



Comparação de metodologias para a determinação da concentração celular em suspensões de *Saccharomyces cerevisiae*

Palavras-Chave: Curva de crescimento, velocidade específica de crescimento, concentração celular, levedura

Autores(as):

GIULIA EMI SETO TAKAKU, FEA

Dr(a). ALINE DE SOUZA LOPES, FEA

Prof. Dr. ANDREAS GOMBERT, FEA

INTRODUÇÃO:

O estudo sobre o crescimento de populações de leveduras pode ser feito a partir da análise da curva de crescimento e de alguns parâmetros como a velocidade específica de crescimento (μ_{MAX}) do microrganismo. Para que se possa realizar essas análises, é necessário quantificar o número de células durante as várias fases ou momentos de desenvolvimento do crescimento da população de leveduras.

Uma maneira rápida e eficaz de acompanhar esse crescimento é através da medição da densidade óptica, que mede a turbidez de uma suspensão microbiológica por meio da determinação do espalhamento da luz detectada por um espectrofotômetro num dado comprimento de onda, por exemplo a 600 nm (OD_{600}) (Eppendorf, 2015). Porém, por se tratar de um método indireto de quantificação celular, é necessária uma calibração contra um método direto, como a contagem de células viáveis por plaqueamento ou por microscopia. Além disso, independentemente dos instrumentos utilizados, essas verificações devem ser realizadas em diferentes diluições de uma suspensão, durante vários momentos ao longo do crescimento de uma cultura controle (Koch, 1970).

Entretanto, os resultados obtidos por diferentes métodos podem ser diferentes, um aspecto que tem sido pouco estudado de forma sistemática. Pesquisadores comumente comparam seus resultados com outros, publicados na literatura, sem considerarem que diferentes métodos de quantificação da concentração celular podem levar a diferentes resultados. Isso motivou a realização do presente estudo, em que usamos 4 diferentes aparelhos para medir a turbidez, além da contagem de colônias em placas de Petri e da contagem microscópica, para quantificar a concentração de células de levedura em amostras retiradas durante uma curva de crescimento. Com esses dados, as diferentes curvas de crescimento foram analisadas e os valores de μ_{MAX} foram calculados.

METODOLOGIA:

- **Cultivo**

A amostragem foi realizada a partir de cultivos de fermento biológico seco (*Saccharomyces cerevisiae*), marca Dr. Oetker, adquirido num supermercado local. As células foram cultivadas em meio de cultura YPD (Yeast extract – peptone -dextrose: extrato de levedura, 10 g/L; peptona, 20 g/L; glicose, 20 g/L), em frascos tipo Schott de 250 ml, com volume total de 100 mL, num Banho Metabólico com Agitação Reciprocante, tipo Dubnoff MA 093 (Marconi), controlado a 30°C e com agitação de 150 rpm. As análises de concentração celular foram realizadas de hora em hora, através de dois métodos diretos e um método indireto (esse em 4 aparelhos diferentes), descritos abaixo. Os cultivos terão duração total de cerca de 8 h.

- **Contagem de levedura em microscópio**

A contagem do número de leveduras em uma amostra foi realizada pelo método de contagem microscópica, em microscópio Zeiss Axiostar, junto com o auxílio de uma câmara de Neubauer, que consiste em uma grade quadriculada (grid), e uma lamínula. O detalhamento deste método encontra-se descrito em Ceccato-Antonini (2017) .

- **Contagem de células viáveis**

Na contagem de células viáveis, utilizou-se o método drop plate de diferentes diluições das amostras, em placas de Petri contendo meio YPD solidificado com ágar (2%), seguido por incubação a 30 °C por 24 h. Placas apresentando entre 3 e 30 colônias foram selecionadas para a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/ml). Os detalhes desta metodologia encontram-se descritos em Silva et al. (2017) .

- **Medida da densidade óptica**

O método indireto a ser usado é a medida da densidade óptica, que mede a turbidez da amostra por meio do espectrofotômetro. As análises foram realizadas em quatro equipamentos diferentes: B 495 MicronaL, DU 640 Beckman Coulter, CO 8000 Cell Density Meter WPA Biowave, e Genesys 20 Thermo. O comprimento de onda utilizado na análise foi de 600 nm, pois trata-se do comprimento mais comumente empregado em estudos publicados e porque normalmente não há absorvância por componentes do meio de cultivo.

