



MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA MÁXIMA EM CINÉTICAS DE CRESCIMENTO DE MICROORGANISMOS

Palavras-Chave: CRESCIMENTO MICROBIANO, VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO MÁXIMA, CRESCIMENTO MICROBIANO EXPONENCIAL

Autores:

ALEXANDRE SOARES DE CARVALHO, FEQ – UNICAMP

Prof. Dr. MARCUS BRUNO SOARES FORTE (co-orientador), FEA – UNICAMP

Prof. Dr. ANDREAS KAROLY GOMBERT (orientador), FEA – UNICAMP

OBJETIVO:

Comparar diferentes metodologias de cálculo da velocidade específica máxima de crescimento (μ_{MAX}) de uma população microbiana, a partir de dados experimentais de concentração celular, obtidos durante cultivos em modo descontínuo.

INTRODUÇÃO:

A biotecnologia surge de interações estratégicas entre ciência e engenharia, resultando em produtos tecnológicos com grande aplicação nas áreas de medicina, agricultura, indústria e controle ambiental (BUTLER, 2011). Porém, foi apenas em 1980 que a natureza comercial da biotecnologia ficou clara, com a primeira patente emitida para um organismo vivo, submetida pela Exxon para uma espécie de *Pseudomonas* geneticamente modificada (GOODMAN, 2009 *apud* BUTLER, 2011).

Desde então, o mercado de biotecnologia vem ganhando força, a ponto de em 2020, os produtos de biorrefinarias representarem 586,8 bilhões de dólares no mercado global, com uma taxa de crescimento anual composta estimada em 8,1% até 2025 (BCC RESEARCH, 2021). Persistem, porém, vários desafios tecnológicos ligados à complexidade inerente à biotecnologia, como, o cultivo em microplacas, que requer uma análise de vários cultivos (centenas ou milhares) de maneira ágil.

Consequentemente, entender o crescimento microbiano e a formação de produtos ao longo do tempo é essencial, o que é feito através dos estudos cinéticos. Eles envolvem toda a dinâmica da vida microbiana: crescimento em si, sobrevivência e morte, formação de produtos, adaptações, mutações, ciclos celulares, efeitos ambientais e interações biológicas (PANIKOV, 2011).

Um dos focos dos estudos cinéticos é a determinação da taxa ou velocidade com que uma população cresce, cujo principal parâmetro é a velocidade específica de crescimento, representada pela letra grega μ e que tem dimensões de T^{-1} (DORAN, 2012). Ao longo do crescimento populacional do

microrganismo, existe uma fase em que as células não encontram nenhuma limitação de nutrientes nem qualquer inibição, e o meio está sob condições físico-químicas adequadas e com mistura perfeita. A população então cresce à maior velocidade possível (velocidade específica de crescimento máxima, μ_{MAX}), até que um substrato se torne limitante do crescimento ou algum composto atinja concentrações inibitórias. Esse período recebe o nome de fase de crescimento exponencial e ocorre com muita frequência tanto em pesquisas quanto em situações aplicadas (RODRIGUES, 2021; PANIKOV, 2011). De maneira geral, a otimização de bioprocessos visa ampliar essa fase ao longo da batelada.

Segundo Doran (2012), na fase exponencial, uma das simplificações possíveis é considerar μ constante e equivalente a μ_{MAX} . Nessa fase, o crescimento pode ser descrito pelas Equações 1 e 2, sendo X_0 a concentração inicial e X a concentração de células num instante t da fase exponencial.

$$\mu_{MAX}t = \ln X - \ln X_0 \quad (1)$$

$$X(t) = X_0 \cdot e^{\mu_{MAX} \cdot t} \quad (2)$$

Entretanto, a velocidade de crescimento não é máxima durante todo o tempo de cultivo. No início, tende a ser menor, para uma “adaptação”. Ao final, metabólitos tóxicos, competição intraespecífica, entre outros fatores, tendem a diminuir também o valor da velocidade. Por isso, o comportamento mais comum do crescimento microbiano é o representado pela Figura 1 (PANIKOV, 2011). A fase exponencial corresponde à região destacada no gráfico, na qual a velocidade específica de crescimento é máxima e a curva de $\ln(X)$ em função do tempo se aproxima de uma reta. Diversas formas de determinar o parâmetro μ_{MAX} são propostas pela literatura, mas o mais tradicional (e que será chamado neste trabalho de método tradicional) está representado na parte inferior da mesma Figura 1 e será mais bem explicado na Metodologia.

