



Acompanhando a cinética de crescimento de *Lactiplantibacillus plantarum* a partir de diferentes metodologias de medida de concentração celular.

Palavras chave: cinética de crescimento microbiano; densidade óptica; espectrofotometria

Ana Letícia Câmara Ferreira, IB - UNICAMP
Prof. Dr. Andreas Karoly Gombert (Orientador), FEA - UNICAMP
Dra. Aline Souza Lopes (Co-orientadora), FEA - UNICAMP

INTRODUÇÃO

É comum encontrar associações diretas e proporcionais entre valores de densidade óptica e de unidades formadoras de colônia (UFC). Esse projeto busca entender quando essa afirmação é verdadeira e em que situações não se aplica. Para isso, estudamos culturas de *Lactiplantibacillus plantarum*, um microrganismo importante que está inserido no diverso grupo das bactérias ácido láticas (BAL). Ao contrário de outras espécies de lactobacilos, como o *Lactobacillus delbrueckii* e *Lacticaseibacillus rhamnosus*, a bactéria *L. plantarum* é encontrada em uma ampla gama de ambientes, desde o trato gastrointestinal, vaginal e urogenital, até sua aplicação em laticínios e na produção de carnes, vinhos, vegetais, entre outros (Seddik et al. 2017). A capacidade de sobreviver, crescer e se adequar a essa diversidade fez da *L. plantarum* um ótimo organismo modelo para o presente estudo. Trata-se de um grupo de bactérias Gram-positivas e incapazes de formar esporos (Coueret et al., 2003). São tolerantes a ambientes de pH baixo e, mesmo tolerando ambientes oxigenados, são características de ambientes anóxicos (Ako e Ps, 2015). Mas além disso, há sua imensa importância econômica, tanto positiva, quanto negativa.

As BAL geram lucros bilionários, principalmente por sua capacidade de fermentação láctica e alcoólica, sendo hoje um dos maiores grupos microbianos de aplicação industrial (Hatti-Kaul et al., 2018). A *L. plantarum*, especificamente tem sido reconhecida não só na indústria alimentícia, mas por sua participação nas áreas de saúde por seu efeito probiótico, ação na diminuição do colesterol, manutenção da saúde gastrointestinal e combate a inflamações (Seddik et. al, 2017). Neste contexto, é extremamente relevante entender a cinética de crescimento destes organismos para que se obtenha, tanto uma produção economicamente viável, bem sucedida e uma inserção segura no mercado (Leichtweis et. al), quanto para prever a deterioração de produtos cárneos embalados a vácuo (Dalcanton, 2010). Assim, esse estudo busca acompanhar a cinética de crescimento da *L. plantarum*, de acordo com o que previu Jacques Monod (1949), e avaliá-la através de diferentes metodologias de contagem de células, a espectrofotometria e o plaqueamento por Drop-plate.

A comparação por diferentes modelos de espectrofotômetro também é uma importante vertente da nossa análise. A turbidimetria é uma metodologia bem difundida para determinar a concentração celular de uma cultura microbiana, entretanto o tipo espectrofotômetro, a largura do detector e a distância do detector de luminosidade são todos fatores que podem influenciar na leitura e nos resultados obtidos (Eppendorf, 2015). Assim, optamos por

trabalhar com a turbidimetria em 4 comprimentos de ondas distintos e em quatro modelos diferentes de espectrofotômetro, comparando as curvas de crescimento obtidas ao fim das análises e se elas correspondem ao comportamento obtido por metodologias de contagem de células viáveis.

METODOLOGIA

Para acompanhar a cinética de crescimento da bactéria, o organismo liofilizado era suspenso em meio MRS (Man, Rogosa & Sharpe, 1960) no dia anterior e posto na estufa a 37°C por aproximadamente 20 h. Feito este crescimento prévio, colocávamos 3 mL dessa suspensão em um frasco Schott contendo 100 mL de MRS, para acompanhar a cinética de crescimento propriamente dita. Antes do início do teste uma alíquota desta suspensão era retirada para leituras de Densidade óptica (OD) e plaqueamento, assim sabíamos de que OD e concentração a cultura partiu. Então, o schott contendo caldo e a cultura prévia de *L. plantarum* era posto no banho maria MA093 - banho metabólico tipo Dubnoff, a 37°C com agitação leve. Nos testes iniciais, realizados em triplicata, as alíquotas eram retiradas a cada 1 h para que fosse feita a leitura da OD e o plaqueamento, seguindo a metodologia do Drop-plate. Em triplicata também foram realizadas curvas cujas alíquotas eram retiradas a cada 30 min ao longo da fase exponencial, observada nos testes anteriores, fazendo a mesma análise em um período menor.

