

## Variáveis que influenciam a produção de biomassa de actinomicetos

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

<sup>1</sup> Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Av. Gal. Rodrigo O. Jordão Ramos, 3000,

<sup>2</sup> Universidade Estadual de São Paulo, Rodovia Araraquara-Jaú/km 01 CEP 14801-902 - Araraquara - SP/Brasil. E-mail: mteixeira@ufam.edu.br

### Resumo

Os actinomicetos, bactérias filamentosas, Gram positivas, assim como os demais microorganismos sofrem influência de diferentes fatores no seu crescimento micelial como constituição do meio de cultura e fatores físicos. A composição 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  $2^4$  com variação dos fatores independentes. Os resultados demonstram uma maior significância da interação entre a velocidade de agitação e a temperatura, seguido da concentração do filtrado de soja influenciado 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:** Bactérias filamentosas, Planejamento Fatorial; Agitação; Temperatura.

### 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 conseqüentemente só podem ser observados em algum estágio do ciclo de crescimento.

Apresentam ampla distribuição no ecossistema, 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 nutriente, fixação de nitrogênio, além de serem produtores metabólitos secundários extremamente diversos como antibióticos, vitaminas e enzimas (Silva-Vinhote *et al.*, 2011).

Dentre os metabólitos secundários os actinomicetos destacam-se principalmente pela produção de uma grande diversidade de antibióticos (Rincón-Enríquez *et al.*, 2014). Estima-se que a ordem produza em torno de 3.000 antibióticos, sendo 90% pelo gênero *Streptomyces*. Este o único gênero microbiano capaz de produzir todos os grupos de antibióticos: aminoglicosídeos, macrolídeos, ansamacrolídeos,  $\beta$ -lactâmicos, peptídeos, glicopeptídeos, antraciclinas, tetraciclina, nucleosídeos, polienos e quinonas (Nascimento *et al.*, 2010, Carvalho, 2011, Nascimento *et al.*, 2014).

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 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).

Os estudos da interação das fontes de carbono e nitrogênio são importantes na medida em que estes compostos apresentam uma complexidade estrutural e são fontes utilizadas para um bom desempenho metabólico. O efeito da interação das diferentes concentrações e de fontes de carbono e nitrogênio pode ser um fator importante para promover melhoria na eficiência fermentativa e melhorar a produção dos metabólitos (Santos *et al.*, 2014).

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.

## **Material e métodos**

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

### *Meios de esporulação e manutenção dos micro-organismos*

O micro-organismo (*Streptomyces* sp. DPUA 1549) preservado pelo método

Castellani foi reativado em meio ágar ISP-2A (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 até esporulação do mesmo, com manutenção da cultura a cada 30 dias.

### *Fermentação Submersa*

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 (CaCO<sub>3</sub>) 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. A biomassa seca ou o peso seco foi determinado pela diferença entre o peso total e o peso do papel de filtro.

### *Planejamento fatorial para o crescimento micelial*

Os estudos de produção foram realizados baseados em um planejamento experimental. Inicialmente foram avaliados fatores como diferentes concentrações de fontes de nitrogênio e de carbono, agitação e temperatura utilizando um planejamento completo 2<sup>4</sup> com 4 pontos centrais (Tabela 1). Após os experimentos foram realizadas as análises estatísticas dos resultados (biomassa), com o auxílio do software Statistica 10.0 e Minitab 16.

Tabela 1. Níveis dos fatores estudados no planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup> para o crescimento micelial e produção de antibióticos por *Streptomyces* sp. DPUA 1549.

<b>Fatores</b>	<b>Inferior (-1)</b>	<b>Central (0)</b>	<b>Superior (+1)</b>
Concentração de glicose (%)	1	2	3
Concentração de filtrado de soja (%)	1	2	3
Temperatura (°C)	25	30	35
Agitação (rpm)	150	180	210

## Resultados e discussão

Para avaliar o efeito de diferentes variáveis (velocidade de agitação, temperatura, concentração de glicose e concentração do filtrado de soja) no crescimento microbiano do *Streptomyces* sp. DPUA 1549 empregou-se um planejamento fatorial completo  $2^4$  (Tabela 2), constituindo 20 ensaios. A análise de variância (ANOVA) mostrou que as variáveis independentes, concentração de filtrado de soja, temperatura e velocidade de agitação 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. A partir das análises dos resultados pôde-se observar que o  $R^2$  apresentou resultado significativo.

