

Contingut de les classes de Microbiologia. Primer curs.

Metabolisme i creixement microbians

Grau de Ciència i Tecnologia dels aliments i Grau de Veterinària

M. Rosa Bragulat Ararà
Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona.

Contingut

| | |
|--|-----------|
| Metodologia docent de les classes teòriques..... | 3 |
| 1. Metabolisme microbià | 4 |
| 1.1. Característiques generals | 4 |
| 1.2. Mecanismes metabòlics generadors d'ATP..... | 5 |
| 1.2.1. Fermentació | 5 |
| 1.2.2. Respiració..... | 6 |
| 1.2.3. Fotosíntesi..... | 9 |
| 2. Creixement microbià | 11 |
| 2.1. Introducció al creixement microbià | 11 |
| 2.2. Corba de creixement d'una població microbiana | 12 |
| 2.3. Cultiu continu | 15 |
| 2.4. Mesura del creixement | 16 |
| Bibliografia | 18 |
| Exemples de preguntes de tipus test..... | 19 |

Metodologia docent de les classes teòriques

En aquest curs, a les classes teòriques es realitzarà una introducció a la classe inversa, en el que s'inclouran dubtes o preguntes que els estudiants o els professors vulguin realitzar sobre els temes tractats. Els resums dels continguts a tractar en els diferents blocs es depositaran al Campus virtual abans de les diferents classes programades. Aquests resums poden incloure preguntes, recomanacions bibliogràfiques concretes dels llibres que els estudiants tinguin en obert, així com d'altres fonts com publicacions i pàgines web, que es puguin consultar en obert. Els estudiants després de rebre aquesta informació la treballen i l'assimilen individualment. A la classe els estudiants proposen als professors els seus dubtes i preguntes sobre el material rebut. També poden donar respostes a les preguntes prèviament plantejades pel professor. El professor explica el contingut del tema i dona resposta als dubtes i preguntes dels estudiants.

Important: Tots els vostres dubtes, les preguntes, les figures i els experiments, els podem comentar a la sessió d'aula corresponent.

1. Metabolisme microbià.

1.1. Característiques generals.

Com ja sabeu, quan parlem de metabolisme ens referim al conjunt de reaccions químiques que es produeixen en les cèl·lules. S'hi inclouen tant les reaccions de biosíntesi o anabòliques, com les catabòliques. En les primeres hi ha un consum d'energia (endergòniques), que es genera amb el segon tipus de reaccions metabòliques (exergòniques).

El compost d'alta energia i probablement el més important en les cèl·lules és l'**ATP** (trifosfat d'adenosina).

Si mirem l'estructura del ATP (*veure Figura 3.12 llibre 2*), ens podem fixar que hi ha dos tipus d'enllaç (anhídrid i èster) que uneixen els grups fosfat a la molècula d'adenosina. Quan s'hidrolitzen els enllaços anhídrid s'allibera molta energia, i es forma l'AMP (Adenosina amb un grup fosfat unit per enllaç èster, no energètic).

Hi ha dos tipus de mecanismes químics de generació de l'ATP:

- Fosforilació a nivell de substrat
- Fosforilació oxidativa

La fosforilació a nivell de substrat és un tipus de mecanisme en el que l'ATP es forma a partir de productes intermedis d'alta energia (elaborats durant reaccions catabòliques, p.ex. la Glucosa 6-P), aquests alliberen un grup fosfat i el donen a una molècula d'ADP, transformant-se en una molècula d'ATP. En canvi, la fosforilació oxidativa és un mecanisme més complex, en el que l'ATP es forma gràcies al pas d'electrons d'una substància donadora a una receptora a través d'una cadena de compostos que tenen la capacitat d'oxidar-se i reduir-se de forma reversible. A aquest mecanisme també se l'anomena cadena de transport d'electrons.

Totes aquestes reaccions metabòliques tenen lloc en la membrana cel·lular.

Pregunta 1. *Sabeu en quins llocs o estructures de la cèl·lula eucariota es produeixen aquestes reaccions? I en els procariotes?*

A més a més, dins la cèl·lula també es produeixen una sèrie de reaccions de manteniment que són semblants entre eucariotes i procariotes, que proporcionen els metabòlits precursors en la biosíntesi. I també reaccions redox, sobretot en organismes quimiòtrofs (pels què la font d'energia són compostos químics), necessàries perquè tot el metabolisme cel·lular funcioni correctament.

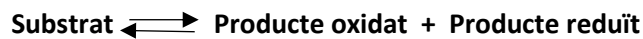
Pregunta 2. *Quin o quins tipus de compostos són necessaris a la cèl·lula perquè es produeixin aquestes reaccions redox?*

1.2. Mecanismes metabòlics generadors d'ATP.

Hi ha 3 tipus: **Fermentació**, **Respiració** i **Fotosíntesi**. Comentarem breument cadascun d'ells per ordre de menor a major complexitat.

1.2.1. Fermentació.

És el metabolisme generador d'ATP més senzill, en el que un compost orgànic és a la vegada donador d'electrons (és a dir, s'oxidarà) i acceptor d'electrons (és a dir, es reduirà). En aquest procés no hi ha un acceptor final d'electrons. Veiem també que es produeix en absència d'oxigen (O_2), és a dir en condicions anaeròbiques o anòxiques. També és destacable que es produeix una oxidació parcial dels àtoms de carboni del substrat, i per aquest motiu la quantitat d'energia alliberada no és massa elevada. Finalment cal dir, que a la reacció global d'aquest metabolisme sempre hi ha un equilibri redox entre el substrat i el/s producte/s que es formen.

