



## REPORTE 1

# Variables ambientales sobre el crecimiento microbiano

*Nicolás Garrido Calderara*

*J. Patricio Parada Gutiérrez*

**Coordinador:** Dr. José Antonio Reyes Suárez  
**Encargado trabajos prácticos:** Yerko Argandoña Vargas

FACULTAD DE INGENIERÍA  
ESCUELA DE INGENIERÍA CIVIL EN BIOINFORMÁTICA  
PROCESOS BIOINDUSTRIALES

24 DE SEPTIEMBRE DE 2021

---

# 1. Introducción

El crecimiento de un cultivo de bacterias están asociados a muchas variables que permiten la duplicación de estos organismos unicelulares como lo es la *E. coli*. Dentro de aquellos factores se encuentran la temperatura, pH, y los nutrientes del medio. Por lo tanto dependiendo de las diferentes condiciones a las que están expuestas, presentarán diferenciación tanto fenotípica como de crecimiento del cultivo.

Es posible obtener distintos crecimientos en distintos tipos de ambientes de incubación o crecimiento en varios tipos de medios de cultivo tanto sólido como líquido. Estos son los principales factores de crecimiento de las bacterias ya que en base a la abundancia de alimento que tengan, será su competitividad y desarrollo de la colonia. Sin embargo mayor cantidad de nutrientes no significa mayor crecimiento. Donde es necesario mantener una relación de volumen en la solución debido a la posibilidad de estresar las colonias reprimiendo su desarrollo por exceso de nutrientes.

Para analizar y obtener el cálculo de microorganismos presentes en una muestra, existen una gran variedad de métodos, los cuales permiten obtener tanto su volumen, masa y cantidad de células. Dentro de ellas es posible considerar la cantidad de biomasa midiendo el peso su peso, o bien determinar su biovolumen a través de microscopía fotónica o epifluorescencia. Sin embargo un método menos costoso de realizar corresponde a espectrofotometría la cual mide los haces de luz que atraviesa el medio de cultivo y calcula su densidad

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Materiales

- Medio estéril y medio LB estéril.
- Matraz Erlenmeyer de 50 mL con 10 mL de medio de cultivo.
- Glucosa, glicerol y sacarosa (sucrosa) estéril.
- Micropipetas.
- Placas multipocillos.
- Espectrofotómetro de placas.
- Agitador orbital con temperatura controlada.

### 2.2. Métodos

Dentro de los elementos de riesgo lo más importante corresponde a la infección de los elementos estériles, para esto el exponer los materiales y herramientas al ambiente es de gran cuidado, de esta forma se trabaja en todo momento bajo el mechero con los tubos, placas y herramientas hacia abajo o cerrados en caso del matraz con el cultivo y los tubos de ensayo.

### 2.2.1. Primera parte

Durante la primera parte se buscó establecer una aproximación para obtener valores de células viables a partir del registro de absorbancia a 600 nm.

- A partir de un cultivo cuyo número de células viables es conocido ( $\text{UFC mL}^{-1}$ ), se generaron 10 diluciones seriadas en base a potencias de dos, las cuales fueron sometidas al espectrofotómetro a 600 nm. En cada aplicación es necesario cambiar las puntas de la micropipeta con el fin de no contaminar las muestras.
- Graficar los datos de “DO” v/s “UFC/mL” (curva de calibración)
- El procedimiento de cada prueba es realizado tres veces con el fin de obtener el cálculo con el “coeficiente de determinación”.

### 2.2.2. Segunda parte

- A partir de un cultivo previo se debe inocular 0,2 mL de este en 20 mL de medio fresco. Se dispondrá de dos medios de cultivos distintos, medio LB (10g/L triptona, 5g/L extracto de levadura, 10g/L NaCl) y medio SOC (20g/L Triptona, 5g/L extracto de levadura, 0.5g/L NaCl, 2.5mM  $\text{MgCl}_2$ , 10mM  $\text{MgSO}_4$ , 20mM glucosa). Cada media hora se debe medir la densidad óptica a 600nm y registrarla.
- Obtener los gráficos de “DO” vs “t”.
- Luego de obtener la curva de calibración es necesario generar una curva de crecimiento de “UFC/mL” v/s “t”

