

ANÁLISIS DE CULTIVOS BACTERIANOS CON FINES AMBIENTALES

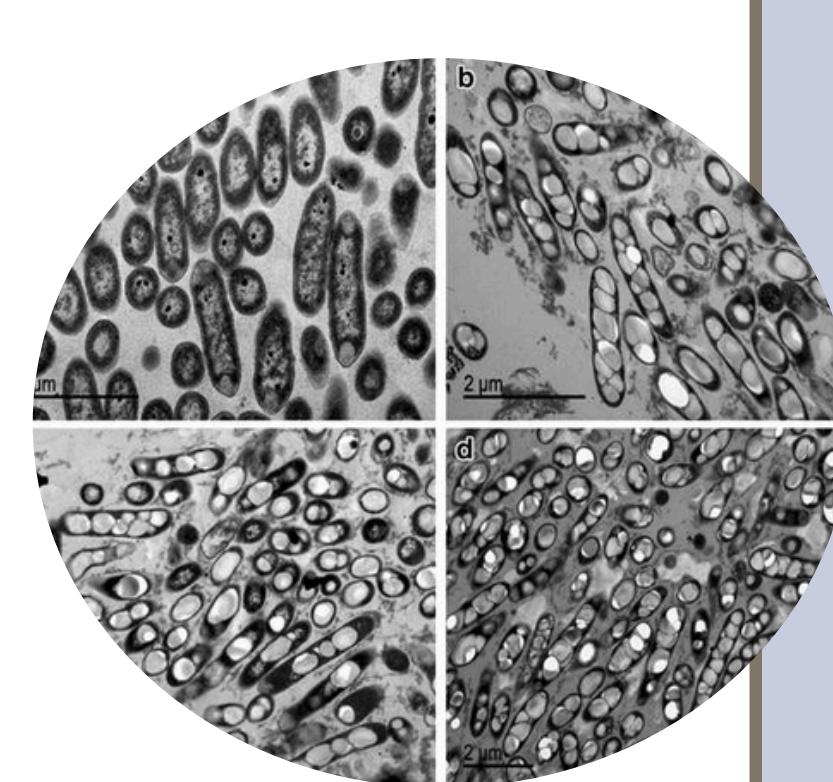
Alumnado: Anabel López, Azahara Titos, Carmen Pérez y Elisa Cantero.

Profesorado UCO: Lara P. Sáez, Gema Rodríguez, Noelia Dorado y Diego Becerra

Coordinadora: Carmen Gutierrez

INTRODUCCIÓN

En este proyecto trabajamos con la bacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, que fue aislada por el grupo de investigación BIO-117 de la UCO, de los lodos del río Guadalquivir contaminados por cianuro. La secuencia de su genoma reveló un gran potencial biotecnológico, y para aprovechar al máximo tal potencial es imprescindible conocer su metabolismo, crecimiento y composición genética. Esta investigación se centra en conocer su crecimiento.



OBJETIVOS

Estudiamos el crecimiento del cultivo de la bacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, aplicando diversas técnicas:

- 1.- Turbidimetría
- 2.- Método Nessler



1 - TURBIDIMETRÍA

FUNDAMENTO

Con este método medimos la turbidez del cultivo, y para ello medimos la absorbancia a 600nm a lo largo del tiempo, ya que cuanto mayor es el crecimiento bacteriano, mayor es la turbidez y por tanto será la absorbancia.

PROCEDIMIENTO

- 1º.- En un cultivo bacteriano en medio líquido, añadimos cierta cantidad de una disolución de NH₄Cl 5 mM.
- 2º.- Tomamos 0,5 mL de muestra y medimos cada 20 min la absorbancia mediante el espectrofotómetro a 600 nm (A₆₀₀) para valorar el grado de turbidez.
- 3º.- Con los datos obtenidos se realiza una gráfica t-Abs.

