

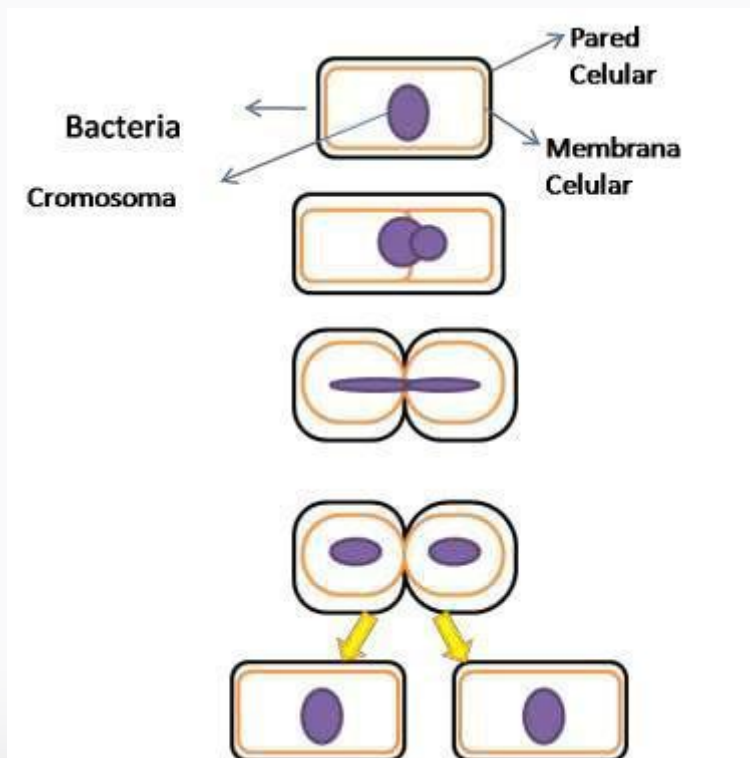
UNIDAD 3: PROLIFERACIÓN MICROBIANA

5. Proliferación microbiana

Según CEUPE (2020), que detalla el proceso de crecimiento microbiano y clasifica la curva de crecimiento en cuatro fases distintas (consulte la figura 16), es importante señalar que la división celular es la fuerza impulsora detrás del crecimiento, lo que representa un aspecto crucial de la vida de una célula microbiana. El término crecimiento microbiano se refiere al aumento del número de células dentro de una población, además este proceso implica llevar a cabo una fisión binaria que depende de al menos una célula viable presente, de lo contrario el crecimiento es nulo. Un ejemplo simple es la división de una célula madre bacteriana en dos células hijas mediante fisión, quienes continúan con su ciclo de crecimiento.

Figura 15.

Fisión binaria



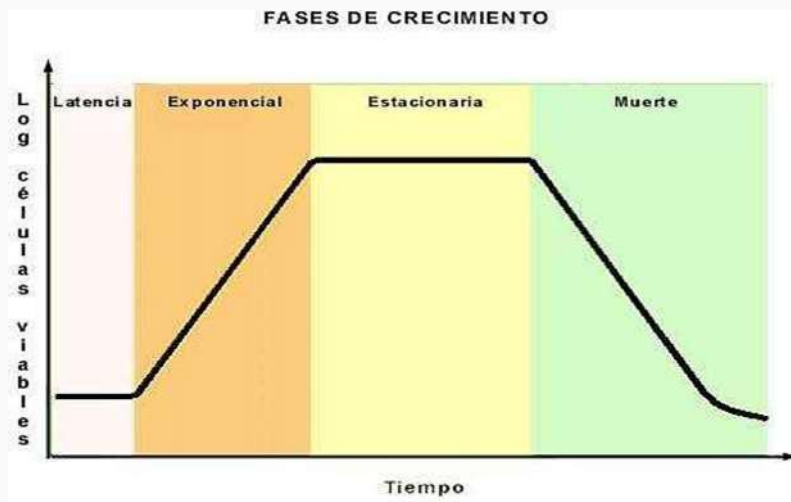
Fuente: García, 2013.

En un entorno con las condiciones óptimas que permitan satisfacer las necesidades microbianas, los microorganismos presentan tiempos de duplicación cortos; durante cada periodo de duplicación, una célula pasa por un proceso que implica su división con el fin de formar dos células, repitiendo el proceso de manera exponencial, con un número de cuatro células luego de duplicación, ocho después de tres períodos y su incremento se va elevando. De esta manera, la tasa de crecimiento y la totalidad de células se duplica en cada periodo de duplicación sucesivo.

La curva que determina el crecimiento de un cultivo de microorganismos se establece en etapas distintas, como es planteado en la gráfica 1.

Gráfica 1

Etapas de la curva de crecimiento microbiano.



Fuente: García, 2014.

