

IMPACTO DO CRESCIMENTO DA CEPA BACTERIANA AG15 EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

Fernanda Mendes Gomes¹

Adrielle Aparecida Paulista Ribeiro²

Iara Rossi Gonçalves³

Tais Magalhães Abrantes Pinheiro⁴

Arthur Camargos Severino⁵

Fabício Gomes Menezes Porto⁶

Miriam Maria de Resende⁷

Sistemas de produção sustentável

Resumo

Os meios de culturas possuem uma alta gama de nutrientes que os tornam ideais para a análise de crescimento bacteriano. A concentração e condição de cultivo de seus compostos, influenciam diretamente na produção e análise de produtos obtidos de fermentações de cepas microbianas. Neste contexto, o estudo realizado visa compreender qual o potencial de crescimento da cepa AG15 diferentes fontes de carbono: glicose, lactose e sacarose. O pré-inóculo foi preparado adicionando-se os microrganismos à solução de cloreto de sódio (0,9%) na concentração de 0,5 g·L⁻¹. Uma alíquota de 5 mL da diluição foi transferida para o meio de cultura e incubada em estufa tipo shaker a 120 rpm e 32 °C, por um período de 24 horas. As amostras foram analisadas ao decorrer do processo fermentativo e os resultados mostraram crescimento semelhante dos microrganismos nos meios com glicose e sacarose e uma inferioridade no meio com lactose.

Palavras-chave: Microrganismos, Açúcares, Potencial de crescimento microbiano.

¹ Aluna de Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Biotecnologia, fernanda.merola@ufu.br

² Aluna de Doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química, adrielle.ribeiro@ufu.br

³ Aluna de Pós-Doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química, iararossi@ufu.br

⁴ Aluna de Pós-Doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química, taisabrantess@ufu.br

⁵ Aluno de Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química, arthur.seveviro@ufu.br

⁶ Aluno de Doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química, fabricao.porto@ufu.br

⁷ Prof. Dr.^a. Universidade Federal de Uberlândia – Campus Santa Mônica, Faculdade de Engenharia Química, mresende@ufu.br

INTRODUÇÃO

A partir da evolução da espécie humana e a fixação territorial, a agricultura se destacou por assegurar a alimentação e o fornecimento de matérias-primas e insumos para a produção em diversos setores industriais. Atualmente, é a principal atividade fomentadora da economia em escala global, e tem o Brasil como um dos destaques em produção e exportação de bens primários.

Em contrapartida, as técnicas convencionais juntamente com a prática agrícola em escala industrial, desencadearam diversos problemas ao meio ambiente. Um exemplo de prejuízo causado pelos métodos errôneos da agricultura brasileira é explicado em um levantamento realizado entre os anos de 2012 a 2016, a respeito do consumo de pesticidas utilizados no país. Os dados mostram a classificação da toxicidade dos agrotóxicos em que 15% é extremamente tóxico, 25% altamente tóxico, 35% mediamente tóxico e 25% pouco tóxico (Pignati, 2017)

Desde então, a agricultura sustentável tornou-se um tema de grande relevância na política ambiental. Toda essa sustentabilidade envolve a aplicação de técnicas adequadas e conscientes para conservação e preservação de solos, água e plantações. Foi a partir disso que se criou o Programa Nacional de Bioinsumo, pelo Ministério da Agricultura e Agropecuária (MAPA) em 2020.

Os bioinsumos são hoje, a nova promessa tecnológica que reconcilia interesses agropecuários e oferece soluções inovadoras, reduzindo o uso expressivo de compostos tóxicos e nocivos tanto ao ambiente quanto à saúde humana.

O termo – bioinsumos - é definido pela Embrapa como “produtos ou processos agroindustriais desenvolvidos a partir de enzimas, extratos (de plantas ou microrganismos), microrganismos, macrorganismos (invertebrados), metabólitos secundários e feromônios, destinados ao controle biológico, sendo também ativos voltados à nutrição, promotores de crescimento vegetativo, mitigadores de estresses bióticos e abióticos e substitutivos de antibióticos.”

Nota-se que estes produtos biológicos fazem parte de todos os sistemas produtivos, desde produção animal e vegetal até processos de pós-colheita e processamento (Carvalho Vidal, 2021). Ademais, o Brasil novamente se destaca na aplicação e exportação desse tipo de manejo, movimentando a economia com cerca de 1 bilhão de reais por ano e um crescimento anual superior a 10%.

