

Artigo - Modelagem de Fenômenos Biológicos

Raphael Levy e Erick Brito

Resumo

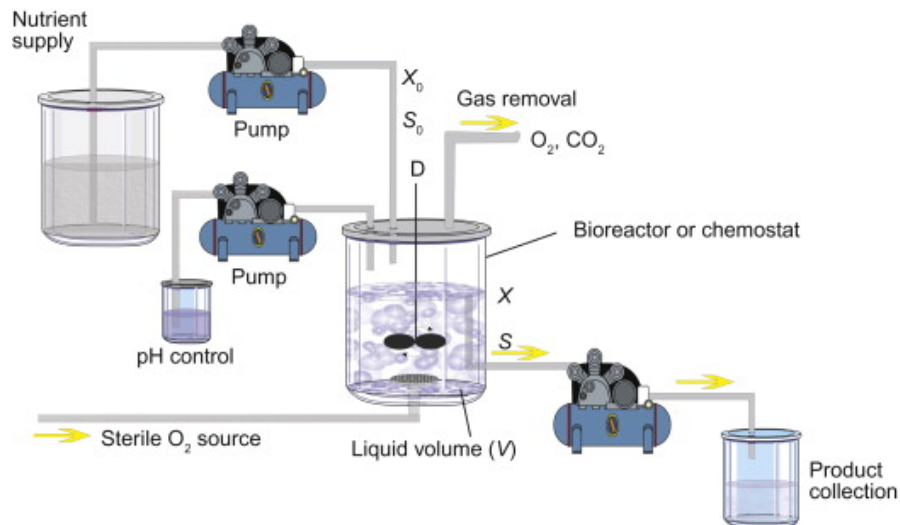
Nesse artigo iremos analisar o comportamento dinâmico de um quimiostato baseado em um modelo com equação de Monod, um tipo de modelo para o crescimento de microrganismos desenvolvido por Jacques Monod.

Abstract

In this article we will analyze the dynamic behavior of a chemostat based on a model with Monod equation, a type of model for the growth of microorganisms developed by Jacques Monod.

Introdução

Como forma de avaliação para o curso de Modelagem de Fenômenos Biológicos, decidimos analisar modelos de crescimento de microrganismos. Mais precisamente, escolhemos analisar o modelo de um **quimiostato** (**chemostat**, em inglês). O quimiostato é um tipo de biorreator, um equipamento laboratorial inventado em 1950 quase que simultaneamente por Jacques Monod e Aaron Novick & Leo Szilard, em que um meio de cultura “fresco” (substrato) é continuamente adicionado, enquanto que o meio anterior com o substrato “restante” é continuamente removido na mesma taxa, mantendo o volume constante, e é usado para controlar a taxa de crescimento dos microrganismos presentes ^[1]. Além disso, é possível também regular níveis de pH, temperatura e oxigenação ^[2]. O nome em si significa “[ambiente] químico estático”.



Funcionamento de um quimiostato ^[2]

Um exemplo de funcionamento de um quimiostato pode ser encontrado em ^[4].

Para análise de competições entre organismos no quimiostato, são utilizados modelos matemáticos baseados em equações diferenciais, com algumas pequenas variações dependendo do estudo feito.

Originalmente, muitos modelos de quimiostato assumiam que o coeficiente de rendimento de biomassa era constante, mas observações experimentais indicavam que um rendimento constante não poderia explicar o comportamento oscilatório presente no quimiostato, como indicado por Rana e Kulsum [5], o que ocorre, em particular, com células de *Saccharomyces cerevisiae* e de fitoplâncton [6], organismos estudados por Porro *et al.*, que estudavam a aparição espontânea de oscilações em condições aeróbicas em culturas de levedura [7], e por Nisbet e Gurney, que estudavam a resposta de populações a flutuações ambientais contínuas [8].

Foi sugerido então que se usasse um coeficiente linear, com um ciclo limitante, e posteriormente Huang [9] e Pilyugin e Waltman [10] desenvolveram modelos com um rendimento variável em vários ciclos, porém esses modelos ainda consideravam apenas o estudo de um único microrganismo por vez. Assim, em 1999, um modelo tridimensional, desenvolvido por Song G. e X. Li [11], que utilizava dois microrganismos, com funções de reações de tipo Monod ¹ [12] e coeficientes de rendimento assumidos como uma função linear da concentração de nutriente, conseguiu estabilidade.

