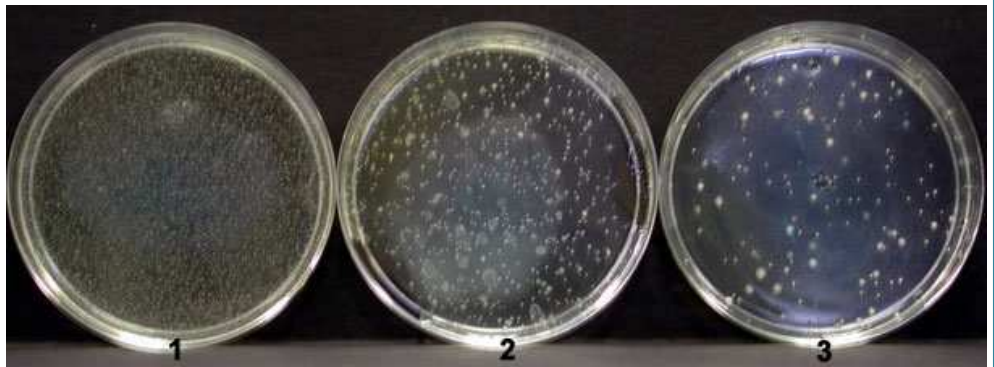


COMO ABORDAR Y RESOLVER ASPECTOS PRÁCTICOS DE MICROBIOLOGÍA

4. CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS QUE DEFINEN EL CRECIMIENTO BACTERIANO

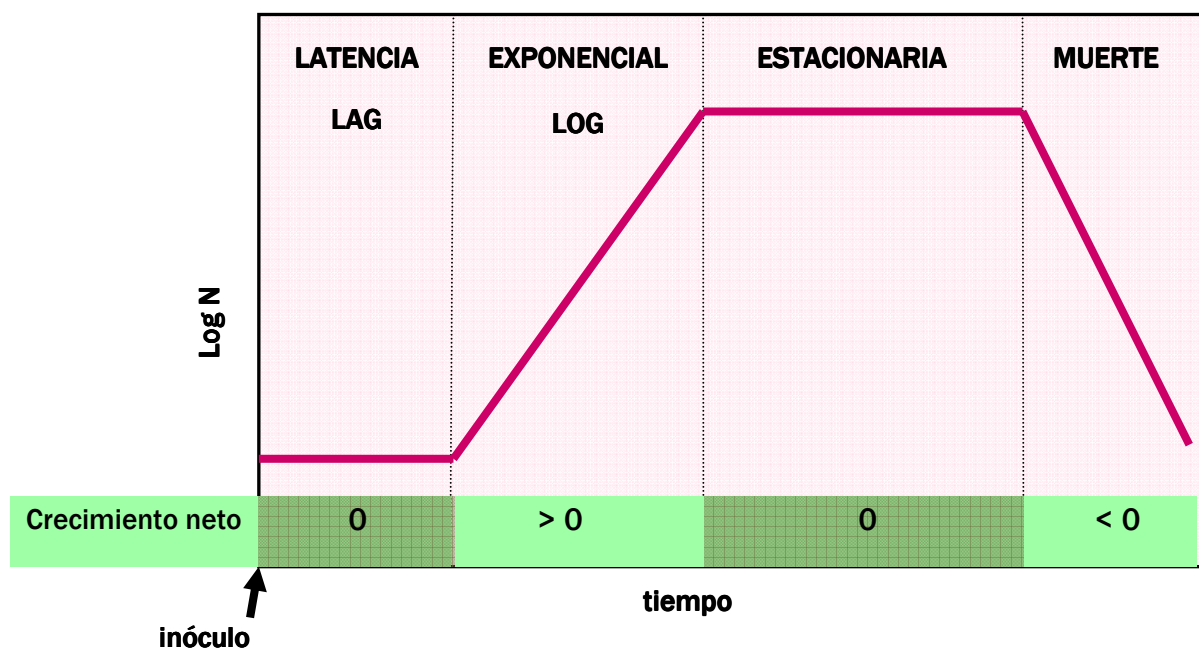


Inés Arana, Maite Orruño e Isabel Barcina

Departamento Inmunología, Microbiología y Parasitología
Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

4. CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS QUE DEFINEN EL CRECIMIENTO MICROBIANO

En condiciones controladas, en el laboratorio, se puede seguir la evolución del número de células a lo largo del tiempo de un cultivo microbiano en un sistema cerrado. Si representamos los resultados obtenidos obtendremos la denominada curva de crecimiento que comprende cuatro fases: fase de latencia o de adaptación, fase de crecimiento exponencial o logarítmico, fase estacionaria y fase de muerte.



El concepto de crecimiento microbiano y las expresiones matemáticas que lo definen pueden consultarse en cualquier texto de Microbiología (Brock Biology of Microorganisms 2012, Prescott's Microbiology 2011).