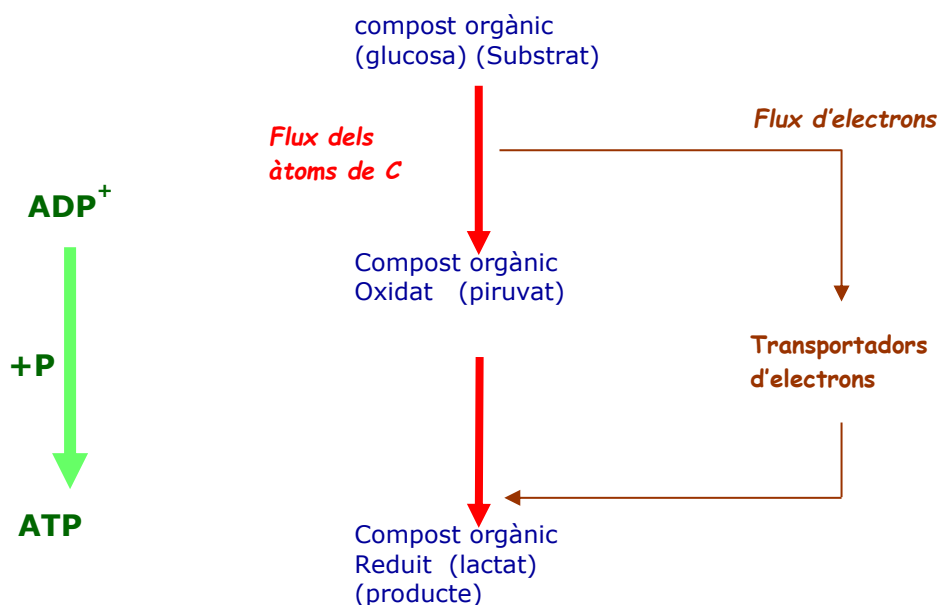


Pregunta 3. *Quin tipus de mecanisme químic de formació d'ATP creus que té lloc en la fermentació?*

Hi ha diversos compostos orgànics que poden ser substrat d'una fermentació, és a dir, fermentables. Els principals són els hidrats de carboni o carbohidrats.

Com que hi ha diferents substrats i diferents productes de la fermentació, i això és específic de cada microorganisme, les fermentacions es solen classificar en funció dels productes obtinguts i la ruta de formació.

Aquest seria l'esquema d'un exemple de fermentació:



Alguns exemples de fermentacions:

- Fermentació alcohòlica (alguns bacteris i també llevats)
- Fermentació àcid-làctica (hi ha dos tipus: homolàctica i heterolàctica) (bacteris de l'àcid-làctic)
- Fermentació propiònica (propionibacteris)
- Fermentació àcid-mixte i butanodiòlica (*Enterobacteriaceae*)
- Fermentació butírica i butanòlica (espècies de *Clostridium*)

Els productes que obtenen els microorganismes amb aquestes reaccions, normalment són de rebuig, però en canvi sí són útils pels humans. (pots consultar la [Tabla 3.4. del llibre 2](#))

Pregunta 4. *Coneixes algunes d'aquestes fermentacions "útils pels humans"?*

1.2.2. Respiració.

Es podria definir com un procés metabòlic generador d'ATP en el que generalment un compost químic orgànic actua com a donador d'electrons i com acceptor final d'aquests electrons hi ha un compost inorgànic. Hi ha alguns microorganismes però, en els que el donador és un compost inorgànic, i també alguns microorganismes poden utilitzar un acceptor orgànic.

Una de les característiques que la diferencien d'una fermentació és que, en un procés de respiració hi ha una transformació del substrat a CO_2 , és a dir, una oxidació total dels àtoms de carboni. Aquesta reacció per tant, genera una elevada quantitat de ATP, si ho comparem amb una fermentació. També cal destacar que en els processos de respiració hi ha tot un conjunt de compostos que tenen la capacitat de oxidar-se i reduir-se de forma reversible.

Pregunta 5. *Quin tipus de mecanisme químic de formació d'ATP creus que té lloc en la respiració?*

Segons quin sigui el darrer acceptor d'electrons, podem distingir dos tipus de respiració: Respiració aeròbica i respiració anaeròbica.

A la respiració aeròbica, el darrer acceptor és l' O_2 , el qual captarà els electrons i es reduirà.

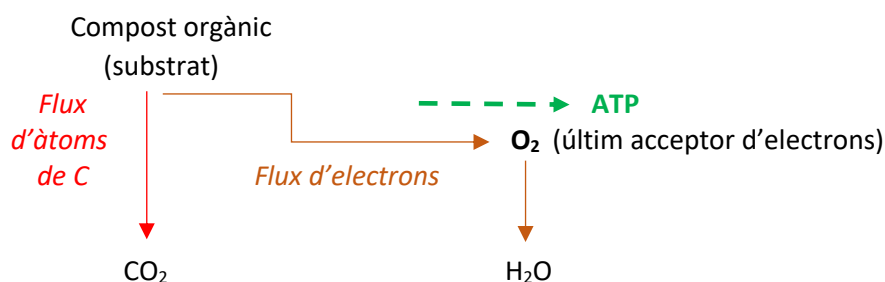
Pregunta 6. *Quins són els productes que es formen en un procés de respiració aeròbica?*

A la respiració anaeròbica, el darrer acceptor d'electrons serà qualsevol altre compost químic, generalment inorgànic, que no sigui l'O₂. Entre aquests podem destacar: nitrats, sulfats, sofre, CO₂, ferro (III), fumarats, etc.

