

Tema 5. Cinética microbiana

EL CRECIMIENTO puede considerarse como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de un organismo. En el caso de un organismo unicelular esto conduce a un aumento del número de individuos.

- **En sistema cerrado**: cultivo intermitente, discontinuo, no renovado o BATCH
- **En sistema abierto** o cultivo continuo con una variante: el cultivo alimentado por lotes o recargas.

Medición del crecimiento microbiano

- Concentración celular: número de células por unidad de volumen (Generalmente [10^6 cél/ml]). Se emplean una cámara de recuento y un microscopio. Es relativamente rápido y exacto. Existen coloraciones que permiten distinguir células vivas de células muertas. (Agotador!!)

Medición del crecimiento microbiano

- Recuento en caja de Petri: Requiere no menos de 24hs. Permite conocer si hay más de una especie presente en el medio de cultivo.
- Peso húmedo: Normalizadas las condiciones se centrifuga un determinado volumen. Errores considerables.
- Medida de la absorbancia: (generalmente a 600nm) como las células desvían la luz, la cantidad de ésta que llega al detector del espectrofotómetro es inversamente proporcional al número de células (Ley de Beer)
- Densidad celular: masa celular o biomasa seca por unidad de volumen: filtración a través de MF (0.2 ó 0,45 μm para bacterias o 1,2 μm para levaduras) [g/l]
- Sólidos suspendidos volátiles

Tiempo de generación: es el tiempo transcurrido para que una célula dé origen a otra (escisión binaria o gemación).

$$N_0 \quad \text{---} \vartheta \text{---} 2n_0 \quad (1\vartheta, 1 \text{ generación})$$

$$2n_0 \quad \text{---} \vartheta \text{---} 4n_0 = 2^2 n_0 \quad (2 \vartheta, 2 \text{ generaciones})$$

$$2^2 n_0 \quad \text{---} \vartheta \text{---} 2^3 n_0; \quad (3\vartheta, 3 \text{ generaciones})$$

$$N = 2^z n_0$$

$$\ln n = z \ln 2 + \ln n_0$$

$$\frac{\ln n - \ln n_0}{\ln 2} = z = \frac{t}{\vartheta}$$

$$\vartheta = \frac{t \ln 2}{\ln n - \ln n_0}$$

Velocidad específica de crecimiento (en función de n)

$$K = \frac{1}{n} \frac{dn}{dt}$$

$$\frac{dn}{n} = k dt \quad ;$$

$$\ln \frac{n}{n_0} = k t$$

$$n = n_0 e^{kt}$$

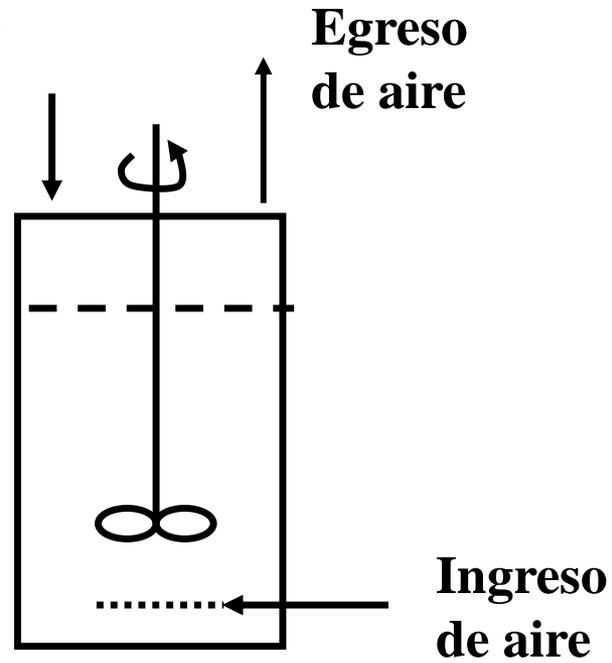
$$\text{Si } n = 2n_0 \longrightarrow t = \theta$$

