**Determinación de parámetros cinéticos de crecimiento de un microorganismo en un sustrato dado por turbidez**

1. Trazar la curva de McFarland que relaciona turbidez (BaSO4) con crecimiento microbiano (µicroorganismos/mL).
2. Realizar un ajuste regresión lineal que permita relacionar de forma adecuada el crecimiento microbiano con la turbidez. Determinar los parámetros de regresión lineal: pendiente (m), ordenada al origen (b) y coeficiente de correlación (r2), Para que el método de cuantificación tenga validez, la curva debe presentar r2≥0.9.

La ecuación resultante tendrá la siguiente forma:

 (y=mx+b)

1. Realizar la medición de la muestra problema a distintos tiempos de crecimiento.
2. Determinar el la concentración de microorganismos presentes asociados a turbidez despejando de la curva de regresión lineal obtenida a partir de la curva de McFarland, para cada tiempo.

Lee la sección final de este documento “Limite de detección” para saber cual es la concentración minima que debes reportar para cada método

1. Trazar la curva de crecimiento bacteriano, para lo cual es necesario realizar una gráfica de concentración microbiana en función del tiempo de incubación

**Cuidado!!! Si vez valores anómalos, debes identificarlos y eliminarlos, de la misma manera que en la curva de McFarland**

1. Identificar en la curva las fases del crecimiento microbiano: fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte (de ser posible).

Para identificar los parámetros cinéticos de crecimiento microbiano, es necesario ubicarse en la fase de crecimiento exponencial, en la cual es posible llevar a cabo su evaluación, ya que en esta sección (al igual que en la de muerte) .

Además, para establecer un modelo adecuado, es necesario tomar en cuenta que la reproducción de los microorganismos se da por fisión binaria, es decir, con una base 2 (21.22.23.24.25…).

Y recurrimos al cálculo diferencial e integral para modelar el fenómeno, sabiendo que:

(el crecimiento del microorganismo problema con respecto al tiempo estará en función de una constante cinética y de una concentración inicial inoculada).

Donde:

N= concentración del microorganismo (microorganismos/mL)

t = tiempo de incubación (min)

k= constante de velocidad de crecimiento ( t-1)

Resolviendo la ecuación por variables separables, tenemos que:

Donde:

Nf= concentración final del microorganismo (microorganismos/mL)al final de la fase exponencial

Ni= concentración inicial del microorganismo (microorganismos/mL) al inicio de la fase exponencial

ti= tiempo inicial de incubación al inicio de la fase exponencial (min)

tf= tiempo final de incubación al final de la fase exponencial (min)

k= constante de velocidad de crecimiento ( min-1)

Es necesario utilizar el log base 2 para modelar el crecimiento por fisión binaria, en caso de usar logaritmo natural (ln X) o logaritmo base 10 (log X), será necesario referenciarlo al modelo base 2, lo cual se traducirá con el uso de un término adicional para su conversión, para el logaritmo natural se necesitara ln 2 y para el log base 10, log102.

Nota: cuidado al consultar el Brook (Biología de los microorganismos pag. 143 fig. 6.7) el editor comienza explicando con el uso del logaritmo base 10 y termina tratando de explicar la constante cinética con logaritmo natural (es muy engañoso si no saben que es necesario realizar las conversiones logarítmicas adecuadas).

Despejando N, de la ecuación, tenemos que:

Sin embargo, se sabe que k(tf-ti)=n , donde:

n= número de generaciones, sustituyendo, tenemos la famosa ecuación

Que expresada como incrementos (integral definida) tenemos que:

Linealizando la ecuación, aplicando la función logaritmo base 2:

Para obtener el tiempo de generación (g) , **g= (/n)** =**1/k.**

Todos estos parámetros puedes obtenerlos fácilmente si tienen los puntos inicial y final de la fase exponencial de crecimiento. Sin mas ni mas.

Entonces, realiza tu gráfica de crecimiento para cada microorganismo, identifica el inicio y término de la fase exponencial y utiliza los valores de las coordenadas (tf, Nf) y (ti, Ni)

Otra forma de obtenerlo es mediante el **método gráfico,**

Para lo cual, es necesario trazar el grafico semilogaritmico de concentración en función de (tiempo logaritmo base 2 de la concentración microbiana para cada tiempo en la fase exponencial).

Después, obtener la ecuación de regresión lineal de éste gráfico, la pendiente obtenida de la regresión lineal será igual a la constante de velocidad de crecimiento y de alli se obtienen todos los parámetros estadísticos, ya que

m = k= 1/g= t/n

Por tanto, con el valor de la pendiente, ya tienes 3 parámetros cinéticos.

