

ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO DE CULTIVOS BACTERIANOS CON FINES AMBIENTALES

Proyecto FIDICIENCIA de inicio a la investigación 2024/2025

AUTORÍA

Este proyecto ha sido realizado por:

- UCO - Grupo de investigación BIO-117, formado por la profesora titular, Lara P. Sáez, y su equipo Gema Rodríguez, Noelia Dorado y Diego Becerra.
- Alumnado: Anabel López y Azahara Titos (IES Fidiana), Carmen Pérez y Elisa Cantarero (IES Medina Azahara).

íNDICE

1. Introducción
2. Objetivos
3. Material
4. Técnicas empleadas para evaluar el crecimiento bacteriano
5. Conclusión
6. Bibliografía
7. Agradecimientos

INTRODUCCIÓN

En este proyecto se estudiará la bacteria **Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT5344**, aislada de **lodos contaminados con cianuro en el río Guadalquivir por el grupo de investigación BIO-117 de la Universidad de Córdoba**.

Gracias a la secuenciación de su genoma, se ha demostrado su gran potencial biotecnológico, especialmente para descontaminar vertidos industriales.

El objetivo principal de este proyecto es **analizar su capacidad para crecer en presencia de un compuesto nitrogenado**. Para ello, se emplearán técnicas como la turbidimetría y el método de Nessler, que permiten evaluar su metabolismo y crecimiento.

OBJETIVOS

Estudiar el crecimiento de un cultivo bacteriano, en concreto de la bacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, aplicando diversas técnicas para ello, como son las siguientes:

- 1.- Turbidimetría
- 2.- Método Nessler

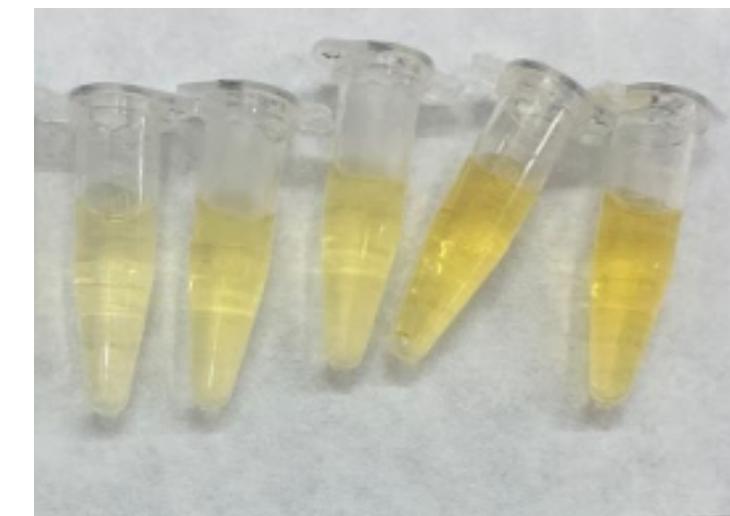
MATERIAL

Material biológico:

- bacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344

Otro material:

- espectrofotómetro, placas de Petri, medio de cultivo M9, asas de siembra, pipetas automáticas, matraces, reactivo Nessler y disolución de NH4Cl.