Em contrapartida, outros estudos indicam que a taxa de crescimento não se ajusta de forma imediata às mudanças no estado estacionário da entrada de substrato ou na taxa de diluição, como previsto por uma equação de Monod, mas na verdade passa por um “atraso” em resposta às alterações na cultura, que é conhecido como um fenômeno inerte ou efeito de histerese ². Assim, foram desenvolvidos modelos que levam em consideração uma equação dinâmica que relaciona a taxa de crescimento específica à concentração de substrato limitante no quimiostato [13]. Nesse artigo íamos estudar o modelo dinâmico proposto por Young *et al.*, porém como esse modelo faz uso de quações com atraso, decidimos modelar as análises usando o modelo “simples” de Monod. As equações abaixo vieram ambas dos estudos de Young *et al.* [13]

Metodologia

O modelo que utilizaremos será o modelo de Monod:

$$\begin{aligned}(dX/dt) &= \mu X - DX \\ (dS/dt) &= DS_f - DS - (\mu X/Y) \\ \mu &= \mu_{max} S / (K_s + S) \\ D &\leq \mu_{max} S_f / (K_s + S_f)\end{aligned}$$

Onde:

- X = Concentração de massa celular (Massa/Volume)
- S = Limite de concentração de saída do substrato (Massa/Volume)
- S_f = Limite de concentração de entrada do substrato (Massa/Volume)
- D = Taxa de diluição (1/Tempo)
- μ = Taxa de crescimento específica (1/Tempo)
- μ_{max} = Máxima taxa de crescimento específica (1/Tempo)

¹Uma equação Monod é um tipo de modelo matemático para o crescimento de microrganismos, desenvolvido por Monod, relacionando a taxa de crescimento dos microrganismos com a concentração de meio nutritivo limitado em um ambiente aquoso. A equação é dada por:

$$\mu = \mu_{max} \frac{[S]}{K_s + [S]}$$

Onde μ é a taxa de crescimento do microrganismo em estudo, μ_{max} é a taxa máxima de seu crescimento, $[S]$ é a concentração do substrato limitante para o crescimento S e K_s é o valor de $[S]$ quando $\mu/\mu_{max} = 0.5$ (K_s é a “constante da meia-velocidade”).

²Tendência de um sistema de conservar suas propriedades na ausência de um estímulo que as gerou [14], retardo de um efeito quando forças agindo sobre o corpo ou sistema são alteradas [15].

- Y = Coeficiente de rendimento (Massa celular/Massa do substrato limitante)
- K_s = Constante de saturação (Massa/Volume)

Analisando as equações (1), (2) e (3) dimensionalmente temos:

- A taxa $\frac{dX}{dt}$ do lado esquerdo de (1) tem as unidades $\frac{Massa/Volume}{Tempo} = \frac{Massa}{Volume \cdot Tempo}$. Observando o lado direito, $\mu X - DX$, e substituindo pelas unidades teremos:

$$\begin{aligned} & \frac{Massa}{Volume} \cdot \frac{1}{Tempo} - \frac{1}{Tempo} \cdot \frac{Massa}{Volume} \\ &= \frac{Massa}{Tempo \cdot Volume} \end{aligned}$$

Pelo fato de terem as mesmas unidades podemos somá-las, então a unidade do lado direito será $\frac{Massa}{Volume \cdot Tempo}$.

- Análogo ao lado esquerdo de (1), o lado esquerdo de (2) tem a unidade $\frac{Massa}{Volume \cdot Tempo}$. Substituindo pelas unidades do lado direito teremos:

$$\begin{aligned} & \frac{1}{Tempo} \cdot \frac{Massa}{Volume} - \frac{1}{Tempo} \cdot \frac{Massa}{Volume} - \frac{1}{Tempo} \cdot \frac{\frac{Massa}{Volume}}{\frac{Massa}{Massa}} \\ &= \frac{Massa}{Tempo \cdot Volume} - \frac{Massa}{Tempo \cdot Volume} - \frac{Massa}{Tempo \cdot Volume} \\ &= \frac{Massa}{Tempo \cdot Volume} \end{aligned}$$

Assim, a equação (2) também possui as dimensões condizentes.

- Na equação (3), temos do lado esquerdo μ , que tem unidade $\frac{1}{Tempo}$. Substituindo pelas unidades no lado direito teremos:

$$\begin{aligned} & \frac{1}{Tempo} \cdot \left(\frac{\frac{Massa}{Volume}}{\frac{Massa}{Volume} + \frac{Massa}{Volume}} \right) \\ &= \frac{1}{Tempo} \end{aligned}$$

Portanto, (3) também é válida quanto às unidades.

