

## CONSTRUÇÃO E CALIBRAÇÃO DE EQUIPAMENTO PARA MONITORAMENTO DE CULTIVOS MICROBIANOS EM AGITADORES

MATHEUS ACEVEDO MONTANO<sup>1</sup>; JACKSON GABRIEL MORAIS BECKER <sup>2</sup>;  
ADRIEL PENHA MUNHOZ<sup>3</sup>; PATRÍCIA DIAZ DE OLIVEIRA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Graduação em Biotecnologia - UFPEL – matheusmontano64@hotmail.com

<sup>2</sup>Graduação em Biotecnologia - UFPEL – kato\_becker@hotmail.com

<sup>3</sup>Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFPEL-  
adrielmunhoz@hotmail.com

<sup>4</sup>Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de alimentos; Programa de Pós  
Graduação em Biotecnologia - UFPEL – bilicadiaz@yahoo.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

Cerca de 90% dos estudos envolvendo bioprocessos começam com a utilização de cultivos agitados em torno de 0,5-5,0L, tendo em vista ser um método barato e rápido de pesquisa (BÜCHS, 2001). Os agitadores orbitais – conhecidos como *shakers* - são equipamentos usuais de qualquer laboratório que lida com microbiologia. São usados para bioprospecção de microorganismos de interesse biotecnológico e na otimização do processo de fermentação (FREYER; KÖNIG; KÜNKEL, 2004). *Shakers* efetuam apenas dois controles da fermentação: temperatura e agitação. A temperatura ótima de crescimento é importante para reduzir o tempo de duplicação (WANG; LEVIN, 2010) e maximar as atividades enzimáticas. A agitação é importante para homogeneizar o meio de cultura, auxiliar na dispersão das bolhas de ar e manter as células em suspensão, dessa forma auxiliando na transferência de massa e de energia para o sistema fermentativo (POLIDORO, 2014).

Para o cultivo de microrganismos ressalta-se também a importância da determinação de outros parâmetros químicos como oxigênio dissolvido (OD, mg/L) e o potencial hidrogeniônico (pH,  $-\log_{10}[\text{H}^+]$ ). O oxigênio é um elemento químico chave no metabolismo microbiano estando relacionado a síntese de ATP (trifosfato de adenosina) que está envolvida no crescimento microbiano. Já o pH é necessário seu controle, posto que no metabolismo celular ocorre a síntese de compostos químicos com caráter ácido ou básico que modificam a característica química do meio de cultivo tornando esse impróprio a sobrevivência microbiana. Logo, é importante ter o conhecimento da curva de crescimento de determinado microrganismo; sua sensibilidade à falta de oxigênio; sensibilidade à mudanças de pH e reagentes que limitam seu crescimento, porque são decisivos para se obter respostas reais sobre produtividade, crescimento e qualidade do bioproduto obtido (LIMA et al., 2001).

Ao desenvolver um processo que utiliza microrganismos não é possível testar todas as estirpes sob todas as condições possíveis, deste modo é necessário trabalhar com volumes menores, antes de proceder-se com o *scale-up* a nível industrial. Para isso, é necessário que os dados obtidos em *shakers* possam reproduzir as condições industriais, pelo menos para os quesitos identificados como os mais importantes (FADHEL; CHAABANE, 2013).

O monitoramento e controle de pH e OD ainda permanecem como sistemas caros entre os equipamentos comerciais disponíveis, como exemplo os sistemas de monitoramento Sensolux (Sartorius), *Shake Flask Reader* (PreSens), Dasgip (Eppendorf), RAMOS (Kuhner), entre outros. Várias diferenças podem ser observadas entre os produtos disponíveis no mercado com o trabalho aqui

discorrido (Tabela 1). Além dos quesitos mencionados na tabela, a tecnologia de referência apresenta outra limitação pontual e clara para o Brasil: falta de mão de obra técnica para manutenção.

Tabela 1. Comparação entre as tecnologias.

Tecnologia de referência	Tecnologia proposta
Alto custo (aquisição)	✓ Baixo
Alto custo (manutenção)	✓ Baixo
Venda combinada (Shaker + Sistema de controle)	✓ Somente o sistema de controle
Restrita à modelos específicos de <i>shakers</i>	✓ Ajustável à qualquer modelo
Agitação com impelidores	✓ Agitação orbital
✓ Múltiplos testes	Um por vez

O objetivo desse projeto é construir um equipamento para monitoramento de pH e oxigênio dissolvido para processos microbiológicos sob agitação em escala de bancada.

## 2. METODOLOGIAS

### 2.1 CONSTRUÇÃO

Foram adquiridos os materiais básicos, por exemplo, caixa de madeira e fios (*jumpers*), e os sensores necessários para a construção do equipamento. O código da sonda de oxigênio dissolvido foi obtido do próprio fabricante e o do pHmetro foi extraído de um site ([www.github.com](http://www.github.com)).

### 2.2 CALIBRAÇÃO

Para avaliar a precisão das medidas realizadas com as sondas, dois experimentos foram realizados separadamente. Primeiramente, dispunha-se de uma solução comercial de 0,0% (mg/L) de oxigênio dissolvido para avaliar a precisão da medição. De acordo com o fabricante da sonda de oxigênio (Atlas Scientific) essa solução só deve ser utilizada para calibrar quando se exige uma precisão na segunda casa decimal. Foram realizadas 5 medições com essa mesma solução a fim de verificar sua precisão. Para realizar a calibração do pHmetro, utilizou-se os tampões de pH 7,00 e pH 4,00 para obter o valor de leitura analógica (0 a 1024) de cada um. Então, com o auxílio do Excel, foi criada uma função linear entre os dois valores obtidos. Como observado por CHENG e ZHU (2005), a relação da leitura entre esses valores de pH se aproxima de uma função linear quando utilizando pHmetros com eletrodo de vidro.