Antes de realizar a leitura, as amostras foram homogeneizadas por um agitador de tubos por cinco segundos. Além disso, como a DO_{600} é proporcional ao número de células dentro de certos limites, a leitura foi realizada dentro da faixa de linearidade dos equipamentos, não ultrapassando o valor de 0,4.

- **Tratamento dos dados**

Os cultivos com a levedura foram realizados em triplicata (triplicata biológica).

Curvas de crescimento: Os dados de concentração celular obtidos por cada método empregado foram dispostos num mesmo gráfico, de cada ponto experimental são apresentados. Com base em cada uma das metodologias, uma curva (linha de tendência) foi traçada, excluindo-se pontos eventualmente não confiáveis, conforme indicado por Della-Bianca, et al. (2021).

Velocidade específica máxima de crescimento: calculou-se o logaritmo natural de cada dado de concentração celular e os valores foram plotados em função do tempo. A região linear de cada curva foi determinada por inspeção visual, uma regressão linear foi calculada e o coeficiente angular da reta é considerado o valor de μ_{MAX} (Della-Bianca, et al. 2021).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A Imagem 1, demonstra o compilado dos resultados obtidos a partir de um dos cultivo de *S. cerevisiae*, em meio de cultivo YPD. As amostras foram retiradas a cada uma hora e submetidas a análise nos espectrofotômetros e pelos métodos diretos, representados pelas linhas tracejadas.

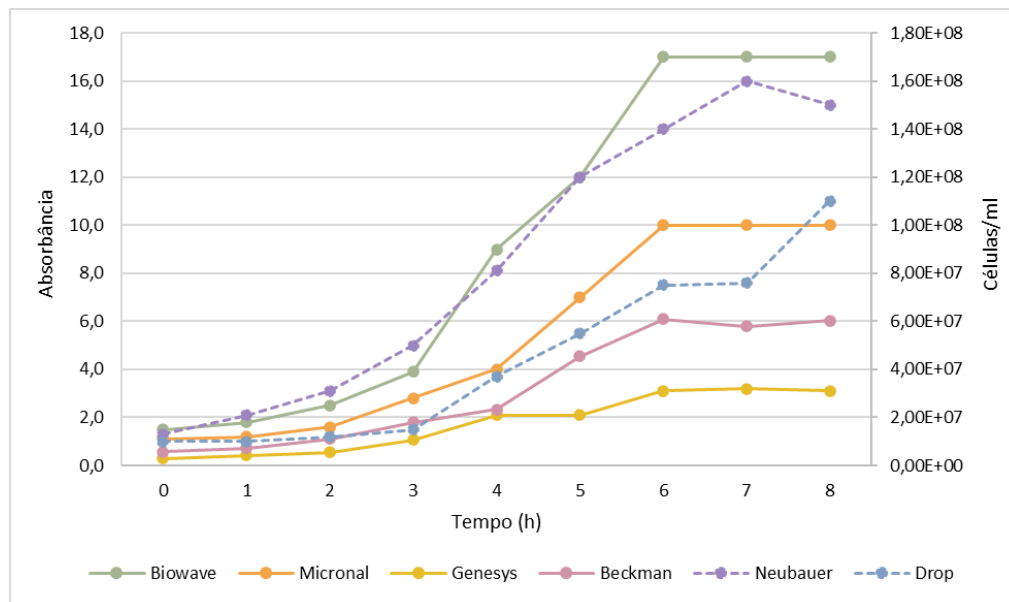


Figura 1: Curva de crescimento analisada pelos diferentes métodos no dia 16 de junho de 2023

Fonte: Elaboração Própria (2023)

Na Imagem 2, os valores calculados do μ_{MAX} foram reunidos e dispostos em um gráfico de barras, contendo os resultados obtidos nos três ensaios independentes realizados.