$$\ln \frac{2n}{n_0} = k = \theta$$

$$\theta = \ln 2 / k$$

REACTOR DISCONTINUO

Control de pH



CINETICA MICROBIANA

SUSTRATO

BIOMASA

PRODUCTOS METABOLICOS

CRECIMIENTO MICROBIANO

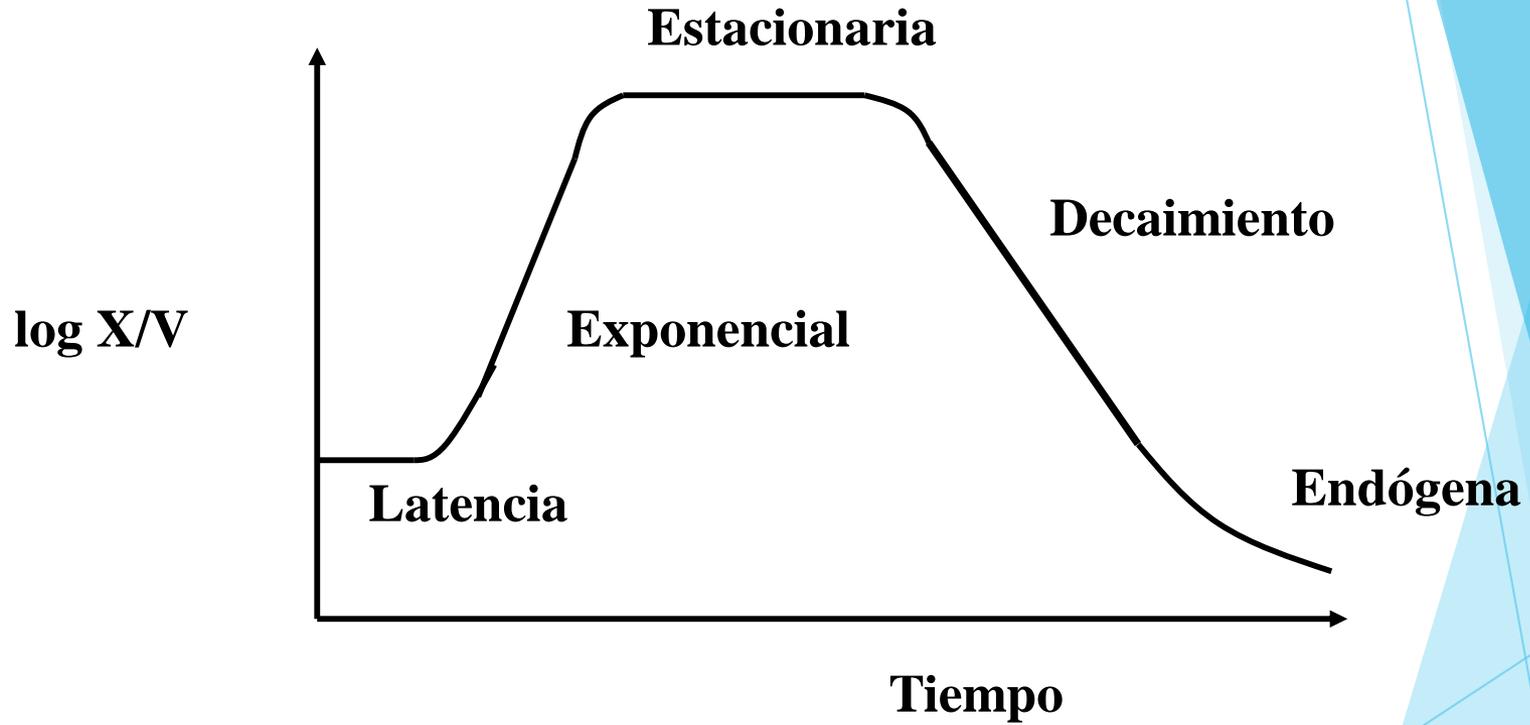
SIN RESTRICCIONES AL DESARROLLO

SUSTRATO LIMITANTE

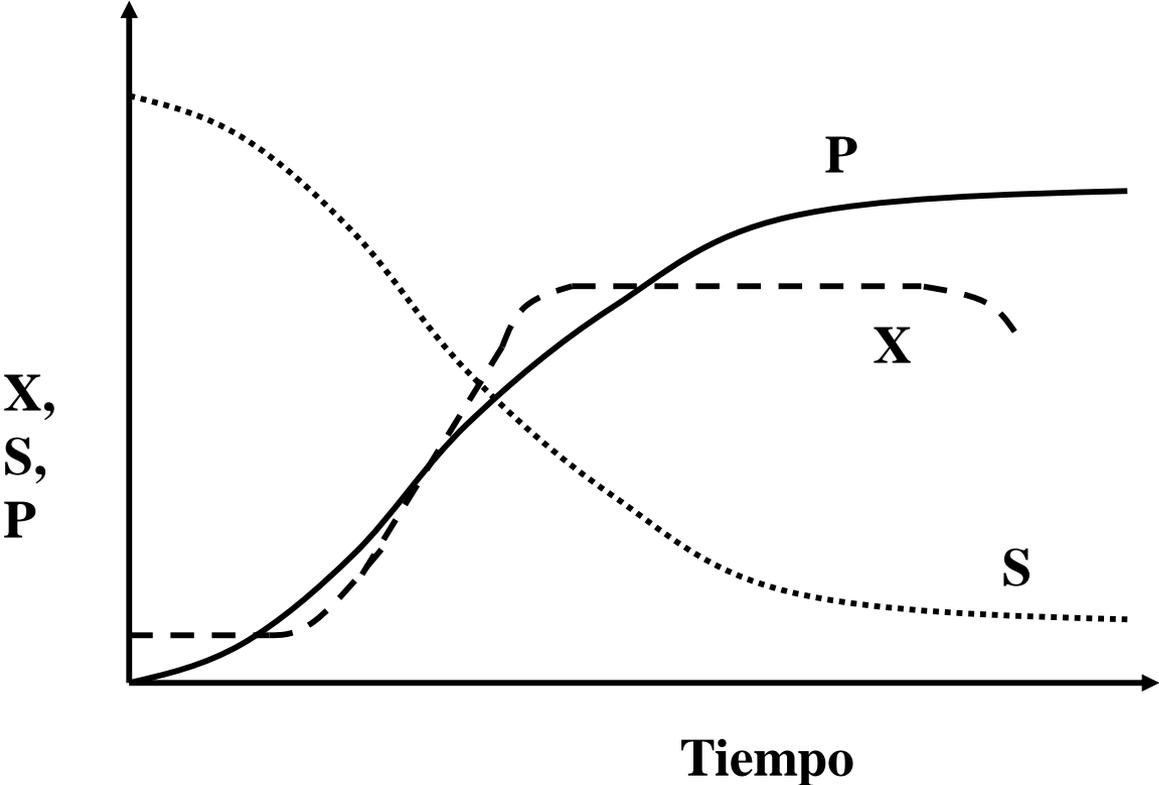
LIMITADO POR INHIBICION POR SUSTRATO O POR PRODUCTO

LIMITADO POR TRANSFERENCIA DE MATERIA

Crecimiento Bacteriano

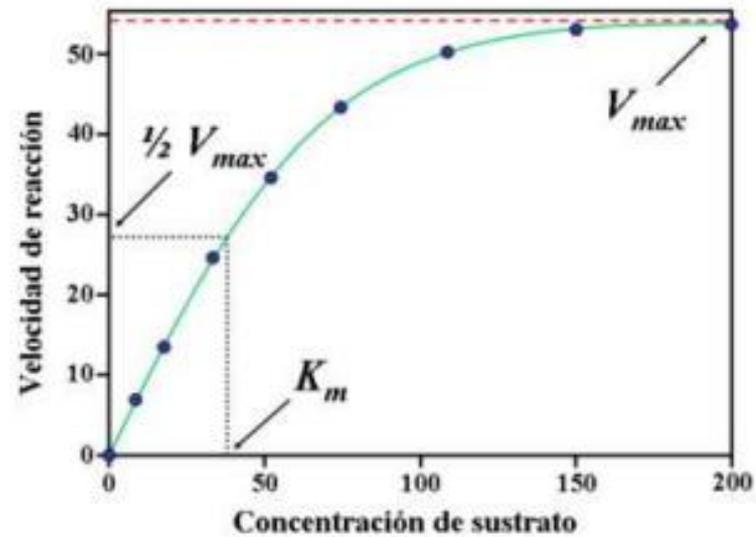


Crecimiento Bacteriano