### 2.3 PRECISÃO

Após, o phmetro ter sido devidamente calibrado com as soluções de pH 7,00 e pH 4,00, avaliaram-se 10 medidas sucessivas durante dois ou três minutos à temperatura ambiente, intercaladas com a limpeza em água destilada e secagem com lenço de papel seco (PEREIRA, 2016).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 CALIBRAÇÃO

A curva para calibração do phmetro (Figura 1) obtida foi utilizada na avaliação da precisão do mesmo. Para a sonda de oxigênio isto não foi necessário pois o próprio equipamento faz a calibração através de um comando.

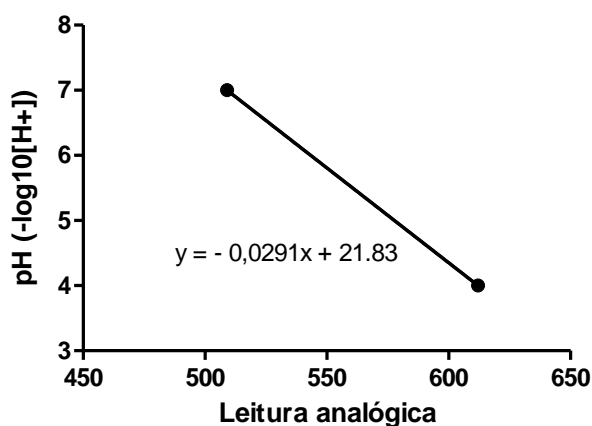


Figura 1. Curva de calibração do phmetro.

#### 3.2 PRECISÃO

Na avaliação da precisão dos instrumentos, a sonda de oxigênio dissolvido aferiu o mesmo valor de 0,00 mg/L em todas as cinco repetições. Já a sonda de pH apresentou uma pequena variação máxima ( $\Delta$ pH máx.) (Figura 2). Com o tempo de 2 minutos para estabilização, com  $\Delta$ pH máx. de 0,09, enquanto que com 3 minutos um  $\Delta$ pH máx. de 0,06, mostrando-se um tempo mais adequado. Esse resultado está de acordo com o encontrado por PEREIRA (2016) que apresentou um  $\Delta$ pH máx. de 0,045.

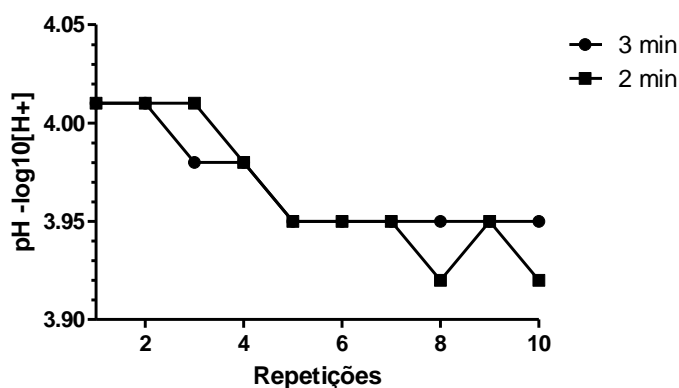


Figura 2. Estabilização da leitura de pH em tampão de referência pH 4,00.

A variação encontrada neste trabalho foi maior, no entanto, isso pode ter sido causado pelo fato de não possuir uma calibração automática de temperatura, como encontrada no trabalho citado. Como ressaltado por PINTO (2010) a temperatura afeta a leitura de pH, por exemplo, a 25 °C a diferença de potencial do sensor é em torno de 59,16 mV para cada unidade de pH, contudo, a 0 °C essa diferença passa para 54,20 mV e à 60 °C para 66,10 mV. Em virtude de que todo o equipamento irá funcionar em temperaturas constantes, indica-se que a calibração com os tampões seja feita na mesma temperatura que se procederá com a fermentação do microrganismo.

#### 4. CONCLUSÕES

Portanto, pode-se concluir que o equipamento desenvolvido por esse projeto permite a implementação do monitoramento automatizado de pH e OD, os quais somente são possíveis em bioreatores de bancada ou em *shaker* com alto custo.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFIERI MAURO. **PHMETER\_TEST**. 1 abr. 2015. Acessado em 5 de set. 2018. Disponível em: <https://github.com/>
- BÜCHS, JOCHEN. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 7, n. 2, p. 91-98, 2001.
- CHENG, K. L.; ZHU, DA-MING. **On calibration of pH meters**. *Sensors*, v. 5, n. 4, p. 209-219, 2005.
- PEREIRA, BRUNO DUARTE AZEVEDO. **Medidor de pH com calibração de pH e compensação automática de temperatura**. 2016. Tese de Doutorado.
- EFPIA (2015) **The Pharmaceutical Industry in Figures: Key Data 2015**. European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations (EFPIA) Report 2015, pp: 1-28.
- FADHEL, E. J., CHAABANE, B. Instituto Francês do Petróleo. **Selecting clones of microbial strains or animal cells that are placed under induction conditions for the production of proteins with a continuous feed of a solution containing compounds including e.g. carbon-containing substrate**, DE 102013103586 A1, 10 abril 2013, 17 outubro 2013.
- PINTO, MARINALDO FERREIRA. **Desenvolvimento de um sistema para o controle do pH da água para irrigação localizada**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- POLIDORO, TOMÁS AUGUSTO. **Desenvolvimento de biorreator de tambor rotativo em escala de bancada**. 2014.
- WANG, JUE D.; LEVIN, PETRA A. Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 822, 2009.