Fase latencia: En esta etapa inicial, los microorganismos se ajustan a las condiciones ambientales en las que se encuentran. Aquí, el número de microorganismos pueden mantenerse constantes o decrecer, antes de que empiece su multiplicación activa una vez adaptados.

Fase exponencial: Los microorganismos en esta etapa presentan una rápida multiplicación, aumentando exponencialmente en número debido a los cortos períodos de duplicación.

Fase estacionaria: En esta etapa, los microorganismos alcanzan un equilibrio entre la reproducción y la muerte de estos, esto ocurre cuando los nutrientes primordiales son agotados o se acumulan los metabolitos que participan en la inhibición del crecimiento microbiano; permitiendo que estos puedan mantener una relativa constancia en esta fase.

Fase de muerte: En esta etapa, el número de células que mueren es mayor a las células nuevas que se forman, ya que las condiciones no permiten un crecimiento continuo.

5.1. Factores determinantes en la proliferación microbiana

De acuerdo con Cervantes et al., (2017) diversos factores influyen en la proliferación de los microorganismos, entre estos factores se destacan los elementos y sustratos que se requieren para el desarrollo microbiano, así como el impacto y la importancia de variables como el agua, luz, temperatura, oxígeno, pH, oxígeno, como se visualiza en la siguiente figura:

Figura 16

Factores del ambiente y crecimiento de los microorganismos



Fuente: Anmat, s.f.

5.1.1. Elementos requeridos por el microorganismo para su desarrollo

Los microorganismos requieren de vitaminas para la obtención de energía y de una variedad de elementos para llevar a cabo su desarrollo, que varían según su especie; en general, requieren elementos esenciales como azufre, fósforo, nitrógeno, carbono, hidrógeno y oxígeno, otros elementos posiblemente esenciales como cloro, potasio, sodio, hierro magnesio y calcio; Además ciertos elementos son importantes para la proliferación de algunos microorganismos, entre ello se destaca el zinc, cobre, yodo, sílice y molibdeno.

5.1.2. Sustratos para el crecimiento

En su entorno de crecimiento, los microorganismos satisfacen sus necesidades alimenticias por medio de sustratos que tienen disponibles. Mientras que los compuestos

alimenticios se disuelven rápido, los complejos requieren de la activa participación de enzimas extras que dependen de la temperatura, la influencia de metales pesados o sales neutras, así como el tiempo de exposición y pH, juegan un papel complejo y crítico en la actividad enzimática. Estas enzimas facilitan la catalización de la hidrólisis de los compuestos, convirtiéndolos en sustancias solubles y simplificadas que son aptas para la absorción, las cuales son productos elaborados por hongos y bacterias

5.1.3. Influencia del agua sobre el crecimiento

El desarrollo bacteriano depende de la presencia del agua, ya que estas pueden crecer en condiciones húmedas más elevadas en comparación con los hongos. El agua es quien facilita el transporte de los nutrientes disueltos hacia sus células, además, permite que los desechos sean eliminados y mantienen la humedad que necesita en su entorno.

5.1.4. Influencia de la temperatura

La presencia simultánea de bacterias y hongos, tienen la capacidad de adaptarse y prosperar en un grado térmico que va desde 0 hasta 65°C, manteniendo esta capacidad durante largos períodos. Es por ello, que la temperatura es el factor determinante para el crecimiento y viabilidad microbiana.

5.1.5. Influencia o del oxígeno y la luz

Algunos hongos necesitan oxígeno para su desarrollo y luz para llevar a cabo su reproducción con normalidad; la luz UV puede tener efectos varios sobre estos, los cuales incluye el estímulo, inhibición o muerte, estas van regidas por factores como el tiempo de exposición, las longitudes de ondas y la especie involucrada. Algunas setas poseen pigmentos oscuros en su micelio, que aparentemente los protegen de esta luz. Por otra parte, las bacterias pueden presentar menor resistencia a la luz UV debido a que los hongos poseen esporas que les permiten ser más resistentes. En el caso de las bacterias anaeróbicas poseen la facultad para crecer en ausencia de oxígeno, mientras que las facultativas anaerobias pueden sobrevivir en presencia y en ausencia de éste, por otra parte, las

aeróbicas dependen del oxígeno y las autotróficas utilizan el dióxido de carbono requerido para su desarrollo.

