

ESERCITAZIONE NUMERICA – CINETICHE DI CRESCITA MICROBICA - A.A. 2024/25

È stato condotto un esperimento di crescita in modalità operativa batch utilizzando un microorganismo non meglio identificato. Sono assegnati i valori di concentrazione di substrato limitante (S) e biomassa (X) misurati nel corso dell'esperimento (vedi file allegato 'Esercitazione_dati.xls'). I valori misurati sono organizzati in una tabella così strutturata:

Tabella 1

Tempo (day)	X (g/m ³)	S (g/m ³)
t ₀	X ₀	S ₀
t ₁	X ₁	S ₁
t ₂	X ₂	S ₂
...	...	...
t _N	X _N	S _N

Obiettivi principali dell'esercitazione:

- 1) Determinare la velocità specifica di crescita massima raggiunta in fase di crescita esponenziale.
- 2) Valutare se il modello cinetico di Monod permette di descrivere correttamente l'evoluzione della velocità specifica di crescita con la concentrazione di substrato.

Si riporta di seguito una descrizione della procedura che si seguirà in ambiente Excel per rispondere ai precedenti quesiti.

PROCEDURA

Analisi grafica preliminare dati sperimentali.

Si tracci in ambiente Excel un grafico che mostra l'andamento di X e di S in funzione del tempo (i.e., è necessario tracciare la seconda e la terza colonna contro la prima). I grafici mostrano chiaramente come sia stata raggiunta nel corso dell'esperimento una fase stazionaria.

Selezione e analisi dei dati relativi alla fase di crescita esponenziale

Si individui l'intervallo di tempo all'interno del quale la popolazione microbica segue una crescita di tipo esponenziale. Si ricorda che in fase di crescita esponenziale, la velocità di crescita cresce linearmente con la concentrazione di biomassa (i.e., $r = \mu X$) e quindi la concentrazione di biomassa nel reattore assume la seguente espressione:

$$X(t) = X_0 \cdot \exp(\mu_{\max} \cdot (t - t_0)) \quad (1)$$

Da cui si trova che $\text{Log}(X/X_0)$ segue un andamento lineare nel tempo:

$$\text{Log}(X(t)/X_0) = \mu_{\max} \cdot (t - t_0) \quad (2)$$

È pertanto possibile determinare la $\mu_{\max}$ andando a determinare la retta che meglio descrive l'evoluzione del $\text{Log}(X/X_0)$ come calcolato dai dati sperimentali disponibili. È tuttavia bene tener presente che la (1) vale solo in fase esponenziale e non quando si è in prossimità di/viene raggiunta una fase stazionaria.

Si può pertanto procedere come segue:

1. All'interno della tabella iniziale, si calcolino in una quarta colonna i valori $\text{Log}(X_i/X_0)$ ($i=1\dots N$) (log indica logaritmo naturale):

Tabella 2

t (day)	X (g/m ³)	S (g/m ³)	Log(X(t)/X ₀)
t ₀	X ₀	S ₀	Log(X ₀ /X ₀)=0
t ₁	X ₁	S ₁	Log(X ₁ /X ₀)
t ₂	X ₂	S ₂	Log(X ₂ /X ₀)
...	...	...	...
t _N	X _N	S _N	Log(X _N /X ₀)

2. Si tracci l'andamento di $\text{Log}(X/X_0)$ in funzione di $(t-t_0)$ (i.e., grafico quarta colonna vs. prima colonna in Tabella 2) e si identifichi quindi l'intervallo di tempo in corrispondenza del quale l'andamento può ragionevolmente essere considerato lineare.
3. Si corregga quindi il grafico avendo cura di includere solo i dati relativi alla fase di crescita esponenziale
4. Si determini la retta che meglio descrive i dati riportati nel grafico utilizzando la funzione Excel 'Aggiungi linea di tendenza' (la funzione è disponibile nel menu che appare selezionando i punti nel grafico e cliccando il tasto destro del mouse). Questa operazione corrisponde a condurre una regressione lineare dei dati $\text{Log}(X/X_0)$ vs. $(t-t_0)$.