Fase de crecimiento exponencial es la fase de crecimiento propiamente dicha y, simplificando el desarrollo matemático,

$$dN/dt = \mu N$$

$$N = N_0 e^{\mu(t-t_0)}$$

se caracteriza mediante la siguiente ecuación:

$$\boxed{\ln N - \ln N_0 = \mu (t - t_0)} \quad \text{ó} \quad \boxed{\log N - \log N_0 = \mu / 2,303 (t - t_0)}$$

siendo la constante de proporcionalidad μ , un índice de la velocidad de crecimiento que se denomina **constante específica de velocidad de crecimiento** (velocidad de crecimiento por unidad de biomasa) y tiene unidades de tiempo (h^{-1}).

Es posible utilizar otros parámetros como por ejemplo, el tiempo que tarda en duplicarse la población o **tiempo de generación, g**.

$$g = 0,693/\mu$$

Al inverso del tiempo de generación se le denomina **velocidad de crecimiento (K)** y sus dimensiones son generaciones/hora.

$$K = 1/g$$

Podemos calcular el valor de μ_{\max} (velocidad máxima) de crecimiento para un microorganismo y un sustrato dado. Para ello se realizan curvas de crecimiento con concentraciones crecientes de sustrato y se determinan los valores de μ para cada concentración estudiada.

$$\mu = \mu_{\max} S/(K_s + S)$$

siendo, K_s la constante de saturación para ese sustrato e igual a la concentración de sustrato para la cual $\mu = \frac{1}{2} \mu_{\max}$.

También podemos utilizar la siguiente transformación de la ecuación:

$$1/\mu = 1/\mu_{\max} + (K_s/\mu_{\max}) (1/S)$$

En la **fase estacionaria** se pueden determinar dos parámetros interesantes: **cosecha máxima y rendimiento**.

Cosecha máxima es la biomasa máxima obtenida. Su cálculo se realiza mediante la expresión siguiente:

$$M = M_t - M_0$$

siendo, M_t la biomasa en el tiempo t y se calcula en el momento en de la fase estacionaria en el que el número de células es más elevado y M_0 la biomasa del inóculo. El resultado se expresa en gramos, miligramos, etc

Rendimiento es la biomasa producida por cantidad de sustrato consumida. Para su cálculo se utiliza la siguiente expresión:

$$Y = \text{Biomasa producida/Sustrato consumido} = (M_t - M_0)/(S_0 - S_t)$$

siendo, S_0 la cantidad de sustrato al inicio del cultivo y S_t la cantidad de sustrato en el tiempo (t) en el que se obtiene el número de células más elevado. El resultado se expresa como g de células/g de sustrato consumido.

Hasta aquí los aspectos teóricos del estudio del crecimiento microbiano, pero ¿cómo se analizan los resultados obtenidos en el laboratorio o planteados en un problema? A continuación veremos como *trabajar* los datos.

Los problemas más sencillos que nos pueden plantear son aquellos en los que conocidos varios términos (p.e. densidad inicial de microorganismos, valor de μ y tiempo) nos pidan resolver una incógnita (en este ejemplo, densidad final de microorganismos). Para ello nos bastará con sustituir en las ecuaciones anteriores los términos conocidos y resolver.

Estos problemas son muy sencillos pero deberemos tener cuidado con las unidades o con la necesidad de transformar algún dato, expresado de forma que no está recogida en la fórmula (p.e. desconocemos μ pero nos dan el valor de g).

Con esta base, se deben **proponer soluciones** para los problemas siguientes:

- 4.1. Si partimos de 10^4 UFC/ml en un cultivo que tiene un tiempo de generación de 2 h, ¿cuántas células cultivables tendremos al cabo de 4, 24 y 48 h de cultivo?
- 4.2. ¿Cuál es el tiempo de generación de un cultivo que tiene una constante específica de velocidad de crecimiento de $0,01 \text{ min}^{-1}$? ¿Cuál será su velocidad de duplicación?
- 4.3. Si se quiere conseguir que un cultivo crezca hasta una densidad celular de 10^8 células/ml en 3 h, y el tiempo de generación es de 30 min., ¿cuál debe ser la densidad celular al comienzo del cultivo?
- 4.4. Tenemos un cultivo de densidad 10^8 células/ml, con un tiempo de generación de 30 min. Si la densidad inicial fue de 10^6 células/ml, ¿que tiempo de incubación ha sido necesario para alcanzar la densidad final mencionada?