5.1.6. Influencia del pH

El pH juega un papel fundamental en el desarrollo microbiano. Tanto los hongos como las bacterias cuentan con la facultad para desarrollarse en pH bajos (1.0 y 3.0) y ambos microorganismos son capaces de modificar el pH mediante productos que secretan durante su desarrollo, para medios no amortiguados. Sin embargo, algunas especies bacterianas requieren de un pH de 8.5 o superior, pero su pH óptimo para la mayoría va desde 6.0. Los hongos, prefieren entornos ácidos y prosperan en un pH hasta de 8.5

5.2. Etapas y regulación de la división celular

Gonzales (2013) sostiene que la división celular es el proceso mediante el cual la célula considerada

como madre da lugar a 2 células hijas que son idénticas tanto entre sí, como a la célula madre de la cual provienen. Este mecanismo es fundamental para la multiplicación de los organismos unicelulares, así como para la proliferación y reconstrucción de órganos y tejidos en organismos pluricelulares. Este proceso está dividido por dos fases en secuencia:

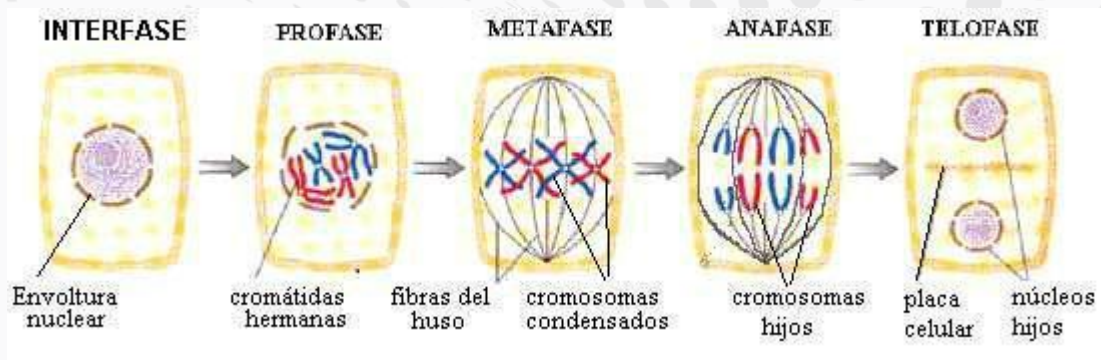
5.2.1. Proceso Mitótico o cariocinético (división nuclear)

Gonzales (2013) señala que el proceso mitótico es continuo, que se ha subdividido tradicionalmente en un número de etapas como se muestra en la figura 17:

1. Profase
2. Metafase
3. Anafase
4. Telofase

Figura 17

Mitosis



Fuente: Gonzales, 2013).

Profase (pro: primero, antes). Cada cromosoma consta de dos cromátidas unidas solamente en el centrómero; estas estructuras comienzan a visualizarse como filamentos extensos dobles, engrosados y acortados. Durante esta fase, cada uno de los cromosomas adoptan una forma compacta adecuada para su transporte y dejan a un lado su configuración laxa de trabajo. Por otra parte, los nucleolos desaparecen se distribuyen en forma de ribosoma en el citoplasma; esto sucede debido a que la envoltura nuclear se fragmenta en cisternas que se confunden con el retículo endoplasmático.

Metafase (meta: después, entre). En esta etapa, los cromosomas se condensan y se acortan lo máximo posible. Debido a la composición microtubular de haces, se forma el huso acromático o también llamado mitótico; a través de cinetocoro (estructura proteica laminar, presente en ambos lados del centrómero), alguno de estos microtúbulos se conecta al cromosoma y otros se solapan en la zona ecuatorial celular, estos son más largos e identificados como polares. Este proceso continua hasta que el número total de centrómeros se alineen en un plano ecuatorial y se dupliquen ellos mismos, lo que conduce a su posterior división.

Anafase (ana: arriba, ascendente). Los cromosomas hijos, originados por la separación de los centrómeros hijos se dirigen hacia los polos celulares, un proceso facilitado por el

huso mitótico quien es el encargado de organizar y asegurar la distribución adecuada de los cromosomas hijos en los núcleos que son descendientes, facilitado por la acción de los microtúbulos cromosómicos los cuales están unidos al cinetocoro luego de haber sido cortado en los extremos. Por otra parte, los microtúbulos polares se alejan de los dos grupos de cromosomas hijos facilitando su separación, mediante el desplazamiento en direcciones distintas.