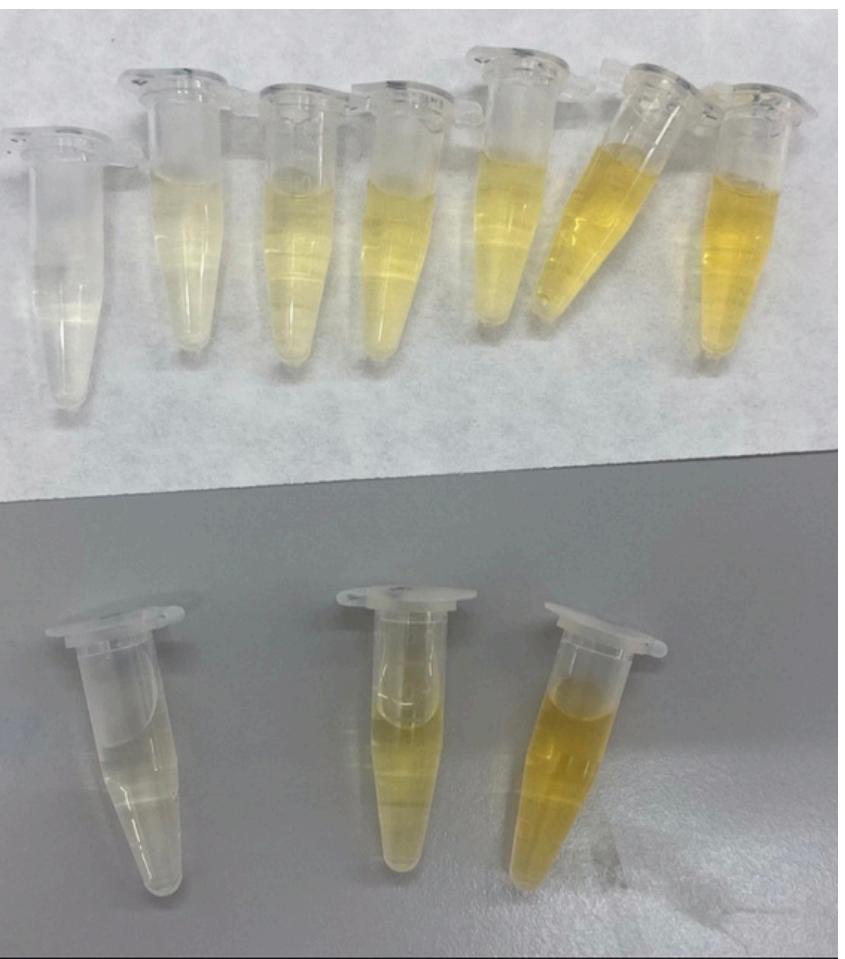


TÉCNICA 1: TURBIDIMETRÍA

FUNDAMENTO E HIPÓTESIS

Fundamento: El nivel de turbidez alcanzado en el medio refleja la cantidad de células presentes en el medio de cultivo.

Hipótesis: A mayor tiempo, mayor crecimiento celular, y por tanto mayor turbidez.



TÉCNICA 1: TURBIDIMETRÍA

OBJETIVOS

- Realizar el seguimiento del crecimiento de un cultivo de la bacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 mediante turbidimetría y comprobar la hipótesis planteada.
- Elaborar la gráfica: Tiempo - Absorbancia (600 nm)