## 3. Resultados

### 3.1. Curva de calibración

Los datos obtenidos de densidad óptica desde una muestra con número de células viables de detalla en la tabla 1

	Dilución en relación a muestra original							Blanco
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	
	0.905	0.537	0.307	0.183	0.110	0.077	0.061	0.044
	0.905	0.537	0.303	0.178	0.111	0.077	0.059	0.042
	0.918	0.542	0.310	0.180	0.113	0.077	0.061	0.041
Promedio	0.909	0.539	0.307	0.180	0.111	0.077	0.060	0.042

Tabla 1: Densidad óptica muestras con  $\text{UFC mL}^{-1}$  conocida (datos en bruto)

Se ajustaron los datos para obtener la densidad óptica de la muestra, ya que la presentada en la tabla 1 indica la densidad óptica tanto del organismo como del medio de cultivo, lo que son presentados en la tabla 2

	Dilución en relación a muestra original						
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
	0.861	0.493	0.263	0.139	0.066	0.033	0.017
	0.863	0.495	0.261	0.136	0.069	0.035	0.017
	0.877	0.501	0.269	0.139	0.072	0.036	0.02
Promedio	0.867	0.496	0.264	0.138	0.069	0.035	0.018

Tabla 2: Densidad óptica muestras con UFC mL<sup>-1</sup> conocida (datos corregidos)

Dado que el inocuo inicial contenía  $4.5 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>, los títulos de las diluciones seriadas están totalmente determinado y se adjuntan en la siguiente tabla

Dilución	Título ( $\times 10^9$ UFC mL <sup>-1</sup> )
1:2	2.25
1:4	1.12
1:8	0.562
1:16	0.281
1:32	0.141
1:64	0.0704
1:128	0.0352

Tabla 3: Título diluciones

Entonces, a partir de los datos experimentales detallados previamente, es que se construyó una *curva de calibración* que relaciona la densidad óptica (DO) medida con la cantidad de células viables (UFC mL<sup>-1</sup>), la que ilustra en la figura 1

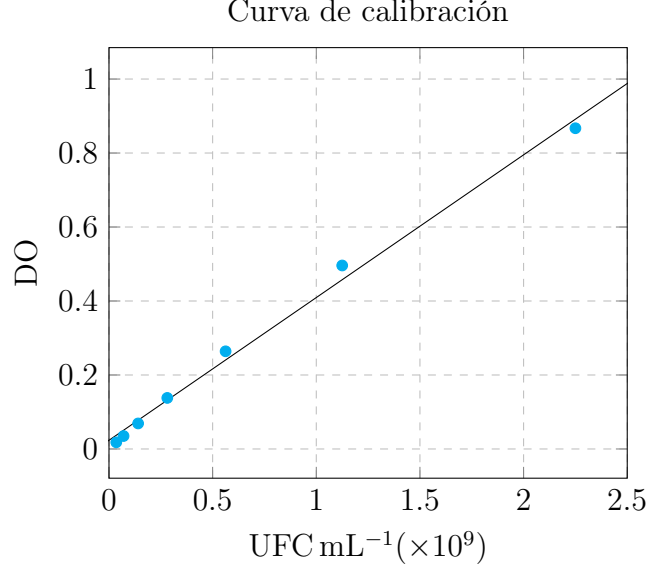


Figura 1: Curva de calibración

De los datos presentados en la tabla 2 y la figura 1, y según el método de mínimos cuadrados, la recta de mejor ajuste se determinó y corresponde a

$$DO(n) = 0.385792 \cdot n + 0.0235 \quad (1)$$

donde  $n$  corresponde a la mantisa del valor de las células viables cuando éstas están expresadas en orden de magnitud 9, e.g., si el número de células viables es de  $2.25 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> entonces el valor que ingresa a la función es 2.25, teniendo este modelo un coeficiente de determinación  $R^2 = 0.994256$ .

Se manipuló el modelo presentado en la ecuación (1) de forma algebraica para obtener un segundo modelo,

$$n(DO) = 2.57718 \cdot DO - 0.0569 \quad (2)$$

, donde DO representa la densidad óptica medida y  $n$ , tal como se indicó más arriba, la mantisa del número de células viables cuando el orden de magnitud es 9.