Um importante grupo de bioinsumos que tem se tornado uma realidade cada vez mais comum, são os biofertilizantes. Seu uso pode ser pela introdução de comunidades microbianas antagonistas à fitopatógenos do solo ou pela promoção de melhor desenvolvimento da planta. Dentre os



microrganismos aplicados para a produção, se destacam aqueles com capacidades multifuncionais, isto é, capazes de produzir enzimas e/ou substâncias que favoreçam o crescimento e proteção das plantas. As bactérias multifuncionais, são comumente encontradas na rizosfera e possuem características de biofertilização, como a fixação de N_2 e solubilização de fosfato pela produção de ácidos orgânicos.

Os microrganismos comumente citados são seres simples e procariontes, e a complexidade e especificidade de cada espécie gera diferentes comportamentos e resultados nos processos fermentativos e por isso a metodologia não pode ser padronizada.

Por conseguinte, é de extrema importância a análise e o estudo da cinética de crescimento dos microrganismos. A obtenção desses dados, permite um melhor direcionamento da metodologia para a produção do biofertilizante, que, por consequência, aumenta a eficácia do produto que será comercializado.

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi analisar o crescimento microbiano no meio fermentativo variando a fonte de carbono, para posteriormente, desenvolver a produção e aplicação no setor agrícola.

METODOLOGIA

O processo pré-fermentativo consistiu no isolamento de uma cepa bacteriana de plantas de Agave (AG), colhida em Sumé-Paraíba, conforme (Baldani e colaboradores, 2014) com modificações, e armazenada no Núcleo de Processos Biotecnológicos (NUCBIO) da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia. Para identificação da cepa e seu potencial de fixação de nitrogênio, o material foi coletado e diluído em solução salina (NaCl) (0,9%) com Tween 80 (1 g L⁻¹) e plaqueado em meios de cultura Jensen - livre de N_2 - com azul de bromotimol em pH 6,8 (Shomi; Uddin; Zerín, 2021) e meio malato, livre de Nitrogênio (NFMM) em pH 7,3 (Shameem et al., 2023). Pós estriagem, a cepa AG15 foi cultivada por cinco dias a 30 °C e a técnica de Gram (Vermelho et al., 2019) foi utilizada para análise de em microscópio.

O meio de cultura utilizado para a fermentação fornece todos os nutrientes fundamentais para o crescimento bacteriano: substrato, peptona, extrato de levedura e cloreto de sódio. As fontes de carbono foram variadas em glicose, sacarose e lactose e se manteve a concentração dos demais nutrientes.

Inicialmente, o microrganismo AG15 foi mantido em placa de Petri em meio batata dextrose ágar (BDA) pH 6,8. O pré-inóculo foi preparado adicionando-se os microrganismos à solução de cloreto de sódio (0,9%) na concentração de 0,5g L⁻¹. Uma alíquota de 5mL foi transferida para um erlenmeyer



contendo 150 mL de meio de cultura e incubado em estufa tipo shaker a 120 rpm e 32 °C por 24 horas. O crescimento celular foi quantificado ao decorrer do processo fermentativo, no intervalo de 0, 2, 4, 8, 12 e 24 horas, por turbidimetria a 600 nm em espectrofotômetro. Além disso, o consumo de açúcar foi quantificado em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) - *Shimadzu LC-20A Prominence model* utilizando fase móvel ácido fosfórico 1% a 0,5 mL/min, detecção por Índice de refração, coluna Supelcogel C640H e temperatura 32 °C. Avaliou-se, também, o comportamento do pH ao longo do processo.

Finalizadas às 24 horas de incubação, toda a cultura celular foi centrifugada por 10 minutos a 8.000 rpm. O sedimento foi cuidadosamente lavado com solução de NaCl (0,9%) e ressuspensão em solução de peptona (1%) na concentração de 34 g L⁻¹. Os dados foram analisados no Statistics 7 e os gráficos plotados pelo software Origin 2018.