TÉCNICA 1: TURBIDIMETRÍA

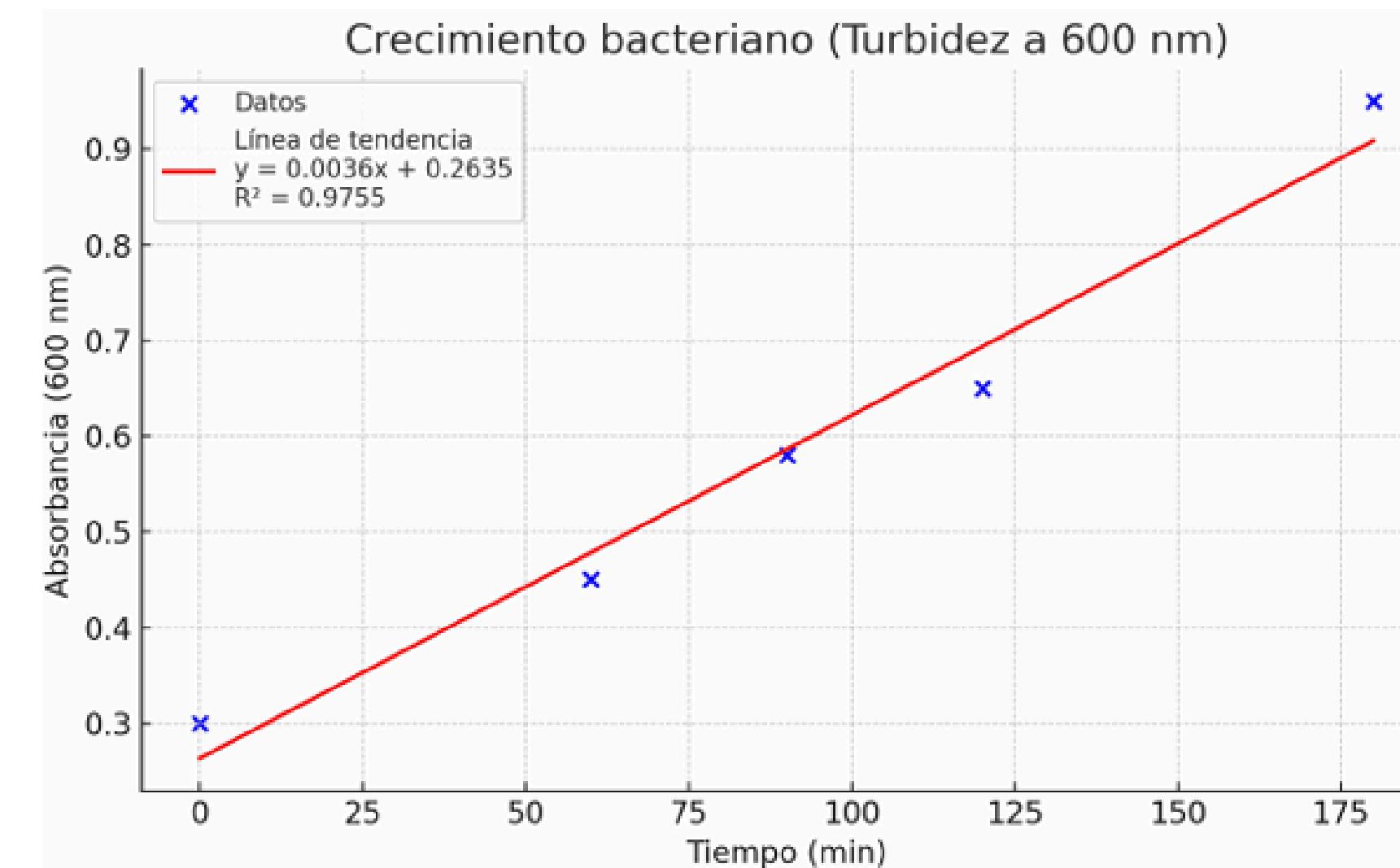
PROCEDIMIENTO Y RESULTADOS

Procedimiento: A un cultivo bacteriano inoculado se le añade cierta cantidad de una disolución de NH₄Cl 5 mM. Se toman muestras cada cierto tiempo y se mide la absorbancia en el espectofotómetro a 600 nm.



Resultados:

X: tiempo (min)	Y: abs (600 nm)
0	0,3
60	0,45
90	0,58
120	0,65
180	0,95



TÉCNICA 1: TURBIDIMETRÍA

CONCLUSIÓN

En la tabla y la gráfica podemos observar que conforme transcurre el tiempo la absorbancia aumenta, por tanto, podemos concluir que la hipótesis planteada es cierta, es decir, cuanto más tiempo transcurre mayor es la turbidez, lo cual es una señal de que el cultivo bacteriano está creciendo adecuadamente.

TÉCNICA 2: MÉTODO DE NESSLER

INTRODUCCIÓN

Los cultivos bacterianos deben tener una fuente de Nitrógeno para poder crecer.

El amonio es la forma más directa de incorporarlo a la biomasa, y por tanto, seguir su consumo suele ser una forma fácil de determinar si el cultivo está creciendo adecuadamente.

