

MODELACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL pH Y LA TEMPERATURA EN LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE *Tsukamurella paurometabola* C-924

Nemecio González*, Jesús Zamora*, Carlos Pérez*, Eladio Salazar*, Eikel Pérez*, Armando Hernández*

*Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Camagüey

*En el presente trabajo se evaluaron tres modelos matemáticos descritos en la literatura para predecir la influencia del pH y la temperatura en la velocidad de crecimiento del microorganismo bionemática *Tsukamurella paurometabola*, Cepa C-924. Se empleó el medio de cultivo semi definido (SD), que tiene como principales nutrientes el extracto de levadura y la sacarosa. Se determinó que el modelo completo de Zwietering y col. (1991) es el que mejor describe la influencia de la temperatura en la velocidad específica de crecimiento. En el caso del pH, el modelo propuesto por Rosso y col. (1995) fue el de mejor ajuste. En este trabajo se propone un modelo combinado a partir de los modelos individuales de ambas variables. El modelo reveló que la mayor velocidad de crecimiento se obtuvo a un pH de 6,6 y a la temperatura de 36 °C.*

Palabras clave: Modelación, bionemática, *Tsukamurella paurometabola*.

*In the present study were evaluated three models mathematical described in the literature to predict the influence of pH and temperature on the rate of growth bionemática *Tsukamurella paurometabola* of the microorganism, strain C-924. Used the semi-defined culture medium (SD), which is the main nutrient yeast extract and sucrose. It was determined that the complete model of Zwietering et al. (1991) is the one that best describes the influence of temperature on the specific speed of growth. In the case of pH, the model proposed by Rosso et al. (1995) was the best fit. In this paper we propose a model combined from individual models of both variables. The model showed that a higher rate of growth was obtained at a pH of 6,6 and temperature of 36 °C.*

Keywords: Modeling, bionemática, *Tsukamurella paurometabola*.

Introducción

Existen diferentes condiciones ambientales que influyen en el crecimiento de los microorganismos, siendo la temperatura y el pH las principales condiciones físicas que pueden cambiar el comportamiento de los microorganismos durante el proceso fermentativo. La microbiología predictiva combina el conocimiento de la fisiología de los microorganismos con la potencia de la modelación matemática para realizar predicciones del crecimiento

Los modelos de crecimiento microbiano por lo general describen las variaciones en la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{\max}). Varios autores han propuesto modelos para describir los efectos individuales y combinados de la temperatura y el pH en μ_{\max} . Ratkowsky *et al.* /1/ y Rosso *et al.* /2/, han propuesto diferentes modelos matemáticos para describir la influencia de la temperatura y el pH en μ_{\max} usando correlacio-

nes empíricas. Zwietering *et al.* /2/ and Rosso *et al.* /3/ propusieron modelos generales, basados en los modelos matemáticos individuales, para describir el efecto combinado del pH y la temperatura en μ_{\max} .

Tsukamurella paurometabola, C924 es una bacteria aislada del suelo que actúa como agente biocontrolador contra nemátodos /4, 6/, pero las condiciones de crecimiento han sido poco estudiadas. Por ello el objetivo del presente trabajo es modelar matemáticamente la influencia del pH y la temperatura en el crecimiento de *Tsukamurella paurometabola*, C-924 para incrementar la productividad del proceso fermentativo de este agente bionemática.

Materiales y métodos

Microorganismo y medio de cultivo: Se usó el microorganismo *Tsukamurella paurometabola*, C-924, aislado del suelo. La bacteria fue cultivada

en el medio de cultivo semi definido (SD), que contiene a la sacarosa y el extracto de levadura como principales nutrientes.

Condiciones experimentales: Se incubó el microorganismo a diferentes temperaturas (28 °C; 30 °C; 33 °C; 37°C; 40 °C y 43 °C) y pH

(5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8 y 8,5) en biorreactor de tres litros (B.E.Marubishi). La velocidad de agitación fue 750 rpm y el flujo de aire 4,5 L/min (1,5 vvm). El pH se controló automáticamente adicionando H₃PO₄ al 20 % e hidróxido de amonio al 25 %.

Modelos

Crecimiento microbiano. La curva de crecimiento se describió empleando el modelo de Gompertz /7/.

$$y = \ln(N/N_o) = A \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_{\max} e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

donde:

e = exp(1)

μ_{\max} – velocidad específica de crecimiento máxima

A – Asíntota, que es el máximo valor alcanzado

λ – Tiempo de la fase lag de crecimiento

N/N_o – Población celular relativa

t – Tiempo

Relaciones de pH, temperatura y μ_{\max} .

Se usaron diferentes relaciones descritas en la literatura para modelar la influencia de la temperatura y el pH en μ_{\max} . (tabla 1).