Seguendo la procedura descritta, si ottiene al punto 4 l'equazione di una retta che descrive l'andamento di $\text{Log}(X/X_0)$ in funzione del tempo. Il coefficiente angolare di questa retta è uguale a $\mu_{\max}$.

Osservazione

È importante a questo punto fornire delle indicazioni sulla procedura che di fatto viene seguita per determinare la retta ottimale al punto (4). A tal fine, si ponga $y_i = \text{Log}(X_i/X_0)$ ($i=1\dots N$). Quando si chiede di tracciare la retta di tendenza, il software va a determinare un valore $\mu_{\max}$ tale per cui risulta minima la distanza tra la retta descritta dall'equazione $y = \mu_{\max}(t-t_0)$ e i punti sperimentali identificati nel grafico dalle coppie $((t_i-t_0), y_i)$ ($i=1\dots N$). Tale distanza è quantificata come somma degli scarti quadratici tra i valori sperimentali $y_i = \text{Log}(X_i/X_0)$ e le predizioni dell'equazione $y = \mu_{\max}(t-t_0)$ (o, meglio, modello lineare) in corrispondenza degli istanti di tempo t_i . In altri termini, il software cerca il valore $\mu_{\max}$ che minimizza la seguente funzione:

$$\begin{aligned}
 F(\mu_{\max}) &= (\mu_{\max}(t_1 - t_0) - \text{Log}(X_1 / X_0))^2 + (\mu_{\max}(t_2 - t_0) - \text{Log}(X_2 / X_0))^2 + \dots + (\mu_{\max}(t_N - t_0) - \text{Log}(X_N / X_0))^2 = \\
 &= \sum_{i=1}^N (\mu_{\max}(t_i - t_0) - \text{Log}(X_i / X_0))^2
 \end{aligned}
 \tag{3}$$

È molto importante osservare quanto segue:

- La F è qui funzione della sola $\mu_{\max}$, i.e., tutte le altre grandezze che compaiono nella sua espressione sono note.
- Qualora la distanza tra i valori sperimentali e il nostro modello lineare fosse stata quantificata non come somma degli scarti quadratici, ma come somma degli scarti semplici (i.e., ottenuti senza elevare al quadrato), allora la minimizzazione di F avrebbe portato ad ottenere una retta quanto più possibile localizzata al di sotto (mantenendo la stessa espressione dello scarto in Eq. (3)) dei nostri dati sperimentali. È questo il motivo per cui la distanza è invece quantificata come somma degli scarti quadratici.

Stima parametri cinetici modello di Monod

Desideriamo ora valutare se il modello di Monod può essere applicato per riprodurre i nostri dati sperimentali di crescita. Si ricorda che il modello di Monod descrive il seguente andamento per la velocità specifica di crescita di biomassa al variare della concentrazione di substrato limitante:

$$\mu(S) = \frac{\mu_{\max} S}{K + S} \quad (4)$$

Per poter verificare se il modello di Monod permette di descrivere i nostri dati sperimentali, è necessario valutare se esistono dei valori dei parametri $\mu_{\max}$ e K (velocità specifica di crescita massima e costante di semi-saturazione, rispettivamente) tali per cui le predizioni del modello presentano un “buon accordo” con i dati sperimentali. Il virgolettato per l’espressione “buon accordo” vuole ricordare che esistono procedure rigorose per quantificare quanto buono sia l’accordo tra dati sperimentali e predizioni modello. Tali procedure non saranno tuttavia discusse in questo corso e per esse si rimanda ai corsi di statistica ed analisi dei dati.

Stimeremo $\mu_{\max}$ e K attraverso i seguenti differenti metodi:

- 1) Variazione per tentativi di $\mu_{\max}$ e K in modo da ottenere un “buon accordo” tra l’andamento di $\mu(S)$ ottenuto dai dati sperimentali di concentrazione, e l’andamento $\mu(S)$ predetto dal modello di Monod.
- 2) Regressione lineare di dati applicando la linearizzazione di Lineweaver-Burk.
- 3) Regressione non lineare di dati applicando il modello di Monod senza alcuna modifica.

