MATEMÁTICAS Y CRECIMIENTO BACTERIANO: UN TRABAJO DE LABORATORIO PARA EL APRENDIZAJE SIGNIFICATIVO

Eje 3: Interdisciplina y articulación entre materias

Leonardo Gualano,[a] *Augusto Graieb,*[b, c] *Esteban Baragatti,*[c@] *Leandro Andrini*[c]

a. Ingeniería en Agrobiotecnología; IBB-INTECH, Chascomús, Universidad Nacional de San Martín.

b. Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional Arturo Jauretche.

c. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

@ eebaragatti@gmail.com

Palabras claves: ENSEÑANZA DE LA MATEMÁTICA, LABORATORIO, INTERDISCIPLINA, CRECIMIENTO BACTERIANO

RESUMEN

En el presente trabajo se relatará una experiencia didáctica desarrollada en la carrera de Ingeniería en Agrobiotecnología, dentro del curso *Tópicos de Matemática*.

La Ingeniería en Agrobiotecnología es una carrera que depende de la Universidad Nacional de San Martín y se dicta en el Instituto de Investigaciones Biotecnológicas e Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH). La primera cohorte ingresó en 2012, y se requiere que lxs ingresantes deban tener pre-aprobado el primer año de una carrera afín en cualquier institución universitaria del país. La materia Tópicos de Matemática se encuentra encuadrada dentro del trayecto de Conocimientos Básicos en el bloque de Ciencias Básicas de la carrera, en el primer cuatrimestre de cursada.

Como parte de implementación de esta materia, desde 2013 se realiza un trabajo práctico que consiste en medir el crecimiento de un cultivo bacteriano en batch. Lxs alumnxs, con la asistencia de los docentes, recolectan los datos experimentales (densidad óptica vs tiempo) y los procesan para modelar el crecimiento bacteriano mediante el modelo logístico continuo (trabajado exhaustivamente en clases previas). El diseño experimental contempla dos condiciones de crecimiento, y propone la evaluación experimental de uno de los supuestos del modelo logístico. El tratamiento de los datos se realiza en forma gráfica y analítica, e involucra la linealización de la curva de crecimiento, el "ajuste" al modelo, y la comparación de los parámetros obtenidos en ambas situaciones.

El propósito didáctico de la experiencia es afianzar los conocimientos teóricos de la matemática en un entorno motivante, en estrecha vinculación con la carrera elegida por lxs estudiantes. En este trabajo mostramos los resultados de las distintas experiencias realizadas, y compartimos algunas reflexiones sobre su desarrollo e implementación.

UN CUERPO DOCENTE INTERDISCIPLINARIO

Los fundamentos sobre "el por qué" de un cuerpo docente interdisciplinario pueden leerse en Graieb *et al.* (2012) y en el trabajo presentado en estas jornadas *Matemáticas en Agrobiotecnología* (Baragatti *et al.*, 2017). Tal como se explicita en dichos trabajos, al momento de concursar la propuesta, en 2011 propusimos a los responsables de la carrera la posibilidad de integración de un grupo interdisciplinario que se hiciera cargo de la materia Tópicos de Matemática. Fue integrado inicialmente por un doctor en Biología Molecular, un licenciado en Matemática, y un doctor en Física (los tres últimos autores de este trabajo). En 2013 se incorporó a este equipo el primer autor, miembro de la primera cohorte de la carrera, inicialmente en calidad de ayudante alumno (que hoy continúa como ayudante graduado). Y desde 2015 la continuidad de la propuesta está a cargo del Dr. Andrés Porta (Lic. en Matemática), y los ayudantes diplomados Leonardo Gualano (ingeniero en Agrobiotecnología) y Érika Porten (Lic. en Matemática).

Al momento de planificar el curso en 2012, luego de analizar otras alternativas, tomamos como eje articulador de la materia el trabajo con modelos matemáticos de fenómenos naturales, en particular mayormente biológicos (Salett Biembengut y Hein, 2004). Los contenidos mínimos fueron desarrollados a lo largo del curso de tal manera que su estudio fuera solidario con esa decisión. Fue, en este contexto, en el cual en 2013 decidimos incluir un trabajo experimental. Entre nuestros propósitos podemos mencionar:

- la aplicación de herramientas matemáticas que forman parte del curso a situaciones prácticas habituales en la carrera de agro-biotecnología
- la formulación de preguntas relevantes sobre un modelo matemático que pudieran ser contestadas mediante la experimentación
- el análisis y discusión de resultados experimentales
- la implicación de lxs estudiantes en alguna tarea que resulte motivante a la vez que implique un trabajo matemático pormenorizado
- la incorporación, a modo de primera experiencia, de lxs estudiantes al ámbito de los laboratorios del IIB-INTECH