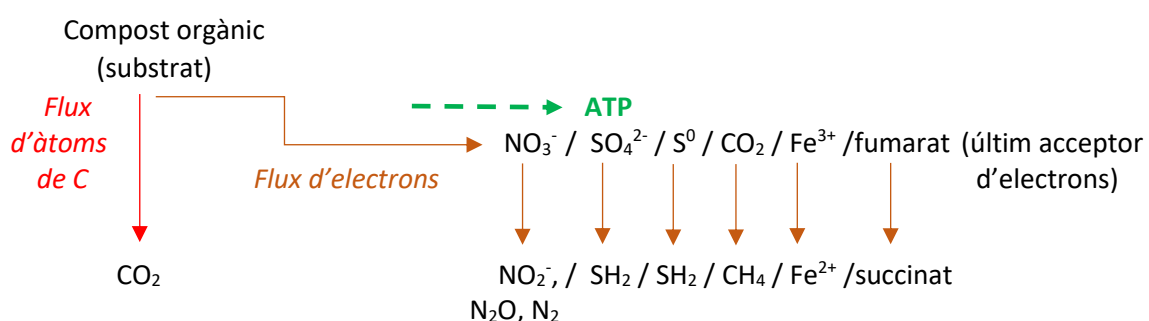
Pregunta 7. Quin és el producte que no es forma en un procés de respiració anaeròbica i sí en la aeròbica?

A la respiració anaeròbica, els nitrats (NO₃⁻) i els sulfats (SO₄²⁻) són dels darrers acceptors d'electrons més comunament utilitzats, però cal no confondre aquesta reacció amb la que es poden utilitzar com a font de N i com a font de S, respectivament. El tipus de reacció i enzims participants són diferents. P.ex. un mateix bacteri podria utilitzar els nitrats com a font de N cel·lular, però en canvi no com a darrers acceptors d'electrons en la respiració anaeròbica.

Esquema de respiració aeròbica:



Esquema de respiració anaeròbica:



Els electrons que són despresos del substrat donador fins al darrer acceptor, passen a través d'una cadena de transportadors d'electrons, formades per compostos que s'oxiden i redueixen de forma reversible, gràcies a uns enzims específics, fins a l'acceptor final que es redueix de forma irreversible. És durant aquest procés que es genera l'ATP.

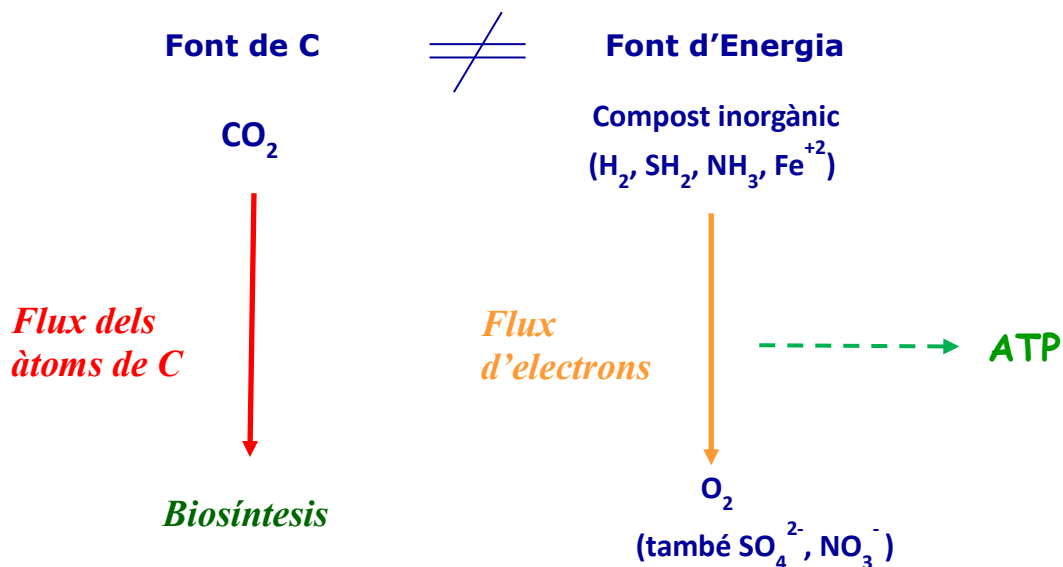
Tal com hem comentat, en els processos metabòlics cel·lulars (p.ex. glucòlisi) també es generen moltes molècules de NADH, les quals tenen un potencial redox (E'₀) força negatiu i que permet que puguin utilitzar-se com a conservadors d'energia. Aquests NADH alliberen protons i electrons que són captats per les molècules transportadores que actuen a nivell de la membrana citoplasmàtica. De forma molt simplificada i

general podem dir que, els transportadors d'electrons d'aquestes cadenes es disposen en ordre creixent positiu de E'_0 , a més a més, es transporten tant electrons com protons i finalment hi ha la reducció del acceptor final d'electrons amb la formació d'energia.

La quantitat d'energia que es produeix en un procés de respiració aeròbica és superior que en el de respiració anaeròbica. Com és lògic amb qualsevol metabolisme de respiració es genera més ATP que amb la fermentació.

Pregunta 8. Per què es produeix més ATP amb una respiració aeròbica que amb una anaeròbica? (et pot ajudar si consultes la Figura 3.9 del llibre 2)

Hem comentat al principi, que hi ha alguns microorganismes que a la respiració utilitzen compostos inorgànics com a donadors d'electrons. Aquests se'ls anomena quimiolitòtrofs i creixen en medis estrictament minerals. De fet, tenen una font de C diferent a la font d'energia. Fins ara hem vist processos en els que la font de C i d'energia pot ser el mateix compost orgànic.



La majoria de quimiolitòtrofs utilitzen l' O_2 com a acceptor final d'electrons (Respiració aeròbica), però hi ha espècies que fan servir els sulfats o els nitrats (Respiració anaeròbica).

