Estación de trabajo para el estudio de la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* mediante el método de turbidez

Elier Riverón-Rodríguez, Nardo Ramíez-Frómeta, Dayana Herrera-Alba,* Grether Barreras-García, Ángela Mariana Zayas-Tamayo y Ángel Regueiro-Gómez.**

Departamento de Investigación y Desarrollo, Dirección de Equipos y Diagnosticadores, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y Calle 158, Playa, La Habana. elier.riveron@cnic.edu.cu; nardo.ramirez@cnic.edu.cu. *Departamento de Desarrollo, Centro de Neurociencias de Cuba, Avenida 25 y Calle 158, Playa, La Habana.
**Departamento de Bioingeniería, Instituto Superior Politécnico José Antonio Echeverría, Calle 114, Marianao, La Habana. regueiro@electrica.cujae.edu.cu.

Recibido: 21 de octubre de 2011 Aceptado: 19 de diciembre de 2011

Palabras clave: turbidez, crecimiento, registro temporal, *Escherichia coli.*
Key words: turbidity, growth, temporal record, *Escherichia coli.*

RESUMEN. El trabajo aborda el diseño de una estación de trabajo para el estudio de la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* mediante el método de turbidez. El sistema cuenta con una interfaz visual basada en el empleo de instrumentación virtual con ayuda del utilitario LabVIEW en su versión 8,5 para permitir el estudio y caracterización temporal del crecimiento bacteriano. En la condición de dispositivo emisor de la señal de estímulo se usó un (LED) diodo emisor de luz roja, con una longitud de onda de 626 nm. En la etapa de recepción de la señal, se utilizó el fototransistor BPW77N, dispositivo que permite medir la absorbancia de la muestra en cuestión. La tarjeta 10 (componente del sistema 10) se integró a la estación de trabajo para el acondicionamiento de las señales. De igual forma, se utilizaron otros elementos tales como el conversor analógico-digital y digital-analógico de la tarjeta comercial PCI-6014 conectada a una computadora. Se obtuvo una estación de trabajo con una interfaz visual capaz de graficar la cinética de crecimiento microbiano y exportar los datos a un fichero Excel para su almacenamiento y posterior análisis. Se graficaron las curvas de crecimiento obtenidas a partir de la incubación de distintas concentraciones de *Escherichia coli* ATCC 25923 durante 17 h a 37 °C. Además, mediante la representación gráfica se comprobó su cinética de crecimiento en un medio de cultivo (Caldo Müller-Hilton) y se diferenciaron las distintas etapas que la componen.

ABSTRACT. This work discusses the design of a workstation for studying the *of Escherichia coli* growth kinetic by turbidity method. The system has a visual interface based on the use of Virtual Instrumentation using LabVIEW utility in its 8,5 version in order to allow the study and the temporary characterization of bacterial growth. As stimulation signal emitting device, it was used a red LED (light-emitting diode) with a wavelength equal to 626 nm. The BPW77N phototransistor was used in the reception stage. This device allows to measure the level of absorbance of the current sample. The Diramic-10 card (Diramic 10 system component) was integrated to the workstation for signal conditioning. Furthermore, it were utilized elements such as the analogical digital and digital analogical converters of the PCI-6014 commercial card connected to computer. It was obtained a workstation with a visual interface able to plot the microbial growth kinetics and export this data to an Excel file for its storage and its further analysis. The growth curves from *Escherichia coli* ATCC 25923 were obtained from incubation for different concentrations were obtained during 17 h at 37 °C. Furthermore, through the graphical representation, the kinetics of the mentioned bacteria in culture medium (Muller-Hilton broth) was checked and the various stoges that it differentiated the various stages that comprise it.

INTRODUCCIÓN

La medición de la turbidez no es una técnica de reciente uso en microbiología, en ella se destaca su utilidad para estudios del crecimiento bacteriano como una medida de la concentración celular.[1,2] Las bacterias absorben y dispersan la luz transmitida, la cual es medida a una frecuencia fija, registrando así, los cambios turbidimétricos de un medio de cultivo líquido al relacionarlo con el control estéril.[3]

Un cultivo de microorganismos en un medio líquido, actúa como una suspensión coloidal, bloqueando y reflejando la luz que pasa a través de él, siendo la luz absorbida directamente proporcional a la concentración de células existentes en el cultivo. En una suspensión bacteriana mediante la nefelometría, medida de la reflexión de los rayos de luz, o bien la turbidimetría, medida del porcentaje de absorción de la luz, se puede estimar el número de células presentes. En el caso de la turbidimetría, para medir el crecimiento celular, la turbidez del cultivo bacteriano se correlaciona con alguna propiedad medible, como el número de células, determinado generalmente por recuento de bacterias viables.[4]