Determinazione della velocità specifica di crescita da dati sperimentali di concentrazione

I dati sperimentali in nostro possesso sono costituiti da valori di concentrazione di biomassa e substrato misurati nel corso di un esperimento di crescita in modalità batch, mentre il modello di Monod può essere utilizzato per determinare come varia la μ al variare della concentrazione di substrato. Risulta chiaro come in tali condizioni non sia possibile condurre un confronto diretto tra le predizioni del modello e i dati sperimentali. È possibile risolvere questo problema in due modi:

- a) Andando a ricavare, a partire dai valori di concentrazione misurati, dei valori della velocità specifica di crescita μ . I valori così ottenuti possono essere considerati delle stime dei valori di μ realmente raggiunti nel corso dell’esperimento (i.e., dei μ sperimentali). Tali valori potranno quindi essere confrontati con quelli predetti dal modello di Monod al variare di S per differenti valori dei parametri $\mu_{\max}$ e K .
- b) Andando a ricavare, utilizzando il modello di Monod, le funzioni che descrivono l’andamento nel tempo di X e di S a partire da un set di condizioni iniziali prefissato per ogni coppia di valori dei parametri $\mu_{\max}$ e K . I valori di X e di S nei diversi istanti di tempo $t_1 \dots t_N$ potranno quindi essere confrontati con i valori delle concentrazioni misurati negli stessi istanti. Sarà quindi possibile variare i parametri $\mu_{\max}$ e K in modo da minimizzare la deviazione tra i valori di concentrazione misurati e i valori di concentrazione predetti.

L’approccio b) rende necessario risolvere (o analiticamente o numericamente) le equazioni differenziali di bilancio su substrato e biomassa che descrivono la crescita in batch con il modello di Monod. Tale sistema deve poter essere risolto per qualsivoglia coppia di parametri $\mu_{\max}$ e K . Non potendo procedere ad una soluzione analitica del sistema di due equazioni di bilancio di materia differenziali, in questa esercitazione

utilizzeremo il metodo a). È tuttavia bene ricordare come una soluzione numerica delle due equazioni differenziali possa essere facilmente ottenuta rendendo di fatto possibile utilizzare il metodo b).

Il primo passo da compiere per poter applicare il metodo a) è ricavare dei valori della velocità specifica di crescita dai dati sperimentali di concentrazione. A tal fine, è sufficiente ricordare che i nostri dati sono stati ottenuti monitorando un esperimento di crescita in batch e che quindi vale, in ipotesi di dipendenza lineare della velocità di crescita dalla concentrazione di biomassa X (i.e., $r=\mu(S)X$), la seguente equazione:

$$\frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu(S) \quad (5)$$

Sulla base della precedente, è possibile calcolare i valori di μ raggiunti in corrispondenza degli istanti di tempo $t_1 \dots t_N$ dell'esperimento di crescita andando ad approssimare la derivata con il rapporto incrementale. Nella pratica, è necessario aggiungere alla nostra tabella una ulteriore colonna nella quale calcolare i "valori sperimentali" di μ (il virgolettato vuole sottolineare che i valori di μ non sono direttamente misurati ma sono ottenuti mediante manipolazione dei dati di concentrazione misurati):

Tabella 3

t (day)	X (g/m ³)	S (g/m ³)	Log(X(t)/X ₀)	μ esperimento
t_0	X_0	S_0	Log(X_0/X_0)=0	-----
t_1	X_1	S_1	Log(X_1/X_0)	$\mu_1 = \frac{1}{X_1} \frac{(X_1 - X_0)}{(t_1 - t_0)}$
t_2	X_2	S_2	Log(X_2/X_0)	$\mu_2 = \frac{1}{X_2} \frac{(X_2 - X_1)}{(t_2 - t_1)}$
...	...	...	...	...
t_N	X_N	S_N	Log(X_N/X_0)	$\mu_1 = \frac{1}{X_{N-1}} \frac{(X_N - X_{N-1})}{(t_N - t_{N-1})}$