Factores que afectan la VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

1. Concentración de sustrato



Modelo de crecimiento sin inhibidor

$$\mathbf{dX/dt = V_g = \mu X}$$

$$\mathbf{\mu = \mu_m S/(K_s + S) \quad Monod}$$

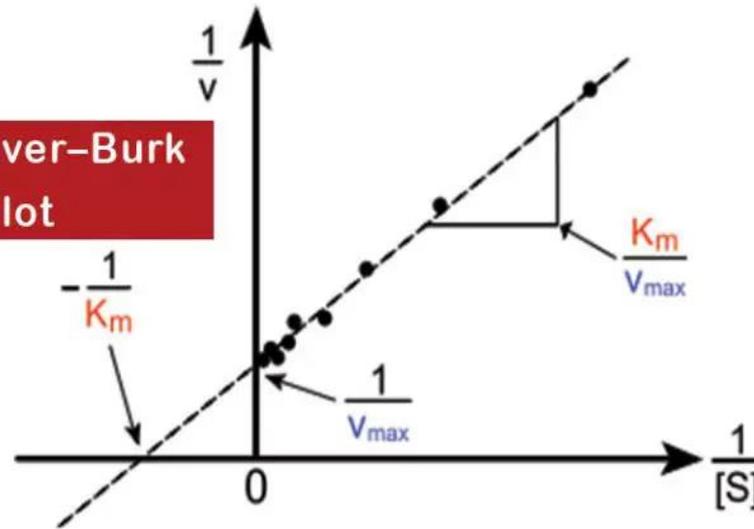
$$\mathbf{V_g = dX/dt = \mu_m XS/(K_s + S)}$$

$$\mathbf{R = Y = (dX/dt)/(dS/dt) \quad Productividad}$$

$$\mathbf{V_s = dS/dt = \mu_m S/Y(K_s + S) = kS/(K_s + S)}$$

$$\mathbf{k = \mu_m/Y}$$

Lineweaver-Burk Plot



$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Modelo de crecimiento sin inhibidor