A leitura da OD era realizada em quatro diferentes modelos de espectrofotômetro, sendo eles: Micronal B495, Beckman Coulter DU640, WPA biowave CO 8000 cell density meter e Thermo Genesys 20. Somado a isso, realizamos a técnica Drop plate que consiste em dividir uma placa de petri em três seções e usá-las para o crescimento de colônias bacterianas a partir de diluições seriadas contendo diferentes concentrações de celulares. Assim, em uma das seções eram postas 3 gotas de 10 uL da diluição 10^{-n} , na outra 3 gotas da diluição $10^{-(n+1)}$ e assim em diante. Normalmente o crescimento era feito para as diluições 3, 4, 5, 6, 7; mudando ao longo da curva. Conforme a amostra ficava mais concentrada, a diluição utilizada também aumentava. As placas eram postas na estufa a 37°C por 24 h, para que fosse possível contar as unidades formadoras de colônias (UFC). Com os resultados obtidos é possível aproximar a concentração celular da suspensão em cada ponto, obtida a partir da equação $n^{UFC} \cdot 10^2 \cdot 10^{-(diluição)}$. Bem como obter gráficos do crescimento das OD em função do tempo, caracterizando a curva de crescimento descrita por MONOD (1949) e possibilitando o cálculo da μ_{max} (velocidade específica de crescimento da bactéria na fase exponencial). Essa velocidade é obtida quando transformamos os valores de OD em ln e então plotamos de forma a obter uma reta que segue a função $Y = aX + b$, por regressão linear. Obtendo a equação desta reta, chegamos em a (coeficiente angular) que equivale a μ_{max} .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 duas vertentes que podem ser analisadas, primeiro a diferença entre os comportamentos da curva em cada aparelho, e o comportamento dos diferentes comprimentos de onda na mesma curva. Os comprimentos de onda maiores apresentam uma menor

sensibilidade nas leituras de densidade óptica, em todos os modelos, as leituras apresentam valores menores. Também é interessante notar que em todos os modelos de espectro estas diferenças entre as leituras a diferentes comprimentos de onda se tornavam mais relevantes conforme a amostra ficava mais concentrada. No gráfico isto é observado pelo afastamento dos valores de OD - nos diferentes comprimentos de onda - em um mesmo momento da curva de crescimento. Como as leituras eram feitas em meio MRS, é possível que esse afastamento seja resultado do consumo dos nutrientes pela *L.plantarum*, causando flutuações nos valores de OD (Myers et al., 2013) bem como a liberação de metabólitos provenientes da fermentação.