- 4.5. Supongamos un cultivo en fase exponencial que en un momento dado tiene 10.000 células/ml y cuatro horas más tarde 100.000.000 células/ml. Calcular μ y g.
- 4.6. En una comida campestre se contaminó la paella con 46 células de *Propionibacterium acnes*. Si *P. acnes* tiene un tiempo de generación de 90 minutos y una fase de latencia (fase lag) de 1,5 h ¿cuántas células de esta bacteria estarán presentes en la paella al cabo de 10 h?
- 4.7. Un carnicero, portador asintomático de *Salmonella*, picó carne sin proteger sus manos con guantes. La carne picada se contaminó con 25 células de *Salmonella spp.* y con 32 células de *S. enterica*. Sabiendo que *Salmonella spp.* Tiene un tiempo de generación de 30 minutos y una fase de latencia de 3 h y que la constante específica de la velocidad de crecimiento de *S. enterica* en la carne es $0,17 \text{ h}^{-1}$ y la duración de su fase de latencia 5 h calcule el número de células del género *Salmonella* que habrá en la carne 10 h después de ser picada.
- 4.8. Se produce un vertido de aguas residuales urbanas en una playa. La densidad de *E. coli* y de *Enterococcus faecalis* en las aguas residuales es de $7,8 \cdot 10^{10}$ y $6,2 \cdot 10^9$ células/100 ml, respectivamente. El factor de dilución del vertido al incorporarse a la playa es de 1/1000. Dado que la concentración de nutrientes en la playa es baja, el crecimiento de ambos microorganismos está ralentizado. El tiempo de generación de *E. coli* es de 3 horas mientras que la constante específica de la velocidad de crecimiento de *Ent. faecalis* es $0,11 \text{ h}^{-1}$. Con los datos que se indican ¿podría indicar cual será el número de células por mililitro, de cada una de estas bacterias, en el agua de la playa 24 horas después del vertido?
- 4.9. Calcular el rendimiento de producción de biomasa por gramo de carbono consumido de un cultivo que produce 20 gramos por litro de células cuando utiliza como única fuente de carbono una solución de glucosa al 10% (peso/volumen).

Sin embargo, en el laboratorio, cuando estudiamos el crecimiento microbiano, los problemas no son tan sencillos o de resolución tan directa. Veamos un ejemplo:

En el laboratorio se inocula un matraz que contiene 100 ml de medio de cultivo X con el microorganismo Y. Se incuba a XX°C con agitación y periódicamente se recogen alícuotas para determinar el número de UFC/ml. Los datos se expresan una tabla como la del siguiente ejemplo (datos en negro):

| Tiempo (h) | Nº UFC/ml | Ln Nº UFC/ml (1) | Ln D _x - Ln D _{x-1} (2) |
|------------|----------------------|------------------|---|
| 0 | 2,05 10 ⁶ | 14,53 | 0 |
| 1 | 2,04 10 ⁶ | 14,53 | -0,02 |
| 2 | 2,01 10 ⁶ | 14,51 | 0,07 |
| 3 | 2,14 10 ⁶ | 14,58 | 0,09 |
| 4 | 2,34 10 ⁶ | 14,67 | 0,14 |
| 5 | 2,69 10 ⁶ | 14,81 | 0,34 (3) |
| 6 | 3,80 10 ⁶ | 15,15 | 0,32 |
| 7 | 5,25 10 ⁶ | 15,47 | 0,35 |
| 8 | 7,41 10 ⁶ | 15,82 | 0,37 |
| 9 | 1,07 10 ⁷ | 16,19 | 0,34 |
| 10 | 1,51 10 ⁷ | 16,53 | 0,19 |
| 11 | 1,82 10 ⁷ | 16,72 | 0,09 |
| 12 | 1,99 10 ⁷ | 16,81 | 0,02 |
| 13 | 2,04 10 ⁷ | 16,83 | -0,06 |
| 14 | 1,91 10 ⁷ | 16,77 | 0,05 |
| 15 | 2,02 10 ⁷ | 16,82 | |

Pasos a seguir para definir los parámetros de crecimiento de este microorganismo XX:

- Transformar el Nº de UFC/ml (en este caso) a log decimal o Ln (datos en rojo) (1).
- Determinar el incremento en densidad de un tiempo al siguiente (2).
- Buscar aquellos tiempos en los que la variación del crecimiento es constante (3).
- Calcular la recta que relaciona, en este intervalo (3), tiempo vs densidad: $\text{Ln } N/\text{ml} = 0,3486 t + 13,0752$. La pendiente nos da el valor de $\mu = 0,3486 \text{ h}^{-1}$.
- Para calcular la cosecha máxima debemos calcular la densidad máxima, en fase estacionaria, y la densidad inicial. Podemos determinar un valor máximo (en este caso $2,04 \cdot 10^7$ UFC/ml) y un valor inicial ($2,05 \cdot 10^6$ UFC/ml) o, asumiendo que las fases estacionarias y lag están representados por la media de los valores máximos y mínimos en los que no hay variación ($1,88 \cdot 10^7$ y $2,14 \cdot 10^6$ UFC/ml, respectivamente). En el primer caso, el valor de M sería $1,835 \cdot 10^7$ UFC/ml; y en el segundo, $1,666 \cdot 10^7$ UFC/ml. Es decir, una variación mínima.

Teniendo en cuenta esta información, se deben **proponer soluciones** para los problemas siguientes:

4.10. Los datos de la fase exponencial de crecimiento de tres especies bacterianas que utilizan glucosa como fuente de carbono son los siguientes:

| Especie A | | Especie B | | Especie C | |
|------------|-------|------------|-------|------------|-------|
| Tiempo (h) | Log N | Tiempo (h) | Log N | Tiempo (h) | Log N |
| 4 | 4,64 | 3 | 5,30 | 5 | 6,22 |
| 5 | 4,81 | 4 | 5,44 | 6 | 6,37 |
| 6 | 4,98 | 5 | 5,58 | 7 | 6,52 |
| 7 | 5,15 | 6 | 5,72 | 8 | 6,67 |
| 8 | 5,32 | 7 | 5,86 | 9 | 6,82 |