$$V_d = k_d X \text{ decrecimiento}$$

$$V' = V_g - V_d$$

$$V'_g = \mu_m \frac{XS}{(K_s + S)} - k_d X$$

$$V'_g = \mu_m \frac{XS}{(K_s + S)} - k_d X = 0$$

$$\mu_m \frac{XS}{(K_s + S)} = k_d X$$

$$\mu_m \frac{XS_{\min}}{K_s} = k_d X$$

$$S_{\min} = k_d K_s / \mu_m$$

$S_{\min} = 0,1$ a $1,0$ mg/l en sistemas aerobios

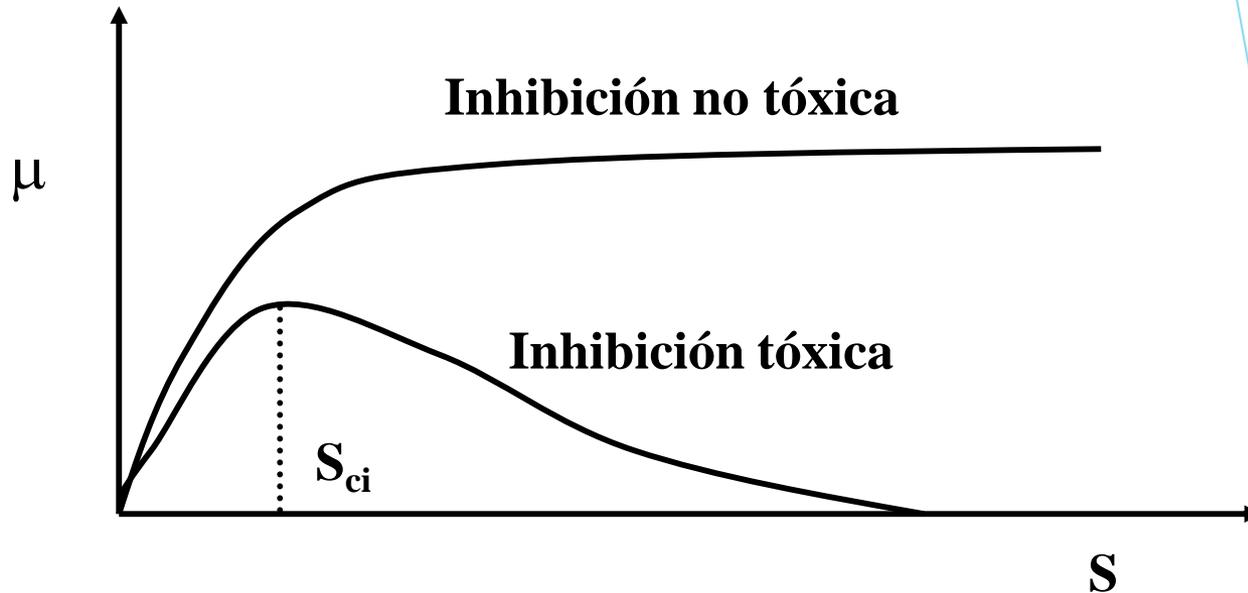
$0,01$ en sistemas anaerobios

Si $S < S_{\min}$ pero $S >$ regulación ambiental \longrightarrow cometabolismo

Cuando hay un inhibidor: ecuación de Andrews

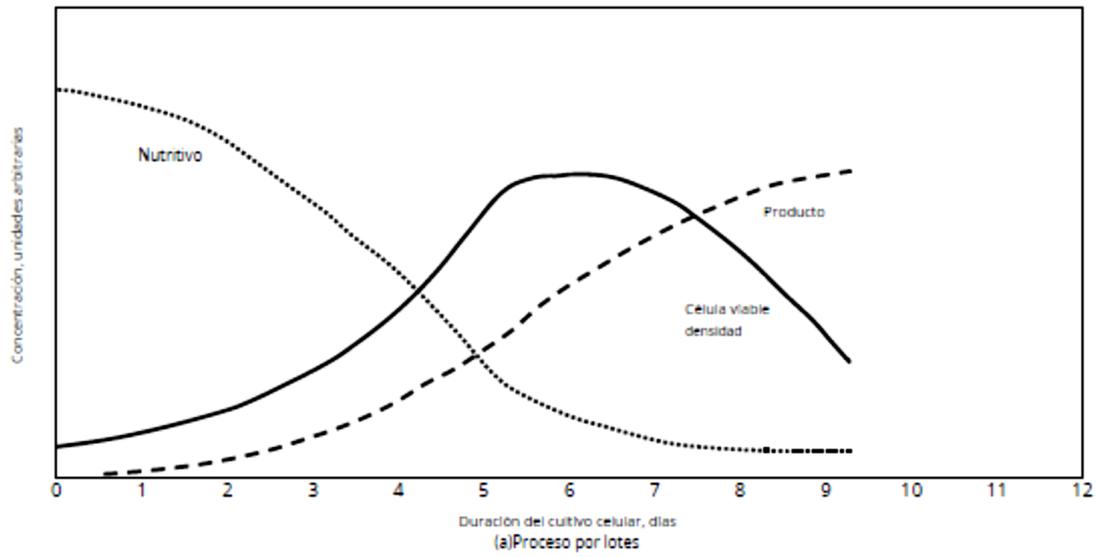
Inhibición por sustrato

$$dS/dt = \mu_m S/Y(K_s + S + S^2/K_i)$$

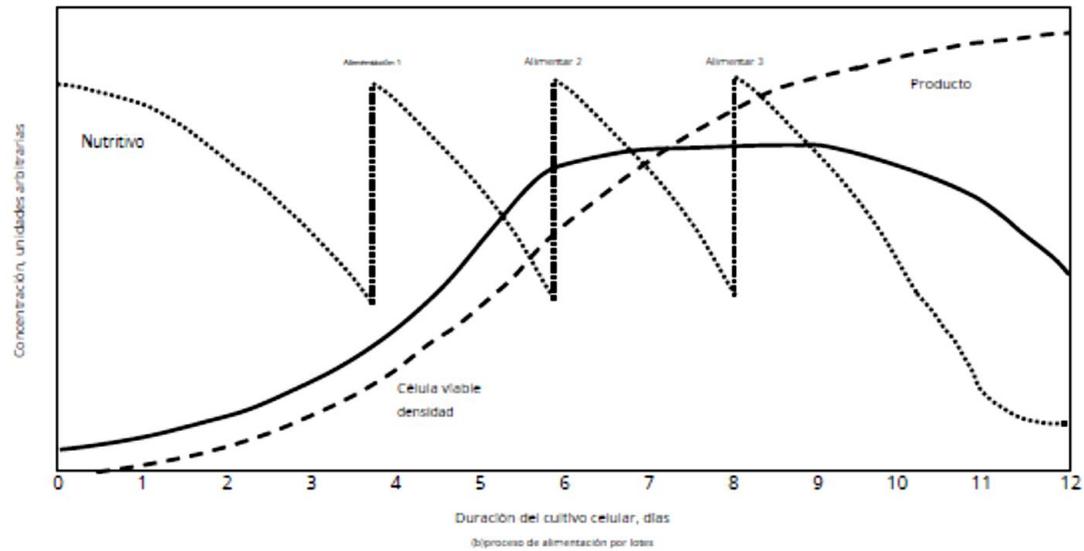


$$S_{cr} \longrightarrow d(dS/dt)/dS = 0$$

$$S_{cr} = (K_s/K_i)^{1/2}$$



Inhibición por sustrato



Lote alimentado

Modelo de crecimiento con varios sustratos

Limitación doble de sustrato

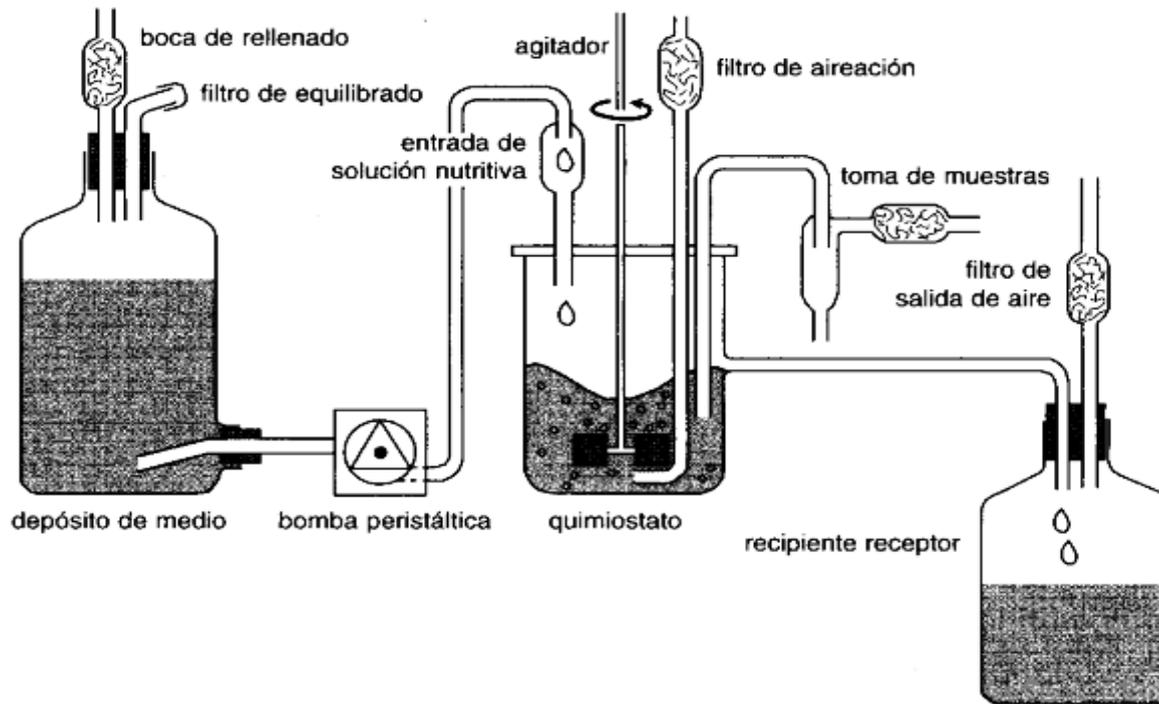
$$\mu = \mu_{\max 1} \frac{s_1}{s_1 + K_{s1}} \mu_{\max 2} \frac{s_2}{s_2 + K_{s2}}$$