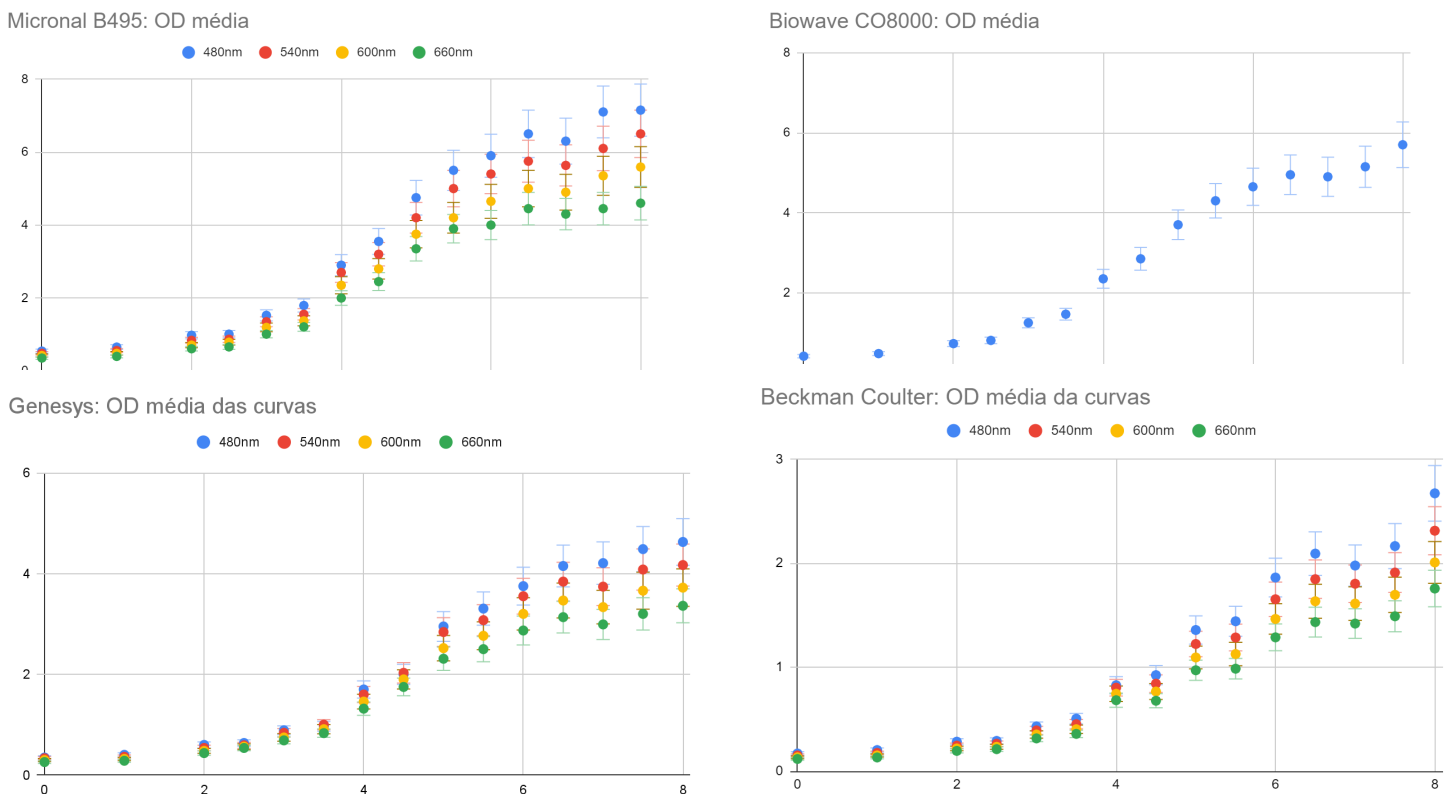


Figura 1. Densidade óptica média medida em todas as curvas para cada comprimento de onda.

As diferenças entre os modelos se mostraram relevantes, não só no valores de OD, mas também diferenças entre as conformações das curvas de crescimento obtidas, sendo menos significante somente entre os equipamentos Biowave CO8000 e o Micronal B495. Essas divergências já são bem documentadas na literatura, uma vez que instrumentos com diferentes configurações ópticas vão mostrar valores diferentes para uma mesma suspensão microbiana (C. Matlock et al., 2011). Além das diferenças entre os aparelhos é notável a diferença entre a curva obtida por Drop-plate (Figura 2) e as curvas obtidas por espectrofotometria, chamando atenção a uma problemática comum a análises que associam densidade óptica com concentração celular de forma direta, uma vez a turbidimetria em para culturas microbianas suspensas vai medir a luz espalhada (ependorf AG, 2015), dispersão essa que é realizada pela célula independente de sua viabilidade (T. Madigan et al., 2004). Ao

passo que essas células inviáveis não crescem nas placas, seja por estresse na amostra, competição, ausência de açúcares, entre outros motivos, o que configura as diferenças observadas.

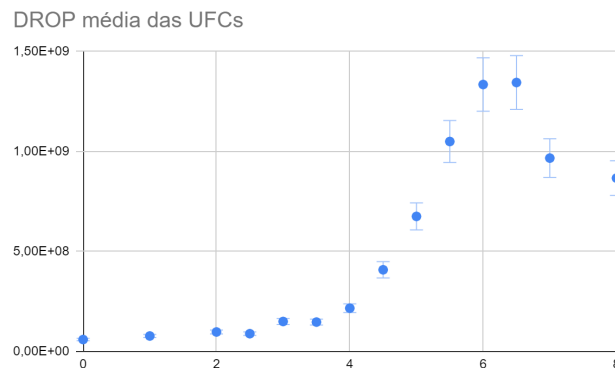


Figura 2. Média das contagens de Unidades formadoras de colônia de todas as curvas

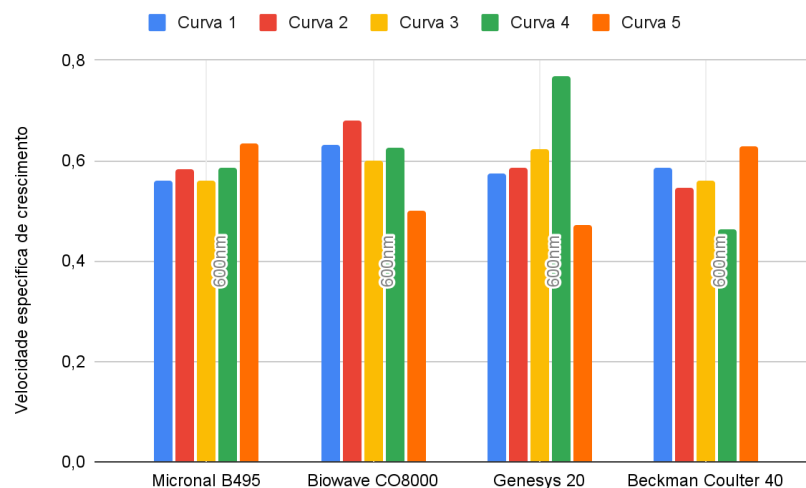


Figura 3. μ Máx do crescimento microbiano obtido em cada espectrofotômetro a 600 nm