EL MODELO UTILIZADO

Aprovechando la conformación del equipo docente nos inclinamos por estudiar la aplicabilidad de un modelo matemático ampliamente analizado en las clases al crecimiento bacteriano. El modelo matemático elegido fue el conocido como "de crecimiento logístico" (Verhulst, 1977; Zwietering, et al., 1990; Lewis y Powell, 2017). Como sistema experimental utilizamos cultivos líquidos de la bacteria *Escherichia coli*. Antes de pasar al diseño experimental y las distintas condiciones evaluadas vamos a referirnos a dos modelos simples para representar el crecimiento bacteriano.

En el modelo más sencillo la variación del número de bacterias en el tiempo (N) puede ser escrita como:

$$\frac{dN}{dt} = K.N \qquad (1)$$

donde K es la tasa reproductiva por unidad de tiempo ($K > 0$). A partir de esta expresión, y suponiendo que K sea una constante que no dependa ni de N ni de t, podemos llegar a que la función $N(t) = N_0 e^{K.t}$ es una solución de la ecuación (1), para una población inicial N_0.

Esta función $N(t)$ representa un crecimiento exponencial para todo tiempo t. Aunque puede ser válida para la fase de crecimiento denominada exponencial, experimentalmente podemos observar que no será adecuada cuando los nutrientes disponibles comiencen a disminuir respecto del número de microorganismos (esto es, los nutrientes son finitos). Si queremos utilizar un modelo aplicable más allá de la fase exponencial debemos asumir, en cambio, que la tasa de reproducción no será constante en el tiempo.

En otras palabras, mientras hay suficiente nutriente el crecimiento puede ser exponencial, y cuando el nutriente limitante se agota, el crecimiento cesa. Pero ¿cuál será la tasa de crecimiento en situaciones intermedias, cuando los nutrientes no alcanzan para solventar el crecimiento exponencial, pero sí un crecimiento menor? Hay, por supuesto, muchas formas de matematizar esta dependencia de K con la concentración del nutriente limitante. La más sencilla y habitual es plantear una dependencia lineal o proporcional (Monod, 1949). Si llamamos c a la concentración del nutriente que limita el crecimiento podemos escribir:

$$K = k.c \qquad (2)$$

donde k es una constante de proporcionalidad. Esta primera hipótesis que hemos adoptado en el planteo del modelo de crecimiento logístico, representado por la ecuación (2), es aquella sobre la cual nos proponemos trabajar en esta experiencia de laboratorio.

Por otro lado, a medida que las bacterias se multiplican, consumen el nutriente. Debido a esto es razonable pensar que la concentración c en el cultivo varíe en forma proporcional a la variación del número de bacterias, tal como expresa la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{dc}{dt} = -\alpha . \frac{dN}{dt} \qquad (3)$$

donde α es la cantidad de nutriente consumido por unidad de N formada. Si aceptamos la ecuación (3), integrando podemos obtener la expresión:

$$c(t) = -\alpha . N(t) + c_0 \qquad (4)$$

donde c_0 satisface la condición inicial (es decir, representa la concentración inicial de nutriente a t_0) para c. Por otro lado, reemplazando (2) en (1) tenemos:

$$\frac{dN}{dt} = k . c . N \qquad (5)$$

Si ahora reemplazamos en (5) a c (que es $c(t)$) por la expresión (4) llegamos a:

$$\frac{dN}{dt} = kN(c_0 - \alpha N) \qquad (6)^{1}$$

Usualmente se reescribe la ecuación (6) en la forma siguiente:

$$\frac{dN}{dt} = rN\left(1 - \frac{N}{B}\right) \qquad (7)$$

donde $r = k . c_0$ y $B = c_0/\alpha$

Al resolver la ecuación diferencial (7) se llega a la expresión utilizada en procesos de *crecimiento logístico*:

$$N(t) = \frac{N_0 . B}{N_0 + (B - N_0)e^{-rt}} \qquad (8)$$

En la ecuación (8) podemos ver que a tiempos largos[2] el término exponencial tiende a un valor "cercano" a cero, por lo que $N(t) \rightarrow B$. Del análisis de estacionaridad y estabilidad de sistemas, en las clases vimos que $N(t) = B$ es un punto estacionario del sistema que resulta, además, estable. Esto justifica que designemos a B como la "capacidad de carga" del sistema, y es en este modelo el máximo valor posible para N.