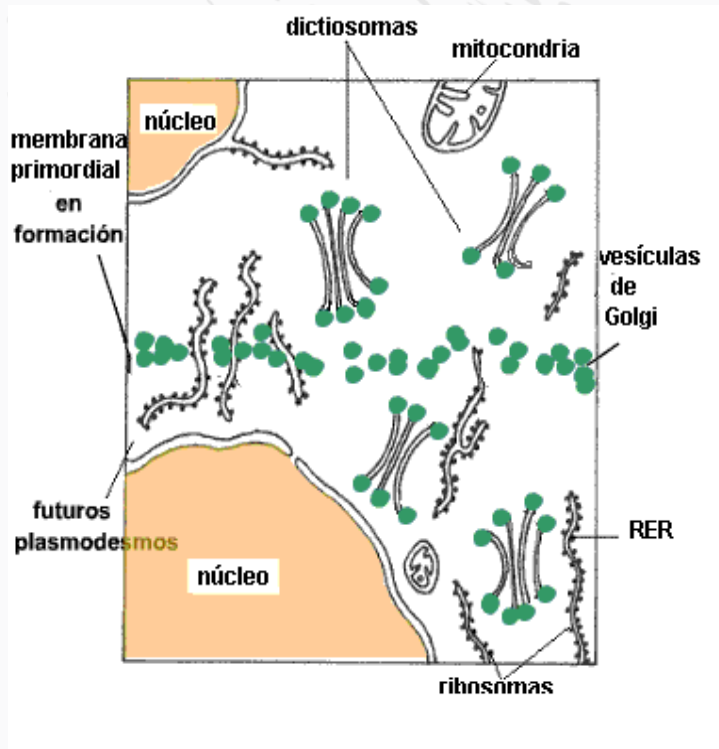
Telofase (telos: fin). El proceso se inicia cuando los cromosomas hijos alcanzan los polos de la célula. Una vez allí, los cromosomas hijos se estiran y pierden su estado condensado, mientras que la envoltura nuclear se vuelve a ensamblar a partir del retículo endoplásmico rugoso y el nucléolo emerge de la región encargada de la organización del nucléolo de los cromosomas SAT.

5.2.2. Citocinesis (reparto del contenido del citoplasma y orgánulos celulares)

Según Gonzales (2013), la citocinesis, definida como la división del citoplasma, tiene lugar tras la división del núcleo en dos núcleos hijos durante el proceso mitótico. En las plantas superiores, una estructura conocida como fragmoplasto emerge en el ecuador de la célula en el punto de la telofase tardía. Esta estructura está cargada por 2 conjuntos de microtúbulos con polaridad opuesta que se superponen en sus extremos al interior del plano de la división y se generan al ritmo que el huso acromático se va desvaneciendo. Entre los microtúbulos se desarrollan un número extenso de dictiosomas que se pegan para crear una cisterna grande que contiene los polisacáridos esenciales para formar la laminilla media y la fase amorfa de la pared primaria (figura 18).

Figura 18

Citogénesis.



Fuente: Gonzales, 2013.

5.3. Etapas de división bacteriana a nivel celular

Los procariontes, destacando las bacterias, se propagan mediante su división celular, denominada fisión binaria. Los organismos unicelulares sólo pueden producir nuevos individuos mediante división celular. En ambas células, procariotas y eucariotas, el producto de la reproducción celular es un par de células hijas que a nivel genético son iguales a la célula madre, estas células hijas son individuos. El proceso de división celular en procariotas se llama fisión binaria y es mucho más sencillo y rápido que la división celular en eucariotas. Debido a que las células bacterianas se dividen tan rápidamente, sus poblaciones crecen de la misma manera. El ADN de los cromosomas circulares bacterianos no está contenido en el núcleo celular, al igual que el ADN nuclear de los eucariotas está asociado con proteínas que ayudan a comprimir la molécula de ADN a un

tamaño mínimo. Las proteínas "Zip" presentes en los procariotas están relacionadas con las de los eucariotas (Cnx Bio, 2018).

5.4. Función de las proteínas FTS Y MRB en la división celular

Como afirma Lago (2018), los genes conocidos como genes *ft* juegan un papel importante en la división celular. Cada uno de estos genes desencadena la síntesis de una proteína, lo que lleva a la creación de proteínas *fts*, las cuales son las encargadas de participar en el proceso de septación, donde se unen para formar un complejo multiproteico. La interacción entre las proteínas *Fts* da como resultado el ensamblaje del aparato de división denominado divisoma, como se ilustra en la Figura 18.

La tubulina forma una estructura dinámica a través de su interacción con GTP, sirviendo como citoesqueleto. *FtsZ* cumple una función similar a la tubulina, en el citoplasma existe una forma soluble de GDP-*FtsZ*, que puede unirse a la membrana y crear un anillo en el sitio de tabique en el centro al interactuar con GTP y transformarse en la forma GTP-*FtsZ*. Una vez que se establece este anillo, otras proteínas son atraídas hacia él, lo que lleva a la formación de un complejo multiproteico que inicia la contracción. En esta etapa, se activa la función GTPasa inherente a las proteínas *FtsZ*, lo que provoca el inicio de la despolimerización.

El anillo está formado por *FtsZ*, que atrae otras proteínas para crear el complejo y facilitar la contracción. En el citoplasma, *FtsA* existe en forma soluble y posee actividad ATPasa. Esta función permite que el anillo *FtsZ* y otra proteína, *FtsQ* interactúen entre sí.

Numerosas proteínas *Fts* se encuentran en el periplasma, y *FtsA* se encuentra en el citoplasma. *FtsQ*, que también es periplásmico, desempeña un papel en el inicio de la sinterización de peptidoglicano. Por el contrario, *FtsI* participa en la continuación de la síntesis de peptidoglicano más que en su inicio, y también está situado en el periplasma. Específicamente clasificada como PBP3, *FtsI* es una proteína fijadora de penicilina que se activa cuando se integra en la estructura del peptidoglicano, facilitando la síntesis del peptidoglicano septal.