El crecimiento microbiológico está dado por el incremento del número de células en una población de microorganismos,[5] en el cual se pueden identificar cuatro fases principales:[6] Inicialmente, se transita por una etapa de latencia en la que los microorganismos se adaptan al medio ambiente y no hay crecimiento celular aparente, a continuación, ocurre la fase de crecimiento exponencial, en la que la masa bacteriana crece hasta que se agotan los nutrientes y se acumulan sustancias tóxicas que inhiben el crecimiento, luego, se alcanza la fase estacionaria que se caracteriza por un cese del crecimiento poblacional debido a la compensación de la formación y muerte de células y finalmente, se llega a la fase de muerte.[6]

Durante la última década se ha diversificado el uso del método turbidimétrico en áreas como, la agricultura, el medio ambiente, la salud, etc.,[2,7,8] potenciando el desarrollo de aplicaciones y equipos para el diagnóstico microbiológico.[9,10]

En el Centro Nacional de Investigaciones Científicas se viene desarrollando desde hace más de una década el sistema DIRAMIC para el diagnóstico rápido microbiológico,[11,12] el cual ha encontrado aplicaciones en la microbiología clínica y la biotecnología. Dicho sistema presenta un lector turbidimétrico, calibrado con un equivalente de la escala McFarland, que permite detectar en términos de transmitancia óptica los cambios de turbidez que se producen en un medio de cultivo debido a la multiplicación de los microorganismos.[5]

El sistema DIRAMIC a pesar de sus diversas prestaciones,[11,12] no permite realizar un estudio temporal automatizado sobre el comportamiento del crecimiento microbiano. Por este motivo, el objetivo principal del presente trabajo consistió en desarrollar una estación de trabajo y su interfaz de control para el estudio automatizado de la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* mediante el método de turbidez.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la preparación de la estación de trabajo se usó un ordenador con un microprocesador Pentium IV de 2,66 GHz y 256 Mb de memoria RAM, una tarjeta de adquisición de datos (TDA) PCI-6014 de 16 bit con un módulo de expansión CB68LP de la National Instruments Corporation[13] del sistema DIRAMIC, se tomó la tarjeta Diramic-10 y el sensor o calibrador y como último elemento, se utilizó una incubadora Memmert modelo INE 700 de fabricación alemana.

El ordenador utilizado soportó la interfaz visual de control desarrollada con la herramienta del programa LabVIEW en su versión 8,5. La TDA conectada al ordenador se encargó de la generación de la señal de estímulo y la adquisición de la señal de respuesta del sensor, las cuales fueron acondicionadas por la tarjeta Diramic-10. El sensor constituyó el dispositivo de medición de turbidez (Fig. 1).

Dicho dispositivo constó de dos partes principales implicadas en la realización de las mediciones: un (LED) diodo emisor de luz de la Avago Technologies Corporation,[14] encargado de emitir luz (señal de estimulación) con una longi-

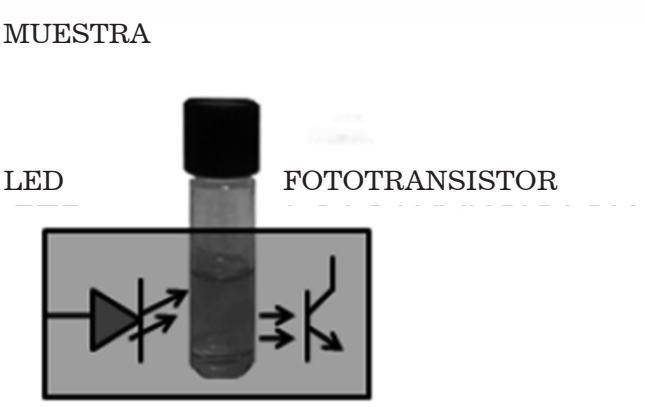


Fig. 1. *Esquema del calibrador.*

tud de onda de 626 nm y un fototransistor BPW77N de la Vishay Semiconductors Corporation, ubicado en el lado opuesto.[15] La intensidad de la radiación luminosa que alcanza la lentilla del fototransistor determina la corriente que circula por su emisor y consecuentemente, genera una tensión de salida, de esta forma, el dispositivo es capaz de transformar la luz incidente en una señal eléctrica medible.