Indique cual de las tres especies crecerá más rápidamente. Razone la respuesta

4.11. Los resultados para *E. coli* en dos medios diferentes (mismas condiciones de incubación) son los reflejados en la tabla. ¿Cuál de los dos medios seleccionaría para estudios posteriores?

| Tiempo (horas) | N° de células/ml | |
|----------------|-------------------|-------------------|
| | Medio A | Medio B |
| 0 | $2,09 \cdot 10^6$ | $2,29 \cdot 10^5$ |
| 1 | $2,04 \cdot 10^6$ | $2,24 \cdot 10^5$ |
| 2 | $1,99 \cdot 10^6$ | $2,25 \cdot 10^5$ |
| 3 | $2,63 \cdot 10^6$ | $2,19 \cdot 10^5$ |
| 4 | $3,47 \cdot 10^6$ | $2,23 \cdot 10^5$ |
| 5 | $4,68 \cdot 10^6$ | $3,16 \cdot 10^5$ |
| 6 | $6,17 \cdot 10^6$ | $4,47 \cdot 10^5$ |
| 7 | $7,94 \cdot 10^6$ | $6,46 \cdot 10^5$ |
| 8 | $8,32 \cdot 10^6$ | $9,33 \cdot 10^5$ |
| 9 | $8,51 \cdot 10^6$ | $1,32 \cdot 10^6$ |
| 10 | $8,33 \cdot 10^6$ | $1,29 \cdot 10^6$ |
| 11 | $8,13 \cdot 10^6$ | $1,26 \cdot 10^6$ |

4.12. Con el objetivo de hacer una curva de crecimiento de la bacteria *E. coli* en caldo nutritivo se inocula un matraz con caldo nutritivo (37°C, 100 r.p.m.). Cada hora se extraen 2 ml del matraz y se mide la absorbancia, obteniendo los siguientes resultados:

| Tiempo (h) | Absorbancia | Tiempo (h) | Absorbancia |
|------------|-------------|------------|-------------|
| 0 | 0,0022 | 6 | 0,1108 |
| 1 | 0,0021 | 7 | 0,1643 |
| 2 | 0,0088 | 8 | 0,1905 |
| 3 | 0,0192 | 9 | 0,2732 |
| 4 | 0,0315 | 10 | 0,2603 |
| 5 | 0,0506 | 11 | 0,2611 |

Paralelamente, a partir de un cultivo de *E. coli*, se preparan diferentes suspensiones celulares en las que se determina el número de bacterias/ml y la absorbancia, obteniéndose siguiente ecuación:
 $\text{Ln N}^\circ \text{ células/ml} = 20,688 \text{ Abs} + 15,387, r = 0,97.$

4.13. Previamente a la realización de una curva de crecimiento de la levadura *Kloeckera apiculata* en caldo YNB, se establecieron las relaciones Absorbancia vs. Densidad celular y Absorbancia vs. Peso seco. Para ello, a partir de una suspensión densa de levadura, se prepararon 10 diluciones a las que se mide la absorbancia (600 nm), y se determinaron la densidad celular y el peso seco, obteniéndose los siguientes resultados:

| Absorbancia | Densidad celular (x10 ⁵ cel/ml) | Peso seco (mg/ml) |
|-------------|--|-------------------|
| 0,203 | 15,43 | 0,06 |
| 0,076 | 7,08 | 0,02 |
| 0,079 | 7,18 | 0,02 |
| 0,325 | 28,80 | 0,08 |
| 0,11 | 10,90 | 0,038 |
| 0,095 | 5,33 | 0,035 |
| 0,47 | 47,00 | 0,169 |
| 0,237 | 24,90 | 0,06 |
| 0,865 | 87,50 | 0,40 |
| 0,68 | 68,00 | 0,25 |

Posteriormente, se inoculó un matraz con 100 ml de caldo YNB con aproximadamente 10⁶ levaduras/ml. El matraz se incubó a 37°C con una agitación de 100 r.p.m. Periódicamente se extrajeron submuestras de 2 ml del matraz para medida de la absorbancia:

| Tiempo (h) | Absorbancia |
|------------|-------------|
| 0 | 0,11 |
| 1 | 0,25 |
| 2 | 0,47 |
| 3 | 1,01 |
| 4 | 1,03 |
| 5 | 1,10 |
| 6 | 1,05 |

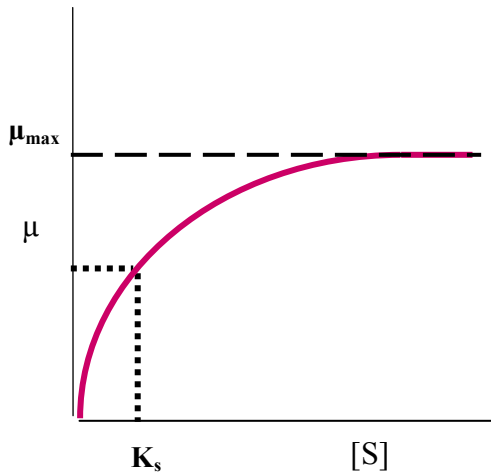
¿Cuál es la densidad del cultivo cuando entra en fase estacionaria? ¿Cuál es el peso seco del cultivo cuando entra en fase estacionaria?