FtsM trabaja en la elaboración de los fragmentos de peptidoglicano FtsW, provee primers para los demás componentes proteicos de la elaboración de peptidoglicano. FtsK es quien hace el papel de instructora o maestra para destruir o disociar las descendencias que tienen las células madre. ZipA hace parte de la etapa de septación, además de que establece la relación entre el aro anillar y la capa de grasa, su función primordial es la preservación del vínculo entre FtsA y FtsQ. Las proteínas Fts y la manera fundamental de separar las cosas es de suma importancia para conocerla debido a que las mismas no se hallan en los eucariotes, por esta razón son una zona sobre la cual es posible actuar selectivamente. Es posible concebir métodos para remover microorganismos.

Conforme a lo que se publicó Lago (2018), también se afirma que la proteína MreB tira hacia un lado el orbe O3, de esta forma, haciendo una separación con los orígenes. Al momento en que el DNA se repite y se marcha de la replisoma, esta fuerza de desplazamiento forza a los cromosomas descendientes a diferentes polos, esto es, la responsable es la misma acción de repetición.

La etapa que culmina la compactación que restaura el orden de los genes se lleva a cabo por un conjunto de proteínas parecidas a las topoisomerasas y a las proteínas SMC (que corresponden a las que se observan en la figura 19).

En la etapa de la replicación, si se utiliza un compuesto que antes de que comience la misma, se puede observar que los dos orígenes no se distinguen lo que lleva a la conclusión de que MreB está involucrada en este momento. En el momento en que los orígenes están diferenciados no tiene efectos la estratificación. Hay dos formas de iniciar la segregación: Al momento en que el DNA se reproduce y se marcha de la replisoma, esta fuerza de desplazamiento forza a los cromosomas descendientes a sitios diferentes, esto es, la responsable es la misma fuerza de reproducción. Hay dos formas de iniciar la segregación: la primera, dependiente de MreB (inicio), y la segunda, independiente de MreB.

Las funciones de MreB son:

- Ayuda a preservar la morfología de bacterias (la figura de coco no la tiene, las transformaciones se deben a la proteína en cuestión, de modo que la forma esférica es la forma común).

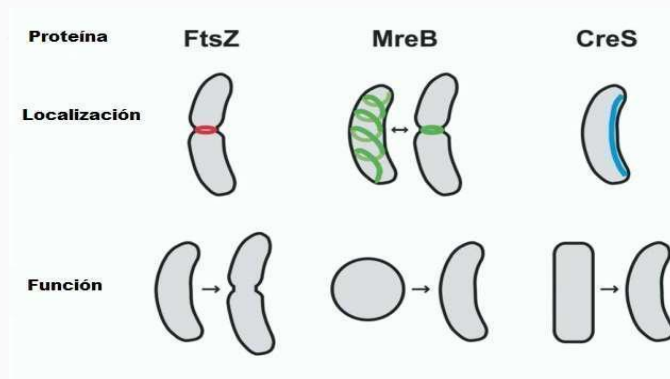
- Involucra en la agrupación, en el momento en que los especialistas en historia comenzaron a separar las causas.
- Involucrada en la posición de polaridad de proteínas. Ej: El desplazamiento al hemisferio norte es posible que se realice a manos de los filamentos de MreB, Caulobacter (quinas)

Para el fin, dentro de las células de E.C., el esqueleto de citoesqueleto es el director de los procedimientos de celularidad, forma, diferenciación, etc. Esta intrincada red de proteínas está formada por microfilamentos de actina, microtubulos y filamentos de tamaño medio, estos tienen un rol significativo dentro de la estructura de la piel de los seres humanos, consisten en componentes del citoesqueleto que son homólogos a las células eucariotas.

Las proteínas FtsZ y BtubA/B son homólogos de la tubulina, mientras que las proteínas MreB, ParM y MamK son homólogas de la actina. Por su parte, la proteína CreS (crecentina) está asociada con los filamentos de intermedio. La estructura organizacional y ensambla proteico es producto de una amplia diversidad morfológica a nivel microbiano, que conserva su estructura gracias a una pared celular rígida que funciona como un exoesqueleto.

Figura 19

Proteínas Fts y MreB.



Fuente: Roca, 2020.