Esses dados podem ser encontrados em ^[13]. O modelo acima pode ser modificado para considerar coeficientes de rendimento variantes e inibição de substrato, mas o modelo Monod continua falho na predição de comportamento dinâmico em quimiostatos experimentais, o que foi mostrado nos estudos de Mateles et al em ^[16] e Storer e Gaudy em ^[17]. Esses estudos mostram que a taxa específica de crescimento de células bacterianas não se ajustam instantaneamente às mudanças em S ou perturbações nos valores estáveis de D e de S_o .

Em resumo, embora vários experimentos em quimiostatos distintos indiquem que a taxa de crescimento específica pode responder de forma instantânea para uma pequena quantidade de mudanças no limite de concentração de saída do substrato, alterações mais rápidas levam a ajustes mais lentos e um atraso na taxa de crescimento, consequentemente desenvolvendo um efeito de histerese, algo que não é previsto no modelo Monod.

Com tantas melhorias possíveis descritas, a equação de Monod deveria ser utilizada para prever o comportamento dinâmico de um quimiostato? Podemos responder essa questão considerando a origem da mesma e pensando sobre o seu real significado. O desenvolvimento da equação de

Monod e a determinação experimental de $\hat{\mu}$ e K_s têm sido discutidos em muitos trabalhos, o mais notável Herbert *et al* ^[19]. Independentemente de $\hat{\mu}$ e K_s serem determinados a partir de cultura em lotes ou a partir de dados de cultura contínua em estado estacionário, a equação de Monod aplicada a uma cultura contínua define uma série de estados estacionários ou condições de equilíbrio que uma determinada cultura pode operar. Em cada ponto da curva Monod, todos os mecanismos envolvidos no crescimento e reprodução, como transferência de massa através da membrana citoplasmática, formação de monômeros bioquímicos e a síntese macromolecular subsequente, estabeleceram taxas constantes que, por sua vez, se manifestam de forma estável em uma taxa de crescimento específica.

Resultados

As análises realizadas sobre o modelo de Monod podem ser encontradas no arquivo Projeto_ModBio-RaphaelLevy_e.ErickBritto_V2.ipynb, no repositório da avaliação. Usando o modelo indicado pelas equações (1), (2) e (3), buscamos alguns artigos (ver ^[20] e ^[21]) que também utilizassem o modelo de Monod para um biorreator contínuo, para podermos utilizar valores iniciais para os parâmetros de forma que faz sentido para o cálculo do modelo, ou seja, garantir que, selecionando valores arbitrariamente, não danificaríamos a modelagem apenas por escolher valores que a equação não poderia suportar. Assim, escrevemos o seguinte código base, baseados nos notebooks 2.4 e 2.7 de Jeffrey Kantor ^[22]:

```
%matplotlib inline

import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
from scipy.integrate import odeint

# valores de parametros

mumax # 1/hora #taxa maxima de crescimento especifica
Ks # g/litro #constante de saturacao
Yxs # g/g #alto coeficiente de rendimento de biomassa (massa celular/massa do substrato limitante)
Sf # g/litro #concentracao do substrato de alimentacao (feeding stream)
D # 1/hora #taxa de diluicao = F(t)/V

# definicao de parametros

def mu(S):
    return mumax*S/(Ks + S)

def Rg(X,S):
    return mu(S)*X

# equacoes diferenciais

def xdif(x,t):
    X,S = x
    dX = Rg(X,S)-D*X
    dS = D*(Sf - S) - Rg(X,S)/Yxs
    return [dX,dS]

def xprim(x,u):
    X,S = x
    X = Yxs*(Sf-(Ks*D)/(mumax-D))
    S = Ks*D/(mumax-D)
    return [X,S]

IC = [0.05, 10.0]

t = np.linspace(0,50)
sol = odeint(xdif,IC,t)
```

```

X,S = sol.transpose()

plt.plot(t,X)
plt.plot(t,S)

plt.xlabel('Time [hr]')
plt.ylabel('Concentration [g/liter]')
plt.legend(['Cell Conc.',
           'Substrate Conc.'])

