

## **Trabajo Práctico Nº 14** **Crecimiento**

### ***Introducción:***

Se considera al crecimiento como un incremento irreversible de masa, volumen, sustancias, de partes ya existentes de un organismo, o a la adición de nuevas partes semejantes a las ya existentes, como ser ramificaciones de un brote, aparición de nuevas hojas, de nuevos internodios, etc.

El estudio cuantitativo del crecimiento puede realizarse sobre la planta entera y también sobre sus partes (hojas, frutos, ramificaciones, bulbos, etc.). Según la región morfológica a medir, se determinará qué magnitud representa mejor su crecimiento (peso, volumen, área, longitud, número de partes, etc.) de acuerdo al problema que se propone estudiar.

El crecimiento de un cultivo de microalgas puede ser expresado como máxima biomasa alcanzada durante un determinado período de incubación o como tasa de crecimiento. La primera es una expresión de la producción de materia orgánica y se expresa como peso seco o peso fresco por unidad de volumen o unidad de área, en una unidad de tiempo. La tasa de crecimiento es una medida de la velocidad a la que ocurre el proceso de multiplicación en el tiempo. Ambos parámetros pueden ser estimados indirectamente mediante índices tales como el número de células comprimidas por centrifugación, medida de densidad óptica (turbidez o absorbancia), estimación de clorofila por fluorimetría, etc., usando factores de conversión adecuados. Una estimación directa puede obtenerse utilizando diversos tipos de cámaras de conteo. Su elección depende del tamaño y forma de las células, de la densidad del cultivo y de la presencia de compuestos extracelulares (ej. mucílago) que obstaculicen el llenado de la cámara o la distribución uniforme de las células. Existe un tamaño y una densidad óptimos para cada cámara. Los índices de división pueden ser expresados de diferentes formas y computados o graficados a partir del conteo celular.

El método de conteo descrito está basado en cultivos unialgales y no es útil para el conteo de algas en situaciones naturales. Se utiliza para tales fines el microscopio invertido o el conteo de cámaras con microscopio óptico.

Si el cultivo es muy diluido o muy denso para ser contado, se debe concentrar o diluir la muestra hasta alcanzar una densidad apropiada para el conteo con el instrumento disponible.

### Uso del hemacitómetro (0,1 mm de profundidad)

Su principal función es el conteo de células sanguíneas. Es también utilizado para contar algas unicelulares con un tamaño de 2-30  $\mu$  y una densidad de  $5 \times 10^4$ - $10^7$  cel/ml.

El hemacitómetro con regla de Neubauer (Figura 1) consiste en un vidrio rectangular con forma de H, a través del cual se forman dos áreas de conteo. Con el cubreobjetos en su lugar, cada área forma una cámara de 0,1 mm<sup>3</sup> (10<sup>4</sup> ml, es decir, 1 mm de lado y 0,1 mm de profundidad). El total del área de la regla de una cámara es de 9 mm<sup>2</sup>. Cada sector está dividido en subcámaras (Figura 2).

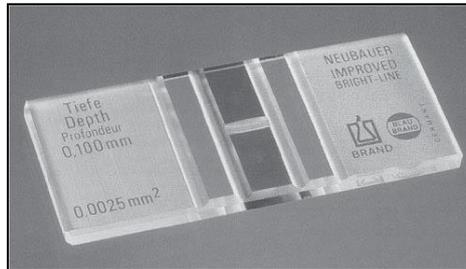


Figura 1: Cámara de Neubauer.