Stima parametri mediante regressione lineare

Per poter procedere alla stima dei parametri mediante regressione lineare, andiamo a riscrivere il modello di Monod nella seguente forma:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K}{\mu_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{\max}} \quad (6)$$

Anche nota come linearizzazione di Lineweaver-Burk. L'equazione (6) chiarisce che se il Modello di Monod descrive il comportamento del nostro microorganismo, l'andamento di $1/\mu$ al variare di $1/S$ è descritto da una retta che intercetta l'asse delle ordinate nel punto $(0; 1/\mu_{\max})$ e l'asse delle ascisse nel punto $(-1/K; 0)$. Per determinare K e $\mu_{\max}$ procediamo quindi come segue:

- 1) Riportiamo nella nostra tabella due ulteriori colonne: una dove calcoliamo, a partire dai "valori sperimentali" di μ , i "valori sperimentali" di $1/\mu$, e l'altra dove calcoliamo i corrispondenti valori $1/S$ (vedi aggiornamento tabella in basso)

Tabella 4

t (day)	X (g/m ³)	S (g/m ³)	Log(X(t)/X ₀)	μ esperimento	1/μ	1/S
t ₀	X ₀	S ₀	Log(X ₀ /X ₀)=0	-----		
t ₁	X ₁	S ₁	Log(X ₁ /X ₀)	$\mu_1 = \frac{1}{X_1} \frac{(X_1 - X_0)}{(t_1 - t_0)}$	1/μ ₁	1/S ₁
t ₂	X ₂	S ₂	Log(X ₂ /X ₀)	$\mu_2 = \frac{1}{X_2} \frac{(X_2 - X_1)}{(t_2 - t_1)}$	1/μ ₂	1/S ₂
...	...	...	...	...	...	...
t _N	X _N	S _N	Log(X _N /X ₀)	$\mu_N = \frac{1}{X_{N-1}} \frac{(X_N - X_{N-1})}{(t_N - t_{N-1})}$	1/μ _N	1/S _N

- 2) Andiamo quindi a diagrammare la colonna dei valori 1/μ contro quella dei valori 1/S.
- 3) Tracciamo la retta di tendenza per i punti riportati nel grafico ottenuto.
- 4) Da coefficiente angolare e termine noto dell'equazione della retta ricaviamo, sulla base della equazione (6), i parametri K e μ_{max}.

Si fa notare che al punto 4) il software determina coefficiente angolare (a) e termine noto (b) dell'equazione della retta y=ax+b in modo da minimizzare la seguente funzione:

$$F(a,b) = \left[\frac{1}{\mu_1} - \left(a \frac{1}{S_1} + b \right) \right]^2 + \left[\frac{1}{\mu_2} - \left(a \frac{1}{S_2} + b \right) \right]^2 + \dots + \left[\frac{1}{\mu_N} - \left(a \frac{1}{S_N} + b \right) \right]^2 = \sum_{i=1}^N \left[\frac{1}{\mu_i} - \left(a \frac{1}{S_i} + b \right) \right]^2 \quad (7)$$

La F in questo caso è funzione solo del coefficiente angolare a e del termine noto b che appaiono nell'equazione della retta. Sulla base della linearizzazione (6), una volta determinati i valori di a e di b che minimizzano la somma degli scarti quadratici (7), K e μ_{max} possono quindi essere determinati come segue:

$$\mu_{\max} = 1/a; K = a/b;$$

Stima parametri mediante regressione non lineare

Intendiamo ora determinare K e μ_{max} andando a confrontare direttamente i valori di μ sperimentali con le predizioni del modello di Monod, senza utilizzare alcuna linearizzazione. Procediamo quindi come segue:

