

Análise de variáveis que influenciam a produção de biomassa de actinomicetos

Fonseca T.R.B.¹, Palheta R.A.¹, Souza B.C.¹, Marinho N.M.V.¹, Ebinuma V.C.S.², Teixeira M.F.S.¹

¹UFAM - Universidade federal do Amazonas (Avenida General Rodrigo Octávio, 3000 - Coroado).

²UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Rodovia Araraquara - Jaú/km 01).

Emails: tamisfonseca@gmail.com, nmvinhote@hotmail.com, valeriac@fcfar.unesp.br

Resumo

Os Actinomicetos, assim como os demais micro-organismos, sofrem influência de diferentes fatores no seu crescimento micelial como constituição do meio de cultura e fatores físicos. A constituição do meio de cultura, juntamente com a capacidade metabólica do organismo, afeta a síntese de metabólitos e o crescimento celular que está diretamente relacionado com a formação da biomassa durante o crescimento. O objetivo deste estudo foi avaliar a interferência da velocidade de agitação e temperatura, além dos efeitos da variação de concentração da fonte de carbono e nitrogênio, na produção da biomassa micelial de Actinomicetos. Para a realização dos ensaios utilizou-se um planejamento fatorial 2⁴ com variação dos fatores independentes. Os resultados demonstraram uma maior significância da interação entre a velocidade de agitação e a temperatura, seguido da concentração do filtrado de soja, influenciando positivamente na produção de biomassa. A otimização das condições de cultivo são de extrema importância para resultados satisfatórios de produção, seja de biomassa ou de metabólitos.

Palavras-chave: crescimento micelial, fermentação submersa, planejamento fatorial.

Introdução

Os Actinomicetos constituem um grupo extremamente diverso; são bactérias Gram-positivas, classificadas na ordem Actinomycetales, aeróbias e com crescimento semelhante ao de fungos filamentosos. Em outros membros da ordem, os filamentos se fragmentam e consequentemente só podem ser observados em algum estágio do ciclo de crescimento. Apresentam distribuição cosmopolita, sendo encontrados predominantemente no solo. Entretanto, podem também estar presentes em ambientes aquáticos e em associação com líquens e plantas (Batista *et. al.*, 2010; Silva-Vinhote *et. al.*, 2011).

Destacam-se por apresentar um papel importante na ecologia, atuando na ciclagem de nutrientes, fixação de nitrogênio, além de serem produtores metabólitos secundários extremamente diversos como antibióticos, vitaminas e enzima (Silva-Vinhote *et. al.*, 2011).

A constituição do meio de cultura, juntamente com a capacidade metabólica do organismo, afeta a síntese de metabólitos e o crescimento celular que está diretamente relacionado com a formação da biomassa durante o crescimento. Fontes nutricionais como carbono, nitrogênio, minerais e fatores ambientais como tempo, temperatura e pH têm uma profunda influência. A temperatura é um dos principais fatores ambientais que afetam o crescimento de muitos micro-organismos (Sales-Campos e Andrade, 2010; Antunes *et al.* 2013). O objetivo deste estudo foi a avaliar a interferência da velocidade de agitação e temperatura, além dos efeitos da variação de concentração da fonte de carbono e nitrogênio na produção da biomassa micelial de Actinomicetos.

Material e Métodos

Este experimento foi realizado no laboratório de Micologia do Departamento de Parasitologia/Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas.

O micro-organismo selecionado, Actinomiceto A8, foi reativado a partir do preservado pelo método Castellani em meio ágar ISP2A (amido 1%, extrato de levedura 0,4%, extrato de malte 1%, dextrose 0,4%, ágar 2%), pH 7,3 em placa de Petri por 10 dias a 25 °C com manutenção da cultura a cada 30 dias.

Em frascos de vidro com capacidade de 125 mL foram distribuídos 50 mL de cada meio de cultura e em seguida levados à autoclave a 121 °C por 15 minutos. Após a esterilização e o crescimento do micro-organismo, retirou-se 10 discos de 0,8 cm de diâmetro e inoculou-se no meio de fermentação selecionado, MPE, composto por cloreto de sódio (NaCl) 0,5%, carbonato de cálcio (CaCO₃) 0,2%, glicose e farelo de soja com variação das suas concentração de acordo com o planejamento fatorial. As inoculações foram feitas assepticamente em Câmara de Fluxo Laminar Contínuo.

Ao término do terceiro dia de fermentação realizou-se a filtração em papel de filtro Whatmann nº 1 da biomassa micelial com o auxílio de uma bomba à vácuo. A biomassa retida no filtro foi levada à estufa a 105 °C até a obtenção de peso constante. O peso seco foi determinado pela diferença entre o peso total e o peso do papel de filtro.