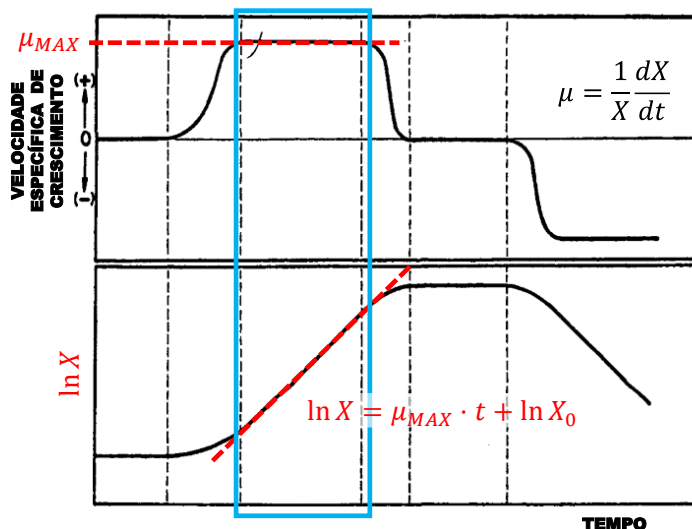


Figura 1 - Velocidade específica de crescimento máxima – fonte: Adaptado de Monod (1949)

METODOLOGIA:

A metodologia pode ser dividida em duas partes: a obtenção de μ_{MAX} por diferentes métodos e a comparação dos resultados obtidos entre si, através de uma análise estatística.

OBTENÇÃO DE μ_{MAX} : primeiramente, a velocidade específica máxima de crescimento foi obtida pelo método mais difundido pela literatura. Ele consiste em fazer um gráfico de $\ln(X)$ em função do tempo, determinar visualmente a região que compreende a fase exponencial (reta de maior inclinação) e fazer a regressão linear dos pontos compreendidos nessa região. O coeficiente angular da reta (inclinação) corresponde ao valor de μ_{MAX} , conforme mostra a Figura 2. O procedimento foi repetido para todos os cultivos, incluindo as replicatas.

