



CONGRESSO BRASILEIRO  
DE ENGENHARIA QUÍMICA EM  
INICIAÇÃO CIENTÍFICA

21-24 Julho de 2019  
Uberlândia/MG



## AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE CULTURA MISTA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

G. C. DELATIN<sup>1</sup>, R. M. DIAS<sup>1</sup>, V. L. CARDOSO<sup>1</sup> e M. M. RESENDE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química  
E-mail para contato: gustavodelatin@gmail.com

**RESUMO** – Na natureza os microrganismos precisam de um ambiente que favoreçam as atividades de metabolismo e catabolismo, dessa forma há particularidades entre os seres e o meio ambiente em que vivem quanto a pH, temperatura e nutrição. Na intenção de encontrar qual o melhor meio nutritivo de crescimento dos micróbios encontrados nos efluentes de curtume para adequar os experimentos voltados para tratamento de Cromo III e Cromo VI e certificar que os métodos usados nas pesquisas mais eficientes possíveis. O trabalho avalia quais os meios de cultura atendem mais eficientemente a contagem de células dos microrganismos, utilizados para tratamento de efluente industrial com resíduos de Cr (VI) e Cr (III). Notando a partir dos resultados obtidos nos experimentos com os seguintes meios de cultura; caldo nutriente, YMA Gelose *Sabourand-dextrose* e Gelose *Czapeck*, apresentam mesma ordem de grandeza para reprodução de microrganismos, sendo assim há presença de grande variedade de micróbios presentes nos processos em que são utilizados.

### 1. INTRODUÇÃO

Na natureza os microrganismos se mantêm a partir de reações químicas que são realizadas no interior do próprio ser, chamadas metabolismo. Nessas atividades estão presentes tanto catabolismo onde há liberação de energia, quanto atividades de anabolismo onde é demandado consumo de energia por parte dos seres.

Para que os micróbios metabolizem da melhor maneira possível é necessário que encontrem um meio onde estejam adaptados, pois fatores como temperatura, pH e nutrição influenciam muito. Dentre as moléculas utilizadas na nutrição são classificadas de acordo com a quantidade necessária por eles, macronutrientes são os componentes que são necessários em maior quantidade e micronutrientes são componentes que não são vistos em grandes quantidades nos meios (Madigan et al. 2004).

Os microrganismos usados remoção e redução biológica de cromo no trabalho de Dias et. al, 2016, é uma cultura mista, e foram utilizados meios simples, porém com certo grau de enriquecimento devido ao crescimento de determinados microrganismos, por exemplo, caldo nutriente mais indicado para bactérias, YMA normalmente empregado para leveduras e bactérias, Gelose *Sabourand-dextrose* indicado para leveduras e por último Gelose *Czapeck* usado comumente para fungos.

Os micróbios estudados foram retirados de uma indústria de curtume da região e passou por inúmeros de experimentos tratando efluente sintético com cromo presente. Assim, a partir do resultado do experimento pode identificar quais grupos majoritariamente participam do processo no tratamento desses resíduos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento de cultura mista através da técnica de contagem de células viáveis utilizando meios de cultura diferenciados.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A cultura mista utilizada neste estudo encontrava-se disponível no laboratório da Faculdade de Engenharia Química da UFU e foi a mesma utilizada no trabalho de Dias et al. (2016). Os microrganismos foram cultivados em meio de cultura com a seguinte composição  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1,0 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2 g/L),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,001 g/L),  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (6,0 g/L),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,5 g/L),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,001 g/L) e Levedura Cervejeira Residual (3,0 g/L) (Dermou *et al.*, 2005).

O crescimento da cultura mista foi avaliado por meio da contagem de células viáveis (células capazes de se reproduzirem) em placas de Petri, conforme o método de (Madigan *et al.*, 2004).

A coleta de alíquotas da cultura mista ocorreu em diferentes tempos de crescimento e estas foram inoculadas em quatro diferentes meios sólidos: caldo nutriente (simples), meio YMA, Gelose *Sabourand-dextrose* e Gelose *Czapeck*. A quantidade de células inoculadas foi de 1 mL e várias diluições das amostras foram realizadas ( $10^0$  a  $10^{12}$  células). O período de incubação das placas de Petri com os meios foi de 48 horas, sendo, então, contado o número de colônias pela contagem em profundidade. Considerando que cada colônia geralmente é originada a partir de um organismo, o número total de colônias encontradas no meio condiz com as células viáveis contidas na alíquota verificada (Madigan *et al.*, 2004).