4.14. Teniendo estos datos referidos a un cultivo bacteriano, calcular μ , g y cosecha máxima

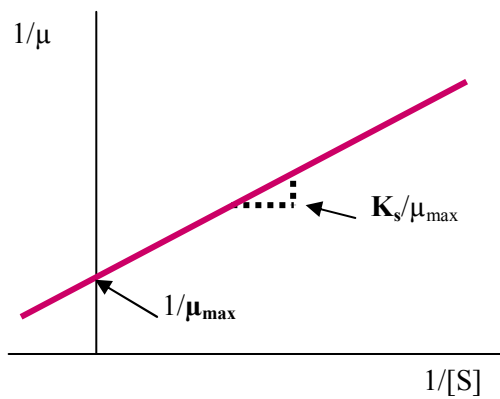
| Tiempo (h) | Células/ml | Tiempo (h) | Células/ml | Tiempo (h) | Células/ml | Tiempo (h) | Células/ml |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 0 | 1000000 | 4 | 3650000 | 8 | 28100000 | 12 | 121000000 |
| 1 | 1100000 | 5 | 6080000 | 9 | 39100000 | 14 | 105000000 |
| 2 | 1600000 | 6 | 9900000 | 10 | 70100000 | | |
| 3 | 2620000 | 7 | 18000000 | 11 | 102000000 | | |

Tras calcular μ , g y cosecha máxima y, sabiendo que la concentración de sustrato inicial es de 5 mg S/ml y se agota durante el crecimiento, calcular el rendimiento.

Cuando nos piden calcular μ_{\max} , podemos hacerlo a partir de la representación gráfica de los valores de μ obtenidos cuando el microorganismo crece con diferentes concentraciones de sustrato, si bien, podemos obtener este valor a partir de la recta que la relaciona $1/\mu$ vs $1/S$.

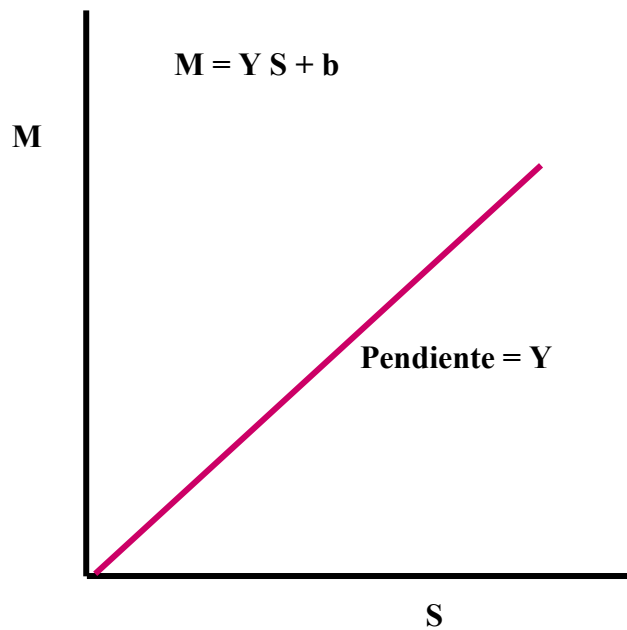


$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S}$$



$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{\max}} + \frac{K_s}{\mu_{\max}} \frac{1}{S}$$

Para calcular el rendimiento (Y), debemos obtener en primer lugar los valores de M (cosecha máxima) para cada curva realizada con una concentración determinada de sustrato y obtener la recta que relaciona M vs S (concentración de sustrato). Y será la pendiente de esa recta.



4.15. Se pretende obtener biomasa a partir de *Candida utilis*. El sustrato que se utilizará en la producción industrial es suero de leche (concentración de lactosa en el suero, 4%). Previamente, para establecer las condiciones adecuadas, se realizan cultivos discontinuos con 10 concentraciones distintas de lactosa, obteniéndose los siguientes datos:

| Concentración de lactosa (g/l) | μ (1/h) | Concentración de lactosa (g/l) | μ (1/h) |
|--------------------------------|-------------|--------------------------------|-------------|
| 1 | 0,083 | 10 | 0,332 |
| 2 | 0,143 | 12 | 0,351 |
| 4 | 0,221 | 14 | 0,367 |
| 6 | 0,273 | 16 | 0,366 |
| 8 | 0,310 | 20 | 0,368 |

Calcule: La constante de saturación del microorganismo para ese sustrato y la velocidad específica de crecimiento máxima.

Al representar la cosecha máxima (mg células/ml) obtenidas en cada cultivo discontinuo frente a la concentración de lactosa (mg lactosa/ml) se obtuvo la siguiente recta: $y = 0,0383 + 0,409 x$ ($r = 0,999$). ¿Cuál es el rendimiento de *Candida utilis*? y ¿Cuál será la cosecha obtenida usando como sustrato el suero de leche?

Bibliografía

Madigan, M.T., J.M. Martinko, D.A. Stahl, D.P. Clark. 2012. Brock Biology of Microorganisms, 13^a ed. Benjamin Cummings.