```

Além da modelagem gráfica elaborada usando os notebooks citados anteriormente, elaboramos também uma análise mais “direta”, baseada no notebook sobre estabilidade de equilíbrios elaborada pelo professor [23]:

```

In [30]: %display typeset

Calculando dX/dt:

In [31]: var('X mu D t')
X = function('X')(t)
dxdt = diff(X,t) == mu*X-D*X
dxdt

Out[31]:  $\frac{\partial}{\partial t}X(t) = -DX(t) + \mu X(t)$ 

Calculando dS/dt:

In [32]: var('S mu D Sf X Y t')
S = function('S')(t)
dsdt = diff(S,t) == D*Sf - D*S - (mu*X/Y)
dsdt

Out[32]:  $\frac{\partial}{\partial t}S(t) = DSf - DS(t) - \frac{X\mu}{Y}$ 

Desenvolvendo a matriz jacobiana:

In [33]: var('S X mu D Y Sf x s')
J = jacobian([mu*X-D*X, D*Sf - D*S - (mu*X/Y)], [x,s])
J

Out[33]:  $\begin{pmatrix} -D + \mu & 0 \\ -\frac{\mu}{Y} & -D \end{pmatrix}$ 

Calculando o traço (p):

In [34]: J.trace()

Out[34]:  $-2D + \mu$ 

Calculando o determinante (q):

In [35]: J.det()

Out[35]:  $(D - \mu)D$ 

```

Autovalores:

```
In [36]: J.eigenvalues()
```

```
Out[36]:  $[-D + \mu, -D]$ 
```

Os autovalores são reais e distintos, já que $\mu \neq 0$ (μ é taxa de crescimento específica; $1/\text{Tempo}$):

Se $\mu > D$, os sinais dos autovalores são opostos: Equilíbrio em ponto de sela

Se $\mu < D$, os sinais dos autovalores são iguais, nesse caso negativos, já que D é taxa de diluição e portanto não pode ser negativo: Equilíbrio pontual estável

Se $\mu = D$, um dos autovalores será 0:.....?

Polinômio característico:

```
In [37]: J.characteristic_polynomial()
```

```
Out[37]:  $x^2 + (2D - \mu)x + D^2 - D\mu$ 
```

```
In [38]: p = J.trace
         print(p)

         q = J.det
         print(q)
```

```
<built-in method trace of sage.matrix.matrix_symbolic_dense.Matrix_symbolic_dense object at 0x6ffecddc66d0>
<built-in method det of sage.matrix.matrix_symbolic_dense.Matrix_symbolic_dense object at 0x6ffecddc66d0>
```

$\Delta = p^2 - 4q$

$p^2 = (\mu - 2D)^2 = \mu^2 - 4\mu D + 4D^2$ $4q = 4(D^2 - \mu D) = 4D^2 - 4\mu D$

$\Delta = \mu^2 - 4\mu D + 4D^2 - (4D^2 - 4\mu D) = \mu^2$

Calculando o equilíbrio pontual do sistema:

```
In [39]: var('S X mu D Y Sf x s')
         xdot(x,s) = mu*x - D*x
         sdot(x,s) = D*Sf - D*s - (mu*x/Y)
         solve([xdot, sdot], [x,s])
```

```
Out[39]: [[x = 0, s = Sf]]
```

Discussão

Conclusão

References

- [1] Wikipedia.
Chemostat.
<https://en.wikipedia.org/wiki/Chemostat>

- [2] ScienceDirect.
Chemostat
<https://www.sciencedirect.com/topics/earth-and-planetary-sciences/chemostat>

- [3] The Chemostat (Volume 1).
Mathematical Theory of Microorganism Cultures. 2017.
https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=e4MtDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP2&dq=mathematical+chemostat&ots=yqWBX1qPGP&sig=f8-_BXxMKAB8-E6h8td660Npr_M#v=onepage&q=mathematical%20chemostat&f=false

- [4] Naomi Ziv, Nathan J. Brandt e David Gresham. 2013
Journal of Visualized Experiments. The Use of Chemostats in Microbial Systems Biology.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3940325/pdf/jove-80-50168.pdf>

- [5] S. M. Sohel Rana and Umme Kulsum. 2012.
A Mathematical Model Related To Chemostat With Variable Yields. Department of Mathematics, University of Dhaka, Dhaka-1000, Bangladesh. Dhaka Univ. J. Sci. 60(2): 147-152, 2012
<https://www.banglajol.info/index.php/DUJS/article/view/11482>

- [6] Jean-Luc Gouzé, Valérie Lemesle. 2008.
Two simple growth models in the chemostat.
<https://hal.inria.fr/hal-01277831/document>