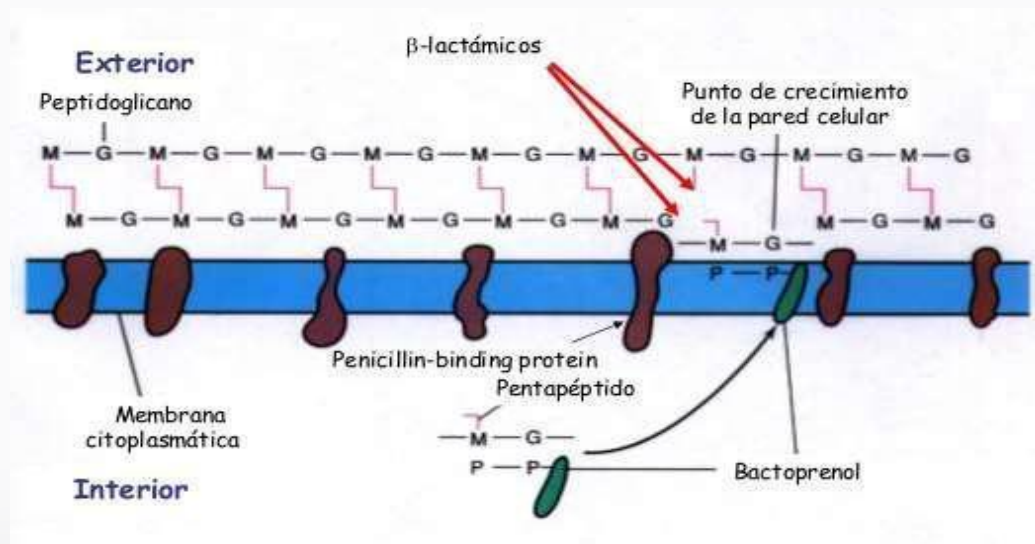
5.5. Procesos biosintéticos del peptidoglicano.

Las unidades constantes del peptidoglicano se producen dentro deloplasma, en tanto que se encuentran unificadas al nucleótido UDP; luego son trasferidas a una sustancia lipídica transportadora que la hace moverse a través de la membrana. Después de ello, se polimerizan y dan un peptidoglicano en la superficie externa de la membrana, a manos de en enzimas que se encuentran a nivel externo superficial como se ilustra en la figura 20.

El peptidoglicano se diferencia de los otros biopolímeros analizados hasta el momento debido a que es un tejido bidimensional en vez de una cadena de componentes, que entierra a la célula como si fuera una bolsa. Por esta razón, su sinterización requiere que las unidades que se repiten sean unidas de manera química en dos dimensiones. La constitución de los sacos de peptidoglicano de todas las bacterias es similar, salvo en la manera en que están compuestos los aminoácidos dentro de las cadenas tetrapeptídica y en la regularidad y cantidad de los vínculos dentro de las diferentes cadenas tetrapeptídica (Stanier *et al.*, 1992).

Figura 20

Biosíntesis de peptidoglicano



Fuente: Rojas, 2015.

5.6. Métodos cuantitativos para determinar el crecimiento microbiano

Crecimiento exponencial: este estilo de crecimiento se produce cuando el número de individuos de la población de bacterias aumenta en duplicado en una franja de tiempo específica. Conocida de igual manera como la tasa de crecimiento uniforme y la tasa de crecimiento logarítmica. Para que esto ocurra, la bacteria debe desarrollarse en un ambiente propicio, sin restricciones de nutrientes y sin desechos tóxicos.

- El lapso de generación es igual.
- El incremento en el número de células es una secuencia de base dos que se incrementa de forma geométrica.

La figura de la representación de esta transformación en potencia matemática es una pendiente que crece constantemente. Si se visualiza en términos de escala de gradiente, se logra una línea recta. A través de la figura semilogarítmica es posible obtener la magnitud de una secuencia de cifras que tienen relación con el crecimiento, como por ejemplo el tiempo de generación (g).

$$g = t / n$$

n = es el número de veces que los miembros de una generación se producen en un período de tiempo t.

5.7. Métodos para medir el incremento de las poblaciones microbianas en el número de células

Láñez (1998) comenta que la proliferación de un cultivo bacteriano es posible medir el incremento en número de células o el aumento de su masa, como se visualiza en la figura 21. Estas dos formas de expresión muestran cómo los componentes crecen de manera uniforme en el mismo intervalo de tiempo, es decir, balanceado.

Figura 21.
Población de microorganismos



Fuente: Benito, 2015.

5.7.1. Cuantificación celular de la masa bacteriana

5.7.1.1. Enfoques directos

En estas técnicas es necesario utilizar preparaciones con procedencia conocida, sin partículas extrañas y completamente limpias.

Medición de peso húmedo: Este proceso se registra por el peso del sedimento obtenido, mediante centrifugación, en el cual se taran sus tubos. Posteriormente el cultivo bacteriano pasa por al proceso de centrífuga y su sobrenadante es eliminado para finalmente ser pesado.

Inconvenientes: Se pueden cometer variedad de errores, que van desde la manipulación de los equipos y de las cepas, hasta la retención líquida intracelular cuya cantidad varía según las características de las cepas bacterianas, entre otros.