Tabla 1
Modelos evaluados para describir la influencia de la temperatura y el pH en μ_{\max}

Modelo	Ecuación	Ref.
Temperatura		
Ratkowsky	$\mu_{\max} = [b_1 (T - T_{\min}) \{1 - \exp(c_1 (T - T_{\max}))\}]^2$	[1]
Zwietering	$\mu_{\max} = \mu_{opt} \left\{ \frac{(T - T_{\min}) (1 - \exp(c_2 (T - T_{\max})))}{(T_{opt} - T_{\min}) (1 - \exp(c_2 (T - T_{\max})))} \right\}^2$	[9]
Rosso	$\mu_{\max} = \mu_{opt} \frac{(T - T_{\max})(T - T_{\min})^2}{(T_{opt} - T_{\min})[(T_{opt} - T_{\min})(T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{\max})(T_{opt} + T_{\min} - 2T)]}$	[2]
pH		
Ratkowsky	$\mu_{\max} = [b_3 (pH - pH_{\min}) \{1 - \exp(c_3 (pH - pH_{\max}))\}]^2$	[1]
Zwietering	$\mu_{\max} = \mu_{opt} \left\{ \frac{(pH - pH_{\min}) (1 - \exp(c_4 (pH - pH_{\max})))}{(pH_{opt} - pH_{\min}) (1 - \exp(c_4 (pH - pH_{\max})))} \right\}^2$	[9]
Rosso	$\mu_{\max} = \mu_{opt} \frac{(pH - pH_{\max})(pH - pH_{\min})}{(pH - pH_{\min})(pH - pH_{\max}) - (pH - pH_{opt})^2}$	[2]

donde:

b_1, b_3, c_1, c_2, c_3 y c_4 – son coeficientes de ajuste de los modelos.

$T_{\max}, T_{\min}, pH_{\max}$ y pH_{\min} – son los valores de temperaturas y pH máximos y mínimos para los cuales se observa el crecimiento.

T_{opt} y pH_{opt} – son los valores de temperatura y pH, para los cuales μ_{\max} es óptimo.

Efecto combinado del pH y la temperatura en μ_{\max} . El efecto combinado de

la temperatura y el pH en μ_{\max} se determinó por la siguiente ecuación: /2, 3/

$$\mu_{\max} = \mu_{opt} \tau(T) \rho(pH)$$

donde:

$\tau(T)$ y $\rho(pH)$ son los modelos individuales de mejor ajuste que describen la influencia de la temperatura y el pH en μ_{\max}

μ_{opt} – es el valor de μ_{\max} para valores óptimos de temperatura y pH.

Resultados y discusión

Ajuste del efecto individual de la temperatura y el pH en μ_{\max}

Se ajustaron al modelo de Gompertz los datos del crecimiento de *Tsukamurella paurometabola* a diferentes valores de pH y temperatura. Se determinaron los valores de μ_{\max} para cada condición experimental. Todos los coeficientes de correlación fueron $R^2 \geq 0,95$.

Se ajustaron los valores de μ_{\max} obtenidos a las

diferentes condiciones de pH y temperatura a los modelos descritos previamente (tabla 1). De los coeficientes de correlación obtenidos se obtuvo que el modelo descrito por Rosso *et al.* /2/ para la evaluación de la influencia del pH en μ_{\max} fue el modelo de mejor ajuste. En el caso de la temperatura se seleccionó el modelo de Zwietering *et al.* /9/.

Los modelos individuales seleccionados se combinaron en el modelo cardinal de pH y temperatura. La siguiente ecuación describe el modelo combinado propuesto:

$$\mu_{\max} = \mu_{opt} \left\{ \frac{(T - T_{\min})(1 - \exp(c_2(T - T_{\max})))}{(T_{opt} - T_{\min})(1 - \exp(c_2(T - T_{\max})))} \right\}^2 \left\{ \frac{(pH - pH_{\max})(pH - pH_{\min})}{(pH - pH_{\min})(pH - pH_{\max}) - (pH - pH_{opt})^2} \right\}$$

Los valores obtenidos para las condiciones óptimas fueron: $T_{opt} = 35,47$; $pH_{opt} = 6,55$ y $\mu_{opt} = 0,638 \text{ h}^{-1}$

En la figura 1 se muestra el efecto combinado del pH y la temperatura en μ_{\max} .