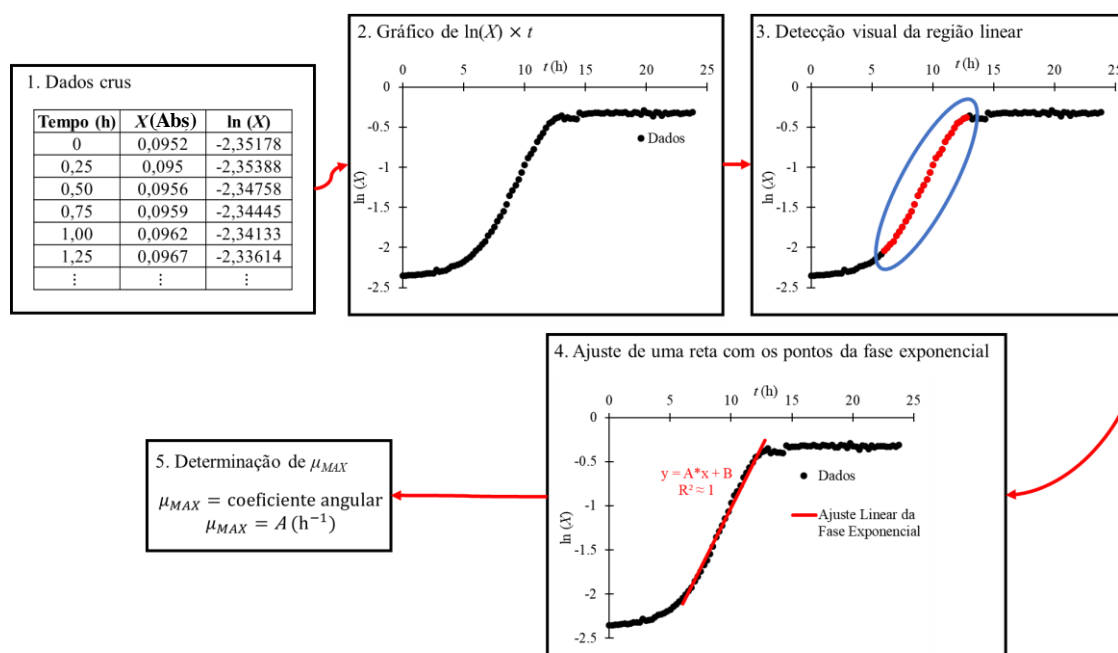


Figura 2 - Passo a passo do método visual para a determinação de μ_{MAX} – fonte: Autoria própria.

Em seguida, vários métodos automáticos para o cálculo da velocidade específica de crescimento máxima foram aplicados: as propostas de Cunha (2022) – Método Geométrico; Trivellin *et al.* (2022) – Método de *Splines*; Le Duy; Zajic (1973) – Método de Derivadas Geométricas; e o Modelo de Gompertz Modificado, apresentado por Zwietering *et al.* (1990) e presente na linguagem de programação R. Também, para cada modelo, todos os cultivos foram analisados, incluindo as replicatas. Finalmente, as rotinas foram repetidas – inclusive o método tradicional – considerando-se a metodologia proposta por Rodrigues *et al.* (2021), em que cada modelo foi ajustado a todas as replicatas de uma mesma linhagem simultaneamente.

ANÁLISE ESTATÍSTICA: Algumas propostas de análises estatísticas foram levantadas. Um estudo mais detalhado se faz necessário para compreender bem o significado e aplicação de cada teste. Por ora, o principal meio comparativo foi o módulo do desvio relativo, cujo cálculo foi feito conforme a Equação 3, para cada valor de μ_{MAX} obtido.

$$\text{Desvio Relativo} = \frac{|\mu_{MAX_i} - \mu_{MAX_A}|}{\mu_{MAX_A}} \quad (3)$$

Em que:

A = Método visual usual;

i = Outros métodos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os resultados apresentados foram obtidos a partir dos dados fornecidos por Beato (2016). Para uma melhor visualização, os resultados dos cinco métodos mais próximos foram colocados em um gráfico, usando os dados de crescimento em glicose (Figura 3).