- 1) Andiamo a riportare in un nuovo grafico i “valori sperimentali” di μ al variare di S (i.e., colonna 5 contro colonna 3 nella precedente tabella 4).
- 2) Riportiamo in tabella una nuova colonna nella quale, fissati separatamente i valori assegnati a K e μ_{max}, calcoliamo i valori di μ predetti dal modello di Monod per valori di S pari a (S₁..S_N). A tal fine, in Excel, andiamo a riportare in due celle separate i valori da noi assegnati per K e μ_{max}. La tabella assume quindi la seguente forma:

Tabella 5

t (day)	X (g/m ³)	S (g/m ³)	Log(X(t)/X ₀)	μ esperimento	1/μ (day)	1/S (m ³ /g)	μ model (day)
t ₀	X ₀	S ₀	Log(X ₀ /X ₀)=0	-----	---	----	-----
t ₁	X ₁	S ₁	Log(X ₁ /X ₀)	$\mu_1 = \frac{1}{X_1} \frac{(X_1 - X_0)}{(t_1 - t_0)}$	1/μ ₁	1/S ₁	$\mu_{mod,1} = \frac{\mu_{max} S_1}{K + S_1}$
t ₂	X ₂	S ₂	Log(X ₂ /X ₀)	$\mu_2 = \frac{1}{X_2} \frac{(X_2 - X_1)}{(t_2 - t_1)}$	1/μ ₂	1/S ₂	$\mu_{mod,2} = \frac{\mu_{max} S_2}{K + S_2}$
...	...	...	...	...	...	...	...
t _N	X _N	S _N	Log(X _N /X ₀)	$\mu_N = \frac{1}{X_{N-1}} \frac{(X_N - X_{N-1})}{(t_N - t_{N-1})}$	1/μ _N	1/S _N	$\mu_{mod,N} = \frac{\mu_{max} S_N}{K + S_N}$

- 3) Tracciamo quindi nello stesso grafico costruito al precedente punto 1 l'andamento dei valori di μ predetti dal modello di Monod contro i valori di S (ultima colonna contro terza colonna in Tabella 5).
- 4) Modifichiamo K e μ_{max} fino a quando l'andamento predetto dal modello di Monod non riproduce, a nostro avviso adeguatamente, l'andamento dei dati sperimentali. Si noti che ogni qualvolta K e μ_{max} sono modificati allora il grafico descrivente i valori predetti dal modello di Monod vs. S viene immediatamente modificato come richiesto.
- 5) Procediamo quindi alla determinazione di μ_{max} e K mediante regressione non lineare. Il nostro obiettivo è ora determinare i valori di μ_{max} e K tali per cui sia minima la distanza tra gli andamenti al variare di S di μ predetto dal modello di Monod e di μ sperimentale. A tale fine, quantifichiamo la distanza tra i nostri dati sperimentali e le predizioni del modello di Monod come somma degli scarti quadratici:

$$\begin{aligned}
 F(\mu_{max}, K) &= [\mu_1 - \mu_{mod,1}]^2 + [\mu_1 - \mu_{mod,1}]^2 + \dots + [\mu_N - \mu_{mod,N}]^2 = \\
 &= \left[\mu_1 - \frac{\mu_{max} S_1}{K + S_1} \right]^2 + \left[\mu_2 - \frac{\mu_{max} S_2}{K + S_2} \right]^2 + \dots + \left[\mu_N - \frac{\mu_{max} S_N}{K + S_N} \right]^2
 \end{aligned} \tag{8}$$

Da notare che la somma degli scarti quadratici è ora funzione di μ_{max} e K.