### 3.2. Curva de crecimiento

Las mediciones de densidad óptica obtenidas para muestra problema se detallan en la tabla 4.

Los datos presentados en la tabla 4 se corrigieron, en su promedio, los cuales se presentan en la tabla 5.

	Glicerol	Sucrosa	Glucosa
$t = 0$ min	0.066	0.067	0.072
	0.067	0.069	0.069
	0.064	0.070	0.070
Promedio	0.066	0.069	0.070
$t = 30$ min	0.084	0.102	0.111
	0.091	0.102	0.105
	0.082	0.111	0.119
Promedio	0.086	0.105	0.112
$t = 60$ min	0.111	0.139	0.153
	0.116	0.143	0.145
	0.105	0.139	0.153
Promedio	0.111	0.140	0.150
$t = 90$ min	0.160	0.162	0.241
	0.163	0.165	0.241
	0.156	0.174	0.240
Promedio	0.160	0.167	0.241
$t = 120$ min	0.233	0.186	0.342
	0.238	0.189	0.325
	0.219	0.196	0.352
Promedio	0.230	0.190	0.340
Blanco	0.037		

Tabla 4: Densidad óptica muestras con  $\text{UFC mL}^{-1}$  desconocido (datos en bruto)

	Glicerol	Sucrosa	Glucosa
$t = 0$	0.029	0.032	0.033
$t = 30$	0.049	0.067	0.075
$t = 60$	0.074	0.103	0.113
$t = 90$	0.123	0.130	0.204
$t = 120$	0.193	0.153	0.303

Tabla 5: Densidad óptica promedio muestras con  $\text{UFC mL}^{-1}$  desconocido (datos corregidos)

Estos datos fueron graficados y dicho gráfico se muestra en la figura 2.

Usando el modelo descrito en la ecuación (2) se interpolaron los datos presentados en la tabla 5; estos datos se tabularon y se encuentran disponibles en la tabla 6

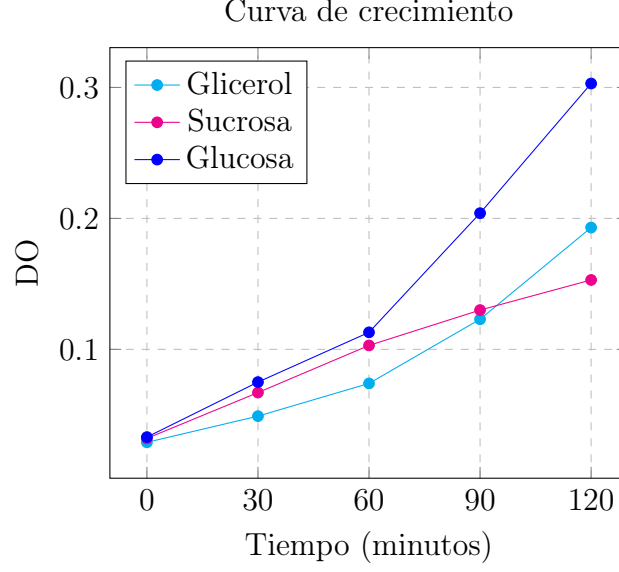


Figura 2: Curva de crecimiento

	Glicerol	Sucrosa	Glucosa
$t = 0$	0.01784	0.02557	0.02815
$t = 30$	0.06938	0.1158	0.1364
$t = 60$	0.1338	0.2085	0.2343
$t = 90$	0.2601	0.2781	0.4688
$t = 120$	0.4405	0.3374	0.7240

Tabla 6: Interpolación de la DO para obtener UFC mL<sup>-1</sup>( $\times 10^9$ )

Estos datos también fueron graficados, lo que se ilustra en la figura 3.

Se asume que este crecimiento es descrito mediante una progresión geométrica de la forma

$$N(t) = N_0 2^{n(t)} \quad (3)$$

en donde  $n(t)$  es el número de generaciones transcurridas en un determinado tiempo  $t$  (minutos para este caso),  $N_0$  es la cantidad inicial de microorganismos y  $N(t)$  es la cantidad de microorganismos como función del tiempo, siendo estas últimas expresadas en UFC mL<sup>-1</sup>.