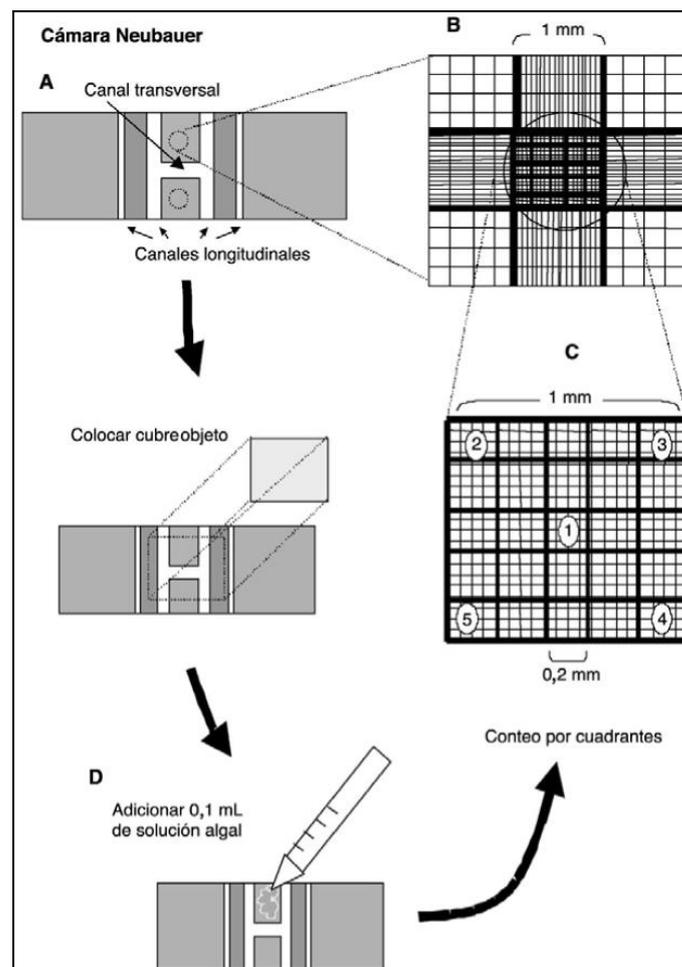


Figura 2: Forma de uso de la cámara de Neubauer

## Cálculos

Si todas las células del bloque son contadas, la densidad (D) se obtiene de la siguiente manera:

$$D = \frac{\text{totalcontadas}}{N^{\circ} \text{ de bloques}} 10^4$$

Para células pequeñas y poblaciones densas, el conteo se realiza en 5 pequeños sectores del bloque central.

El cálculo puede realizarse de la siguiente manera:

Según Guilliard:

$$d = 10^6 \times \frac{1}{4} R$$

R = promedio del n° de células en los 5 sectores centrales.

## Curva de crecimiento:

Cuando representamos una magnitud medida en función del tiempo, obtendremos una curva de tipo sigmoide, también llamada *curva de tamaño* (en el caso de microalgas en cultivo, tamaño poblacional)

Se determina el número de células en intervalos regulares, graficando el número de células en el eje de las ordenadas y el tiempo en el eje de las abscisas.

La curva obtenida debería poder dividirse en las cuatro fases siguientes (Figura 3y 4):

**Fase I:** Latencia (fase lag). Adaptación o ajuste a la nueva situación. Puede disminuir el número de células con respecto al inóculo.

**Fase II:** Exponencial. Activa multiplicación, la masa de células duplica a la anterior en intervalos de tiempo iguales y sucesivos..

**Fase III:** Lineal. La población o masa de células se incrementa linealmente con el tiempo. El crecimiento se mantiene constante.

**Fase IV:** Estacionaria. Baja división celular. Se mantiene una masa estable de células por unidad de volumen. Se compensan las pérdidas por procesos catabólicos con los procesos anabólicos. Cuando los procesos catabólicos superan a los anabólicos se produce la muerte celular.

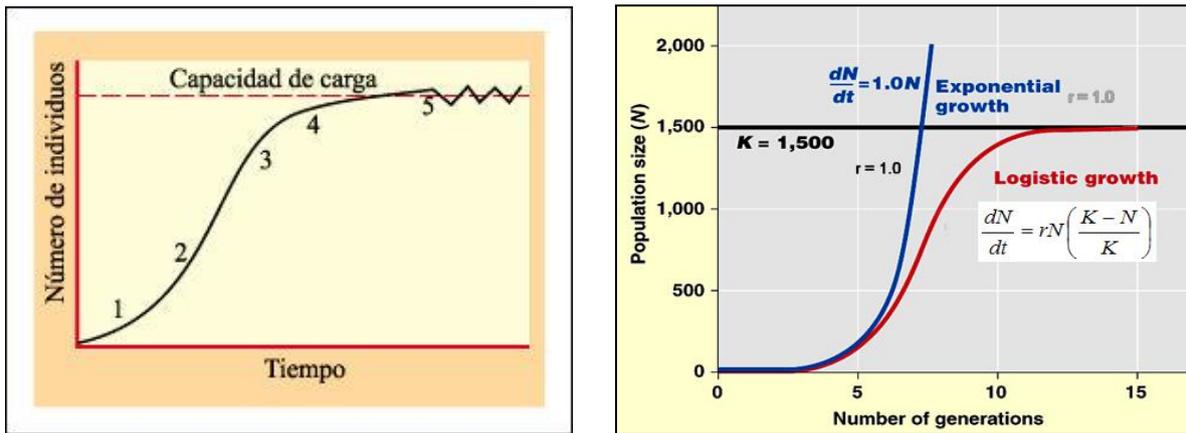


Figura 3 y 4: Curva de crecimiento en el tiempo

Esta curva, mediante la cual representamos el crecimiento, es una curva teórica que se da en algunos casos, pero muy poco frecuentes; lo normal es que se obtengan aproximaciones a la misma. La pendiente de esta curva en cada punto, representada por la inclinación de la tangente a la curva, es la medida de la velocidad de crecimiento. Velocidad de crecimiento es el aumento o incremento de tamaño (medido en largo, peso, tamaño, volumen, etc.) por unidad de tiempo. Mientras la gráfica *tamaño vs tiempo* permite visualizar el crecimiento total, la gráfica de *velocidad del crecimiento vs tiempo* nos permite apreciar la intensidad del crecimiento en cada etapa del mismo.