TÉCNICA 2: MÉTODO DE NESSLER

FUNDAMENTO E HIPÓTESIS

Fundamento:

Se basa en la reacción coloreada que adquiere el reactivo de Nessler cuando se combina con el amonio.

Se mide la absorbancia a 410 nm con el espectrofotómetro.

Hipótesis:

A mayor tiempo desde que el amonio se añade al cultivo, menos concentración de amonio disponible en el cultivo, ya que la bacteria consume amonio.



TÉCNICA 2: MÉTODO DE NESSLER

OBJETIVOS

- Realizar el seguimiento del consumo de amonio en un cultivo de la bacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 para comprobar la hipótesis planteada.
- Elaborar una recta patrón: Absorbancia(410 nm) - Concentración de amonio (NH_4^+), utilizando el método de Nessler.
- Calcular por interpolación la concentración de amonio en muestras de cultivo obtenidas a distintos tiempos.

TÉCNICA 2: MÉTODO DE NESSLER

PROCEDIMIENTO

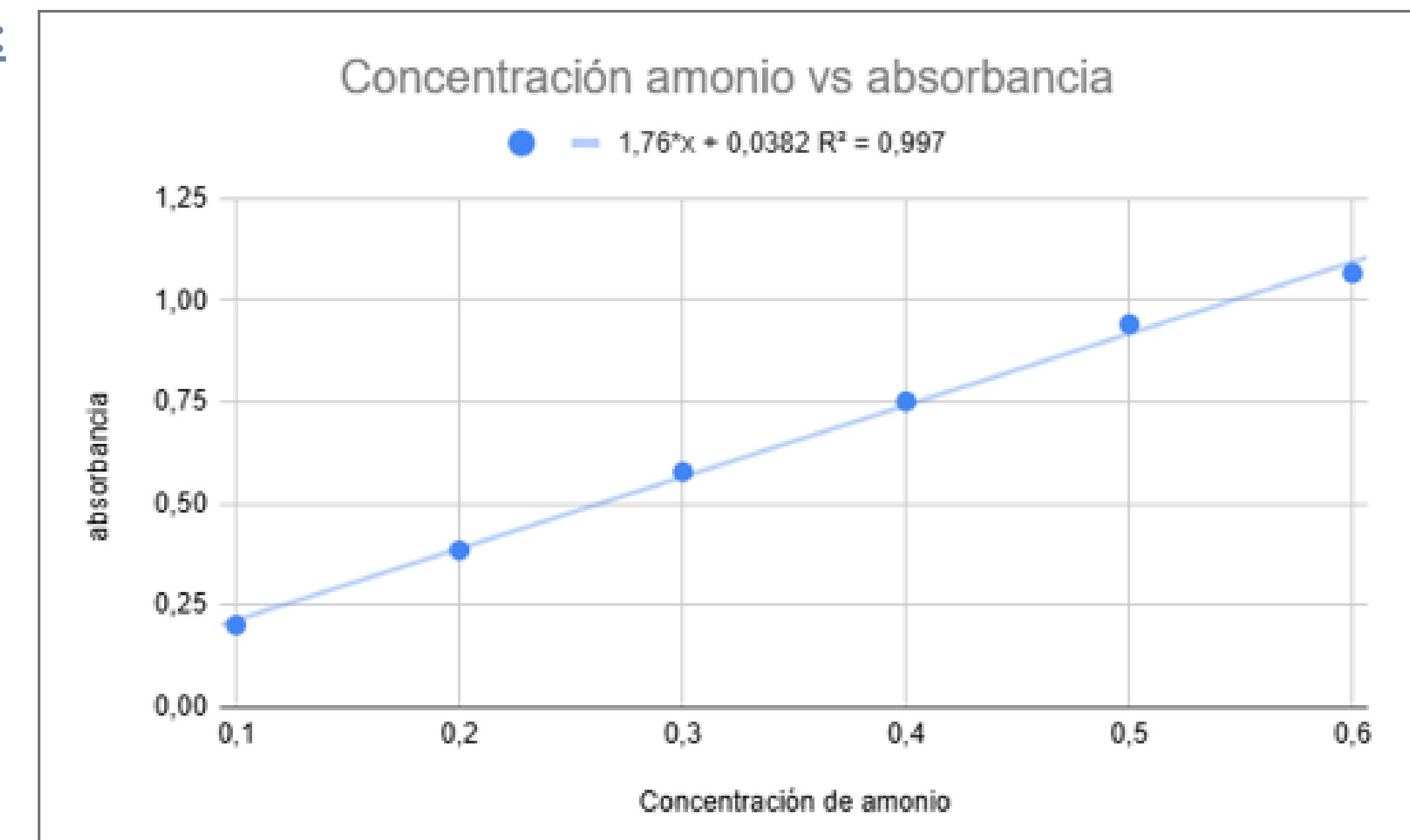
1.- Elaboración de la recta patrón:

- Mezclamos 0,5 mL de muestra con 0,5 mL de reactivo de Nessler.
- Esperamos 5 minutos y medimos la absorbancia a 410 nm.
- Preparamos una recta patrón con soluciones conocidas de NH₄Cl (0,1-0,5 mM).
- Incluimos un blanco con agua destilada y reactivo.
- Representamos las absorbancias frente a la concentración de amonio.
- Obtenemos la ecuación de la recta y el valor de R².
- Usamos esta recta para interpolar la concentración de amonio en nuestras muestras

TÉCNICA 2: MÉTODO DE NESSLER RECTA PATRÓN

1. Elaboración de la recta patrón:

Eje x: [NH4+] (mM)	Eje y: Absorbancia (410nm)
0,1	0,202
0,2	0,386
0,3	0,578
0,4	0,751
0,5	0,941
0,6	1,066



TÉCNICA 2: MÉTODO DE NESSLER

CONCLUSIÓN

La recta patrón muestra un aumento en la absorbancia conforme aumenta la concentración de amonio, (NH_4^+), de manera lineal, por tanto podemos concluir que a mayor absorbancia, mayor concentración de amonio.

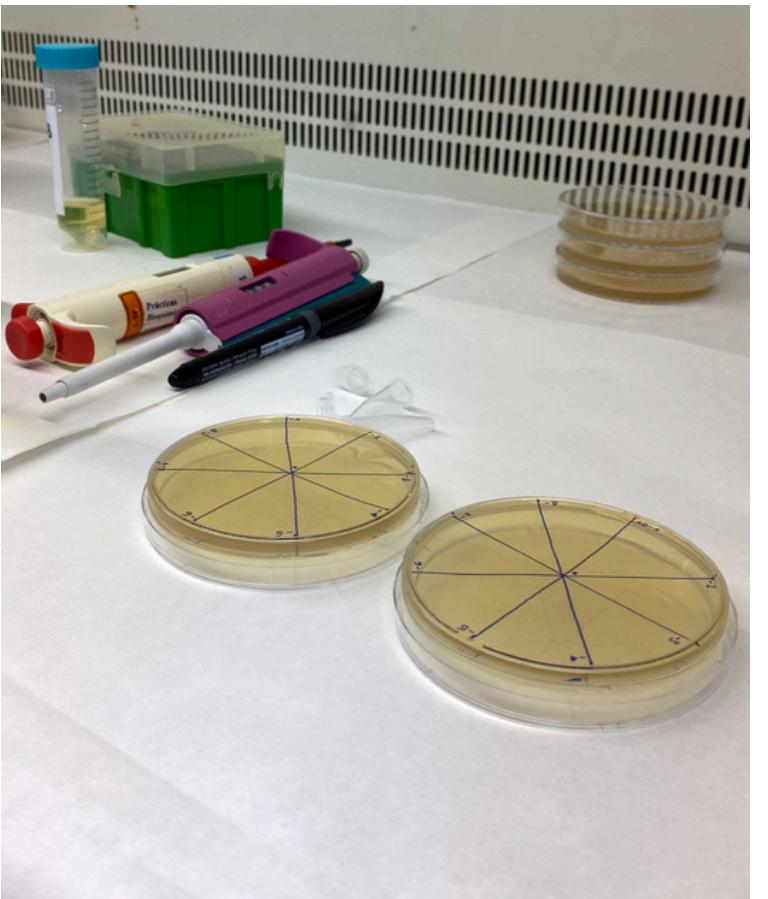
Esta recta patrón nos sirve para obtener, por interpolación, la concentración de amonio en el cultivo, en un tiempo determinado, conocido su valor de absorbancia.