Para efectos prácticos de cálculo, el modelo presentado en (3) se linealizó mediante el uso de logaritmos naturales, tal como se expresa a continuación

$$\begin{aligned} \Rightarrow \ln(N(t)) &= \ln(N_0 2^{n(t)}) \\ \Leftrightarrow \ln(N(t)) &= n(t) \ln(2) + \ln(N_0) \end{aligned} \quad (4)$$

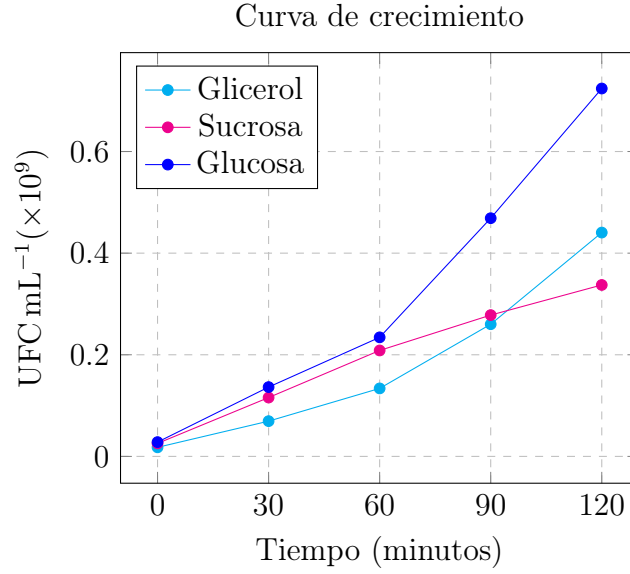


Figura 3: Curva de crecimiento

El tiempo generacional, denotado por  $g$ , se define como

$$g = \frac{t}{n} \quad (5)$$

Al calcular el recíproco del tiempo generacional es que se puede obtener la velocidad de crecimiento del microorganismo.

Al reemplazar (5) en (4), se obtiene la siguiente expresión

$$\ln(N) = \frac{\ln(2)}{g}t + \ln(N_0) \quad (6)$$

A consecuencia del desarrollo matemático anterior, es que se procedió a calcular el logaritmo natural de los valores presentes en la tabla 6, lo que se almacenó en la tabla 7.

	Glicerol	Sucrosa	Glucosa
$t = 0$	16.6970	17.0569	17.1531
$t = 30$	18.0551	18.5674	18.7311
$t = 60$	18.7119	19.1554	19.2721
$t = 90$	19.3766	19.4435	19.9657
$t = 120$	19.9034	19.6362	20.4003

Tabla 7: Valores de  $\ln N$

Las justificaciones y demostraciones de teoremas asociados a las próximas expresiones matemáticas escapan a los objetivos del presente reporte, pero son resultados bien co-



nocidos dentro de los métodos numéricos, particularmente para el cómputo por mínimos cuadrados (Chapra y Canale 2015).

Al tenerse  $n$  observaciones de la forma

$$\underbrace{\begin{pmatrix} \ln(N_1) \\ \vdots \\ \ln(N_n) \end{pmatrix}}_Y = \underbrace{\begin{pmatrix} t_1 \cdot \ln(2) & 1 \\ \vdots & \vdots \\ t_n \cdot \ln(2) & 1 \end{pmatrix}}_A \underbrace{\begin{pmatrix} g^{-1} \\ \ln(N_0) \end{pmatrix}}_X$$

no es posible despejar, directamente, el vector de interés  $X$ . Para solventar el inconveniente de que la matriz  $A$  no es cuadrada, se procede a multiplicar por la izquierda por su transpuesta, de forma que la matriz resultante,  $A^t A$ , es una matriz cuadrada. Entonces, el vector de interés se obtiene mediante

$$X = (A^t A)^{-1} (A^t Y) \quad (7)$$

Se aplicó entonces este razonamiento a las tres columnas de datos de la tabla 7, lo que determina los siguientes modelos:

$$\ln(N) = 0.02578t + 17.001903, \quad R^2 = 0.961773 \quad (8)$$

$$\ln(N) = 0.02902t + 17.564960, \quad R^2 = 0.841405 \quad (9)$$

$$\ln(N) = 0.02576t + 17.558637, \quad R^2 = 0.933942 \quad (10)$$

donde las ecuaciones (8), (9) y (10) representan la linealización del crecimiento bacteriano en glicerol, sucrosa y glucosa, respectivamente.