Y a partir de la ordenada al origen podemos determinar la concentración de microorganismos al inicio de la fase de crecimiento exponencial, ya que:

Lo único que tienes que hacer es:

Donde:

b = ordenada al origen (intersección con el eje)

Ni= concentración inicial del microorganismo (microorganismos/mL) al inicio de la fase exponencial.

Ahora calcula los parámetros cinéticos para los microorganismos evaluados. Recuerda que estos parámetros son específicos para cada microorganismo.

Compara los parámetros obtenidos para los microorganismos analizados. ¿Hay diferencia? ¿Cuál crece mas rápido?

Realízalo por los dos métodos: método algebraico y método gráfico y compáralos.

Para comparar dos métodos un parámetro fácil de utilizar es el cálculo de DPR (diferencia porcentual relativa), la cual se calcula de la siguiente manera:

Donde

X2= valor a comparar por método 1

X1= valor a comparar por método 2

DPR= diferencia porcentual relativa

Si dos métodos son iguales el valor de DPR será menor al 20% y si son diferentes, ese valor será mayor.

Aunque la mejor alternativa es utilizar una t de student, puedes apoyarte del DPR para llevar a cabo una comparación rápida de dos valores.

Ahora, tienes dos fuentes de datos la medición por nefelometría y la densidad óptica a 600 nm (D.O. 600 nm) :

1. Compara las curvas de McFarland obtenidas por nefelometría y por D.O a 600 nm. Recuerda el factor de correlación para convertir unidades nefelometricas a unidades klett

D.O. 600 nm= densidad óptica a 600 nm

U.K.= turbidez nefelometrica en unidades Klett

Puedes referenciar una a la otra y comparar la sensibilidad del método, es decir la pendiente de la curva (m) y también puedes comparar el límite de detección obtenido para cada método mediante (este puede calcularse con los parámetros de regresión lineal m y b, les envío un Excel propiedad del Dr. Francisco Rojo C. que puede ayudarlos a encontrar el límite de detección. Coloquen sus datos en la pestaña “Datos” del archivo “Curvas de McFarland para limite de detección” y lean el límite de detección estimado en la celda que lleva el nombre de CMD.

Utiliza tus datos de la curva de McFarland según el método que se te asignó, para el otro método selecciona los datos de uno de los equipos a los que les fue asignado (en tu informe debes poner de quien tomaste los datos)

Ahora calcula los parámetros cinéticos para cada microorganismo por cada método, utiliza el DPR para compararlos. Hazlo en una tabla.

LIMITE DE DETECCIÓN

Hay varios métodos para aproximarse al limite detección, uno de ellos es mediante el uso de blancos de método.

Para este caso, los pasos a seguir son los siguientes:

1. Lee por triplicado el valor de 3 blancos independientes (agua desionizada) como si fueran muestras.
2. Obtén el promedio () y la desviación estándar asociada ().
3. El valor del límite de detección se calcula como:

d) Tradúcelo con ayuda de tu curva de calibración a unidades de concentración (microorganismos/mL).

* Ahora cada vez que calcules una concentración de muestra menor a tu LD, infórmalo como <LD (menor al límite de detección).
* El uso del límite de detección te proporcionará una herramienta útil para establecer tu intervalo de trabajo y le dará confiabilidad a tus resultados.

El otro método es mediante las desviaciones estándar asociadas a la pendiente y ordenada al origen de la curva de calibración, este es una aproximación estadística.

Para calculo del limite de detección. Coloquen sus datos en la pestaña “Datos” del archivo “Curvas de McFarland para límite de detección” (En Moodle) y lean el límite de detección estimado en la celda que lleva el nombre de CMD.

El limite de detección nos dice cual es la concentración mínima que puedes reportar por el método utilizado y que debes en tu informe.

Por ejemplo:

Si el limite de detección (LD en la celda CMD) es menor (incluyendo valores negativos) a la concentración que obtuviste al interpretar tus valores de concentración de microorganismos entonces reportas: <LD, sustituyendo el valor de LD. Si LD=250 000 000 microorganismos/mL, entonces reportas la concentración de microorganismos como <250 000 000 microorganismos/mL.

Para el caso de tu curva de crecimiento, los valores menores al límite detección tómalos como un valor constante, en este caso 250 000 000 microorganismos/mL, ya que no puedes reportar una concentración por debajo de este valor, esto te servirá para identificar la fase de adaptación.