AG15



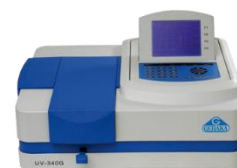
Solução NaCl (0,9%)
0,5 g/L biomassa seca



75 mL de
meio cultivo



Mantido em incubadora 24
horas a 120 rpm e 32 °C



Crescimento
quantificado a 600 nm



pH avaliado



Quantificação de
glicose e ácidos



Cultura centrifugada
10 min. a 8000 rpm



Sedimento ressuspensão
em solução peptonada
34 g/L biomassa seca

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, verificamos que o AG15 apresentou bom índice de crescimento no meio proposto. Os resultados revelaram que o crescimento celular foi substancial, conforme ilustrado na Figura 01. Observou-se que o início do crescimento celular ocorreu aproximadamente 8 horas após o início do processo fermentativo, e seu pico máximo de crescimento no período de 24 horas. Nota-se também, um declínio significativo da quantidade de glicose no meio a partir de 4 horas, juntamente com a queda no

índice de pH. Podemos afirmar que o esgotamento do açúcar ocorre após 12 horas, com células ainda com potencial de crescimento e pH estável na faixa de 5 a 6.

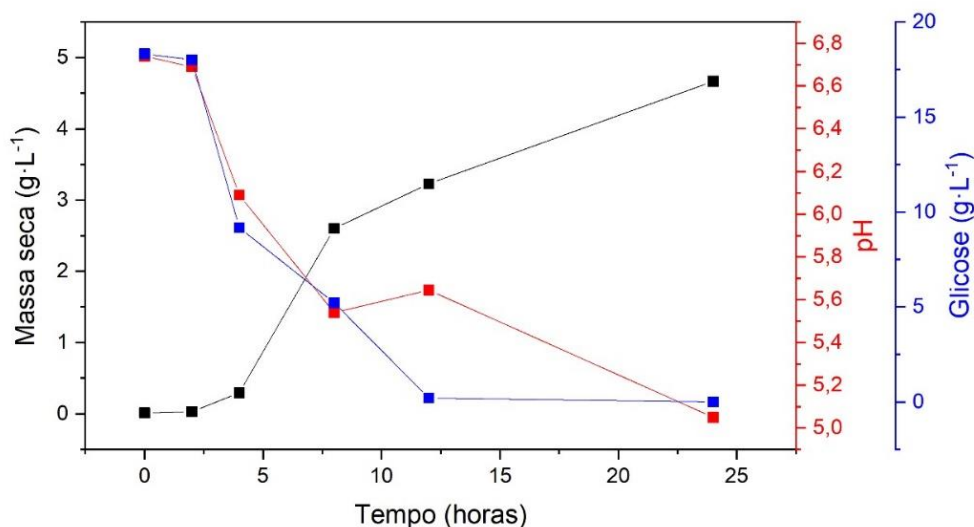


Figura 01: Potencial de crescimento da cepa AG15 em meio de cultivo com glicose

O meio com lactose revelou um baixo índice de crescimento celular (Figura 02). Os índices de pH mostraram uma pequena queda de 7,5 para 6, indicando a produção de compostos ácidos durante o processo fermentativo. As células tiveram pequena variação de crescimento, o qual é iniciado no período de 4 horas, mas sem valor significativo. Seu alto índice de expansão é visualizado no fim da fermentação. A Figura 02 evidencia a queda da concentração de lactose, porém a diminuição se mostrou pequena, 30%, evidenciando dificuldade do microrganismo em consumir essa fonte de carboidrato.