Tabela 2. Planejamento fatorial para avaliação do crescimento micelial de *Streptomyces* sp. DPUA 1549.

Standard Run	Design: 2**(4-0) design				
	Concentração de glicose (%)	Concentração de filtrado de soja (%)	Temperatura (°C)	Velocidade de agitação	Biomassa (g)
1	1	1	25	150	3,843
2	1	1	25	210	3,400
3	1	1	35	150	3,363
4	1	1	35	210	4,574
5	1	3	25	150	5,592
6	1	3	25	210	5,065
7	1	3	35	150	2,361
8	1	3	35	210	5,934
9	3	1	25	150	5,547
10	3	1	25	210	2,581
11	3	1	35	150	1,342
12	3	1	35	210	4,534
13	3	3	25	150	5,873
14	3	3	25	210	5,485
15	3	3	35	150	2,410
16	3	3	35	210	4,158
17 (C)	2	2	30	180	4,805
18 (C)	2	2	30	180	5,172
19 (C)	2	2	30	180	5,006
20 (C)	2	2	30	180	4,113

De acordo com o gráfico de Pareto, 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.

A Tabela de análise de variância (ANOVA) mostrou que a interação entre as variáveis temperatura e velocidade de agitação (3by4) foram significativas ao processo para um intervalo de confiança de 95%. De acordo com o gráfico de Pareto (Gráfico 1), a interação entre as variáveis apresentou o efeito mais significativo, no nível positivo, logo este fator influencia diretamente no crescimento micelial de *Streptomyces* sp. DPUA 1549.

A temperatura como variável sozinha apresentou um efeito negativo, o que indica que trabalhar com esta variável no nível inferior promoverá resultados superiores. Por outro lado, a concentração de filtrado de soja apresentou efeito positivo e trabalhar com uma maior concentração deste substrato pode gerar 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 ocasionaria resultados mais promissores.

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.

Corroborando com os dados obtidos para o *Streptomyces* sp. DPUA 1549, 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, 2009). As fontes de nitrogênio também proporcionaram um melhor crescimento em *Penicillium citrinum*, sendo o farelo de soja o segundo melhor substrato (TAVARES et. 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.