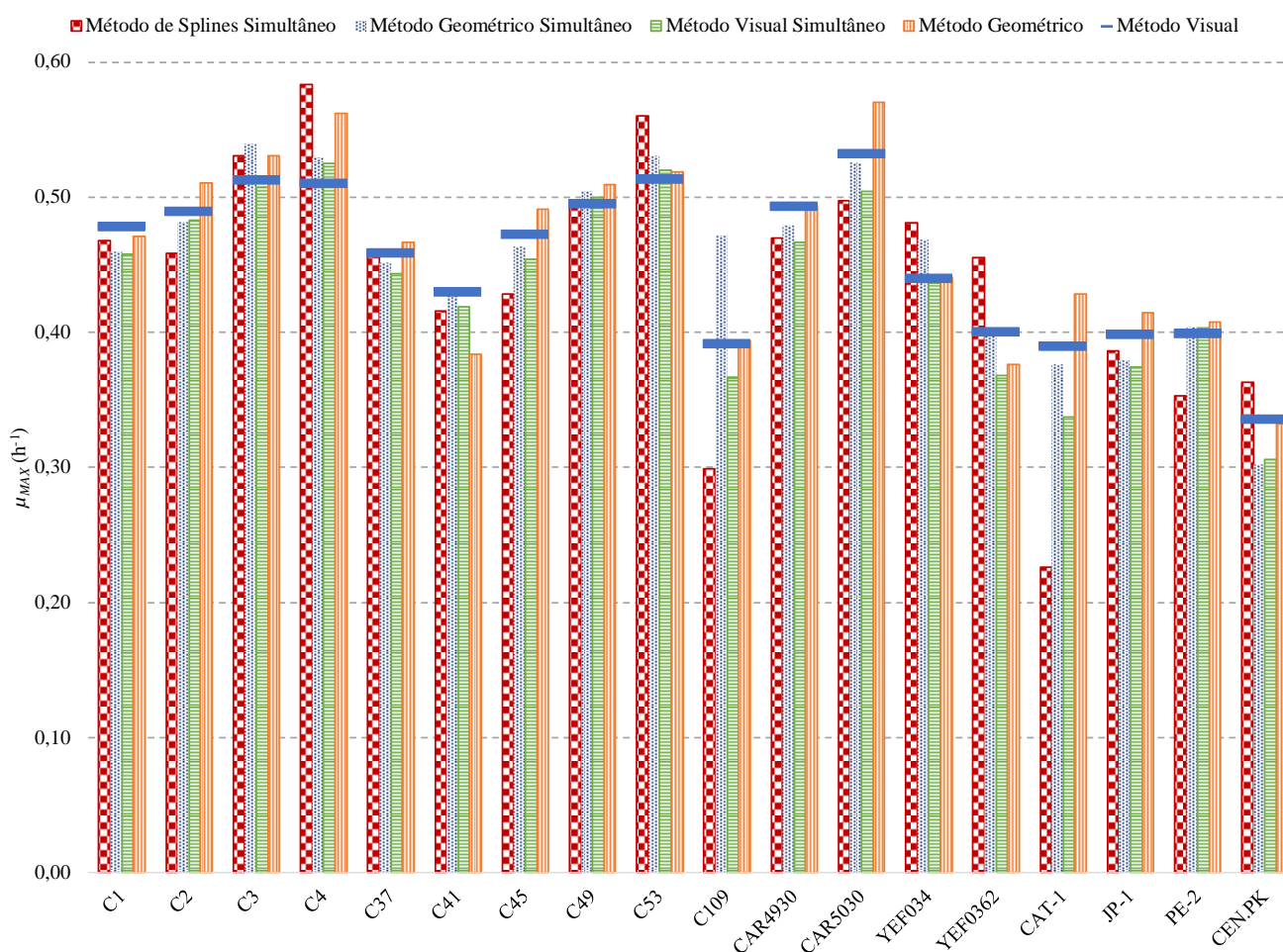


Figura 3 - Comparação gráfica dos valores obtidos para μ_{MAX} entre alguns métodos e o método visual – fonte: Autoria própria

É possível observar que os valores mostrados na Figura 3 são relativamente próximos entre si, mostrando um indício de que os métodos podem ser intercambiáveis. Apesar disso, alguns cultivos apresentaram resultados bastante distintos, especialmente quando se compara o método de *splines* simultâneos com os demais. Uma das explicações possíveis é o formato da curva. Provavelmente, existe alguma característica no perfil de crescimento que impactou na aplicação do método.

Já no caso do desvio relativo, o parâmetro permitiu inferir qual método é mais próximo do tradicional. A Tabela 1 apresenta a frequência com que cada método apresentou o menor desvio relativo. Analisando cultivo a cultivo, para encontrar o menor desvio, chegou-se à conclusão de que os quatro mais semelhantes ao tradicional, nesta ordem, são: método visual com as curvas ajustadas simultaneamente; método proposto por Cunha (2022) com as curvas ajustadas separadamente; esse mesmo método com as curvas ajustadas simultaneamente; método proposto por Trivellin *et al.* (2022), curvas ajustadas simultaneamente.