Proceso de calibración del sistema para la medición

Antes de comenzar el proceso de medición, se calibró el sistema. En este proceso, se genera una tensión con el conversor digital-analógico (CDA) al conversor tensión-corriente localizado en la tarjeta Diramic-10, el cual inyecta una corriente determinada al LED para controlar su intensidad. Luego, la señal luminosa es captada por el receptor, lo que genera una tensión que al ser registrada por el conversor analógico-digital (CAD), tiene que ser igual a 0,879 V con una precisión de 0,001 V debido a que el fototransistor posee una mejor respuesta y estabilidad para ese nivel de tensión.

Con el objetivo de encontrar la tensión a generar por el CDA que satisfaciera la condición mencionada de una forma rápida y eficiente, se comenzó a generar un nivel de tensión de 5 V. Mediante la aplicación del método de bisección y la utilización del teorema del valor medio,[16] se ajustó la salida del CDA hasta obtener una tensión por el CAD determinada con la precisión deseada.

Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo, se tomó de tres a cuatro colonias de un cultivo fresco (18 a 24 h) de *Escherichia coli* ATCC 25923 y se inoculó en 4,5 mL de medio de cultivo estéril (Caldo Müller-Hilton) hasta alcanzar una concentración de células equivalente a 0,5 de la escala McFarland en el calibrador de inóculos del sistema (Opción McFarland).[17]

Preparación de las muestras micro biológicas

A partir de la concentración de células equivalente a 0,5 McFarland, se tomó 1 mL de la muestra correctamente homogenizada y se inoculó en 9 mL de medio estéril (Caldo Müller-Hilton), luego, se realizaron sucesivamente diluciones seriadas de la muestra a partir de 1/10 hasta $1/10^6$.[18]

Ensayos realizados con el sistema

Una vez calibrado el sistema, se midió la turbidez de un cultivo de *Escherichia coli* ATCC 25923 en incubación. Los experimentos tuvieron una duración de 17 h y las mediciones se realizaron cada 6 min. En la realización de los ensayos se emplearon concentraciones iniciales del microorganismo en estudio de: 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, y 10^8 unidades formadoras de colonias u.f.c/mL. La temperatura de operación de la incubadora se ajustó a 37 °C teniendo en cuenta que la temperatura de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25923 se sitúa en el intervalo entre 20 y 40 °C,[19] y que la óptima se encuentra entre 35 y 40 °C.[20]

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diseño electrónico del sistema

La estación de trabajo (Fig. 2) quedó implementada con la estructura siguiente. La computadora soporta la Interfaz de Control para la Determinación del Crecimiento Bacteriano en Muestras Biológicas, desarrollada mediante la herramienta LabVIEW. A su vez, se comunica con la tarjeta de adquisición de datos PCI-6014 conectada al puerto PCI del ordenador. Esta tarjeta contiene al CDA cuya función es la generación de la señal de estímulo con que se excita al LED y al CAD que se encarga de registrar la luz incidente en el fototransistor. La conexión

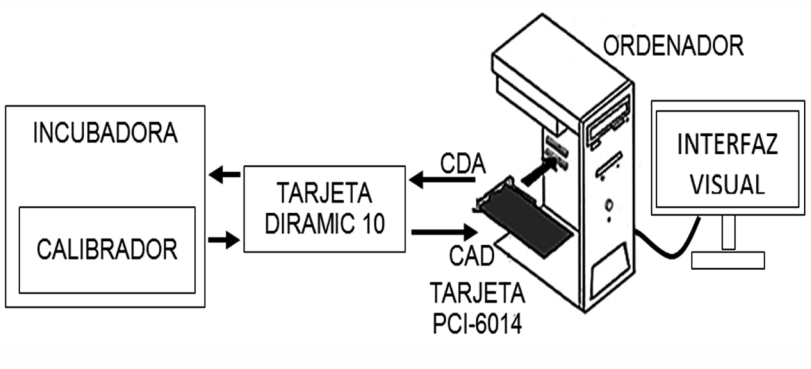


Fig. 2. *Diagrama de la estación de trabajo.*

entre el CDA y el LED así como entre el fototransistor y el CAD, se realiza con el uso de la tarjeta Diramic-10 que tiene como función el acondicionamiento de ambas señales. El calibrador que soporta al LED y al fototransistor se coloca dentro de la incubadora.

Diseño de programa del sistema

El diseño de la interfaz visual (Fig. 3) para el control de la estación de trabajo y representación de los resultados de las mediciones, sigue la secuencia de funcionamiento que se explica a continuación.