A realização do procedimento em triplicata para cada diluição da amostra da cultura mista permite a redução de erros causados pela contagem de viáveis em profundidade, como exemplo agregados e duas células próximas. O uso desta técnica proporciona a contagem de diversos tipos de micro-organismos, a partir de meios de cultura específicos. Há meios seletivos, os quais favorecem o crescimento de um organismo, e meios seletivos e diferenciais, que também distinguem um organismo por características fenotípicas.

O caldo nutriente (simples) é usado para o cultivo e a contagem em placa de bactérias aeróbias totais. O pH foi ajustado para 7,4 a 7,6. A esterilização do meio foi a 121 °C por 20 minutos. Os reagentes que compõem o caldo nutriente e são diluídos em 1 L de água destilada estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Reagentes para caldo nutriente (simples).

Reagentes	[g/L]
Extrato de carne	3,0
Peptona	10,0
Fosfato de potássio dibásico	1,0



Cloreto de sódio	5,0
Agar-agar	30,0

O meio YMA também foi utilizado para o cultivo e a contagem em placa de bactérias aeróbias totais. O pH foi ajustado para 6,0. A esterilização do meio foi a 121 °C por 20 minutos. Os reagentes que compõem o meio YMA e foram preparados em 1,0 L de água destilada estão expostos na Tabela 2.

Tabela 2 – Reagentes para meio de cultura YMA.

Reagentes	[g/L]
Glicose (dextrose)	10,0
Extrato de levedura	3,0
Peptona	5,0
Agar-agar	20,0

Já o meio Gelose *Sabourand–dextrose* usado para o cultivo e contagem em placa de leveduras e fungos não filamentosos. O pH foi ajustado para 5,5. A esterilização do meio foi a 110 °C por 15 minutos. Os reagentes que compõem o meio Gelose *Sabourand–dextrose* estão apresentados na Tabela 3 na quantidade para preparar 1 L.

Tabela 3 – Reagentes para meio de cultura Gelose *Sabourand–dextrose*.

Reagentes	[g/L]
Peptona	10,0
Glicose (dextrose)	40,0
Agar-agar	20,0

O meio Gelose *Czapeck* é indicado para o cultivo e contagem em placa de fungos filamentosos. O pH deve ser ajustado para 5,5. A esterilização do meio deve ser a 110 °C por 15 minutos. Os reagentes que compõem o meio Gelose *Czapeck* e são diluídos em 1 L de água destilada estão apresentados na Tabela 4.