(Si vols conèixer més coses sobre aquest grup de microorganismes pots donar una ullada al capítol 13 (ap.II) llibre 2)

Es pot deduir quin metabolisme generador d'ATP tenen els microorganismes tenint en compte la seva relació amb l'oxigen, és a dir si són aerobis estrictes, microaeròfils, anaerobis facultatius, anaerobis estrictes.

Pregunta 9. Com ompliries aquesta taula que tens a continuació?

| Tipus de microorganisme | Metabolisme generador d'ATP | Últim acceptor d'electrons | Producte reduït |
|-------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------|
| Aerobis estrictes | | | |
| Microaeròfils | | | |
| Anaerobis facultatius | | | |
| Anaerobis estrictes | | | |

1.2.3. Fotosíntesi.

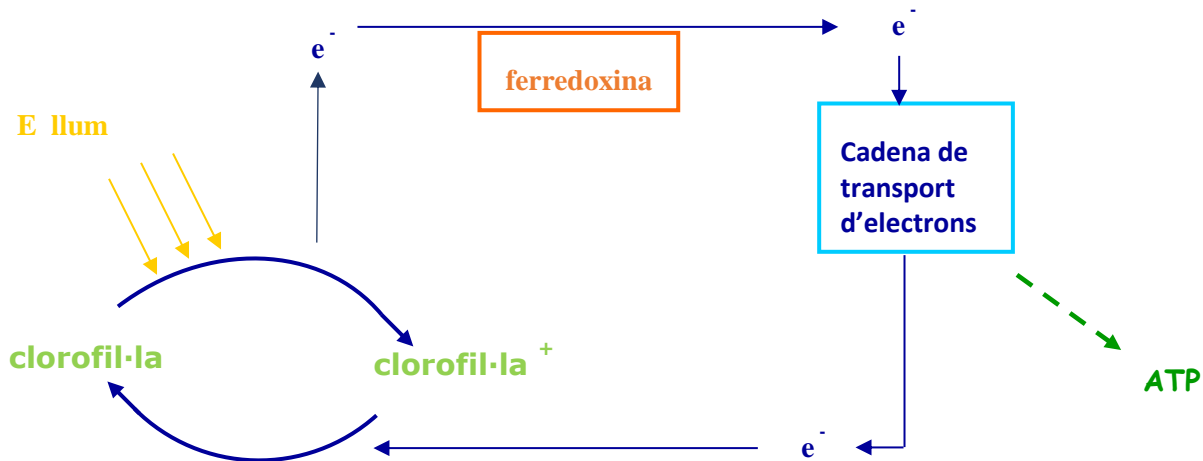
És el metabolisme de generació d'ATP dels organismes que tenen la capacitat de transformar l'energia lumínica en energia química. És el més complex de tots. Són els organismes fotòtrofs els que ho poden realitzar, i hi trobem tant eucariotes, com les plantes, algunes algues i alguns protistes unicel·lulars, com també alguns procariotes. Entre aquests destacarem els cianobacteris, els anomenats bacteris verds i els bacteris vermells. La majoria són fotoautòtrofs, és a dir que com a font de C utilitzen el CO₂. Per què ens en fem una idea de la importància d'aquests microorganismes, es calcula que realitzen més de la meitat de la fotosíntesi a la Terra.

Intentarem explicar el procés de forma molt simple. Per que es produeixi la fotosíntesi és necessari el que es coneix com aparell fotosintètic. Aquest consta de tres components necessaris: 1) una antena de pigments recollidors de la llum, normalment clorofil·la o bacterioclorofil·la; 2) un centre de reacció fotosintètica, on s'activa la clorofil·la i provoca un despreniment d'electrons; 3) una cadena de transport d'electrons, semblant a la respiració, amb la conseqüent formació d'ATP.

Com que hi intervé una cadena de transport d'electrons, el mecanisme químic no deixa de ser una fosforilació oxidativa, que en aquest procés metabòlic se l'anomena fotofosforilació.

En realitat de mecanismes químics de formació d'ATP n'hi ha dos: un cíclic i un no cíclic. La utilització de l'un o l'altre depèn del microorganisme i de les seves necessitats. Els anomenarem fotofosforilació cíclica i fotofosforilació no cíclica.

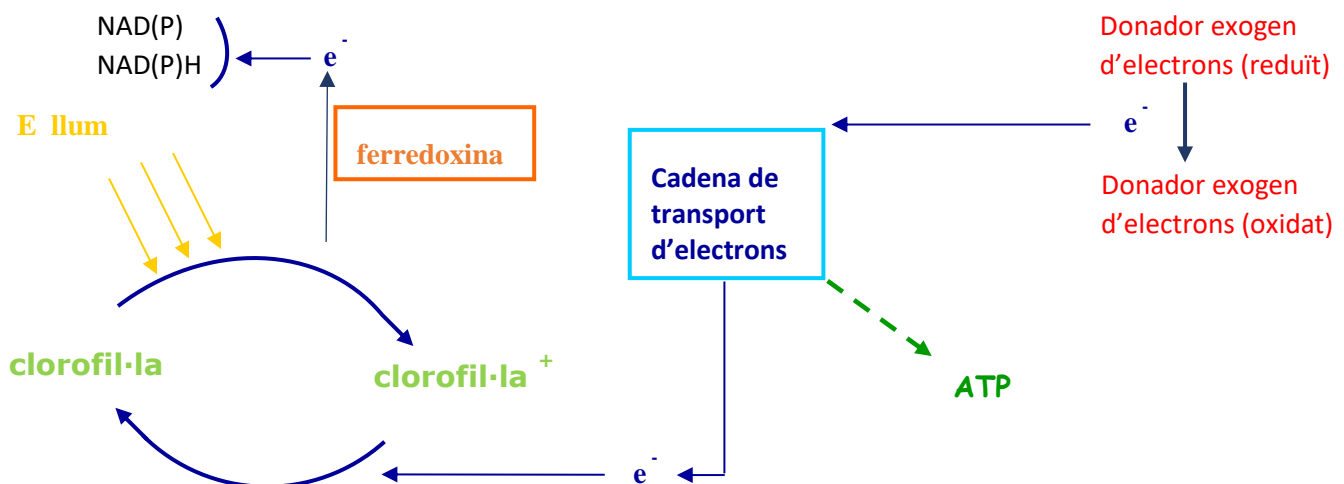
FOTOFOSFORILACIÓ CÍCLICA (esquema):