Este esquema se puede replicar para varios sustratos y el producto de las μ_{\max} se reemplaza por una μ media

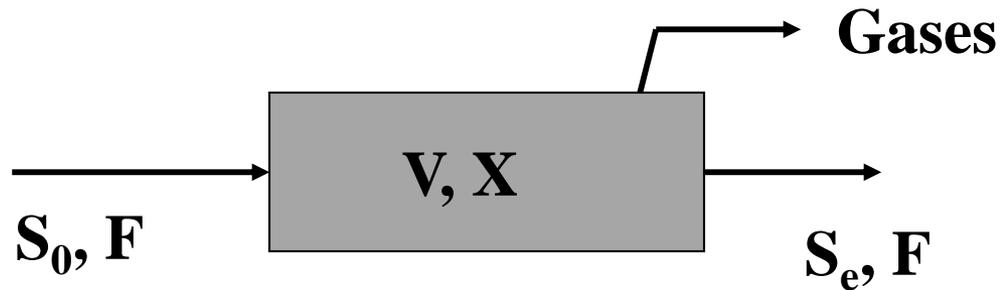
Inhibición por producto

$$\mu = \mu_{\max} \frac{s}{s + K_s} \frac{1}{1 + p/K_i}$$

REACTOR CONTINUO



REACTOR CONTINUO



Balance de masa

Acumulación = Entrada + crecimiento - salida

$$V(dX/dt) = FX_0 - FX + Vr'_g$$

$$V(dX/dt) = \mathbf{F}X_0 - \mathbf{F}X + V (\mu_m X S / (K_s + S) - k_d X)$$

$$dX/dt = (\mathbf{F}/V)X_0 - (\mathbf{F}/V)X + (\mu_m X S / (K_s + S) - k_d X)$$

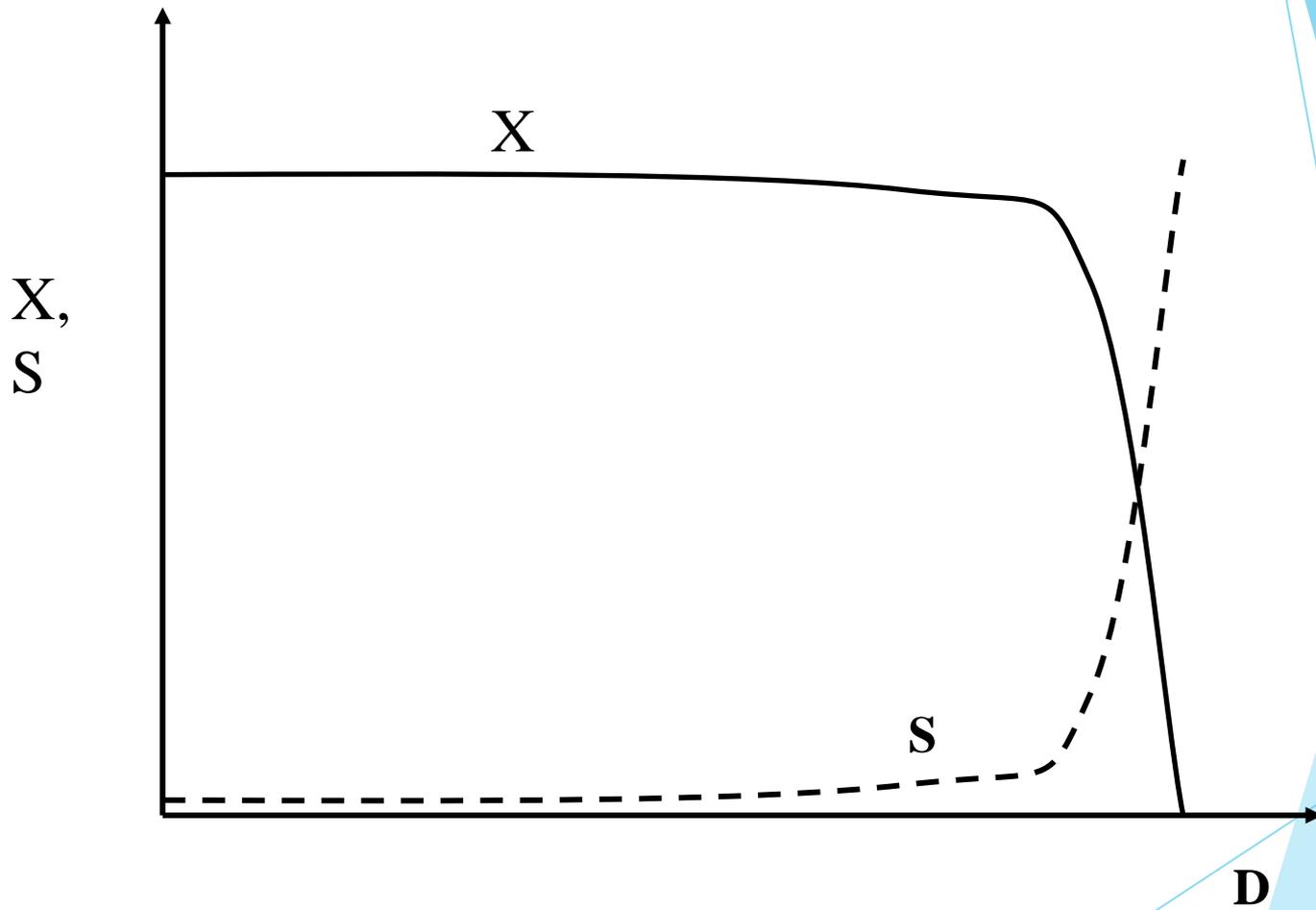
$$dX/dt = \mathbf{D}X_0 - \mathbf{D}X + (\mu_m X S / (K_s + S) - k_d X)$$

$$X_0 = 0, \quad dX/dt = 0$$

$$dX/dt = (\mu_m S / (K_s + S) - k_d)X - \mathbf{D}X = 0$$

$$\mathbf{D} = (\mu_m S_e / (K_s + S_e)) - k_d = \mu$$

Si $\mathbf{D} > \mu \longrightarrow$ wash out



Se denomina quimiostato al reactor en que el cultivo está controlado por el sustrato