TÉCNICA 2: MÉTODO DE NESSLER

PROCEDIMIENTO

2. Seguimiento del consumo de amonio en los cultivos:

- Tomamos tres muestras de cultivo bacteriano recogidas en distintos tiempos.
- Estas muestras fueron inoculadas en la sesión anterior y conservadas a -20 °C.
- A cada muestra le aplicamos el ensayo de Nessler y medimos la absorbancia a 410 nm.
- Determinamos la concentración de amonio por interpolación en la recta patrón.
- De este modo, cuantificamos el amonio residual no consumido por las bacterias en cada punto del cultivo

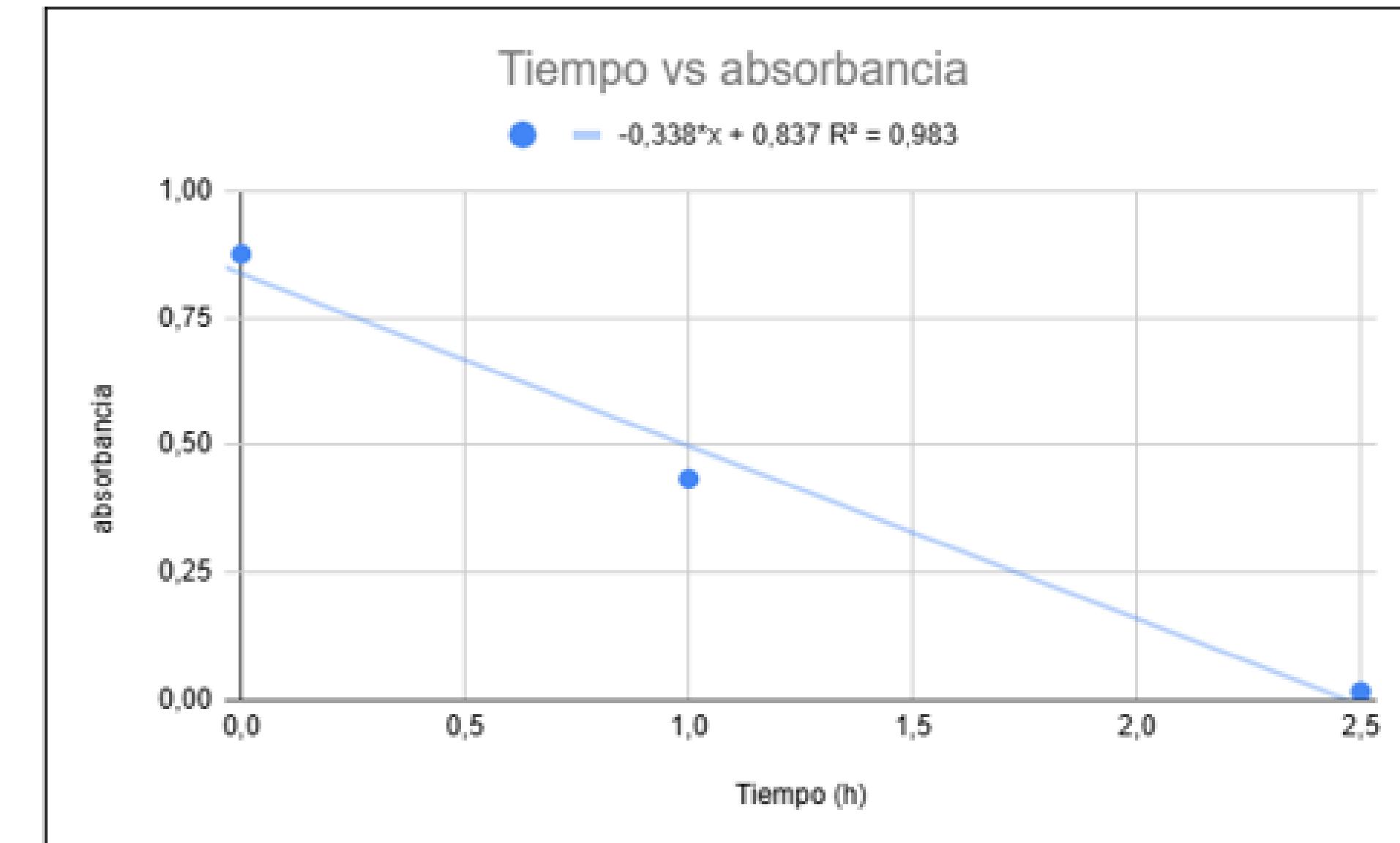


TÉCNICA 2: MÉTODO DE NESSLER

RESULTADOS

2. Seguimiento del consumo de amonio en los cultivos:

Tiempo (h)	Absorbancia (410 nm)	[NH4+] disponible (mM) (INTERPOLACIÓN)
0	0,875	0,475
1	0,434	0,225
2,5	0,016	0



TÉCNICA 2: MÉTODO DE NESSLER

CONCLUSIÓN

La gráfica muestra una disminución en la absorbancia y por tanto, según la recta patrón, en la concentración de amonio, NH_4^+ , a lo largo del tiempo.

Esto confirma nuestra hipótesis, ya que a medida que transcurre el tiempo, el cultivo consume más amonio, por lo que disminuye la concentración de amonio disponible en el cultivo, lo que indica un crecimiento bacteriano activo y adecuado.

CONCLUSIÓN DEL PROYECTO

Hemos aprendido:

- cómo se desarrolla el trabajo en el laboratorio de forma profesional
- aplicar diversas técnicas para evaluar el crecimiento bacteriano

De esta forma, en un futuro este estudio nos sería útil para conocer las condiciones ideales para el crecimiento de la *Pseudomonas pseudoalcalígenes*, así como los factores que más influyen en su crecimiento y si es viable o no su crecimiento en presencia del cianuro, y así pueda ser una solución frente a problemas de contaminación ambiental, como ocurre en el río Guadalquivir.