Si a una especie determinada la ponemos en las condiciones ideales, sin nada que limite su crecimiento y sin otras especies competidoras o depredadoras, la población en cuestión alcanzará un máximo de natalidad y una mortalidad mínima, y se dice que alcanza su potencial biótico.

Una población no puede crecer indefinidamente, ya que al cabo del tiempo empieza a haber limitaciones de recursos y espacio y aumenta el número de muertes.

En el crecimiento de una población intervienen también el resto de las poblaciones que comparten territorio con ellas, ya sea por relaciones beneficiosas o perjudiciales.

Esta resistencia hace que tras un crecimiento inicial se alcance un estado estacionario llamado *capacidad de carga del ecosistema* (K). En condiciones naturales las poblaciones tienden a mantener un número de individuos que oscila alrededor de la capacidad de carga. A las oscilaciones se les llama *fluctuaciones* y se dice que la población está en *equilibrio dinámico* o *fase estacionaria*.

**La resistencia ambiental** está marcada por una serie de factores que impiden que la población alcance su máximo potencial biótico. Factores externos: bióticos (depredadores, parásitos, competidores), abióticos (cambios climáticos, catástrofes, escasez de alimentos o agua etc.)

Factores internos: la densidad elevada provoca un descenso de la reproducción (competencia, emigración).

**Objetivo:**

- Reconocer las fases del crecimiento poblacional en un cultivo de microalgas.

**Materiales:**

Hematocitómetro	Erlenmeyers con medio de cultivo
Microscopio	Pipetas estériles
Concentrado de microalgas	
Lugol	

**Procedimiento:**

Luego de autoclavar y dejar enfriar el medio nutritivo, se procede a la siembra en condiciones de esterilidad:

1. Utilizando una pipeta estéril, tomar 1 ml de concentrado de microalgas, colocar una o dos gotas de lugol y realizar el conteo según las indicaciones de los docentes.
2. Inocular 4 erlenmeyers conteniendo medio de cultivo con un número de células conocido e igual en cada uno (50.000 cél/ml).
3. Colocar a cada uno de tres erlenmeyers papel celofán de color rojo, azul y verde, respectivamente y dejar uno como testigo, sin cubrir.
4. Llevar a cámara de cultivo y homogeneizar por agitación manual diariamente.
5. Cada 48 hs. tomar una alícuota de cada Erlenmeyer y determinar el número de células por mililitro. Para ello:
  - Tomar 1 ml de cultivo y colocar en un tubo de ensayo, agregando 2 gotas de lugol.
  - Lavar el hematocitómetro con agua y jabón o con alcohol y secar con papel tissue.
  - Colocar el cubreobjetos en la parte central del hematocitómetro, sobre el área de la regla.
  - Usando una pipeta, colocar una gota de la muestra de algas entre el hematocitómetro y el cubreobjetos. Llenar ambas cámaras.
  - Controlar que la distribución de algas en las cámaras sea homogénea. Si no fuera así, repetir la operación. Esperar 2 o 3 minutos a que las células se asienten antes de contar.
  - Construir una tabla para registrar periódicamente los datos obtenidos.

**Resultados:**

- Expresar los datos registrados en una gráfica de N° de células/ml vs Tiempo.
- Calcular la tasa de replicación diaria (r) y total (R) para cada uno de los ensayos.

$$N_t = N_0 \times e^{rt}$$
$$\ln N_t = N_0 + rt \quad \longrightarrow \quad r = \frac{\ln\left(\frac{N_t}{N_0}\right)}{t_2 - t_1}$$

Incluir los datos de condiciones de cultivo.

N<sub>t</sub>: Cantidad de células totales en cultivo al finalizar el tratamiento.

N<sub>0</sub>: Cantidad de células iniciales en el inicio del cultivo (inóculo inicial)

t<sub>2</sub>: Tiempo al finalizar el tratamiento

t<sub>1</sub>: Tiempo inicial del tratamiento

**Bibliografía:**

- ✓ Mc Lachlan, J. 1959. The growth of unicelular algae in artificial and enrices sea water media.
- ✓ Stein, J.R. 1973. Phycological Methods. Cambridge University.