Medición del peso seco: En este método, similar al anterior descrito, representa entre el 10% y el 15% del peso húmedo. En esta fase se necesita llegar a un peso constante, en donde el sedimento se seca a 105°C toda la noche, antes de ser pesado

Inconvenientes: Este método puede inducir a varios errores y demandar mucho tiempo. Utilizando una balanza de laboratorio es complicado llegar a menos de 1 mg exactos, en peso seco esto equivale en número de bacterias aproximadamente a 5×10^9 bacterias.

Medición del nitrógeno total: se lleva a cabo a través de una titulación y digestión ácida utilizando la técnica de micro-Kjeldahl.

Identificación de componentes principales: DNA, peptidoglicano, RNA, proteínas, entre otros.

5.7.1.2. Enfoques indirectos

Permite medir los nutrientes consumidos o de producción por unidades de tiempo de los metabolitos. Ejemplos: consumo de oxígeno y carbónico (QO_2 y QCO_2), que se determinan mediante respirómetro de Warburg.

Métodos turbidimétricos (ópticos): Se basa en medir la cantidad de luz que se dispersa o se transmite en un cultivo microbiano

Cuantificación de luz transmitida:

McFarland standards: Consta de una serie de patrones contenidos en tubos de vidrio completamente sellados con una mezcla del 1% de Cl_2Ba (cloruro de bario) en su interior y cantidades variables de SO_4H_2 (Ácido sulfúrico) al 1%, en cada uno de estos tubos se forma un precipitado de SO_4Ba el cual es el responsable de la turbidez observada. Para cada cepa estudiada se determina la relación entre la turbidez observada en cada tubo y la concentración o masa en bacterias (células/ml) que genera una turbidez equivalente.

Inconveniente: Este método se ha dejado a un lado por la espectrofotometría, ya que Macfarland es exacto pero muy poco preciso

Espectrofotómetro: Cuantifica la cantidad de luz absorbida por las muestras, es decir, su densidad óptica

Nefelómetro: Se encarga de medir la luz dispersada directamente por la muestra debido a un sensor posicionado de manera perpendicular en dirección a la luz incidente, lo que lo hace más sensible que el espectrofotómetro.

5.7.2. Cuantificación numérica de individuos

5.7.2.1. Técnicas directas

Cámara de recuento de Petroff-Hauser: Se compone de una lámina especial con una superficie graduada con medidas específicas; cuenta con una profundidad excavada de 0.02mm y 1mm² total de su área. Esta lámina está dividida por cuadrículas, en primer lugar, el área se divide en 25 cuadros grandes y cada uno de ellos se divide en 16 cuadros más pequeños, en total esto crea 400 pequeñas áreas en donde se puede esparcir la muestra. Para usar el cámara primero se coloca una muestra entre lámina y laminilla, luego se deja reposar por unos minutos en la plataforma del microscopio para que las células se asienten y sean visibles. Después se cuenta el número de células en varios de los cuatro pequeños. Este recuenta presenta una estimación del número de células, en donde su concentración se establece mediante la siguiente fórmula:

$$N \times 25 \times 50 \times 1000 = \text{concentración en células/ml.}$$

Cuantificación en preparaciones que se teñen: Se utiliza una lámina con una pequeña cavidad circular de área A_t y volumen (v) identificado, la muestra se coloca en esta cavidad con una micropipeta o con un asa para siembras y luego con ayuda de un colorante

se tiñe. Después se examina con un microscopio equipo con un campo visual definido Ac, si se encuentran n bacterias en ese campo visual, por mililitros la concentración bacteriana se establece de la siguiente forma:

$$n \cdot A_t / A_c \cdot 1/v$$

cuantificación en proporción de Wright: Es un método que se usa en su mayoría en las áreas virológicas. Para llevar a cabo su procedimiento, se mezcla una suspensión de bacterias con una cantidad precisa de glóbulos rojos con una concentración conocida o bolitas de látex. La determinación de la concentración bacteriana se determina según la proporción bacteriana y corpúsculos visibles en el mismo objetivo y campo del microscopio.

Contadores electrónicos de partículas (tipo Coulter): En este método la suspensión bacteriana fluye por un tubo delgado conocido como capilar entre dos electrodos. La corriente eléctrica se interrumpe momentáneamente cada vez que una partícula como lo son las bacterias atraviesa un pequeño orificio de aproximadamente 30mm. Estas interrupciones son registradas para determinar el tamaño y número de partículas mediante un dispositivo eléctrico

Últimamente se ha estado utilizando la citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS), aquí las partículas las partículas de interés son marcadas con un anticuerpo monoclonal u otro ligando particular dirigidos a moléculas de superficie, los cuales están enlazados a sustancias que generan fluorescencia cuando es expuesta a un haz de luz, llamados fluorocromo.