Se denomina turbidostato al reactor en que el cultivo está controlado por la biomasa

Diferencias básicas.

Entre el cultivo discontinuo clásico y el continuo en el quimiostato existen unas diferencias básicas, que debemos finalmente recalcar una vez más.

El cultivo discontinuo hay que verlo como un sistema cerrado (en cierto modo como un organismo pluricelular), que en su desarrollo cumple con una fase de latencia, una fase exponencial, una fase estacionaria y una fase de muerte (juventud, madurez, vejez y muerte). En cada momento reinan condiciones de cultivo distintas. Es casi imposible una automatización en un cultivo discontinuo.

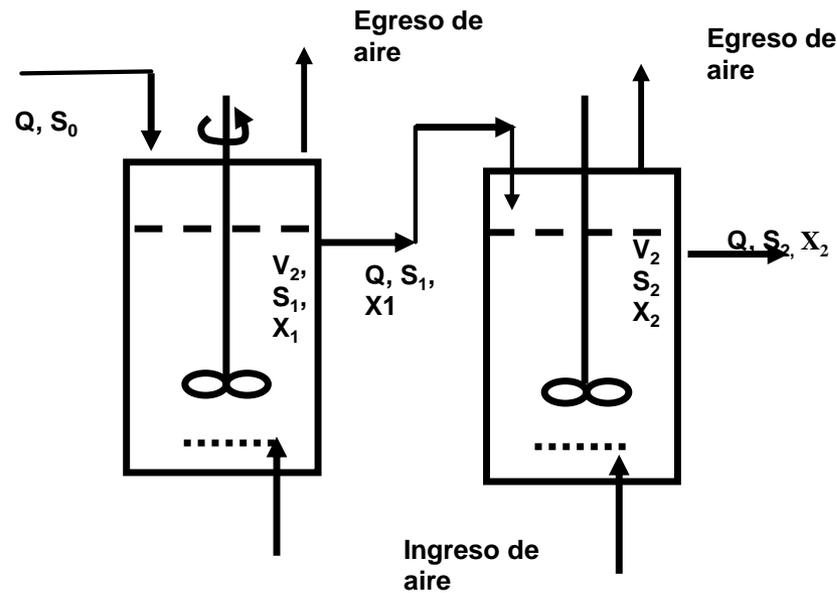
El cultivo continuo representa un sistema abierto, que tiende hacia un "equilibrio dinámico". El factor tiempo está excluido hasta cierto punto.

Para los organismos reinan siempre las mismas condiciones ambientales.

El aparato puede automatizarse fácilmente.

Cultivo en dos etapas

Sistema de dos etapas monocorriente (el sustrato ingresa al primer reactor):



Condiciones Q es el mismo en ambos, V es distinto

Definimos $D_1=Q/V_1$ y $D_2= Q/V_2$

Primera etapa

$$\mu_1=D_1$$

$$X_1= r(S_0-S_1)$$

Segunda etapa

-Biomasa

$$X_2V_2 = \text{total}$$

En estado estacionario se puede demostrar por balance de materia

$$\mu_2= D_2 (X_2-X_1)/X_2 \quad (1)$$

$$\mu_2 < D_2$$

- Sustrato

$$S_2 V_2 = \text{Total}$$

En estado estacionario se puede demostrar por balance de materia

$$D_2(S_1 - S_2) = \mu_2 X_2 / r$$

$$\mu_2 = r D_2(S_1 - S_2) / X_2 \quad (2)$$

Igualando 1 y 2 simplificando y despejando:

$$X_2 - X_1 = r(S_0 - S_1)$$

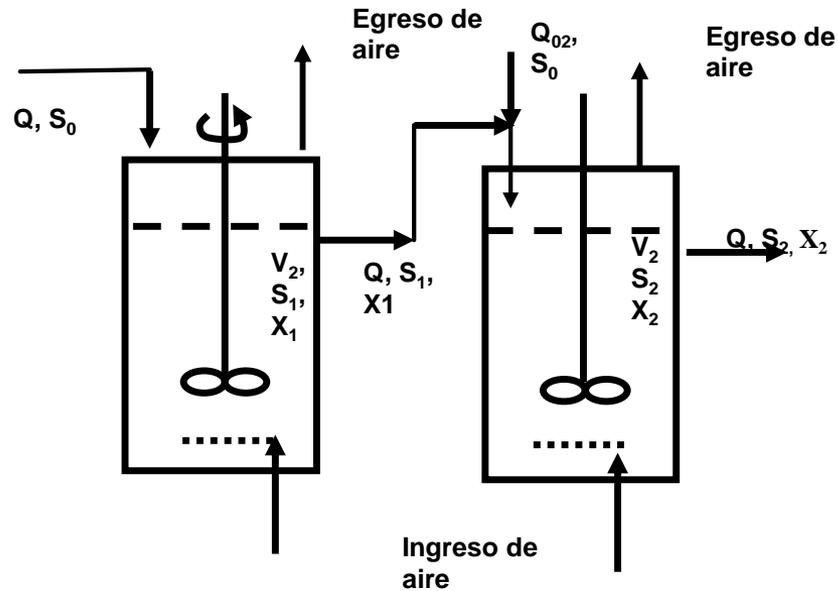
$$\text{Como } X_1 = r(S_0 - S_1)$$

Reemplazando y simplificando :

$$X_2 = r(S_0 - S_2)$$

El mismo razonamiento se aplica a más etapas, pero tengamos en cuenta que si va disminuyendo por un agotamiento del sustrato.