1. En la ecuación (6) vemos que el efecto de considerar una dependencia lineal de la tasa de crecimiento K con la concentración del nutriente limitante es matemáticamente equivalente a asignar una dependencia de K con N del tipo $K(N) = k(c_0 - \alpha N)$.

2. Aquí se da "sentido" al proceso de "paso al límite", donde "tiempos largos" equivale a $t \rightarrow \infty$.

Para aplicar este modelo matemático debemos medir experimentalmente el número de bacterias en el tiempo, y luego realizar un ajuste de los parámetros tal que los datos experimentales y los estimados por la ecuación (8) concuerden lo mejor posible. Es decir, que a partir de los datos experimentales obtenemos valores concretos para B y r.

Estamos ahora en condiciones de plantear los **objetivos del trabajo de laboratorio**:

- evaluar la ecuación diferencial logística como modelo para el crecimiento de *E. coli* en el laboratorio
- indagar sobre la validez de uno de los supuestos que llevan al modelo logístico, en particular que la tasa de reproducción K resulte proporcional a la concentración del nutriente limitante (ecuación 2, es decir $K = k.c$).

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se comparan dos condiciones de crecimiento que difieran en la cantidad de nutrientes presentes en el medio. Por un lado, una condición en que la cantidad de nutrientes sea la normalmente utilizada en el cultivo del microorganismo (medio estándar), y por el otro una condición en la que se utiliza el medio de cultivo diluido en un factor de 4 (medio diluido).

Metodología

Los cultivos bacterianos de *E. coli* BL21 se incuban a 37 °C con agitación (180 rpm). El medio estándar utilizado es el de Luria-Bertani. La biomasa se estima mediante la medida de la densidad óptica de alícuotas del cultivo cada una hora, durante nueve horas o hasta saturación del cultivo.

Cálculos

Para poner a prueba el supuesto de que k es una constante, a partir de datos experimentales, debemos utilizar alguna relación entre los parámetros que podemos obtener de la curva. Como ya mencionamos, los parámetros que definen la forma de la ecuación logística son N_0, B y r. El parámetro k está incluido en la definición de r:

$$r = k.c_0 \qquad (9)$$

RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN

Tomaremos como ejemplo, por su particularidad, lo obtenido por dos grupos de estudiantes de la cohorte 2013, uno trabajando con el cultivo en el medio estándar y otro trabajando con el cultivo en el medio diluido.[3]

Como puede verse el cultivo en el medio estándar crece más rápidamente que el correspondiente al del medio diluido. En este caso los cultivos no llegan a la saturación dentro del intervalo de medidas.

Los valores obtenidos fueron ajustados mediante la ecuación logística linealizada usando el programa Excel. En el caso del cultivo estándar se obtuvo un coeficiente de determinación (estadístico r^2) de $r^2 = 0{,}994$ y en el caso del cultivo diluido un valor para r^2 de 0,991. Dado que el coeficiente "define" la calidad del modelo para replicar los resultados cuando $r^2 \cong 1$, por lo tanto, la ecuación logística resultó un buen modelo para representar el crecimiento bacteriano en ambos casos.

Los valores obtenidos para la capacidad de carga B resultantes fueron de 1,87 para el cultivo estándar y de 0,96 para el cultivo diluido (expresados en unidades de absorbancia). Es decir que a pesar de que la dilución empleada fue de 1/4, la capacidad de carga sólo disminuyó aproximadamente a la mitad.