Al comenzar a ejecutarse el programa, después que se ha calibrado exitosamente el sistema, se activa la interfaz representada por un indicador LED de forma circular ubicado en la esquina superior derecha (Fig. 3). En el caso de que la calibración no resulte exitosa, se visualiza un mensaje que alerta sobre el error de calibración. Una vez activado el indicador de calibración, automáticamente se inicia el registro temporal del crecimiento del microorganismo a estudiar según el tiempo de muestreo, que no es más que el tiempo transcurrido entre una medición y la siguiente y el tiempo de registro que está asociado al tiempo de duración total del estudio. Estos dos indicadores deben ser previamente fijados por el usuario antes de comenzar a operar la aplicación.

Iniciado el ciclo de mediciones, en la primera ventana denominada Medición de Tendencia (Fig. 3) se visualiza en tiempo real la tensión que se origina a la salida del fototransistor, permitiendo supervisar los experimentos en tiempo real. La segunda ventana denominada Medición Completa (Fig. 3) tiene la función de graficar los resultados una vez concluida la última medición. Mediante los controles ubicados en la esquina inferior izquierda (Fig. 3), se puede manejar la representación gráfica de la segunda ventana mediante la ampliación de un área determinada de ella, entre otras opciones. También se presenta una componente en forma de tabla, la cual muestra la tensión correspondiente a cada medición, así como la fecha y el tiempo en que se realizó cuyas magnitudes pueden ser exportadas a un fichero Excel para su almacenamiento. En la adquisición de los datos se ubicó un filtro digital variable para minimizar el error en las mediciones, que está dado por el promedio de 100 mediciones.[21]

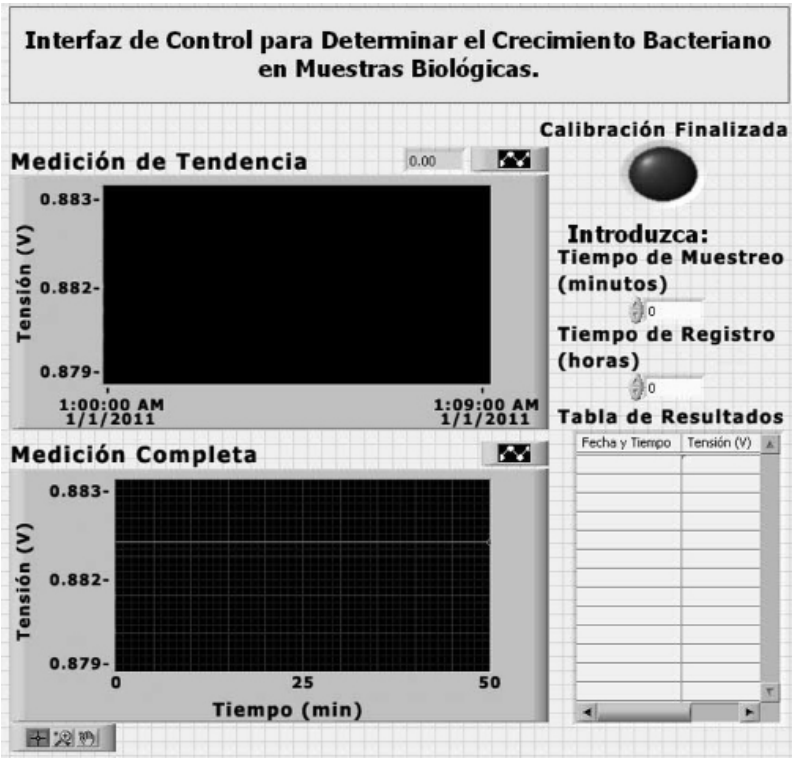


Fig. 3. *Interfaz visual para el control del sistema.*

Evaluación de la estación de trabajo

En los experimentos realizados con *Escherichia coli* ATCC 25923, se obtuvieron las tres primeras fases de su crecimiento para distintas concentraciones iniciales (Fig. 4). En la fase I, la bacteria metaboliza, pero no se multiplica, en la fase II, muestra un crecimiento exponencial o logarítmico, mientras que en la fase III (fase estacionaria), la concentración celular se mantiene relativamente constante.[6] La fase IV (de muerte), no se aprecia, pues las bacterias muertas y los desechos de su metabolismo quedan suspendidos en el medio, manteniendo el grado de turbidez y por ende, no se produce una variación de la respuesta en tensión perceptible.