Dos etapas multicorriente (se agrega medio fresco en la segunda etapa)



Condiciones

V_1 distinto de V_2

$$D_1 = Q_1/V_1$$

$$D_2 = Q_2/V_2 = Q_1/V_2 + Q_{02}/V_2 = D_{12} + D_{02}$$

Primera etapa

$$\mu_1 = D_1$$

$$X_1 = r(S_0 - S_1) \quad (1)$$

Segunda etapa

$$dX_2/dt = D_{12}X_1 + \mu_2X_2 - D_2X_2 = 0$$

$$\mu_2 = D_2 = D_{12}X_1/X_2$$

Para el sustrato limitante:

$$dS_2/dt = D_{12}S_1 + D_{02}S_0 - \mu_2X_2/r - D_2S_2 \quad \text{reordenando y despejando}$$

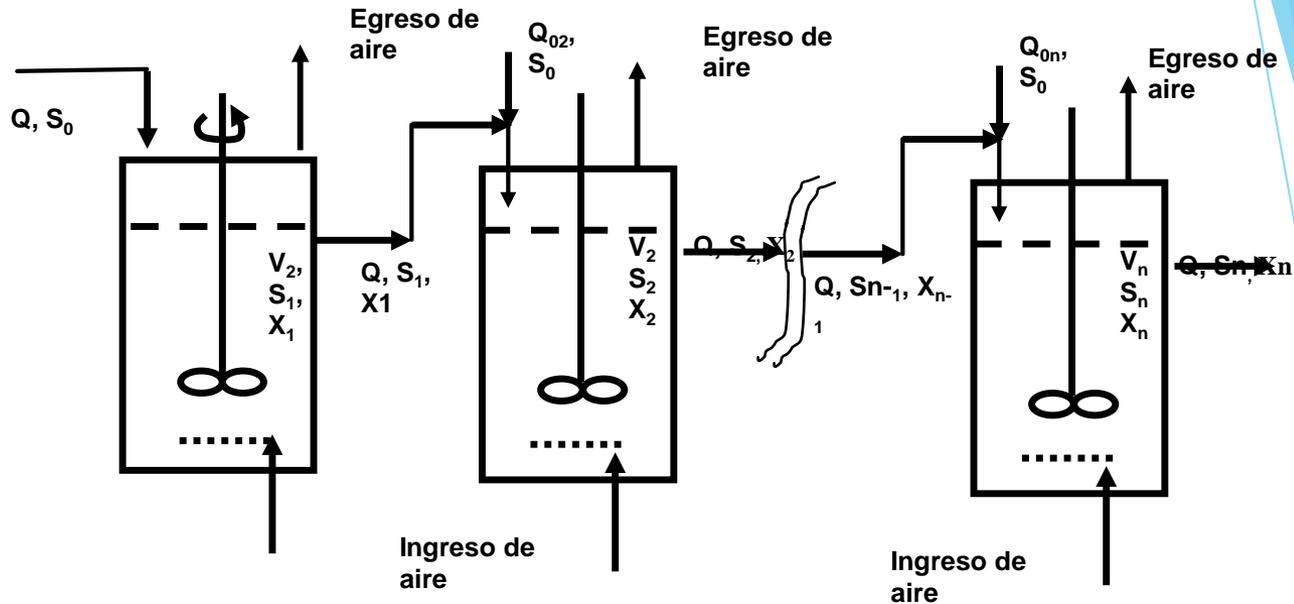
$$\mu_2 = r/X_2 * (D_{12}S_1 + D_{02}S_0 - D_2S_2) \quad (2)$$

igualando 1 y 2 y despejando

$$X_2 = D_{12}X_1/D_2 + (r/D_2) * (D_{12}S_1 + D_{02}S_0 - D_2S_2)$$

Como $D_{02}S_0$ se puede regular podemos hacer este término sensiblemente mayor a $X_2 = r * (S_0 - S_1)$

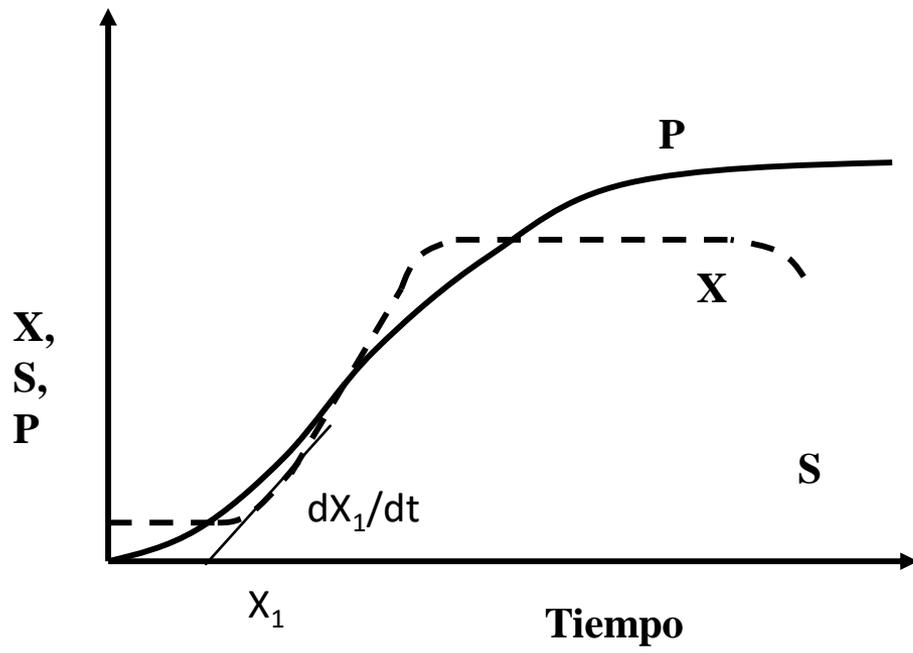
Determinación del número de etapas



restricción se considera que todos los reactores tienen el mismo volumen.