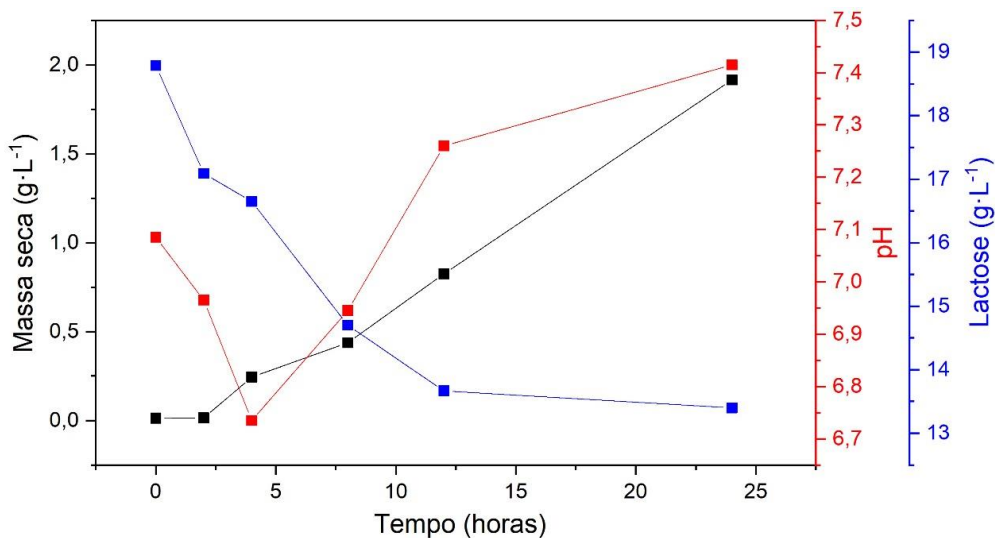


Figura 02: Potencial de crescimento da cepa AG15 em meio de cultivo com lactose

Como os resultados obtidos apresentaram diferenças significativas, entre as análises de um monossacarídeo (glicose) e um dissacarídeo (lactose), realizou-se o mesmo experimento com outro dissacarídeo, a sacarose (Figura 03). A célula teve bom potencial de crescimento, tendo início em 4 horas de fermentação e maior índice em 24 horas. O pH caiu constantemente em todo o processo fermentativo, com início em 7,38 e final a 5,29. A sacarose foi totalmente consumida em todo o período analisado, portanto é notório que o microrganismo apresentou uma preferência por essa fonte de carbono.

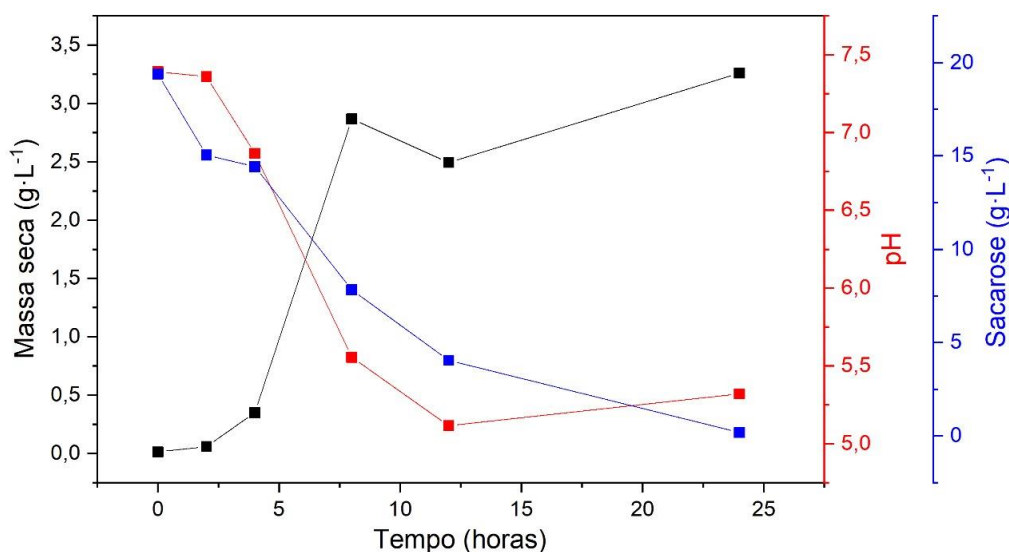


Figura 03: Potencial de crescimento em meio de cultivo com sacarose.

A partir das análises individuais, podemos fazer um comparativo do potencial de crescimento da cepa AG15 sob as diferentes formulações de meio realizadas, como mostra a Figura 04. Nota-se uma maior semelhança entre o consumo dos açúcares glicose e sacarose, pois ambos sofrem redução a partir de 2 horas de fermentação e se findam após as 24 horas do processo. Já a lactose, não foi totalmente consumida durante a fermentação e a razão pode ser atribuída à menor capacidade do microrganismo em assimilar esse carboidrato, uma vez que a cepa utilizada neste estudo foi isolada do solo e sua fonte usual de carboidrato não são os produtos lácteos. Ademais, a queda quantitativa da lactose requer análise maior para um possível crescimento celular em um tempo superior ao que foi estudado.