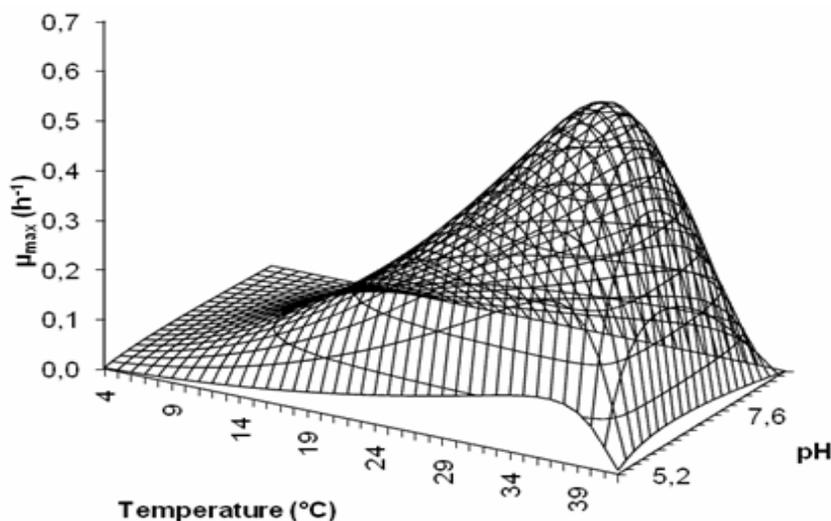


Fig. 1 Superficie de respuesta obtenida para el efecto combinado del pH y la temperatura en μ_{\max}

La respuesta del microorganismo a variaciones de pH consiste en una meseta de velocidad de crecimiento constante en un rango cercano al óptimo, como se ha descrito anteriormente por Presser *et al.* /10/. Además se observa que los valores de μ_{\max} crecen gradualmente hasta que se alcanza el valor de μ_{opt} a medida que la temperatura aumenta. Cuando la temperatura es mayor de T_{opt} los valores de μ_{\max} decrecen drásticamente debido a la inactivación de la enzima o enzimas limitantes de la reacción.

De la curva de influencia de la temperatura en la velocidad de crecimiento se obtuvo una energía de activación para la reacción limitante de 37,8 kJ/mol y una energía de inactivación de 227,2 kJ/mol. Estos valores son muy cercanos a los valores reportados para un amplio rango de microorganismos /10/.

Se corroboró el ajuste del modelo a los datos experimentales obteniendo la regresión lineal entre los valores de μ_{\max} observados y los calculados por el modelo. Se obtuvo la siguiente ecuación con un coeficiente de correlación de 0,977 8.

$$\mu_{\max\text{Observado}} = 1.023\mu_{\max\text{Calculado}} - 0.017$$

Una prueba de t-Student ($\alpha=0,05$) mostró que la ecuación obtenida es igual estadísticamente a la ecuación $y= x$ ($p_{\text{pendiente}}=0,299 4$, $p_{\text{constante}}=0,153 4$)

Estos modelos se han usado generalmente para predecir las fronteras crecimiento/no crecimiento de diferentes patógenos para aumentar la seguridad de los alimentos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que los modelos descritos son una herramienta adecuada para incrementar los rendimientos de los procesos fermentativos de microorganismos beneficiosos. En nuestro caso se obtuvo un incremento de los rendimientos del procesos fermentativo del biocontrolador *Tsukamurella paurometabola* C-924, creciendo al microorganismo a los valores óptimos de pH y temperatura.

Conclusiones

Se obtuvo un modelo combinado que describe la influencia del pH y la temperatura en la veloci-

dad específica máxima de crecimiento μ_{\max} . Estos resultados sugieren que la combinación de los diferentes modelos individuales que describen la influencia del pH y la temperatura en μ_{\max} puede ser una vía factible para modelar la influencia combinada de estos factores ambientales en el crecimiento de los microorganismos.

Bibliografía

- Ratkowsky D.A., Lowry R.K., Mcmeekin T.A., et.al. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *Journal of Bacteriology*, 1983, 154(3): 222 – 1226.
- Rosso, L., Lobry, J. R., Bajard, S., y Flandrois, J. P. Conveniente model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(2): 610-616.
- Zwietering M.H., Wiltjes T, De Wit J.C., And Van 'T Riet K. A decision support system for predictions of microbial spoilage in foods. *Journal of Food Protection*. 1992, 55: 973 – 979.
- Mena, J.; De La Riva, G.; Vázquez, R. P. et.al. Nematicidal agent and method for the bio-control of nematodes. February 1996, International Application Published Under the Patent Cooperation Treaty (PCT 0397), WO 96/04749
- Mena, J.; Pimentel, E.; Hernández, A. T. et.al. Mechanism of action of *Corynebacterium paurometabolum* strain C-924 on nematodes. *Nematology*, 2002a, 4(2): 287.
- Mena, J.; Veloz, L.; Vázquez, R. P. et.al. Population of *Corynebacterium paurometabolum* strain C-924 in soils treated with HeberNem. *Nematology*, 2002b, 4(2): 287.
- Zwietering M.H., Jongenburger I., Rombouts F.M., And Van 'T Riet K. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(6): 1875 – 1881.
- Zwietering M.H., De Koos J.T, Hasenack B.E., De Wit J.C., And Van 'T Riet K. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(4): 1094 – 1101.
- Presser K.A., Ratkowsky D.A., And Ross T. Modeling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and Lactic Acid concentration. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(6): 2355 – 2360.
- Dengremont E., Membré J.M., Statistical Approach for Comparison of the Growth Rates of Five Strains of *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(12): 4389 – 4395.