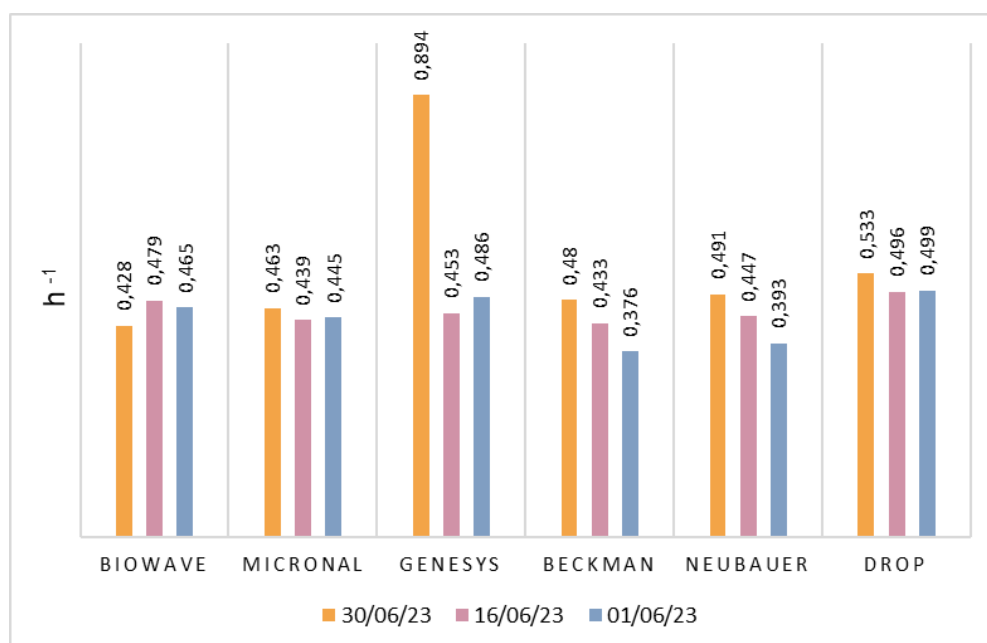


Figura 2: Valores de MMAX calculados em três ensaios independentes, por metodologia de medida da concentração celular

Fonte: Elaboração Própria

Comparando os métodos diretos de quantificação para uma mesma suspensão, verificou-se que a concentração celular pela microscopia em Câmara de Neubauer apresentou valores superiores aos encontrados pelo Drop (Figura 1). Trata-se de um resultado esperado, uma vez que o Drop faz a contagem de células viáveis, enquanto na contagem pela Câmara de Neubauer, não há distinção entre células viáveis e não-viáveis. Contudo, observou-se que os valores de μ_{MAX} encontrados para os três ensaios, a partir dos dados de contagem microscópica, são inferiores aos obtidos para os dados obtidos pelo método do Drop plate.

Quando a mesma amostra foi submetida aos diferentes espectrofotômetros, observou-se resultados de absorvância diferentes para cada equipamento. Segundo Eppendorf (2015), quando se trata de medições de densidade óptica, a amostra não absorve a luz, mas a reflete em uma direção aleatória por cada partícula (célula) da amostra. Isso significa que as células microbianas espalham a luz dependendo principalmente de seu tamanho e forma.

Apesar disso, é possível notar que houve alguns saltos no resultado da absorvância de alguns espectrofotômetros quando aumentou-se a diluição da amostra, antes da medida, de 10^{-1} para 10^{-2} , mesmo respeitando a faixa de linearidade do equipamento. Como, por exemplo, nos pontos da terceira para a quarta hora na curva do CO 8000 WPA Biowave (Figura 1), em que houve um salto de 3,9 para 9,0 de absorvância.

Em relação à divergência das leituras de densidade óptica, Koch (1970) relata que o uso de diferentes equipamentos influencia na leitura da turbidez, na fase lag e no cálculo da taxa específica de crescimento. Segundo Eppendorf (2015), os resultados podem ser influenciados por diversos fatores, sendo um deles a configuração óptica de cada equipamento. Idealmente, a abertura de saída deve ser a menor possível para uma melhor resolução, para que apenas uma porção da luz espalhada seja detectada. E, por isso, recomenda-se realizar um cultivo individual para cada microrganismo escolhido e para cada equipamento utilizado. (Eppendorf, 2015).