Willey, J.M., L.M. Sherwood, C.J. Woolverton. 2011. Prescott's Microbiology Companion Site, 8^a ed. McGraw-Hill Ryerson Ltd.

PROPUESTAS DE RESOLUCIÓN

4.1. $N_0 = 10^4$ UFC/ml, $g = 2$ h, ¿cuántas células cultivables tendremos al cabo de 4, 24 y 48 h de cultivo?

$$\begin{array}{l} \log N - \log N_0 = \mu / 2,303 \cdot (t-t_0) \quad y \quad g = 0,693/\mu \\ \log N = [\mu / 2,303 \cdot (t-t_0)] + \log N_0 \quad y \quad \mu = 0,693/g \quad \mu = 0,3465 \text{ h}^{-1} \end{array}$$

| | | |
|-------|--|---|
| 4 h: | $\log N = [0,3465 / 2,303 \cdot (4)] + 4$ | $N = 3,99 \cdot 10^4$ UFC/ml $N = 4,09 \cdot 10^7$ UFC/ml $N = 1,67 \cdot 10^{11}$ UFC/ml |
| 24 h: | $\log N = [0,3465 / 2,303 \cdot (24)] + 4$ | |
| 48 h: | $\log N = [0,3465 / 2,303 \cdot (48)] + 4$ | |

4.2. $\mu = 0,01 \text{ min}^{-1}$, ¿g? ¿K?

| | |
|-----------------|---|
| $g = 0,693/\mu$ | $g = 69,3 \text{ min} = 1,155 \text{ h}$ $K = 0,8685 \text{ h}^{-1}$ |
| $K = 1/g$ | |

4.3. $N = 10^8$ células/ml, $t = 3$ h, $g = 30$ min. ¿ N_0 ?

$$\begin{array}{l} \log N - \log N_0 = \mu / 2,303 \cdot (t-t_0) \quad y \quad g = 0,693/\mu \\ \log N - [\mu / 2,303 \cdot (t-t_0)] = \log N_0 \quad y \quad \mu = 0,693/g \quad \mu = 1,386 \text{ h}^{-1} \end{array}$$

$N = 1,56 \cdot 10^6$ células/ml

4.4. $N_0 = 10^4$ células/ml, $N = 10^8$ células/ml, $g = 30$ min. ¿t?

$$\log N - \log N_0 = \mu / 2,303 \cdot (t-t_0) \quad y \quad g = 0,693/\mu$$

$t = 3,323 \text{ h}$

4.5. $N_0 = 10.000$ células/ml, $N = 100.000.000$ células/ml, $t = 4$ h. ¿ μ ? ¿g?

$\mu = 2,303 \text{ h}^{-1} \quad g = 0,3 \text{ h}$

4.6. $N_0 = 46$ células, $g = 1,5$ h, fase lag = 1,5 h ¿Células tras 10 h?

$$\begin{array}{l} t = 10 \text{ h} - 1,5 \text{ h} = 8,5 \text{ h} \\ \log N - \log N_0 = \mu / 2,303 \cdot (t-t_0) \quad y \quad \mu = 0,693/g = 0,462 \text{ h}^{-1} \\ \log N = [\mu / 2,303 \cdot (t-t_0)] + \log N_0 = [0,462/2,303 (8,5)] + 1,663 = 3,368 \end{array}$$

$2,33 \cdot 10^3$ *Propionibacterium acnes*

4.7. *Salmonella spp.*, $N_0 = 25$ células, $g = 0,5$ h, fase lag = 3 h. *S. enterica*, $N_0 = 32$ células, $\mu = 0,17$ h⁻¹, fase lag = 5 h
 ; Células de *Salmonella* (*Salmonella spp.* + *S. entérica*) tras 10 h?

| | <i>Salmonella spp.</i> | <i>Salmonella enterica</i> |
|---------------------------|--|----------------------------|
| Fase lag (h) | 3 | 5 |
| μ (h ⁻¹) | 1,386 | 0,170 |
| g (h) | 0,50 | 4,08 |
| N_0 (células) | 25 | 32 |
| Tiempo de crecimiento (h) | 7 | 5 |
| N (células) | $3,98 \cdot 10^5$ | 74,8 |
| N (<i>Salmonella</i>) | <i>(Salmonella spp. + S. enterica)</i> $3,98 \cdot 10^5$ | |

4.8. Tras 24 h después del vertido ¿densidad por ml?

| | <i>E. coli</i> | <i>Enterococcus</i> |
|----------------------------------|----------------------|---------------------|
| Aguas residuales: células/100 ml | $7,8 \cdot 10^{10}$ | $6,2 \cdot 10^9$ |
| Vertido: células/100 ml | $7,8 \cdot 10^7$ | $6,2 \cdot 10^6$ |
| μ (h ⁻¹) | 0,231 | 0,11 |
| g (h) | 3 | 6,3 |
| Tiempo de crecimiento (h) | 24 | 24 |
| N (células/100 ml) | $1,99 \cdot 10^{10}$ | $8,71 \cdot 10^7$ |
| N (células/ml) | $1,99 \cdot 10^8$ | $8,71 \cdot 10^5$ |

4.9. ¿Rendimiento?