L'arribada de la llum provoca una activació de les molècules de clorofil·la i es desprenen electrons, aquests són transportats per la ferredoxina fins a la cadena de transport d'electrons amb la formació d'ATP. Els electrons sobrants tornen de nou al centre de reacció desactivant la clorofil·la i deixant-la preparada per la següent activació.

Depenent de les necessitats es pot requerir una concentració de NADPH a la cèl·lula, aleshores el microorganisme engega el procés no cíclic.

FOTOFOSFORILACIÓ NO CÍCLICA (esquema):



En aquest procés veiem que la clorofil·la ha de desactivar-se i per això cal que obtingui els electrons d'un donador exogen. En aquest procés també es formarà ATP, a més de piridin-nucleòtids reduïts.

Segons quin sigui aquest donador exogen d'electrons, veurem que hi ha dos tipus de fotosíntesi: oxigènica i anoxigènica. En la fotosíntesi anoxigènica els donadors exògens d'electrons són generalment el SH₂, el S₀, el H₂.

Pregunta 10. *Quin creieu que és el donador exogen d'electrons en la fotosíntesi oxigènica? Quin producte es forma?*

Pregunta 11. *Amb quin mecanisme creieu que obtenen ATP els bacteris fotosintètics? I les plantes?*

Per concloure aquesta part de metabolisme microbià, us podeu mirar un resum gràfic: [Figura 11.1 del llibre 1.](#)

2. Creixement microbià.

2.1. Introducció al creixement microbià.

Abans hem de definir el que entenem per creixement. És un concepte que varia en funció de si parlem d'una cèl·lula o d'un conjunt de cèl·lules, i també de si parlem d'un organisme unicel·lular o un pluricel·lular.

Es podria definir creixement, com un augment ordenat de tots els components químics d'un organisme. Així quan parlem d'una cèl·lula que està en creixement, s'entén que augmenta la mida i el pes, i normalment això acaba amb una divisió cel·lular. En canvi el creixement d'una població cel·lular implica una divisió cel·lular i com a conseqüència es produeix un augment del nombre de cèl·lules.

Quan parlem de multiplicació cel·lular en un organisme pluricel·lular entenem que aquest augmenta la mida, en canvi per un unicel·lular entenem que hi ha un augment del nombre d'individus.

Per conèixer el creixement dels microorganismes, primer cal entendre com és la divisió cel·lular. Això s'ha estudiat en bacteris, ja que són un model més senzill. En general, els bacteris es reproduïen per una divisió o escissió o fissió binària, normalment transversal. A partir d'una cèl·lula mare es formen 2 cèl·lules filles idèntiques entre sí i a la progenitora. Aquest procés consta de tres etapes: 1) replicació del DNA; 2) divisió del DNA; 3) formació del septum transversal i separació de les cèl·lules. ([mireu un esquema senzill a la Figura 5.1 del llibre 2 o Figura 7.1 del llibre 1](#)).

A la primera etapa es produeix la replicació del DNA, l'inici es troba en un punt anomenat "origen" i el final en una seqüència de terminació que està en el lloc oposat de l'origen. En aquesta fase hi intervenen unes proteïnes específiques de la divisió cel·lular. Comença la replicació del DNA en ambdues direccions, el DNA de

la cèl·lula progenitora es desenrotlla i comença la síntesis dels DNA de les futures cèl·lules filles. Paral·lelament, la cèl·lula es va allargant i augmenta de pes i mida. A la segona etapa ja es divideix el DNA en dues còpies idèntiques i comença la tercera etapa, en la que es forma el septo, que s'inicia a la paret cel·lular i en el centre de la cèl·lula. En aquest moment, la membrana i la paret cel·lular van creixent cap a l'interior. Finalment, la cèl·lula es divideix. (mireu la Figura 7.3 del llibre 1).

A microbiologia, quan es vol estudiar el creixement dels microorganismes, degut a la seva mida tan petita, normalment no es fa un seguiment d'una sola cèl·lula, sinó que s'estudien poblacions de cèl·lules. Per aquest motiu parlarem de creixement d'una població.

Un paràmetre que ens permetrà valorar aquest creixement és el temps de generació (tgen). Aquest es pot definir com el temps que transcorre entre dues divisions cel·lulars. També se'l pot definir com el temps que triga una població en duplicar-se, per això també se'l pot anomenar temps de duplicació.