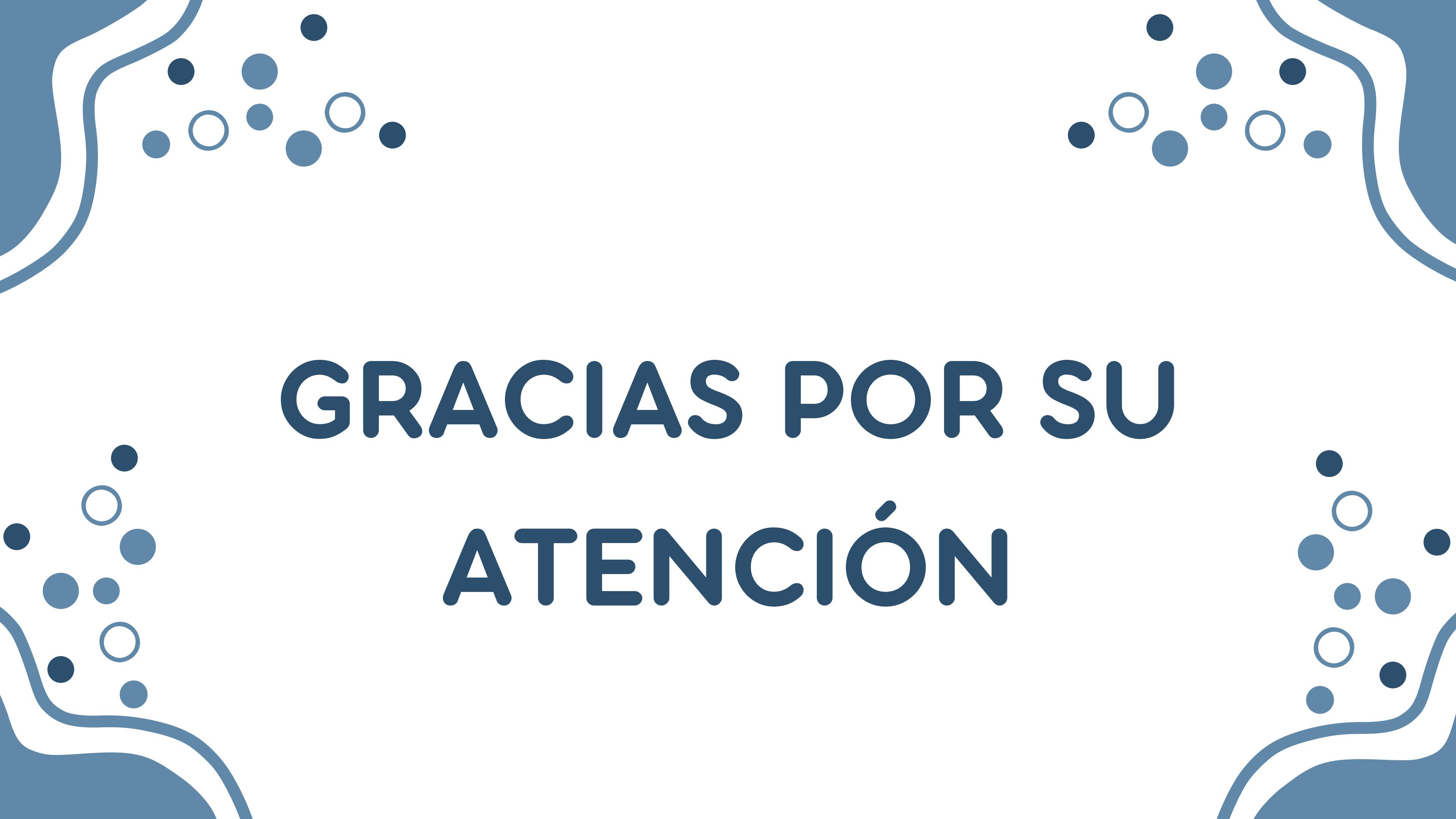
AGRADECIMIENTOS

Por último, queremos agradecer a todas las personas y entidades que han hecho posible la realización de este proyecto:

- UCO - Grupo de investigación BIO-117, formado por: la profesora titular, Lara P. Sáez, y su equipo Gema Rodríguez, Noelia Dorado y Diego Becerra.
- Profesora de Biología y coordinadora de Fiduciencia, Elena León.
- Profesora Coordinadora, Carmen Gutiérrez por su colaboración en este proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

Atlas RM y Bartha R, Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental, 4º ed., Addison-Wesley, 2002 Dash S y Dash H. Elsevier. Microbial Biodegradation and Bioremediation: Techniques and case studies for environmental pollution, Elsevier, 2021 Sáez LP, Cabello P, Ibáñez MI, Luque-Almagro VM, Roldán MD, Moreno-Vivián C. (2019) Cyanate assimilation by the alkaliphilic cyanide-degrading bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344: mutational analysis of the cyn gene cluster. Int J Mol Sci 20,3008, pp 1-15. doi:10.3390/ijms20123008



**GRACIAS POR SU
ATENCIÓN**