Solución de glucosa = 10 % (p/v) = 10 g/100 ml = 100 g/l

Biomasa = 20 g/l

$Y = \text{Biomasa producida} / \text{Glucosa consumida}$

$$\frac{20 \text{ g células/l}}{100 \text{ g glucosa/l}} = 0,2 \text{ g células/g glucosa}$$

4.10. ¿Que especie crece más rápido?

| Especie A | | Especie B | | Especie C | |
|--------------------------|---------------|--------------------------|---------------|--------------------------|---------------|
| Tiempo (h) | Log N | Tiempo (h) | Log N | Tiempo (h) | Log N |
| 4 | 4,64 | 3 | 5,30 | 5 | 6,22 |
| 5 | 4,81 | 4 | 5,44 | 6 | 6,37 |
| 6 | 4,98 | 5 | 5,58 | 7 | 6,52 |
| 7 | 5,15 | 6 | 5,72 | 8 | 6,67 |
| 8 | 5,32 | 7 | 5,86 | 9 | 6,82 |
| μ (h ⁻¹) | 0,3915 | μ (h ⁻¹) | 0,3224 | μ (h ⁻¹) | 0,3455 |
| g (h) | 1,77 | g (h) | 2,15 | g (h) | 2,01 |

4.11. ¿En que medio de cultivo crece mejor?

| Tiempo (horas) | Medio A | | Medio B | |
|--------------------------|----------------------------|---------------|----------------------------|---------------|
| | Células/ml | Ln células/ml | Células/ml | Ln células/ml |
| 0 | 2,09 10 ⁶ | 14,55 | 2,29 10 ⁵ | 12,34 |
| 1 | 2,04 10 ⁶ | 14,53 | 2,24 10 ⁵ | 12,32 |
| 2 | 1,99 10⁶ | 14,50 | 2,25 10 ⁵ | 12,32 |
| 3 | 2,63 10⁶ | 14,78 | 2,19 10 ⁵ | 12,30 |
| 4 | 3,47 10⁶ | 15,06 | 2,23 10⁵ | 12,31 |
| 5 | 4,68 10⁶ | 15,36 | 3,16 10⁵ | 12,66 |
| 6 | 6,17 10⁶ | 15,64 | 4,47 10⁵ | 13,01 |
| 7 | 7,94 10⁶ | 15,89 | 6,46 10⁵ | 13,38 |
| 8 | 8,32 10⁶ | 15,93 | 9,33 10⁵ | 13,75 |
| 9 | 8,51 10 ⁶ | 15,96 | 1,32 10⁶ | 14,09 |
| 10 | 8,33 10 ⁶ | 15,94 | 1,29 10 ⁶ | 14,07 |
| 11 | 8,13 10 ⁶ | 15,91 | 1,26 10 ⁶ | 14,05 |
| Fase lag (h) | 3 | | 5 | |
| μ (h ⁻¹) | 0,2809 | | 0,3583 | |
| g (h) | 2,47 | | 1,93 | |
| M (células/ml) | 6,28 10⁶ | | 1,07 10 ⁶ | |

Fase exponencial

4.12. $\text{Ln } N^\circ \text{ células/ml} = 20,688 \text{ Abs} + 15,387$, $r = 0,97$. ¿Densidad del cultivo en fase estacionaria?

| Tiempo (h) | Absorbancia | Ln células/ml | Células/ml |
|-------------------------|-------------|---------------|-------------------|
| 0 | 0,0022 | 15,43 | $5,03 \cdot 10^6$ |
| 1 | 0,0021 | 15,43 | $5,03 \cdot 10^6$ |
| 2 | 0,0088 | 15,57 | $5,78 \cdot 10^6$ |
| 3 | 0,0192 | 15,78 | $7,13 \cdot 10^6$ |
| 4 | 0,0315 | 16,04 | $9,25 \cdot 10^6$ |
| 5 | 0,0506 | 16,43 | $1,37 \cdot 10^7$ |
| 6 | 0,1108 | 17,68 | $4,77 \cdot 10^7$ |
| 7 | 0,1643 | 18,79 | $1,45 \cdot 10^8$ |
| 8 | 0,1905 | 19,33 | $2,48 \cdot 10^8$ |
| 9 | 0,2732 | 21,04 | $1,37 \cdot 10^9$ |
| 10 | 0,2603 | 20,77 | $1,05 \cdot 10^9$ |
| 11 | 0,2611 | 20,79 | $1,07 \cdot 10^9$ |
| Media fase estacionaria | | | $1,16 \cdot 10^9$ |

Fase estacionaria

4.13. ¿Densidad del cultivo en fase estacionaria? ¿Peso seco del cultivo en fase estacionaria?