El tgen és molt variable, ja que depèn no solament de l'espècie, sinó també de les condicions ambientals. Així, com exemple, *Escherichia coli* en condicions òptimes té un tgen de 20minuts. (si voleu veure exemples de tgen, consulteu la Taula 7.3 del llibre 1)

Pregunta 12. *El valor del tgen per una població bacteriana, on creus que serà més gran a la natura o al laboratori? Per què?*

2.2. Corba de creixement d'una població microbiana.

Si representem aquest creixement en una gràfica de coordenades aritmètiques, entre el nombre de cèl·lules de la població en funció del temps, en hores, ens apareix una línia corba amb una pendent que augmenta de forma constant. Veiem que es va duplicant la població a intervals de temps constant. Aquest tipus de creixement és exponencial. (mireu la Figura 5.9 (b) del llibre 2)

Com que és difícil, veure què passa de forma precisa en petits espais de temps davant d'una corba, és millor representar-ho en una escala semilogarítmica, és a dir, el \log_{10} del nombre de cèl·lules en funció del temps. Si us fixeu (Figura 5.9 (b) llibre 2 o Figura 7.12 del llibre 1) ara ens apareix una línia recta, amb la que també observem aquest creixement exponencial.

Anem a fer una mica de càlculs matemàtics amb aquest creixement exponencial.

Si tenim un nombre de cèl·lules inicials (N_0) en un cultiu bacterià, a la primera generació el nombre de cèl·lules (N_1) serà el doble de N_0 :

$$\text{a la primera generació: } N_1 = 2 \times N_0$$

$$\text{a la segona generació: } N_2 = 2 \times N_1 = 2^2 \times N_0 \dots$$

$$\text{a la enèsima generació (n): } N_n = 2 \times N^{n-1} = 2^n \times N_0$$

Per tant, podem conèixer el nombre de cèl·lules de la població en un moment determinat: $N = 2^n \times N_0$

Si aquesta fórmula la transformem en logaritmes, per facilitar-ne el càlcul, quedaria: $\log N = \log N_0 + n \log 2$

Fixeu-vos que podem calcular quantes generacions (n) hi ha en una població, només coneixent quantes cèl·lules hi havia inicialment (N_0) i quantes (N) en tenim en el moment que fem el càlcul:

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2}$$

Un altre paràmetre important en el creixement exponencial de la població microbiana és la velocitat de creixement (k). També la podem calcular, ja que és el nombre de generacions (n) que es produeixen per unitat de temps:

$$k = \frac{n}{t}$$

De fet el valor de k és la pendent de la recta.

Si seguim amb les matemàtiques, podem observar que en realitat el tgen és el temps transcorregut dividit per n :

$$\text{tgen} = \frac{t}{n} \quad \text{i per tant, deduïm que el tgen és inversament proporcional a } k.$$

Aquest tipus de creixement exponencial o logarítmic ascendent no dura massa temps i s'atura. Això sol ser degut a diferents causes, com que s'esgoti algun nutrient essencial pel creixement del microorganisme i/o per l'acumulació de productes del metabolisme microbià, que poden resultar-li tòxics.

Pregunta 13. *Perquè creieu que això que acabem d'explicar és una sort per a nosaltres?*

Així doncs, hi ha diferents fases en el creixement d'una població microbiana. Cadascuna d'elles tindrà una durada determinada, depenent del microorganisme i les condicions ambientals, i pot produir-se o no com anirem veient més endavant. Per aquest motiu parlem d'una corba de creixement.

Le quatre fases que veieu a la gràfica es diferencien pels canvis no només en la velocitat de creixement, sinó també per canvis morfològics i fisiològics en les cèl·lules de la població:

1a- fase de latència: no hi ha augment del nombre de cèl·lules; $k = 0$

2a- fase exponencial o logarítmica: hi ha augment del nombre de cèl·lules; $k > 0$

3a- fase estacionària: no hi ha augment del nombre de cèl·lules; $k = 0$

4a- fase de mort: hi ha disminució del nombre de cèl·lules vives; k té un valor negatiu

La primera s'anomena fase de latència, i realment és una etapa d'adaptació del microorganisme al medi on es troba, que li proporciona un temps necessari per sintetitzar enzims i posar a punt la maquinària per a començar a créixer. En aquesta veiem que el nombre de cèl·lules de la població no augmenta ni disminueix. Aquesta fase pot tenir una durada més o menys llarga i fins i tot no produir-se.

Anem a veure diferents possibilitats. Partirem d'un cultiu d'un microorganisme que es troba en un medi de cultiu (mc1) a una temperatura determinada i el volem sembrar de nou en un medi fresc (mc2) en les següents condicions:

| Cultiu (mc1) | Sembra nova | Hi haurà F. latència? |
|--------------------------------|-------------|--------------------------------|
| Fase de latència o exponencial | mc1 | No |
| Fase estacionària o de mort | mc1 | Sí |
| Fase estacionària o de mort | mc2 | Sí |
| Fase de latència o exponencial | mc2 | Dependrà del canvi efectuat ** |

** En el darrer supòsit, dependrà del canvi efectuat en el mc2 respecte al mc1.

Pregunta 14. *Si en el mc1 com a font de C hi ha arabinosa i en el mc2 hi ha glucosa, hi haurà una nova F. latència? I si en el mc2 hi ha xilosa?*

Realment a la fase exponencial o logarítmica de creixement és en la que més canvis es produeixen, tant a nivell morfològic com fisiològic. En aquesta fase el valor de k és el més elevat, però encara que les condicions de creixement siguin les més òptimes pel microorganisme, no podrà anar a més velocitat ja que al final tot està determinat genèticament.

Quan anteriorment ens hem preguntat, perquè creiem que és una sort que els microorganismes no estiguin creixent exponencialment de forma contínua, aquí hi teniu un exemple d'un bacteri que cada 30 minuts (t_{gen}) es divideix i per tant el nombre de cèl·lules es duplica. A les 10 hores hi ha més d'un milió de cèl·lules en la població!