- 6) Andiamo quindi a costruire in Excel la funzione descritta dall'equazione (8). A tal fine, per ogni tempo di campionamento t₁...t_N, calcoliamo in una nuova colonna lo scarto quadratico tra il valore di μ sperimentale e quello predetto dal modello di Monod con i valori assegnati in celle separate per μ_{max} e K. La tabella assume quindi la seguente forma:

Tabella 6

t (day)	X (g/m ³)	S (g/m ³)	Log(X(t)/X ₀)	μ esperimento	1/μ (day)	1/S (m ³ /g)	μ model (day)	(μ _i - μ _{mod,i}) ²
t ₀	X ₀	S ₀	Log(X ₀ /X ₀)=0	-----	---	----	-----	
t ₁	X ₁	S ₁	Log(X ₁ /X ₀)	$\mu_1 = \frac{1}{X_1} \frac{(X_1 - X_0)}{(t_1 - t_0)}$	1/μ ₁	1/S ₁	$\mu_{mod,1} = \frac{\mu_{max} S_1}{K + S_1}$	(μ ₁ - μ _{mod,1}) ²
t ₂	X ₂	S ₂	Log(X ₂ /X ₀)	$\mu_2 = \frac{1}{X_2} \frac{(X_2 - X_1)}{(t_2 - t_1)}$	1/μ ₂	1/S ₂	$\mu_{mod,2} = \frac{\mu_{max} S_2}{K + S_2}$	(μ ₂ - μ _{mod,2}) ²
...	...	...	...	...	...	...	...	...
t _N	X _N	S _N	Log(X _N /X ₀)	$\mu_1 = \frac{1}{X_{N-1}} \frac{(X_N - X_{N-1})}{(t_N - t_{N-1})}$	1/μ _N	1/S _N	$\mu_{mod,N} = \frac{\mu_{max} S_N}{K + S_N}$	(μ _N - μ _{mod,N}) ²

- 7) Calcoliamo la somma degli scarti quadratici riportati nell'ultima colonna della Tabella 6. Tale somma definisce la funzione descritta dalla equazione (8). Utilizziamo quindi il risolutore Excel per determinare i valori di μ_{max} e K che minimizzano tale somma.

Stima coefficiente di resa Y_{X/S}

Procediamo come segue:

- 1) Aggiungiamo una nuova colonna in tabella dove calcoliamo, per ogni intervallo tra due successivi tempi di campionamento, il rapporto tra biomassa prodotta e substrato consumato:

Tabella 6

t (day)	X (g/m ³)	S (g/m ³)	Log(X(t)/X ₀)	μ esperimento	1/μ (day)	1/S (m ³ /g)	μ model (day)	(μ _i - μ _{mod,i}) ²	Y _{X/S}
t ₀	X ₀	S ₀	Log(X ₀ /X ₀)=0	-----	---	----	-----		
t ₁	X ₁	S ₁	Log(X ₁ /X ₀)	$\mu_1 = \frac{1}{X_1} \frac{(X_1 - X_0)}{(t_1 - t_0)}$	1/μ ₁	1/S ₁	$\mu_{mod,1} = \frac{\mu_{max} S_1}{K + S_1}$	(μ ₁ - μ _{mod,1}) ²	$\frac{(X_1 - X_0)}{(S_0 - S_1)}$
t ₂	X ₂	S ₂	Log(X ₂ /X ₀)	$\mu_2 = \frac{1}{X_2} \frac{(X_2 - X_1)}{(t_2 - t_1)}$	1/μ ₂	1/S ₂	$\mu_{mod,2} = \frac{\mu_{max} S_2}{K + S_2}$	(μ ₂ - μ _{mod,2}) ²	$\frac{(X_2 - X_1)}{(S_1 - S_2)}$
...	...	...	...	...	...	...	...	...	
t _N	X _N	S _N	Log(X _N /X ₀)	$\mu_1 = \frac{1}{X_{N-1}} \frac{(X_N - X_{N-1})}{(t_N - t_{N-1})}$	1/μ _N	1/S _N	$\mu_{mod,N} = \frac{\mu_{max} S_N}{K + S_N}$	(μ _N - μ _{mod,N}) ²	$\frac{(X_N - X_{N-1})}{(S_{N-1} - S_N)}$

- 2) Andiamo quindi a tracciare l'andamento dei valori Y_{X/S} così ottenuti contro i valori di concentrazione di substrato. È in tal modo possibile valutare se il coefficiente di resa si mantiene costante nel corso del processo.