Frequência com que cada método apresentou o menor desvio relativo		
	Método	Frequência
Curvas Ajustadas Separadamente	Cunha (2022)	17
	Trivellin <i>et al.</i> (2022)	0
	Zwietering <i>et al.</i> (1990)	0
	Le Duy e Zajic (1973)	0
Curvas Ajustadas Simultaneamente	Visual	20
	Cunha (2022)	11
	Trivellin <i>et al.</i> (2022)	10
	Zwietering <i>et al.</i> (1990)	0
	Le Duy e Zajic (1973)	0

Tabela 1 - Frequência com que cada método apresentou o menor desvio relativo – fonte: Autoria própria

CONCLUSÕES:

Antes de tudo, este trabalho abriu margem para uma discussão a respeito de “um método correto para determinar a velocidade específica de crescimento máxima”. Ao longo de muitos anos, várias publicações têm assumido como verdade absoluta os valores obtidos pelo método tradicional. Nesse sentido, a iniciação científica abre margem para um questionamento sobre se determinado método é válido ou não e, por esse motivo, uma análise estatística mais profunda é muito importante para que se possa confirmar ou não a validade dos métodos, incluindo o tradicional. Assim, um melhor estudo estatístico está sendo desenvolvido ainda durante a iniciação científica.

Por outro lado, a relativa proximidade entre os valores obtidos por muitos dos métodos aplicados leva à conclusão de que é possível encontrar métodos automáticos com resultados muito próximos ao manual. Dessa forma, não apenas a vida de pesquisadores poderá ser facilitada – minimizando o tempo para o cálculo de parâmetros – mas também essa ideia poderá ser levada a indústrias e laboratórios de larga escala, nos quais o volume de dados é muito grande e a velocidade de processamento deve ser máxima.

Por fim, vale destacar que, para este trabalho, foram analisados somente dados de cultivos com leveduras. No futuro, será interessante realizar a análise com dados de outros microrganismos, como bactérias e bolores, e observar como o microrganismo impacta nos resultados obtidos por cada método.

BIBLIOGRAFIA

BEATO, F. B. **Fisiologia de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de biomas brasileiros: novos olhares sobre a biodiversidade e aspectos relevantes para aplicações industriais**. 2016. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

BCC RESEARCH. Report Overview. *In*: BCC RESEARCH. **Biorefinery Products: Global Markets**. [S. l.]: BCC Publishing, 2021. cap. Report Highlights.

BUTLER, M. 1.01 - Introduction. *In*: MOO-YOUNG, M. (Ed.). **Comprehensive Biotechnology**. 2. ed. Burlington: Academic Press, 2011. p. 1–2. ISBN 978-0-08-088504-9.

CUNHA, G. C. G. **Desenvolvimento de um meio de cultura sintético definido para imitar melaço de cana-de-açúcar em fermentação etanólica**. 2022. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 2022.

DORAN, P. M. Chapter 12 - Homogeneous Reactions. *In*: DORAN, P. M. (Ed.). **Bioprocess Engineering Principles**. 2. ed. London: Academic Press, 2012. p. 599–703. ISBN 978-0-12-220851-5.

LE DUY, A.; ZAJIC, J. E. A geometrical approach for differentiation of an experimental function at a point: Applied to growth and product formation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 15, n. 4, p. 805-810, 1973.

PANIKOV, N. 1.20 - microbial growth dynamics. *In*: MOO-YOUNG, M. (Ed.). **Comprehensive Biotechnology**. 2. ed. Burlington: Academic Press, 2011. p. 257–283. ISBN 978-0-08-088504-9.

RODRIGUES, C. I. S.; DELLA-BIANCA, B. E.; GOMBERT, A. K. μ_{MAX} of *Saccharomyces cerevisiae*: So often used, so seldom put into perspective. **Research Square Platform LLC**, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-182823/v1>.

TRIVELLIN, C.; OLSSON, L.; RUGBJERG, P. Quantification of microbial robustness in yeast. **ACS Synthetic Biology**, American Chemical Society (ACS), v. 11, n. 4, p. 1686–1691, 2022.

ZWIETERING, M. *et al.* Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and environmental microbiology**, Am Soc Microbiol, v. 56, n. 6, p. 1875–1881, 1990.