A fermentação foi conduzida com base em um planejamento fatorial de 2⁴ com repetição do ponto central em *shaker*, onde a variável resposta foi a produção de biomassa e os fatores independentes foram temperatura (25 °C, 30 °C, 35 °C), velocidade de agitação (150 rpm, 180 rpm, 210 rpm), concentração de glicose (1%, 2%, 3%) e concentração de nitrogênio (1%, 2%, 3%).

Para análise estatística dos resultados foi usado o *software* Statistica 10.0 com base na tabela de ANOVA e no gráfico de Pareto.

Resultados e discussão

Visando atingir os objetivos, planejamentos experimentais vêm sendo empregados para aperfeiçoar vasta gama de bioprocessos (Gonçalves *et al.*, 2012). Através do planejamento fatorial, é possível reduzir o número de experimentos e avaliar as variáveis significativas juntamente com seus efeitos (Bruns e Scarmino, 2006). Em adição, juntamente com a ferramenta estatística, a metodologia de superfície de resposta (MSR) é frequentemente usada para aperfeiçoar um processo usando ferramenta estatística. Este modelo é usualmente construído para os fatores definidos de um meio por equação polinomial quadrática para descrever os efeitos de interação entre as variáveis (Zafar *et al.*, 2012). O objetivo deste conjunto de técnicas estatísticas é executar o plano experimental pela construção de modelos empíricos e avaliar o efeito independente das variáveis na desejável variável resposta. Esta metodologia reduz o número de experimentos e fornece informação suficiente para um resultado aceitável estatisticamente (Guo *et al.*, 2012).

Para avaliar o efeito de diferentes variáveis (velocidade de agitação, temperatura, concentração de glicose e concentração do filtrado de soja) no crescimento microbiano do Actinomiceto A8, empregou-se um planejamento fatorial completo 2⁴, constituindo 20 ensaios. A análise de variância (ANOVA) mostrou que as variáveis independentes, concentração de filtrado de soja, temperatura e a interação entre as variáveis temperatura e velocidade foram significativas ao processo para um intervalo de confiança de 95%. O planejamento apresentou falta de ajuste não significativa, o que demonstra a boa interação entre os resultados previstos e obtidos experimentalmente.

Tabela 1. Tabela de análise de variância (ANOVA) para um intervalo de confiança de 95%, onde a variável resposta é a produção de biomassa do Actinomiceto A8.

ANOVA: Var. : Biomassa; R ² : 0,8513; Adj: 0,68607; 2** (4-0) design; MS Residual = 0,580668; DV: Biomassa					
Fatores	SS	df	MS	F	p
(1) Concentração de glicose (%)	0,3425	1,0	0,3425	0,5899	0,4621
(2) Concentração de filtrado de soja (%)	4,6322	1,0	4,6322	7,9773	0,0199
(3) Temperatura (°C)	5,7900	1,0	5,7900	9,9713	0,0116
(4) Agitação (rpm)	2,4925	1,0	2,4925	4,2924	0,0682
1 by 2	0,0000	1,0	0,0000	0,0000	0,9972
1 by 3	1,7128	1,0	1,7128	2,9498	0,1200
1 by 4	0,3502	1,0	0,3502	0,6030	0,4573
2 by 3	2,6479	1,0	2,6479	4,5602	0,0615
2 by 4	1,1702	1,0	1,1702	2,0152	0,1894
3 by 4	10,7797	1,0	10,7797	18,5644	0,0020
Erro	5,2260	9,0	0,5807		
Total SS	35,1441				

Os parâmetros da fermentação tais como tempo, agitação, temperatura, pH e vitaminas, fontes de carbono e de nitrogênio podem ser determinantes no controle do processo, por isso é necessário um conhecimento da fisiologia microbiana e do comportamento celular do micro-organismo.

De acordo com o gráfico de Pareto (Figura 1), a interação entre as variáveis apresentou o efeito mais significativo, no nível positivo. A temperatura como variável sozinha apresentou um efeito negativo, o que indica que trabalhar com esta variável no nível inferior (25 °C) promoverá resultados superiores. Por outro lado, a concentração de filtrado de soja apresentou efeito positivo e trabalhar com uma maior concentração (> 3%) deste

substrato gerará melhores resultados. Como a interação entre temperatura e velocidade de agitação apresentou efeito positivo e a variável independente temperatura sozinha efeito negativo, trabalhar com a velocidade de agitação no nível inferior (150 rpm) acarretaria em resultados mais promissores.

Fatores como velocidade de agitação, concentração de glicose e as demais interações não apresentaram resultados significativos para a produção da biomassa micelial.