Analisando as velocidades específicas de crescimento microbiano (Figura 3), vemos a ausência de um padrão bem definido. Alguns valores mais próximos entre si, os da curva 1, por exemplo. Outros destoam completamente, como as curvas 4 e 5. A velocidade de crescimento depende de fatores como disponibilidade de nutrientes, temperatura e pH (AGUDELO et al., 2012), que foram preparados da mesma maneira para todos os experimentos. Assim, tamanha divergência não era esperada. *L. plantarum* é um organismo que em condições ótimas pode atingir valores μ Máx maiores que $0,5h^{-1}$ (Agudelo et al., 2012 Apud FU, Wenge y MATHEWS, A.P, 1999)

CONCLUSÃO

A espectrofotometria de culturas microbianas deve ser utilizada com cautela, mantendo em mente que em amostras vivas o princípio muda de luz absorvida pela amostra para luz

espalhada quando em contato com a célula (Brian C. Matlock, 2019). Este tipo de análise é muito suscetível a variáveis, as cubetas, o comprimento de onda e o modelo de aparelho. Assim, a ausência de padronização pode levar a várias imprecisões no trabalho. E, ainda com padronização, valores de velocidade específica crescimento são muito variáveis (Figura 3), bem como as leituras de densidade óptica (Figura 1). Assim, como análise futura buscaremos entender se há algum padrão nas variações de μ_{\max} entre os equipamentos e os diversos comprimentos de onda, bem como os valores dessa velocidade nas curvas obtidas a partir da metodologia Drop-plate. Além disso, veremos se há uma relação linear entre as leituras de OD e as contagens de unidades formadoras de colônias que permita comparar esses dois valores de forma direta.

REFERÊNCIAS

- Seddik, H.A., Bendali, F., Gancel, F. et al. **Lactobacillus plantarum and Its Probiotic and Food Potentialities. Probiotics & Antimicro. Prot.** 9, 111–122 (2017). <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9264-z>. Acessado em: Julho 2023
- Leichtweis, Nilvane Perondi, and Graziela Bruschi Brinques. **Produção e aplicação de probióticos em alimentos.** Salão de Iniciação Científica (19.: 2007: Porto Alegre). Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2007. (2007). Acessado em: Julho 2023
- COUËRET, Valérie et al. **Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products.** Le Lait, INRA Edição, 2003, 83 (4), pp.269-306. Acessado em: Julho 2023
- LIMA, AKO et al. **Bactérias lácticas e sua importância na indústria de alimentos e saúde: Uma revisão.** Diversidade Microbiana da Amazônia 2015. Editora INPA, [S. l.], p. 330-335, 14 maio 2022. Acesso em: Julho 2023.
- Hatti-Kaul R, Chen L, Dishisha T, Enshasy HE. **Lactic acid bacteria: from starter cultures to producers of chemicals.** FEMS Microbiol Lett. 2018;365(20):10.1093/femsle/fny213. Acessado em: Julho 2023
- White Paper; **OD600 Measurements Using Different Photometers – Why does the absorbance value of turbidity measurements vary using different photometers?**, Eppendorf, 2015.
- White Paper; **Factors Influencing OD600 Measurements - Which factors influence microbial growth and with this varying absorbance values of turbidity measurements using the same photometer?**. Eppendorf, 2015
- Brian C. Matlock, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE USA. **Differences in bacterial optical density measurements between UV-Visible spectrophotometers.** Thermo Fisher Scientific, technical note. 2019.
- Dalcanton, Francieli. **Modelagem matemática do crescimento de bactérias ácido lácticas em condições isotérmicas e não isotérmicas.** Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2010.
- MONOD, Jacques. **The Growth of bacterial cultures.** Pasteur Institute, Paris, França, p. 372-395, 1949. Acesso em: Julho 2023
- Orozco Murillo, M y Solarte, J. (2003). **Búsqueda del mejor medio de cultivo y modelamiento cinético para la obtención del ácido láctico a partir de glucosa por vía fermentativa.** Acesso em: Julho 2023
- Wenge Fu, A.P. Mathews. **Lactic acid production from lactose by Lactobacillus plantarum: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen.** Biochemical Engineering Journal Volume 3, Issue 3, June 1999, Pages 163-170. Acesso em: julho 2023
- Agudelo, Claudia, Rodrigo Ortega, and José Luis Hoyos. **Determinação de parâmetros cinéticos de dois inóculos lácticos: Lactobacillus plantarum A6 e bactérias ácido lácticas de iogurte.** Biotecnología en el Sector agropecuario y agroindustrial 8.2 (2010): 08-16. Acesso em: Julho 2023
- Myers, J.A., Curtis, B.S. & Curtis, W.R. **Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density.** BMC Biophys 6, 4 (2013). Acesso em : Julho 2023