A exemplo disso, tomando a quarta hora (Figura 1) como referência, observa-se que o CO 8000 Biowave WPA apresentou uma DO_{600} de 9,0, enquanto o Thermo Genesys 20 apresentou um valor de 2,1, para a mesma amostra.

Além disso, os valores de μ_{MAX} encontrados foram diferentes para cada um dos quatro espectrofotômetros. Segundo Della-Bianca et al. (2021), a calibração do método direto contra o indireto pode ser realizado de diversas maneiras, que podem influenciar no valor de μ_{MAX} . Sendo assim, como os valores de absorvância para cada espectrofotômetro foram diferentes para a mesma amostra, a calibração com o método direto irá gerar um valor de μ_{MAX} diferente para cada equipamento.

Segundo Steckelberg (2001), a taxa de crescimento é específica para cada microrganismo e que nas destilarias brasileiras o valor deste parâmetro para as cepas com características fermentativas

satisfatórias está na faixa de 0,5 h⁻¹. Uma classificação feita por Stroppa et al (2009) , dividiu a μ_{MAX} em três níveis: menor que 0,45 (baixo); entre 0,45 e 0,55 (médio) e maior que 0,55 h⁻¹(alto). Sendo assim, verifica-se que os valores de μ_{MAX} encontrados são similares aos relatados pela literatura e a maioria se encontra no nível médio, por exceção do valor encontrado no dia 30 de junho de 2023, no qual o Genesys 20 obteve um μ_{MAX} de 0,894 h⁻¹, muito acima dos outros resultados coletados.

CONCLUSÕES:

Os valores de densidade óptica foram diferentes, dependendo do espectrofotômetro utilizado. Desse modo, a comparação desses resultados com valores presentes na literatura, em outros ensaios realizados com condições de cultivos diferentes, ou até mesmo usando equipamentos diferentes de medida da turbidez, pode gerar erros de interpretação, pois não são valores correspondentes.

Posteriormente, para determinar se as curvas geradas são iguais ou não, será um Teste de Tukey. Em vez de se adotar um cut-off (como por exemplo $p < 0,05$), será calculado e apresentado os p-values e uma discussão a ser realizada com base nisto (Amrhein et al, 2019). Pretendemos verificar o quanto as curvas de crescimento diferem umas das outras, quando diferentes metodologias são usadas para levantamento da curva de crescimento. Assim como os diferentes valores de μ_{MAX} serão comparados por meio do teste de Tukey, conforme indicado acima para as curvas de crescimento.

BIBLIOGRAFIA

AMRHEIN, V., Greenland, S., McShane, B. **Scientists rise up against statistical significance.** Nature 567, 305-307 (2019). doi:<https://doi.org/10.1038/d41586-019-00857-9>

CECCATO-ANTONINI. S. R. **Microbiologia da fermentação alcoólica: a importância do monitoramento microbiológico em destilarias.** Editora UFSCar, 1a ed. 2017.

DELLA-BIANCA, B.; Gombert, A.; Rodrigues, C. **μ_{MAX} of *Saccharomyces cerevisiae*: so often used so seldom put into perspective.** Research Square (preprint). 2021. <<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-182823/v1>>. Data de acesso: 11/07/23.

EPPENDORF. **OD600 Measurements Using Different Photometers.** White Paper. No 28. 2015.

EPPENDORF. **Factors Influencing OD600 Measurements.** White Paper. No 27. 2015.

FUKUDA, Nobuo. **Apparent diameter and cell density of yeast strains with different ploidy.** Scientific reports vol. 13,1 1513. 27 Jan. 2023. doi:10.1038/s41598-023-28800-z

KOCH, A.L. **Turbidity Measurements of Bacterial Cultures in Some Available Commercial Instruments.** Department of Microbiology. Analytical Biochemistry, Volume 38, Issue 1, Pages 252-259, Indiana University. Bloomington, Indiana. 1970.

SILVA, N., et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água.** 5a Edição Editora Edgard Blucher. São Paulo. 2017.

STECKELBERG, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas.**Campinas. SP: [s.n.], 2001.

STOPPA, C. T., et al. **Parâmetros cinéticos de linhagens de levedura isoladas de alambiques mineiros.** Ciência e Agrotecnologia. 2009.. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542009000700048>