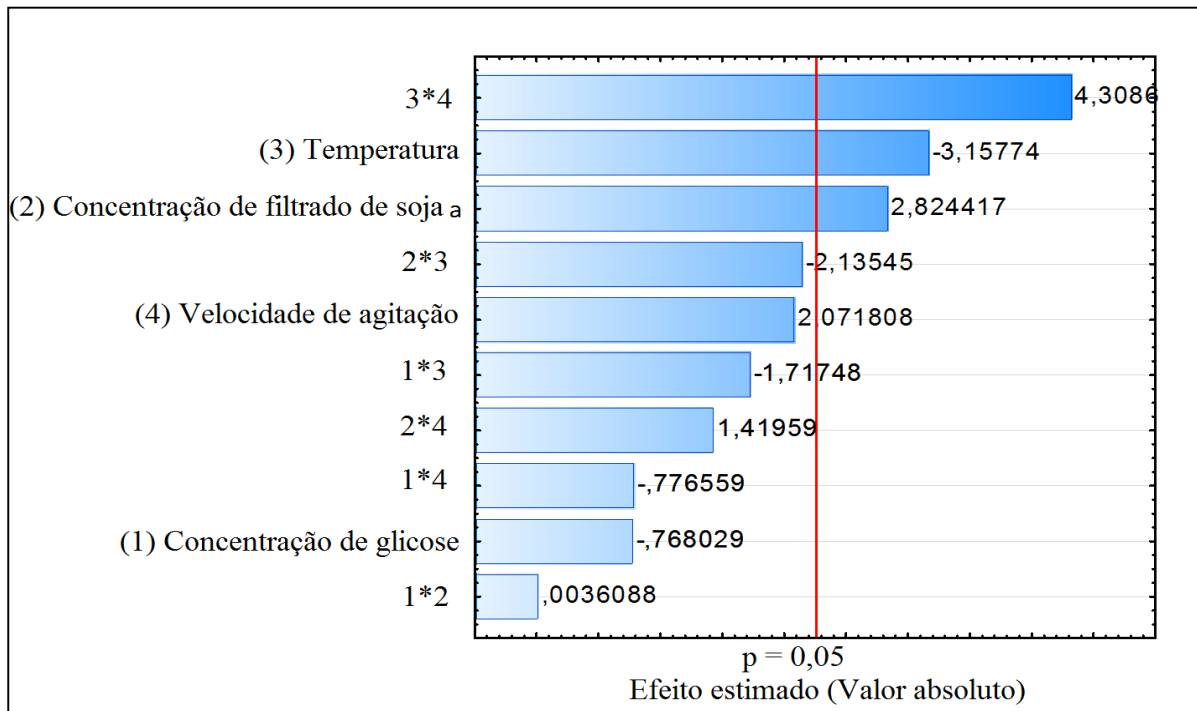


Figura 1. Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta a produção de biomassa do Actinomiceto A8.

Corroborando com os dados obtidos para o Actinomiceto A8, o gênero *Streptomyces* apresenta um maior crescimento micelial quando se tem uma maior concentração de filtrado de soja, 4% e uma baixa concentração de glicose 1% (Nascimento *et al.*, 2010). As fontes de nitrogênio também proporcionaram um melhor crescimento em *Penicillium citrinum*, sendo o farelo de soja o segundo melhor substrato (Tavares *e. al.*, 1998).

No trabalho de Tavares *et. al* (1998) verificou-se também que o uso de temperaturas em torno de 25 °C favorecem a maior produção de biomassa.

Conclusão

As interações físicas, agitação e temperatura apresentaram uma maior significância na produção de biomassa micelial do Actinomiceto A8 quando comparado aos outros fatores avaliados, no entanto para otimização das condições é necessário a realização de mais estudos.

Referências

- Antunes, et al. (2013). Influência da fonte nutricional no crescimento ótimo e na produção de antimicrobianos produzidos por isolados de *Streptomyces* sp. Rev. Bras. Bioc., 11(2):131-138.
- Batista, et al. (2010). Avaliação de actinomicetos com potencial para promoção de crescimento em plântulas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) de diferentes cultivares. Unimontes Cien., 12(1):60-69.
- Bruns, R.E.; Scarminio, B.B.N. (2006). Statistical design: chemometrics. Amsterdam: Elsevier. 412p.
- Gonçalves, et al. (2012). Use of response surface methodology to optimize production of pectinases by recombinant *Penicillium griseoroseum* T20. Biocatalysis and Agri. Biotech,1(2):140-146.
- Guo, J. et al. (2012). Process optimization for microwave-assisted direct liquefaction of *Sargassum polycystum* C. Agardh using response surface methodology. Biores. Tech., 120, 19-25.

Sales-Campos, et al. (2010). Produtividade de *Pleurotus ostreatus* em resíduos da Amazônia. *Interciencia*, Caracas, 35(3):198-201.

Silva-Vinhote, et al. (2011). Taxonomic Characterization and Antimicrobial Activity of Actinomycetes Associated with Foliose Lichens from the Amazonian Ecosystems. *Australian J. Basic Appl. Sci.*, 5, 910-918.

Tavares, et al. (1998). Utilização do resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. *Química Nova*, 21, 6.

Zafar, et al. (2012). Optimization of polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Azohydromonas lata* MTCC 2311 by using genetic algorithm based on artificial neural network and response surface methodology. *Biocatalysis and Agri. Biotech.*, 1(1):70-79.