5.7.2.2. Técnicas indirectas:

Estos enfoques sólo cuantifican las bacterias viables, lo que necesariamente no coincide con el número bacteriano total.

Método del número más probable: Las partículas se en varias muestras iguales de forma aleatorias en función de la cantidad medida de partículas en la suspensión; todo esto se basa en la distribución de Poisson

$$PX = mX \cdot e^{-m/x!}$$

En donde se tienen en cuenta:

- x: Cantidad total de partículas reales en cada muestra.
- m: concentración de partículas (número de partículas por unidad de volumen)

Se toman porciones pequeñas de la suspensión original y se coloca en un medio de cultivo adecuado para este tipo de crecimiento bacteriano, bajo un periodo de incubación según lo estimado, para posteriormente observar su crecimiento. Se registra la porción de la muestra que no presenta crecimiento la cual es identificada como P0 (x = 0). De acuerdo a ello, Poisson establece que: $P_0 = e^{-m}$ lo que lleva a calcular el valor de m mediante, $m = -\ln P_0$.

Cuantificación celular viables en placa: Es fundamental para contar las bacterias viables en un medio de cultivo sólido, el cual consiste en dividir la placa en cuadrantes y contar las colonias aisladas

Determinación de la proporción células viables/células totales: Este método implica monitorear regularmente el crecimiento de células de manera individual y establece la proporción de las células que se pueden visualizar en el microscopio, pero se les impide crecer, es decir que presentan inviabilidad. Esta técnica se lleva a cabo mediante micro cultivos en láminas portaobjetos

Recuento sobre filtros de nitrocelulosa: Para determinar la concentración bacteriana en suspensiones diluidas, se utiliza una técnica en la cual la suspensión atraviesa una membrana de nitrocelulosa en donde las bacterias son retenidas. Posteriormente, sobre un medio de cultivo sólido se coloca un filtro donde las bacterias desarrollan colonias,

contadas estas colonias y conociendo el volumen de la suspensión procesada se puede calcular la concentración inicial bacteriana en la muestra.

5.8. Ecuaciones matemáticas y modelos aplicados en el crecimiento microbiano

Arana et al. (s.f.) en su escrito plantea los criterios determinantes en la proliferación de microorganismos. Primeramente, la etapa de crecimiento de manera exponencial es la que se encarga de la proliferación propiamente dicha y, simplifican el proceso de ecuaciones matemáticas

$$dN/dt = \mu N$$

$$N = N_0 e^{\mu(t-t_0)}$$

Se define a través de la siguiente ecuación:

$$\ln N - \ln N_0 = \mu (t-t_0)$$

$$\log N - \log N_0 = \mu / 2,303 (t-t_0)$$

La constante μ representa la velocidad específica de crecimiento en horas en sentido opuesto o inversas (h^{-1}), siendo un indicador importante en el ritmo de crecimiento por unidad de biomasa. Otros parámetros incluyen los intervalos necesarios para que la población se duplique, es decir su tiempo de generación.

$$g = 0,693/\mu$$

$$g = 0,693/\mu$$

La velocidad de crecimiento (K) cuyas unidades son generación por hora, es el tiempo de generación inversa

$$K = 1/g$$

Se establece el valor de μ_{\max} (velocidad máxima) de proliferación de una bacteria en un sustrato específico mediante la construcción de curvas de crecimiento con sustratos con diferentes concentraciones y cada una de ellas proporciona valores μ , que permiten determinar la máxima velocidad proliferante

$$\mu = \mu_{\max} S / (K_s + S)$$

La invariante de saturación del sustrato es representada como K_s , definida como la concentración a la cual corresponde a la mitad de μ_{\max} .

Además, se emplea la transformación de la ecuación de la siguiente manera:

$$1/\mu = 1/\mu_{\max} + (K_s/\mu_{\max}) (1/S)$$

La cosecha máxima y el rendimiento son parámetros claves que se dan en la fase estacionaria.

La biomasa máxima alcanzada se expresa con la ecuación siguiente:

$$M = M_t - M_0$$

$$M = M_t - M_0$$

Cosecha máxima: M_t representa la cantidad máxima alcanzada de biomasa, medida en el momento en donde el número de células es máximo en la fase estacionaria y esta se compara con la biomasa inicial M_0 expresada en gramos o miligramos

La biomasa en el tiempo t y es secuenciada y calculada en la fase estacionaria en el que el número celular es más alto y M_0 la biomasa del inóculo. El resultado se expresa en g, mm, etc.

Rendimiento: Es la relación de la biomasa que se produce con la que se consume y se determina bajo lo siguiente:

$$Y = \text{Biomasa producida} / \text{Sustrato consumido} = (M_t - M_0) / (S_0 - S_t)$$

S_0 representa la cantidad inicial de sustrato y S_t la cantidad en el momento (t) cuando se obtienen un número máximo de células y se expresa como g de células/g de sustrato consumido.