Los puntos de la tabla 7, junto con los modelos, están representados en la figura 4

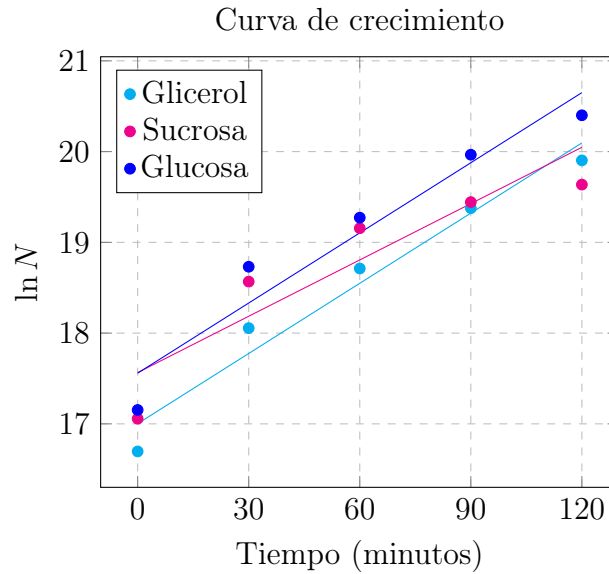


Figura 4: Curva de crecimiento (linealizada)

A partir del desarrollo anterior es que se logró determinar los siguientes parámetros para *E. coli* BL21(DE3)

$$g_{\text{Glicerol}}^{-1} = 0.0372 \frac{\text{gen}}{\text{min}} \quad g_{\text{Sucrosa}}^{-1} = 0.0290 \frac{\text{gen}}{\text{min}} \quad g_{\text{Glucosa}}^{-1} = 0.0372 \frac{\text{gen}}{\text{min}}$$

lo que indica la velocidad de crecimiento del microorganismo.

Lo anterior también se puede expresar como

$$g_{\text{Glicerol}} = 26.8856 \frac{\text{min}}{\text{gen}} \quad g_{\text{Sucrosa}} = 34.4585 \frac{\text{min}}{\text{gen}} \quad g_{\text{Glucosa}} = 26.9042 \frac{\text{min}}{\text{gen}}$$

lo que indica el tiempo que le toma a una célula duplicarse.

## 4. Discusión

Esta actividad de laboratorio tuvo por objetivo el crecimiento de un cultivo de bacterias *E. coli* en dos medios de cultivos diferentes. Medio LB y Medio SOC, los cuales poseen diferencias en cuanto a concentraciones de fuentes de carbono y otros minerales que influyen en el crecimiento del microorganismo. Así, en un principio lo que se debía lograr era la comparación de ambos medios de cultivo y determinar en cuál de ellos el microorganismo se desarrollaba de mejor manera. El objetivo final del laboratorio es lograr la construcción de una curva de crecimiento de concentración de unidades formadoras de colonias del microorganismo (UFC/ml) en función del tiempo, las unidades formadoras de colonias constituyen una medida de la cantidad de microorganismo activo o vivo que se encuentra en una muestra. Una forma de medir la cantidad de material celular que crece a lo largo de un determinado tiempo es por medio de la densidad óptica o absorbancia, cuanto más material celular se encuentre en una muestra, menor es la cantidad de luz que atraviesa esta muestra misma debido a la dispersión de la luz por parte de las células en suspensión. La medición de la densidad óptica de las muestras se lleva a cabo haciendo uso de un instrumento denominado espectrofotómetro, de esta manera es posible medir la cantidad de material celular en suspensión en la muestra, sin embargo, esta medición no permite discriminar entre el material celular activo o células vivas y las células no vivas, por lo que, para efectos de poder obtener una curva de crecimiento en relación a la concentración de UFC en función del tiempo se debe construir una curva de calibración, esta grafica la densidad óptica en función de la concentración de UFC.

## 5. Conclusión

- La esterilización y la desinfección son importantes para asegurar que el cultivo de microorganismos no esté contaminado como también para asegurar que no se contamine el medio exterior con microorganismos.
-

## Referencias

Chapra, S. C. & Canale, R. P. (2015). *Numerical Methods for Engineers* (7th). McGraw-Hill Education.