*Ara ens creieu quan us diem que en una colònia hi ha milions de bacteris,
i que per fer una tinció de Gram només cal tocar una mica la colònia amb la nansa de nicrom?*

Posem un altre d'exemple:

*** Si 1 cèl·lula bacteriana amb $t_{gen} = 20'$ creix a ritme exponencial durant 48h (2880min), formarà una població equivalent a 4000 vegades el pes de la Terra

$$n = t / t_{gen}; \quad n = 2880 \text{ min} / 20 \text{ min} = 144 \text{ divisions cel·lulars}$$

heu de tenir en compte que, a més a més, el pes d'una cèl·lula bacteriana és aprox. de 3×10^{-12} picograms.

*** Si tenim temps, a l'aula podem parlar de com omplir un tauler d'escacs (64 caselles) amb grans de blat de forma exponencial ...

Normalment s'arriba a la fase estacionària quan algun nutrient essencial s'esgota, aleshores veiem que el nombre de cèl·lules de la població es manté constant, igual que a la fase de latència. La durada d'aquesta fase no només depèn de la quantitat del nutrient essencial, sinó també de la fisiologia de cada microorganisme.

Com en tot ésser viu, finalment arriba la fase de mort. En aquesta fase el nombre de cèl·lules vives disminueix cada període de temps, i per tant, segueix sent exponencial o logarítmica però en sentit negatiu. Si la mort de les cèl·lules va acompanyada d'una lisi cel·lular, disminueix tant el nombre de viables com no viables i disminueix el nombre total de cèl·lules de la població. Si les cèl·lules es moren, però no hi ha lisi cel·lular, disminuirà el nombre de viables, però no el nombre de cèl·lules totals de la població, i en aquest cas depenent de la tècnica que fem servir per mesurar el nombre de cèl·lules del cultiu, potser no es detectarà bé aquesta fase.

Per concloure aquest apartat destaquem que en la corba de creixement d'una població, no només hi ha canvis en el nombre de cèl·lules, sinó que també hi ha canvis morfològics i fisiològics.

Ara podem reflexionar sobre aquest aspecte amb les següents 3 preguntes:

Pregunta 15. A quina fase creieu que hi ha més canvis a la mida cel·lular?

Pregunta 16. A quina fase creieu que formaran endòspores els bacteris que tenen aquesta capacitat?

Pregunta 17. A quina fase creieu que els bacteris elaboren el què anomenem metabòlits secundaris com toxines, substàncies antibiòtiques, entre d'altres?

2.3. Cultiu continu.

Fins ara hem vist el creixement de la població microbiana en cultius discontinus. També en l'ambient natural és un cultiu discontinu. Però per a fer estudis de metabolisme i creixement, o per seleccionar poblacions a partir de substrats naturals, o estudiar interaccions microbianes, en ocasions es necessita treballar amb sistemes de cultius continus. Amb aquests es pot mantenir la població microbiana que s'estudia en fase exponencial de creixement durant períodes llargs de temps i de forma controlada. Bàsicament, hi ha dos tipus d'aparells de cultiu continu: quimiòstat i turbidòstat. (Mireu la Figura 7.38 del llibre 1 per entendre l'esquema i funcionament d'un quimiòstat). La diferència bàsica entre ambdós aparells és que en el quimiòstat el medi de cultiu fresc té un nutrient essencial que està quantitat limitant, així que la densitat de la població dependrà

de la concentració d'aquest nutrient, a més hi ha un control independent de la velocitat de creixement i del nombre de cèl·lules de la població. En canvi, en el turbidòstat el medi de cultiu fresc conté tots els nutrients en excés, i la velocitat a la qual entra el medi fresc es controla mesurant la densitat de la població, normalment mesurant l'absorbància.

2.4. Mesura del creixement.

En aquesta darrera part d'aquest bloc veurem algunes de les tècniques que s'utilitzen per mesurar el creixement d'una població microbiana, fonamentalment les que es basen en determinar la massa cel·lular i les que es basen en determinar el nombre de cèl·lules. Veureu que no hi ha cap tècnica ideal, algunes són més precises, altres més sensibles, algunes permeten arribar a valors molt baixos amb un bon límit de detecció i d'altres no.

Entre les que es basen en determinar la massa cel·lular hi ha algunes que són mètodes directes, com per exemple mesurar el pes sec. La determinació del pes sec consisteix en mesurar un volum fix de cultiu líquid microbià, separar les cèl·lules del medi per centrifugació, rentar-les, assecar-les (aprox. 90-110°C / 2h) i pesar-les. No s'utilitza massa per poblacions bacterianes, ja que obtenir 1 mg de pes sec d'una població és molt difícil doncs aquesta hauria de ser enorme (p.ex. 1×10^9 cèl·lules bacterianes \approx 1mg), per això aquesta tècnica es fa servir més per eucariotes pluricel·lulars, com per exemple els fongs micel·liars. Altres tècniques són indirectes, ja que es basen en determinar algun component cel·lular o alguna activitat metabòlica, com per exemple mesurar el contingut d'ATP o el contingut de DNA, entre d'altres. La majoria d'aquestes últimes solen ser sensibles i precises, però en canvi complexes en la realització.

D'aquestes darreres és destacable la tècnica que es basa en la turbidimetria, és a dir, mesurar la quantitat de llum que dispersa una solució de cèl·lules:

$> n^{\circ} \text{ cèl.} \rightarrow > \text{ difracció } (> \text{ terbolesa})$

De fet és el que fem quan mirem a contrallum una suspensió de cèl·lules, quan més densitat té la solució menys llum deixa passar i més tèrbola la veiem. Per mesurar aquesta densitat òptica o terbolesa s'utilitza un espectrofotòmetre o un fotòmetre. A major difracció, el valor de l'absorbància també és més gran. (Podeu consultar el capítol 5.10 del llibre 2).