- [7] Porro et. al. 1988.
Oscillations in continuous cultures of budding yeast: a segregated parameter analysis.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18587737/>

- [8] R. Nisbet and W. Gurney. 1982.
Modelling Fluctuating Populations.
<https://www.amazon.com/Modelling-Fluctuating-Populations-R-Nisbet/dp/1930665903>

- [9] Zhu, L. and X.C. Huang. 2005.
Relative positions of limit cycles in a continuous culture vessel with variable yields. Journal of Mathematical Chemistry, 38, 2:119-128.
Multiple limit cycles in a continuous culture vessel Nonlinear analysis: Theory, Methods and

Applications.

- [10] Pilyugin S. S. and P. Waltman, 2003.
Multiple limit cycles in the chemostat with variable yield, *Math. Biosci.* 182, 151-166.
- [11] Song G. and X. Li, 1999.
Stability of solution to the chemostat system with non-constant consuming rate, *J. Biomath.* 14:1, 24.
- [12] Wikipedia.
Monod equation.
<https://en.wikipedia.org/wiki/Monod.equation>.
- [13] T. B. Young, D. F. Bruley, e H. R. Bungay. 1970.
A dynamic mathematical model of the chemostat *Clemson University, Clemson, South Carolina* 29631
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bit.260120506>
- [14] Wikipedia.
Histerese.
<https://pt.wikipedia.org/wiki/Histerese>
- [15] LAASP.
What's Hysteresis?.
<https://www.lassp.cornell.edu/sethna/hysteresis/WhatIsHysteresis.html>
- [16] R. I. Mateles, D. Y. Ryu, and T. Yasuda, *Nature*, 208,263 (1965).
Measurement of Unsteady State Growth Rates of Micro-Organisms.
<https://www.nature.com/articles/208263a0>
- [17] F. F. Storer and A. F. Gaudy, *Environ. Sci. Technol.*, 3, 143 (1969).
Computational analysis of transient response to quantitative shock loadings of heterogeneous populations in continuous culture.
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es60025a007>
- [18] Engineering LibreTexts.
Bacterial Chemostat.
[https://eng.libretexts.org/Bookshelves/Industrial_and_Systems_Engineering/Book%3A_Chemical_Process_Dynamics_and_Controls_\(Woolf\)/06%3A_Modeling_Case_Studies/6.03%3A_Bacterial_Chemostat](https://eng.libretexts.org/Bookshelves/Industrial_and_Systems_Engineering/Book%3A_Chemical_Process_Dynamics_and_Controls_(Woolf)/06%3A_Modeling_Case_Studies/6.03%3A_Bacterial_Chemostat)

- [19] The continuous culture of bacteria.
HERBERT D, ELSWORTH R, TELLING RC. The continuous culture of bacteria; a theoretical and experimental study. *J Gen Microbiol.* 1956 Jul;14(3):601-22. doi: 10.1099/00221287-14-3-601. PMID: 13346021.
- [20] Analytical solution for a hybrid Logistic-Monod cell growth model in batch and continuous stirred tank reactor culture.
Xu P. Analytical solution for a hybrid Logistic-Monod cell growth model in batch and continuous stirred tank reactor culture. Biotechnology and Bioengineering. 2020;117:873-878.
<https://doi.org/10.1002/bit.27230>
- [21] Analyses of various control schemes for continuous bioreactors
Pramod Agrawal Henry C. Lim. 2005
<https://link.springer.com/chapter/10.1007/BFb0006380>
- [22] Notebooks de base para modelagem.
Repositório Principal: *jckantor/CBE30338* (<https://github.com/jckantor/CBE30338>).
2.4 Continuous Product Blending
(<https://jckantor.github.io/CBE30338/02.04-Continuous-Product-Blending.html>).
2.7 Fed-Batch Bioreactor
(<https://jckantor.github.io/CBE30338/02.07-Fed-Batch-Bioreactor.html>).
- [23] Analisando a Estabilidade de Equilíbrios.
Repositório Principal: *fccelho/Modelagem-Matematica-IV* (<https://github.com/fccelho/Modelagem-Matematica-IV>).
Aula 3 - Análise de Estabilidade Linear
(<https://github.com/fccelho/Modelagem-Matematica-IV/blob/master/Planilhas%20Sage/Aula%203%20-%20An%C3%A1lise%20de%20Estabilidade%20Linear.ipynb>).