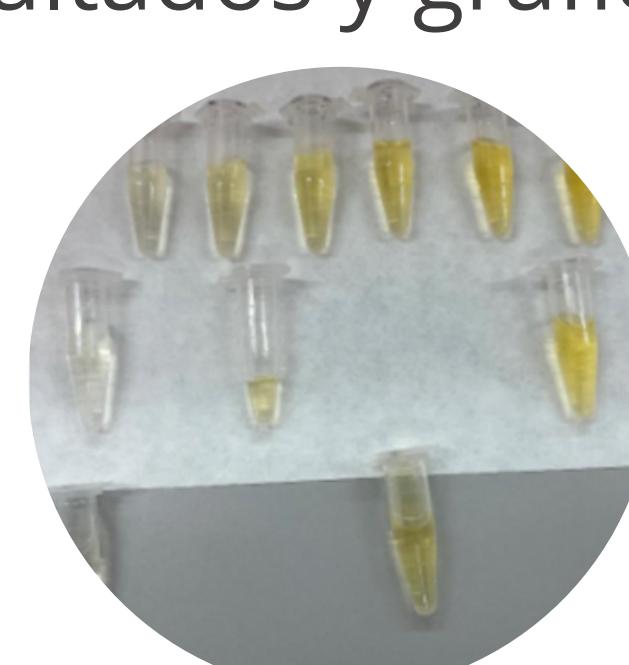
2 - MÉTODO NESSLER

FUNDAMENTO

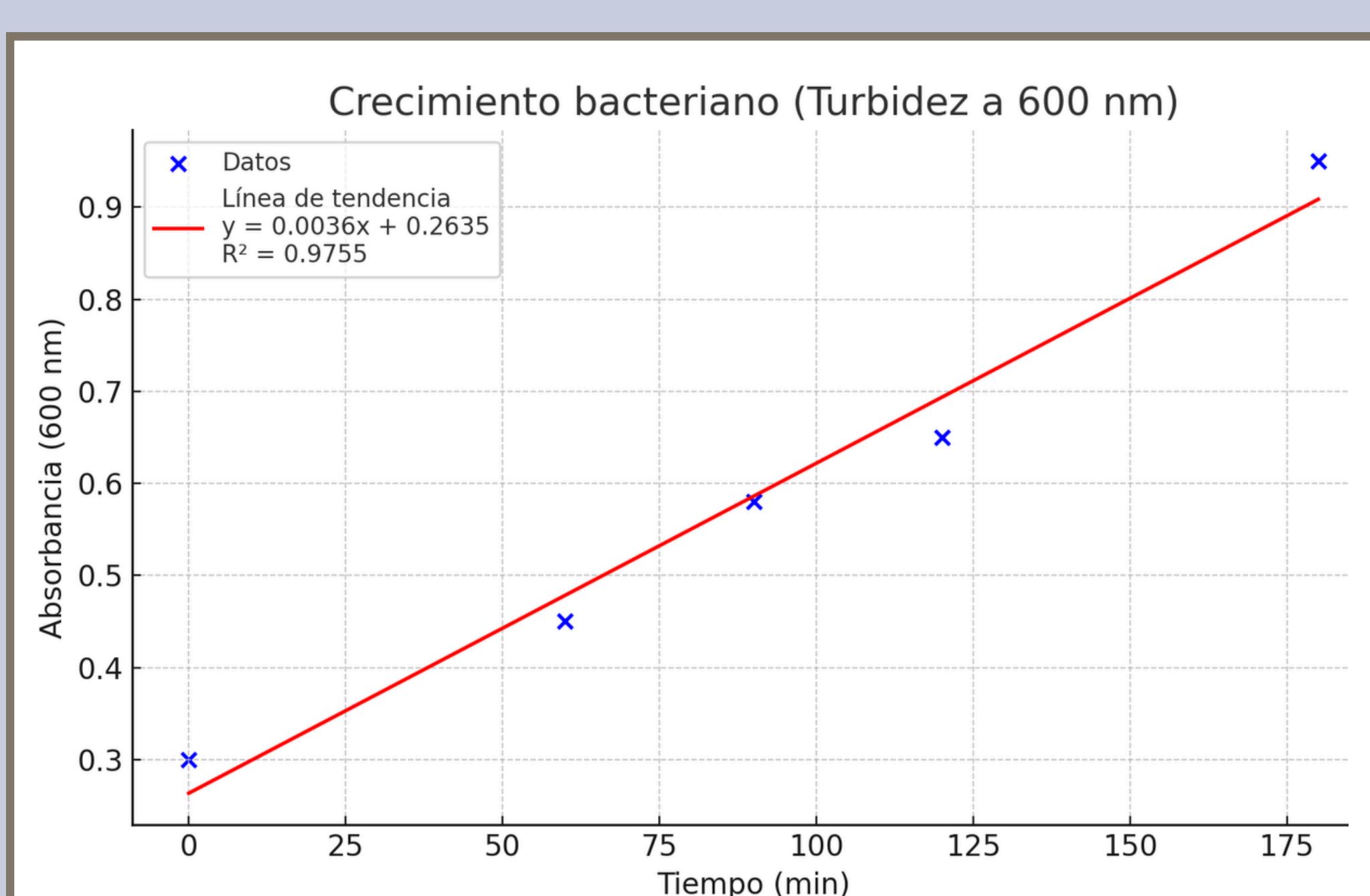
Con el método Nessler podemos conocer como avanza el crecimiento de un cultivo ya que conforme el cultivo crece consume amonio, y con este método medimos la cantidad de amonio residual que queda en el cultivo. Este método se basa en la reacción coloreada (amarillo/marrón) que adquiere el reactivo de Nessler cuando se combina con el amonio. Se mide la absorbancia en un espectrofotómetro.