| Absorbancia | Densidad celular ($\times 10^5 \text{ cel/ml}$) | Peso seco (mg/ml) |
|-------------|---|-------------------|
| 0,203 | 15,43 | 0,06 |
| 0,076 | 7,08 | 0,02 |
| 0,079 | 7,18 | 0,02 |
| 0,325 | 28,80 | 0,08 |
| 0,11 | 10,90 | 0,038 |
| 0,095 | 5,33 | 0,035 |
| 0,47 | 47,00 | 0,169 |
| 0,237 | 24,90 | 0,06 |
| 0,865 | 87,50 | 0,40 |
| 0,68 | 68,00 | 0,25 |

$$\text{Ln } N \text{ células/ml} = 3,391 \text{ Abs} + 13,433$$

$$\text{Peso seco/ml} = 0,444 \text{ Abs} - 0,026$$

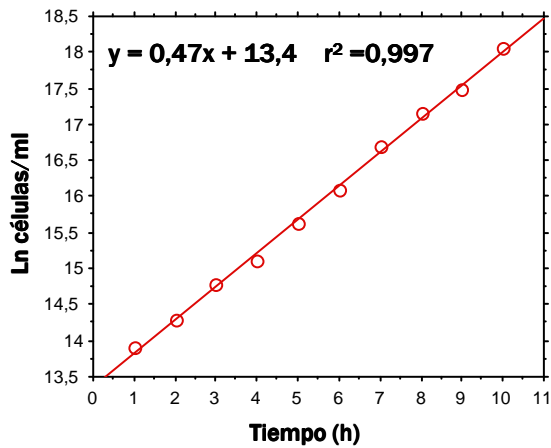
| Tiempo (h) | Absorbancia | Ln células/ml | Células/ml | Peso seco/ml |
|-------------------------|-------------|---------------|--------------------|--------------|
| 0 | 0,11 | 13,81 | $9,95 \cdot 10^5$ | 0,023 |
| 1 | 0,25 | 14,28 | $1,59 \cdot 10^6$ | 0,085 |
| 2 | 0,47 | 15,03 | $3,37 \cdot 10^6$ | 0,183 |
| 3 | 1,01 | 16,86 | $2,10 \cdot 10^7$ | 0,423 |
| 4 | 1,03 | 16,93 | $2,25 \cdot 10^7$ | 0,431 |
| 5 | 1,10 | 17,16 | $2,84 \cdot 10^7$ | 0,463 |
| 6 | 1,05 | 16,99 | $2,39 \cdot 10^7$ | 0,440 |
| Media Fase estacionaria | | | $2,395 \cdot 10^7$ | 0,439 |

Fase estacionaria

4.14. ¿ μ , g y cosecha máxima?

| Tiempo (h) | Células/ml | Ln células/ml |
|------------|------------|---------------|
| 0 | 1000000 | 13,816 |
| 1 | 1100000 | 13,911 |
| 2 | 1600000 | 14,286 |
| 3 | 2620000 | 14,779 |
| 4 | 3650000 | 15,11 |
| 5 | 6080000 | 15,621 |
| 6 | 9900000 | 16,108 |
| 7 | 18000000 | 16,706 |
| 8 | 28100000 | 17,151 |
| 9 | 39100000 | 17,482 |
| 10 | 70100000 | 18,065 |
| 11 | 102000000 | 18,44 |
| 12 | 121000000 | 18,611 |
| 14 | 105000000 | 18,469 |

Fase exponencial



$\mu = 0,47 \text{ h}^{-1}$

$g = 1,47 \text{ h}$

Cosecha = $1,21 \cdot 10^8 - 1 \cdot 10^6 = 1,20 \cdot 10^8 \text{ cel/ ml}$

$Y = \frac{1,20 \cdot 10^8 \text{ células/ ml}}{5 \text{ mg/ml}} = 2,4 \text{ células/mg sustrato}$

4.15. ¿Constante de saturación para la lactosa?

| Concentración de lactosa (g/l) | μ (1/h) | 1/ lactosa (l/g) | 1/ μ (h) |
|--------------------------------|-------------|------------------|--------------|
| 1 | 0,083 | 1 | 12,0481928 |
| 2 | 0,143 | 0,5 | 6,99300699 |
| 4 | 0,221 | 0,25 | 4,52488688 |
| 6 | 0,273 | 0,166666667 | 3,66300366 |
| 8 | 0,310 | 0,125 | 3,22580645 |
| 10 | 0,332 | 0,1 | 3,01204819 |
| 12 | 0,351 | 0,0833333333 | 2,84900285 |
| 14 | 0,367 | 0,071428571 | 2,72479564 |
| 16 | 0,366 | 0,0625 | 2,73224044 |
| 20 | 0,368 | 0,05 | 2,7173913 |

$$1/\mu = 9,9646 \cdot 1/S + 2,0486 \quad R^2 = 0,9994$$

$$\mu_{\max} = 1/2,0486 = 0,4881 \text{ h}^{-1}$$

$$K_s = 9,9646 \mu_{\max} = 4,864 \text{ g/l}$$

$$\text{mg células/ml} = 0,0383 + 0,409 \text{ mg lactosa/ml} \quad (r = 0,999)$$

$$Y = 0,409 \text{ mg células/mg lactosa}$$

$$\text{Lactosa en suero de leche} = 4 \% = 4 \text{ g/100 ml} = 40 \text{ mg/ml}$$

$$M_{\text{suero de leche}} = 16,4 \text{ mg células/ml}$$