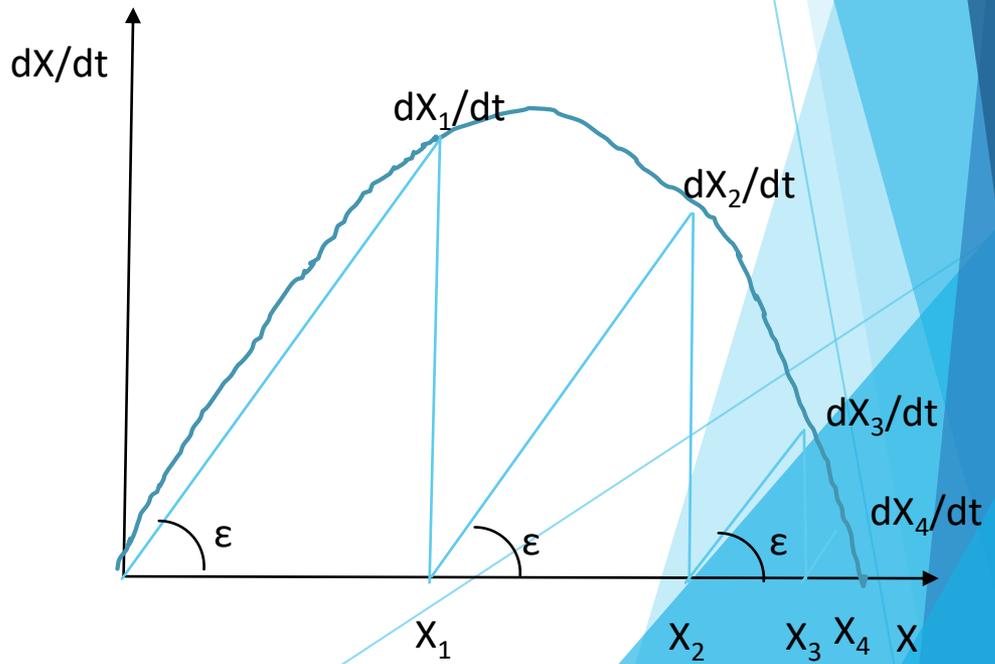
$$V \frac{dX_n}{dt} + X_n \frac{dV}{dt} = QX_{n-1} + \mu X_n V - QV_n$$

En estado estacionario se puede escribir $DX_n/dt * V = Q/V * (X_n - X_{n-1})$

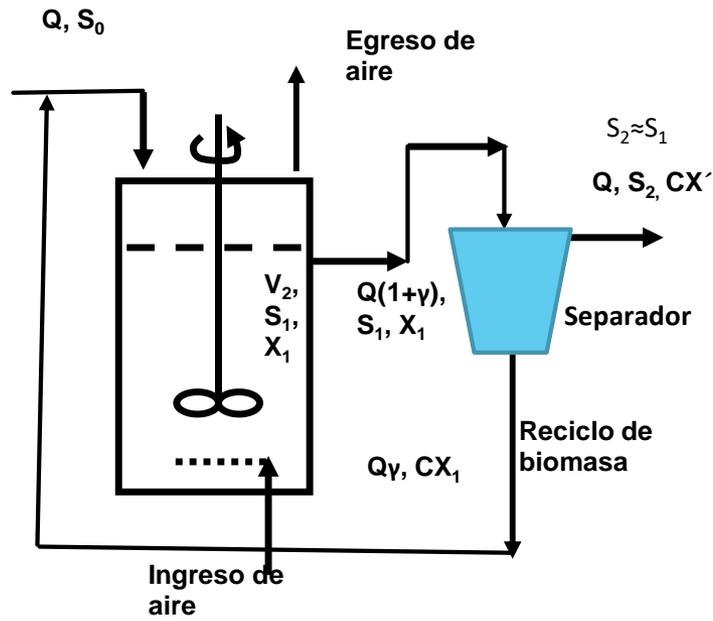


$dx/dt = 0$
 $X_0 = 0$

$Q/V = \text{tg } \epsilon.$



Una etapa con reciclo de biomasa



Definimos

γ relación de reciclaje < 1

C factor de concentración de biomasa > 1

Balance de biomasa

VX = biomasa total

$$XdV/dt + V dX/dt = \gamma Q * CX + \mu XV - (1 + \gamma) Q X$$

Reordenando y simplificando, considerando estado estacionario ($dX/dt = 0$) llegamos a:

$$\mu = D * (1 + \gamma - \gamma C)$$

hay que tener en cuenta que el paréntesis es menor que 1 ya que C es mayor que 1.

Balance de sustrato:

SV = sustrato total

$$SdV/dt + VdS/dt = QS_0 + \gamma QS - Q(1 + \gamma)S - \mu XV/r$$

Balance = entrada – salida – consumo

Reordenando, simplificando y teniendo en cuenta que en el estado estacionario $dS/dt = 0$ podemos decir:

$$X = D(S_0 - S) r / \mu \quad \text{y Como } \mu = D * (1 + \gamma - \gamma C) < D$$

queda

$$X = (S_0 - S) r / (1 + \gamma - \gamma C) \quad X \text{ es mayor que } (S_0 - S) r \text{ por lo que se obtiene mayor biomasa}$$

Como

$\mu = \mu_m S / (K_s + S)$ despejando

$$S = K_s \mu / (\mu_m - \mu)$$

Reemplazando μ queda:

$$S = K_s D^*(1 + \gamma - \gamma C) / (\mu_m - D^*(1 + \gamma - \gamma C)) < K_s D / (\mu_m - D)$$

$$X = r (S_0 - S) / (1 + \gamma - \gamma C)$$

$$X = [r / (1 + \gamma - \gamma C)] * [S_0 - K_s D^*(1 + \gamma - \gamma C) / (\mu_m - D^*(1 + \gamma - \gamma C))] > r(S_0 - DK_s / (\mu_m - D))$$