PROCEDIMIENTO

- 1º.- Realizar la recta patrón que relaciona la concentración de amonio (eje x) con la absorbancia (eje y).
- 2º.- Añadir reactivo de Nessler a la muestra de cultivo bacteriano.
- 3º.- Medir en el espectrofotómetro la intensidad de color (absorbancia a 410 nm) del cultivo a diferentes tiempos.
- 4º.- Obtener la gráfica correspondiente tiempo-absorbancia.
- 5º.- Por interpolación, usando la recta de calibrado anterior, obtenemos la concentración de amonio que hay en el cultivo.
- 6º.- Observamos los resultados y gráficas obtenidas y sacamos conclusiones.

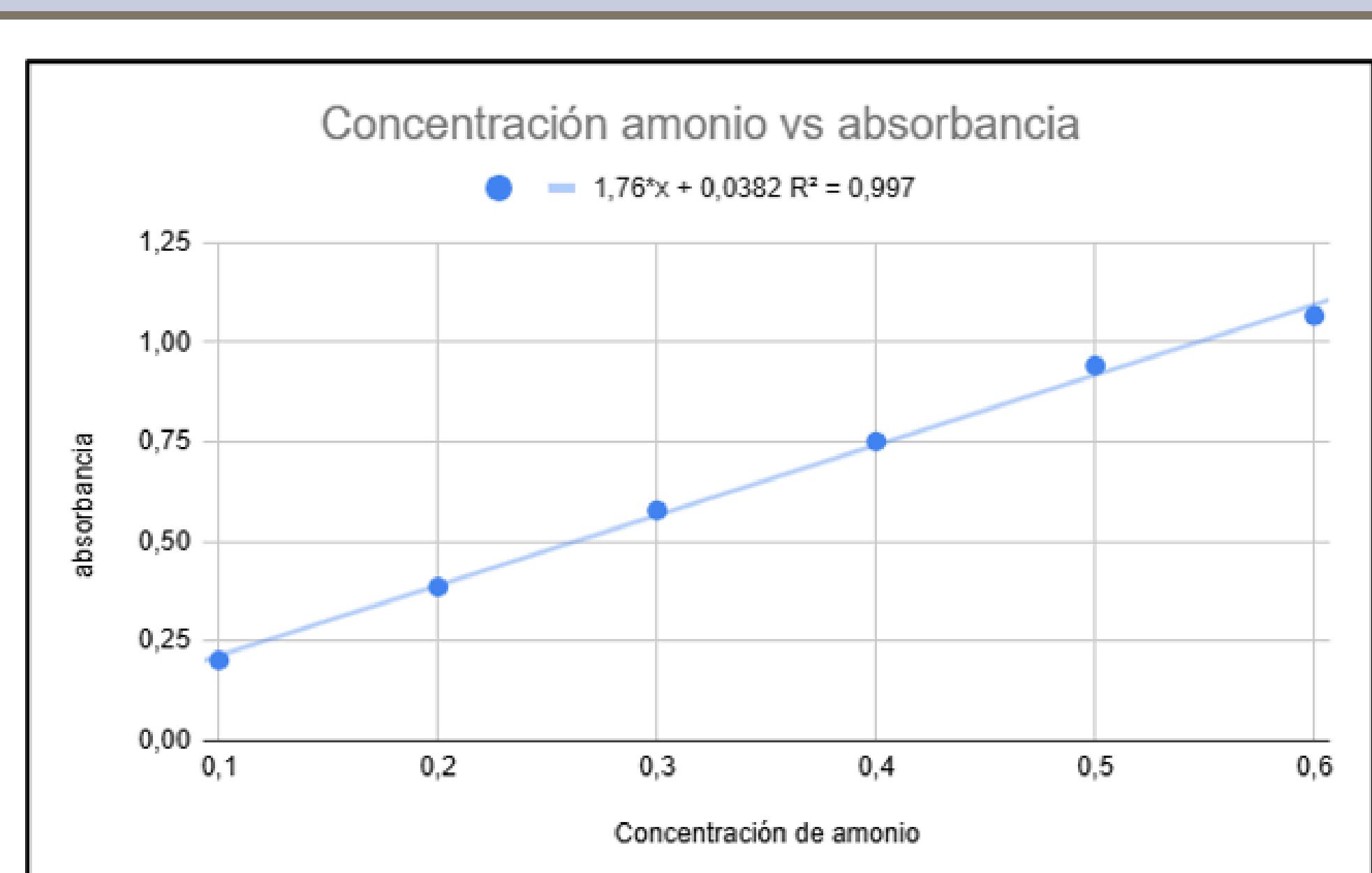


RESULTADOS Y CONCLUSIONES



TUBIDIMETRIA

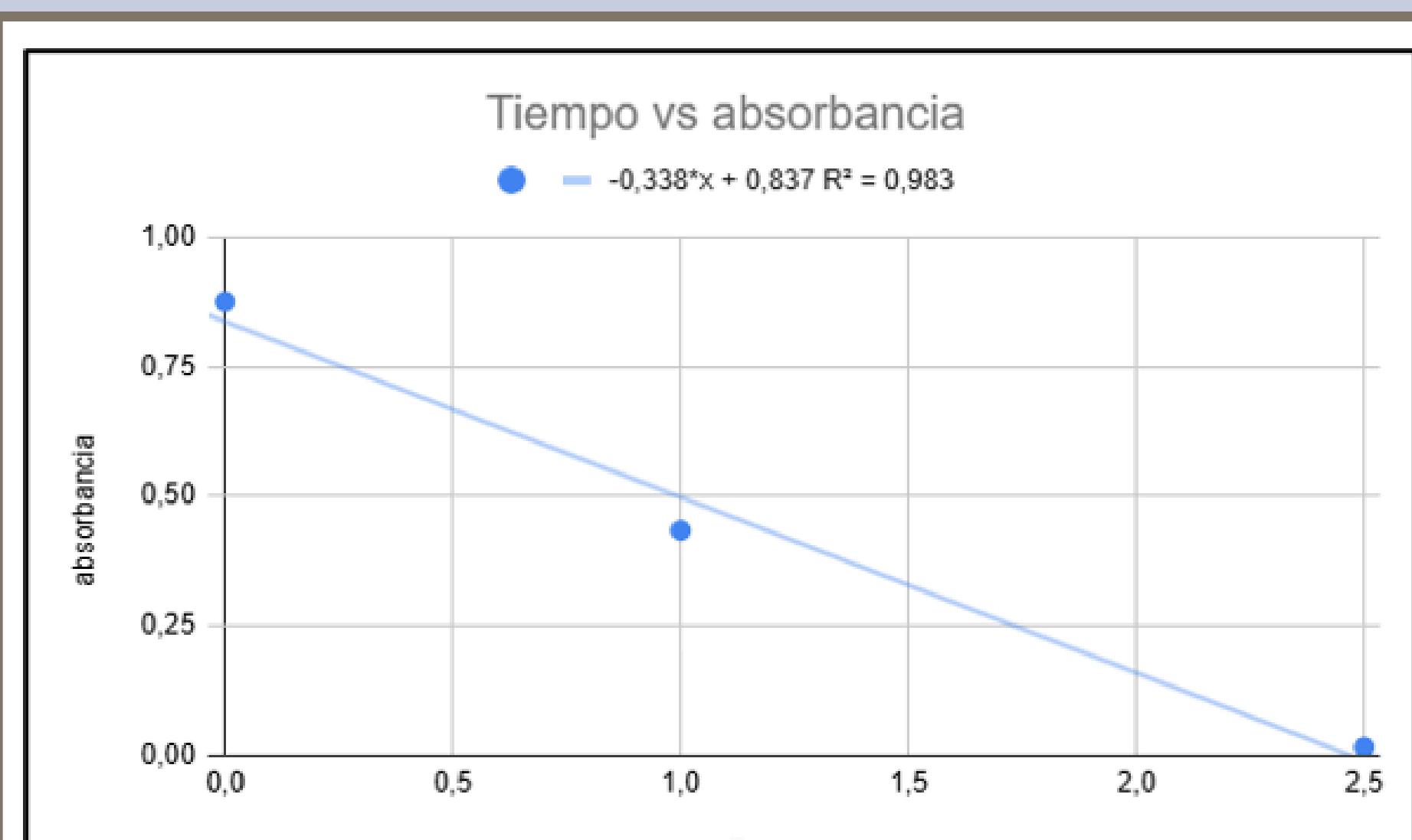
La gráfica muestra un aumento progresivo de la absorbancia, indicando incremento en la turbidez, debida al aumento de densidad celular. Esto indica que el cultivo creció correctamente con el tiempo.



MÉTODO NESSLER: recta calibrado
Tabla de datos:

V. Independiente	Eje x: [NH ₄ ⁺] (mM)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
V. Dependiente	Eje y: Absorbancia (410 nm)	0,202	0,386	0,578	0,751	0,941	1,066

Como se observa en la gráfica, a mayor concentración de amonio, mayor es la absorbancia. Esta recta nos sirve para obtener por interpolación valores de concentración de amonio en la muestra, conocida su absorbancia.



MÉTODO NESSLER: resultados

Eje X: Tiempo (h)	0	1	2,5
Eje Y: Absorbancia (410 nm)	0,875	0,434	0,016
[NH ₄ ⁺] disponible (mM) (INTERPOLACIÓN)	0,475	0,225	0

La gráfica muestra que con el tiempo, la absorbancia disminuye, indicando menor concentración de NH₄⁺. Esto confirma que el cultivo consume amonio durante su crecimiento de forma adecuada.