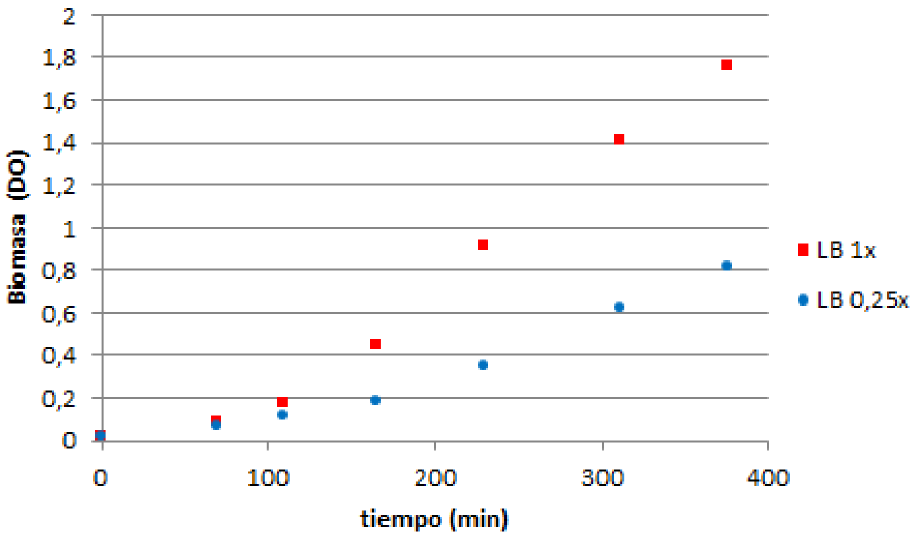

Gráfico 1. Biomasa (en DO) en función del tiempo.

3. Tanto en los datos mostrados en el gráfico como en los resultados obtenidos mostrados en la tabla, hay ausencia de consideraciones de errores, motivo que escapaba a la situación didáctica planteada, y que abre otro espacio de contenidos matemáticos a ser considerado.

Por último, según la ecuación (9), si k es constante tal como se asume en el planteo del modelo logístico, r deberá ser proporcional a la concentración de nutriente limitante c_0. Aunque el valor de r para el cultivo estándar resultó mayor que el correspondiente al cultivo diluido, el cociente entre ellos es de apenas 1,32 en lugar del valor esperado, 4.

Tabla 1. Valores de los parámetros B y r obtenidos a partir de los datos experimentales

Condición	B	r
Medio estándar	1,87	0,0144
Medio diluido	0,96	0,0190

REFLEXIONES FINALES

Los resultados que hemos resumido, nos permitieron una rica discusión en el aula. Es interesante notar que, si la experiencia hubiese consistido solamente en el crecimiento en una condición cualquiera y el ajuste mediante el modelo logístico, es altamente probable que se hubiera llegado a la conclusión de que el modelo resultaba adecuado. En esa situación las suposiciones que permitieron deducir la ecuación logística no tendrían por qué ser cuestionadas, y también es altamente probable que lxs estudiantes se hubieran convencido de lo acertadas que resultaron.

El diseño experimental permitió poner a prueba el modelo en una situación más exigente, en la que la suposición de que la velocidad de crecimiento sería proporcional a la concentración de nutrientes no se comprobó. De aquí se sigue que el solo hecho de que un modelo matemático que reproduzca o permita interpretar una serie de datos experimentales de manera adecuada no nos autoriza a concluir que todos los postulados realizados para obtenerlo sean válidos.

Los resultados resultan disruptivos y promueven en lxs estudiantes una revisión de todo el proceso por el cual se llega a la ecuación logística, tanto en lo que hace a la matemática como a los criterios extra matemáticos. De esta manera, pensamos que el diseño propuesto cumple con un rol epistémico además de satisfacer otros propósitos habituales de este tipo de actividades.

REFERENCIAS

Baragatti, E., Gualano, L., Graieb, A., Andrini, L. (2017). *Matemáticas en Agrobiotecnología*. 1ras Jornadas sobre Enseñanza y Aprendizaje en el Nivel Superior en Ciencias Exactas y Naturales. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

Graieb, A., Baragatti, E., Andrini, L. (2012). *Fundamentación didáctico-epistemológica del dictado del curso Tópicos de Matemática para la ingeniería en agrobiotecnología*. III Jornadas de Enseñanza e Investigación Educativa en el campo de las Ciencias Exactas y Naturales. Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación, UNLP. http://jornadasceyn.fahce.unlp.edu.ar/iii-2012

Lewis, M., Powell, J. (2017). Yeast for Mathematicians: A Ferment of Discovery and Model Competition to Describe Data. *Bulletin of Mathematical Biology*, 79(2), 356-382. doi: 10.1007/s11538-016-0236-3

Monod, J. *The growth of bacterial cultures.* Annu. Rev. Microbiol., 3(1), 371-394. doi: 10.1146/annurev.mi.03.100149.002103

Salett Biembengut, M. y Hein, N. (2004). *Modelación matemática y los desafíos para enseñar matemática*. Educación Matemática, 16(2), 105-125.

Verhulst, P.F. (1977). A note on the law of population growth. En Mathematical Demography, *Biomathematics*, Vol 6 (pp. 333-339). Springer: Berlin. doi: 10.1007/978-3-642-81046-6_37

Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Vant't Riet, K. (1990). *Modeling of the Bacterial Growth Curve,* Applied and Environmental Microbiology, 56(6), 1875-1881.