Entre els mètodes basats en la determinació del nombre de cèl·lules, podem utilitzar el microscopi. Partint d'un volum conegut i utilitzant uns portaobjectes especials, anomenats cambra de recompte (o de Petroff-Hausser o de Bürker) podem comptar les cèl·lules que hi ha en una suspensió. (Consulteu capítol 5.8 del llibre 2 o Figura 7.33 del llibre 1).

Ja us podeu imaginar que aquesta tècnica és força cansada, sobretot quan es tracta de comptar poblacions bacterianes!

L'ús d'un comptador electrònic ajuda una mica més, però també té l'inconvenient que ens pot comptar partícules del medi que no són cèl·lules microbianes.

Les tècniques més usuals al laboratori, són la sembra en placa amb medi sòlid utilitzant el mètode per superfície, que assageu vosaltres a les pràctiques, o pel mètode d'inclusió o en profunditat. De fet es basa en fer dilucions de la mostra i sembrar una alíquota en plaques amb medi de cultiu sòlid escollit. L'avantatge d'aquestes tècniques és que només es fa recompte de cèl·lules viables. Però també té inconvenients com ara que, s'escullen unes condicions determinades, com el medi de cultiu o la temperatura d'incubació, i no tots els microorganismes hi poden créixer. La diferència entre el mètode per superfície i el d'inclusió és fonamentalment la quantitat d'inòcul que es pot afegir a la placa amb medi de cultiu. Mentre que amb la de superfície es recomana afegir 0,1ml de la suspensió, amb la d'inclusió es pot posar un volum més gran, com 1ml, ja que el medi de cultiu el tenim prèviament líquid en un bany per sobre de 50°C, el qual aboquem al damunt de l'inòcul i deixem que es refredi i solidifiqui. Amb aquest darrer mètode la mostra queda inclosa dins el medi.

Una altra tècnica de recompte del nombre de viables és la del nombre més probable (NMP). Amb aquesta també es realitzen dilucions seriades de la mostra, i es sembren alíquotes en tubs amb medi de cultiu líquid. La lectura es realitza segons el medi i condicions, com ara grau de terbolesa, canvi de coloració, formació de gas, entre d'altres. Els tubs positius de cada dilució es compten i el resultat s'extrapola en la taula de McCrady, que ens dona una aproximació de la càrrega microbiana en la mostra.

Una altra tècnica és la de filtració a través de membrana. S'utilitza per mostres líquides, i a partir d'un volum conegut, es fa passar a través d'un filtre especial que reté les cèl·lules microbianes. D'aquesta forma el que es fa és concentrar la mostra. Després aquest filtre es diposita a la superfície d'un medi de cultiu determinat en placa de Petri i s'incuba a la temperatura adequada. Posteriorment es fa el recompte de les unitats formadores de colònia desenvolupades. Aquestes dues darreres tècniques, NMP i filtració a través de membrana, s'utilitzen sobretot per mostres on es pressuposa que la càrrega microbiana és baixa. ([Consulteu capítol 5.8 del llibre 2](#)).

Important: Tots els vostres dubtes, les preguntes, els experiments, etc, els podem comentar a la sessió d'aula corresponent.

Bibliografia

Llibres de consulta:

Per poder consultar aquest llibre des de casa podeu utilitzar el servei ARE. El servei ARE permet accedir des de qualsevol dispositiu amb connexió a internet situat fora de la UAB als recursos electrònics subscrits:

<https://www.uab.cat/web/que-oferim/acces-als-recursos-electronics-des-de-fora-de-la-uab-1345727672556.html>

Llibre 1: Willey JM, Sandman KM, Wood D. 2020. 11a ed. "Prescott's Microbiology". McGraw-Hill Higher Education.

https://www.ingebook-com.are.uab.cat/ib/NPcd/IB_Escritorio_Visualizar?cod_primaria=1000193&libro=11835

Capítols principals: 7, 10, 11

Llibre 2: Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. 2015. 14a edició. "Brock. Biología de los microorganismos". Pearson Education, S.A.

https://www.ingebook-com.are.uab.cat/ib/NPcd/IB_BooksVis?cod_primaria=1000187&codigo_libro=5850

Capítols principals: 3, 5 i 8

Exemples de preguntes tipus test

- En un procés de respiració anaeròbica la quantitat d'ATP produïda és superior que en un de respiració aeròbica.
 - Els bacteris anaerobis facultatius poden obtenir energia per respiració anaeròbica utilitzant els nitrats com a últims acceptors d'electrons.
 - A la fotosíntesi bacteriana oxigènica, el donador exogen d'electrons sempre és l'oxigen.
 - A la fase de creixement exponencial d'una població bacteriana, hi ha un augment tant de la massa cel·lular com del nombre de cèl·lules.
 - La velocitat de creixement exponencial d'una població microbiana és directament proporcional al seu temps de generació.
-
- Els processos de fermentació es caracteritzen perquè:
 - I) Hi ha sempre un estricte equilibri oxidació-reducció
 - II) L'obtenció d'ATP es realitza per fosforilació a nivell de substrat
 - III) Tenen lloc en condicions d'anaerobiosi
 - IV) Els principals substrats són compostos orgànics

A) Només III B) II i III C) I, III i IV D) I, II, III i IV

- El temps de generació és:

- A) El mateix per tots els bacteris
- B) Directament proporcional al nombre de generacions produïdes en una població
- C) El temps que transcorre entre dues divisions cel·lulars
- D) Cap de les anteriors

- Entre les tècniques que s'utilitzen per mesurar el creixement d'una població microbiana, les que es basen en la determinació del nombre de cèl·lules són:

- A) Recompte per filtració a través de membrana
- B) Determinació del pes sec
- C) Determinació del contingut de DNA
- D) Cap anteriors