Los resultados (Fig. 4), aunque esperados, evidencian y avalan un correcto y lógico funcionamiento de la estación de trabajo diseñada, pues mientras mayor es la concentración inicial de la bacteria, con más rapidez aparece la fase II.[22] El equipo Diramic 10 detecta concentraciones totales de células de 10^5 en aproximadamente 4 h,[8] lo cual corresponde con los valores obtenidos por el sistema propuesto para la misma concentración (Fig. 4).

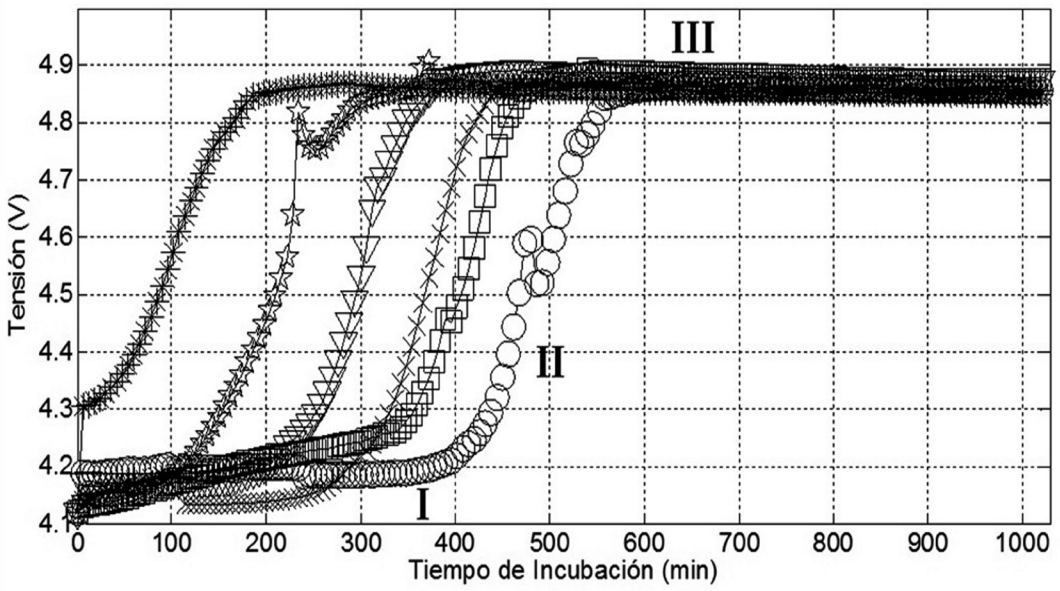


Fig. 4. **D***el crecimiento de la Escherichia coli ATCC 25923 para distintas concentraciones iniciales:*

10^2 UFC/mL, 10^3 UFC/mL, 10^4 UFC/mL, 10^5 UFC/mL, 10^6 UFC/mL, 10^8 UFC/mL

Fases: I Metabolización II Crecimiento exponencial III Estacionario

El equipo Diramic 10 no se encuentra automatizado, por lo que si se desea realizar un estudio del crecimiento total de células en el tiempo, se tiene que retirar la muestra en cuestión del ambiente favorable para su crecimiento (incubadora) cada vez que se desee realizar una medición.[17] Con un sistema automatizado como el propuesto se eleva las prestaciones del sistema Diramic, se hace menos engorroso el estudio y se elimina la desventaja antes mencionada, evitando así el traslado de la muestra de la incubadora al equipo y disminuyendo por consiguiente los riesgos biológicos.