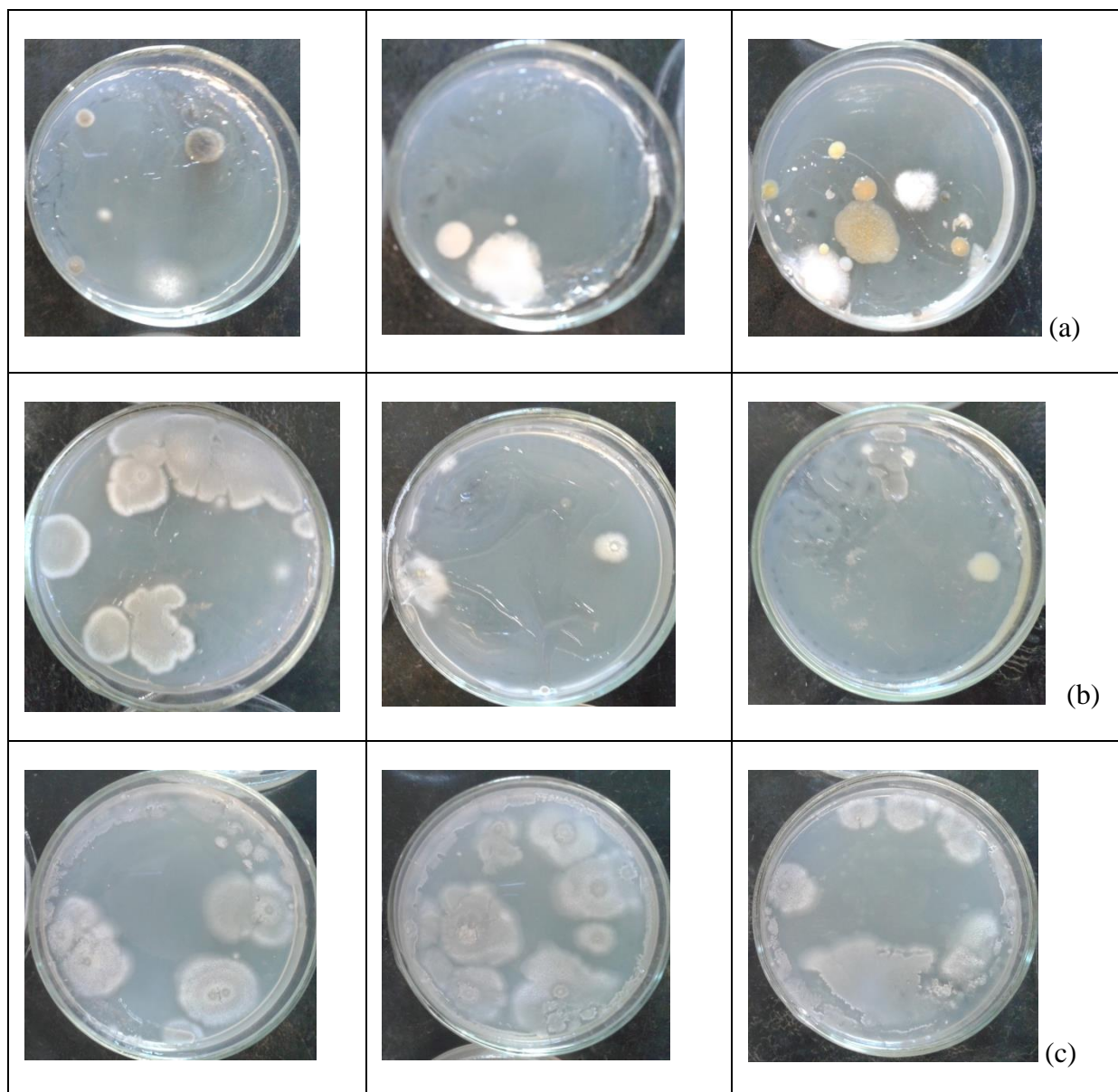
Tabela 4 – Reagentes para meio de cultura Gelose *Czapeck*.

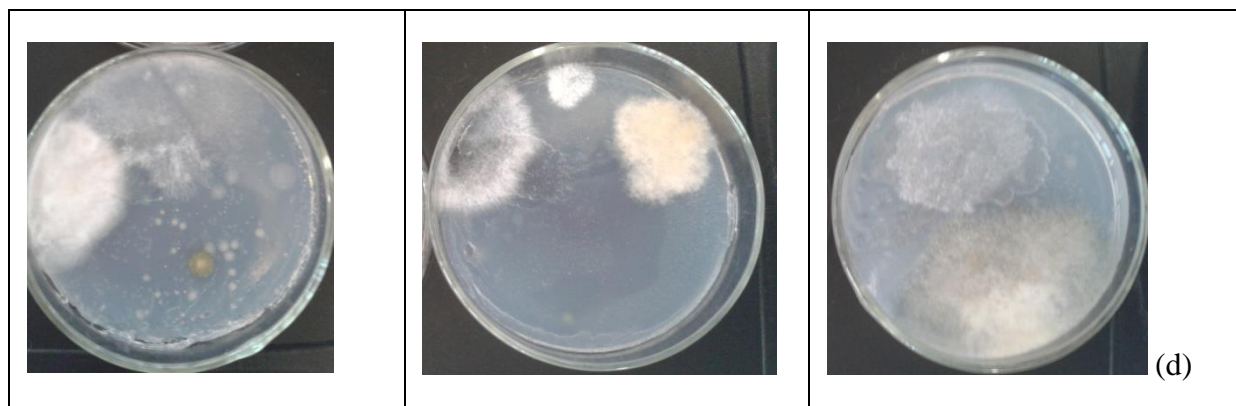
Reagentes	[g/L]
Glicose	20,0
Nitrato de sódio	2,0
Fosfato dibásico de potássio	1,0
Sulfato de magnésio	0,5
Cloreto de potássio	0,5
Sulfato ferroso	0,01
Sulfato de amônio	1,0
Agar-agar	20,0

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As colônias desenvolvidas em cada meio de cultura (caldo nutriente (simples), meio YMA, Gelose *Sabourand-dextrose* e Gelose *Czapeck*), encontradas após a incubação das placas de Petri por 48 horas, são apresentadas na Figura 1.