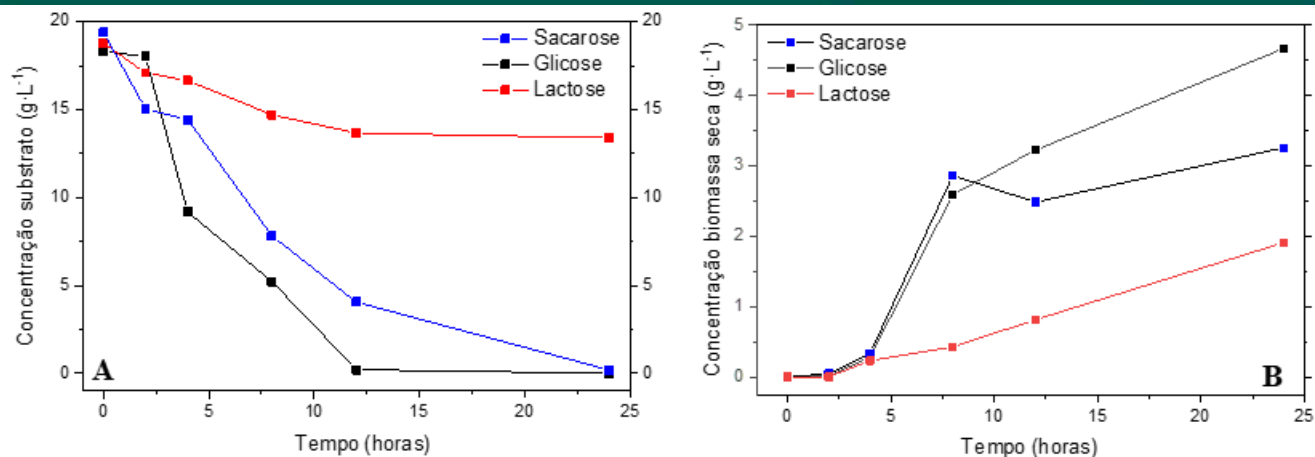


Figura 04: Comparação do processo fermentativo para as três fontes de carbono utilizadas – A - variação da concentração de substrato e B - variação da biomassa – no decorrer do tempo.

CONCLUSÕES

O estudo evidencia a influencia que a composição nutricional de um meio de cultura tem no crescimento celular de um microrganismo e revela que a cepa AG15 apresenta desempenho variado em meio com diferentes fontes de carbono.

Os resultados demonstram que a AG15 apresenta metabolismo fermentativo eficiente, com destaque dos meios que contêm glicose e sacarose como substrato. No meio com glicose, a cepa apresenta crescimento significativo e pico máximo em 24 horas. A sacarose também se mostra uma boa fonte de carbono, com desenvolvimento semelhante à glicose.

Em comparativo, no meio com lactose, o crescimento celular é baixo, iniciado em 4h de fermentação, sem aumento significativo e uma assimilação de açúcar de apenas 30%.

A cepa, isolada da rizosfera de agave, e sua facilidade em assimilar glicose e sacarose sugere que o uso de resíduos industriais ricos em carboidratos, como melaço de cana-de-açúcar e resíduos de processamento de frutas, podem ser fontes adequadas de carbono para a produção em massa da cepa AG15.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro fornecido pelas agências de fomento brasileiras: “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES), “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq) e “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais” (APQ-04349-22 - FAPEMIG). Agradece também o apoio financeiro fornecido pela Satis Indústria e Comércio Ltda.



REFERÊNCIAS

- BALDANI, J. I., REIS, V. M., VIDEIRA, S. S., BODDEY, L. H., BALDANI, V. L. D. 2014. Plant and Soil 384 (1-2). 413-431.
- PIGNATI, W. A. et al. Spatial distribution of pesticide use in Brazil: a strategy for Health Surveillance. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 22, n. 10, p. 3281–3293, 1 out. 2017.
- SHAMEEM, M. R., SONALI, J. M. I., KUMAR, P. S., RANGASAMY, G., GAYATHRI, K. V., PARTHASARATHY, V. 2023. *Environmental Research*. 220. 115200.
- SHOMI, F. Y., UDDIN, M. B., ZERIN, T. 2021. *Stamford J. of Microbiology* 11 (1). 11-13.
- VERMELHO, A. B., PEREIRA, A. F., COELHO, R. R. R., SOUTO-PADRÓN, T. C. B. S. 2019. *Práticas de microbiologia*. GUANABARA KOOGAN (ed). 2nd ed. Rio de Janeiro. 97-97.
- VIDAL, M. C. et al. Bioinsumos: a Construção de um Programa Nacional pela Sustentabilidade do Agro Brasileiro. *Economic Analysis of Law Review*, v. 12, n. 3, p. 557, 20 fev. 2022.
- ZAGO, S. L., SANTOS, M. F., KONRAD, D., FIORINI, A., ROSADO, F. R., MISSIO, F. R., VENDRUSCOLO, E. C. G. 2019. *J. of Agricultural Science* 11. (6). 269-280.

REALIZAÇÃO