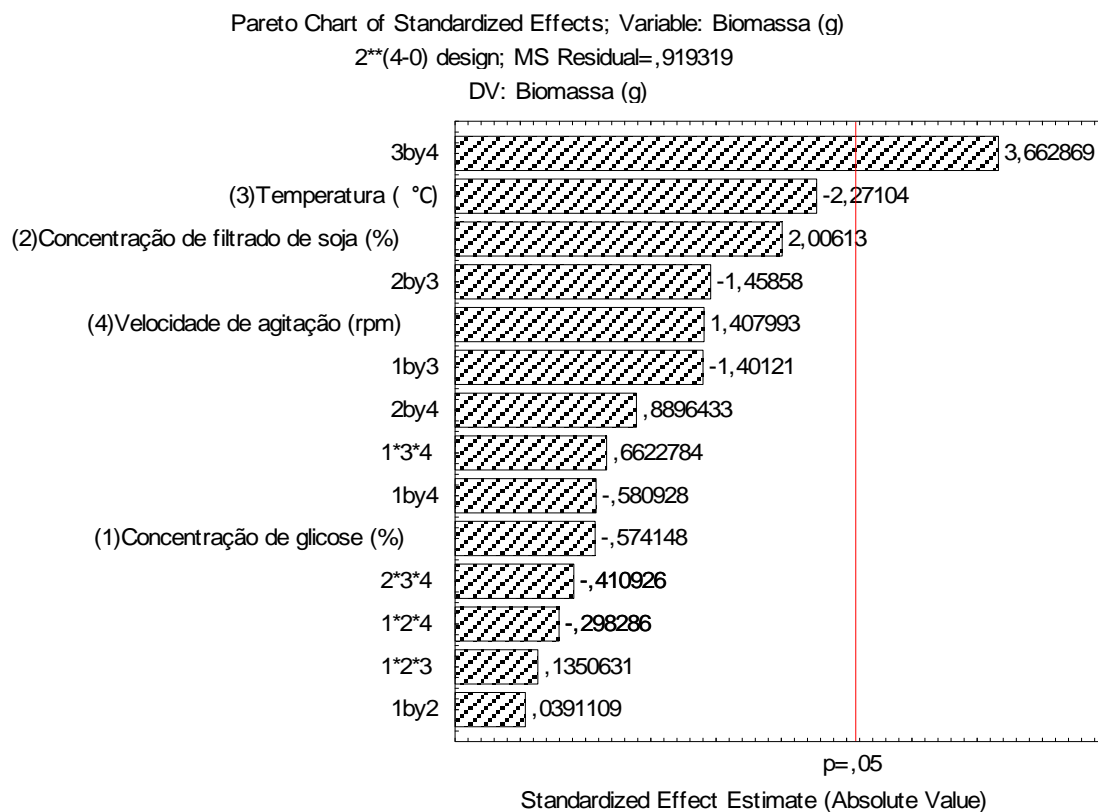


Figura 1. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis, tendo como variável resposta a produção de biomassa de *Streptomyces* sp. DPUA 1549.

### Conclusão

As interações físicas, agitação e temperatura apresentaram uma maior significância na produção de biomassa micelial do *Streptomyces* sp. DPUA 1549 quando comparado aos outros fatores avaliados, entretanto para otimização das condições é necessário a realização de mais estudos.

### Referências

Antunes, TC, Salamoni SP, Frazzon APG, Germani JG, Van Der Sand ST (2013) Influência da fonte nutricional no crescimento ótimo e na produção de antimicrobianos produzidos por isolados de *Streptomyces* sp. Ver. Bras. Bioc., 11, 2, 131-138.

Batista WB, Nobre SAM, Nobre PB, Fernandes BHA, Gomes HAR, Aguiar RM, Melo GA, Pereira GVN (2010) Avaliação de actinomicetos com potencial para promoção de crescimento em plântulas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) de diferentes cultivares. Unimontes Científica, v. 12, n. 1/2, p. 60-69.

Carvalho TS (2011). Avaliação da atividade antimicrobiana de actinomicetos endofíticos contra bactérias Gram-negativas resistentes a beta-lactâmicos. Trabalho de conclusão de curso (Farmácia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 26 fls.

Nascimento RP (2006) Estudo da produção de endoxilanas por *Streptomyces malaysiensis* AMT-3 Utilizando resíduos agro-industriais. Tese de doutorado: Doutor em Ciências (Microbiologia), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 164 fls.

Nascimento TP, Porto TS, Porto ALF (2009) Efeito da fonte de carbono e de nitrogênio na produção de metabólitos antimicrobianos por *Streptomyces* sp. IX Jornada de ensino, pesquisa e extensão, 2009. Recife. <<http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0833-1.pdf>>.

Nascimento TP, Porto CS, Teixeira MFS, Porto TS, Porto ALF (2014) Produção de biocompostos com atividade antimicrobiana de *Streptomyces* sp. ante isolados de mastite caprina. Arq. Bras. de Med. Vet. e Zoot, 66(1):101-108.

Rincón-Enríquez G, López-Pérez L, Quiñones-Aguiar EE (2014) Efectividad biológica *in vitro* de actinomicetos sobre el agente causal del tizón de halo en frijol. Revista Fitotecnia Mexicana, 37(3):229-234.

Sales-Campos C, Minhoni MTA, Andrade MCN (2010) Produtividade de *Pleurotus ostreatus* em resíduos da Amazônia. Interciencia, Caracas, 35(3):198-201.

Santos EFS, Schautz CA, Cardoso CAL, Ernandes JR, Batistote MO (2014) Efeito da complexidade estrutural da fonte de carbono e nitrogênio no desempenho fermentativo de leveduras industriais. Ciência e Natura, 35(2):9-14.

Silva-Vinhote NM, Pereira TM, Astolfi Filho S, Matsuura T (2011) Taxonomic Characterization and Antimicrobial Activity of Actinomycetes Associated with Foliose Lichens from the Amazonian Ecosystems. Australian Journal of Basic e Applied Sciences, 5(5): 910-918.

Tavares VB, Sivieri K, Ceron CR, Silva R e Trabuco e (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.