Figura 1 – Colônias em: (a) caldo nutriente; (b) meio YMA; (c) Gelose *Sabourand-dextrose*; (d) Gelose *Czapeck*.





Os resultados apresentados na Tabela 5 indicaram que a contagem de células viáveis das amostras não mostrou alteração significativa entre os quatro meios de cultura avaliados, permanecendo na mesma ordem de grandeza de  $10^{11}$  (UFC/mL).

Tabela 5 – Contagem do número de colônias.

Meios de cultura	Número de colônias (UFC/mL)
Caldo nutriente (simples)	$6,0 \times 10^{11}$
Meio YMA	$7,5 \times 10^{11}$
Gelose <i>Sabourand-dextrose</i>	$12,0 \times 10^{11}$
Gelose <i>Czapeck</i>	$3,0 \times 10^{11}$

É possível perceber pela Tabela 5 que os quatro meios de cultura utilizados apresentaram crescimento das colônias, de modo que todos são eficientes para seu respectivo tipo de micro-organismo. No trabalho de Castele et al., (2006), é notável que a eficiência do meio de cultura dependa da origem dos microrganismos. Então quando os probióticos eram de iogurtes alguns meios mais específicos foram eficientes e quando eram de queijos outros meios de cultura foram eficientes. Assim é visto que no meio de cultura mista usado para possível solução de tratamento de resíduos de cromo usado no trabalho de Dias et al., (2016), Crisostomo et al., (2016) e de Moura et al., (2014), possui variados microrganismos trabalhando nas remoções de cromo e reduções de cromo (VI) a cromo (III).

## 4. CONCLUSÃO

Os resultados indicaram que os meios de cultura avaliados proporcionaram crescimento da cultura mista, mantendo mesma ordem de grandeza, notando grande variedade de micróbios na cultura mista estudada.

## 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro Fundação de Apoio Universitário/UFU, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).





CONGRESSO BRASILEIRO  
DE ENGENHARIA QUÍMICA EM  
INICIAÇÃO CIENTÍFICA

21-24 Julho de 2019  
Uberlândia/MG



## 6. REFERÊNCIAS

- CASTEELE, S. V., VANHEUVERZWIJN, T., RUYSSSEN, T., ASSCHE, P. V., SWINGS, J., HUYS, G. Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. *International Dairy Journal*, 16 (2006) 1470–1476.
- CRISOSOTOMO, C. A. B., LIMA, F. A., DIAS, R. M., CARDOSO, V. L., DE RESENDE, M. M. *Joint Assessment of Bioreduction of Chromium(VI) and of Removals of Both Total Chromium and Total Organic Carbon (TOC) in Sequential Hybrid Bioreactors*. *Water Air Soil Pollut* (2016) 227: 51.
- DERMOU, E., VELISSARIOU, A., XENOS, D., VAYENAS, D. V. *Biological chromium (VI) reduction using a trickling filter*. *J. Hazard. Mater.*, v. B126, p. 78–85, 2005.
- DIAS, R. M., CARDOSO, V. L., RESENDE, M. M. Influence of Magnetic Field Frequency Generated by Permanent Magnets in Mixed Culture Used for the Treatment of Effluent Contaminated with Chromium. *Water Air Soil Pollut* v. 227, n. 305, p. 1-6, 2016.
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. *Microbiology of Brock*. São Paulo: Prentice Hall, 2004.
- MOURA, A. A. O., TERRA, N.M., BORGES, W.S., COSTA, E. J. X., CARDOSO, V. L., RESENDE, M. M. Influence of an Electromagnetic Field on the Bioreduction of Chromium (VI) Using a Mixed Culture of Microorganisms. *Wiley Online Library* (wileyonlinelibrary.com) in 6 March 2014.