CONCLUSIONES

Se diseñó e implemento una estación de trabajo para el estudio automatizado de la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* mediante el método de turbidez con la creación de una interfaz visual sencilla y de fácil manipulación para el control del sistema. El sistema se puso a prueba mediante la preparación de muestras de *Escherichia coli* ATCC 25923 a distintas concentraciones. Los ensayos permitieron obtener curvas de crecimiento similares a las que han sido reportadas, observándose, en cada concentración estudiada de dicho microorganismo, las tres fases de su crecimiento detectables con el método de turbidez. Además, se obtuvo la relación entre la cinética de crecimiento de la *Escherichia coli* ATCC 25923 y su concentración inicial. Los resultados obtenidos avalan un correcto funcionamiento del sistema en la realización de estudios temporales de crecimiento de la *Escherichia coli* ATCC 25923.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Levashov PA, Sedov SA, Shipovskov S, Belogurova NG, Levashov AV. Quantitative turbidimetric assay of enzymatic gram-negative bacteria lysis. Analytical Chemistry. 2010;82(5):2161-2163.
2. Fangio MF, Lurlina MO, Fritz R. Actividad antimicrobiana de mieles del sudeste de la provincia de Buenos Aires frente a *Escherichia coli*. Revista Argentina de Microbiología. 2007;39(2):120-123.
3. Hernández JE. Desarrollo y aplicación del sistema DIRAMIC en el control de la calidad bacteriológica de la leche cruda y pasteurizada. [Tesis en opción del título de doctor en Ciencias Veterinarias]. Mayabeque, Universidad Agraria de La Habana; 1998.
4. Álvarez J. Nuevos usos del Sistema Diramic en la evaluación de la calidad de la leche. [Tesis en opción del título de doctor en Ciencias Veterinarias]. Mayabeque, Universidad Agraria de La Habana; 2006.
5. Madigan M, Martinko JM, Parker J. Biología de los microorganismos. 8.ª ed, Prentice Hall, 2001.
6. Cobas H, Pavoni S, Zayas A, Rodríguez F, Álvarez E, Contreras R. Aplicación de la voltametría en el análisis del crecimiento microbiológico. VII Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería, 2007. La Habana 2007.
7. Díaz BH, Esteller MV, Garrido SE. Calidad físico-química y microbiológica del agua en parques acuáticos. Hidrobiológica. 2011;21(1):49-62.
8. Travieso F, Cruz M, Duarte E, Villa E, Alonso M, et al. Empleo del sistema DIRAMIC en la determinación de la calidad microbiológica del agua. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2004;35(1):37-43.
9. Xiao D, Zhao S, Yuan H, Yan X. CE detector based on light-emitting diodes. Electrophoresis. 2007;28(1-2):233-242.
10. Eom IY, Dasgupta PK. Frequency-selective absorbance detection: Refractive index and turbidity compensation with dual-wavelength measurement. Talanta. 2006;69(4):906-913.
11. González LI, Travieso F, González L, Álvarez E, Tillán G, Contreras R. Sistema DIRAMIC: Primer reporte multicéntrico de los resultados de los ensayos de susceptibilidad a antibióticos. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2005;36(No. especial).
12. Álvarez E, Contreras R, Álvarez AB. Resistencia microbiana en la red nacional cubana de laboratorios con equipos DIRAMIC durante los años 2002 al 2004. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2005;36(No.especial).
13. NI 6013/6014 Family Specifications. National Instruments, Inc. (Consultado: 19 de julio de 2011). Disponible: http://www.ni.com/pdf/manuals/370844b.pdf
14. HLMP-EDxx/ELxx, 5 mm Precision Optical Performance Best Value, AlInGaP Lamps. Avago, Inc. (consultado: 4 de abril de 2011). Disponible: http://www.avagotech.com/docs/5988-8249EN
15. BPW77NA, BPW77NB, Silicon NPN Phototransistor, RoHS Compliant. Vishay Semiconductors, Inc. (consultado: 13 de abril de 2011). Disponible: http://www.vishay.com/docs/81527/bpw77n.pdf
16. Joseph E, Rigdon SE, Varberg DE. Cálculo. Capítulo 3, Solución numérica de ecuaciones. 9a ed. Pearson Educación: 2007:p.190-192.
17. Tillán G, Álvarez E, Contreras R. Manual de Usuario Diramic 10. 2008.
18. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Introducción a la microbiología, 9a ed, Médica Panamericana: 2007:p.178.
19. Camacho S. Análisis Microbiológico. (Consultado: 22 de julio de 2011). Disponible: http://www.educa.madrid.org/web/ies.mateoaleman.alcala/TEORIA_EM_alumnos.pdf.
20. Michanie S. *Escherichia coli* O157:H7, la bacteria que dispara el HACCP en la industria de la carne. Información Veterinaria, CMVPC, Córdoba. (Consultado: 9 de agosto de 2011). Disponible: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/carne_y_subproductos/44-escherichia_coli.pdf
21. Morales LJ, Shmaliy Y. Moving Average Hybrid Filter to the Enhancing Ultrasound Image Processing. Revista IEEE América Latina. 2010;8(1):9-16.
22. Pavoni S, Cobas H, Zayas Á, Álvarez E, Contreras R, Rodríguez F. Evaluación de un sensor de capas delgadas para la detección voltamétrica del crecimiento de *Escherichia coli*. Universidad, Ciencia y Tecnología. 2006;10(40):211-215.