

## **Estudo de meio de cultura para *Bacillus Subtilis* CCT516 utilizando técnica de planejamento experimental**

JÖNK, M. W.<sup>1</sup>, TODESCATO, D.<sup>1</sup>, MAASS, D.<sup>1</sup>, OLIVEIRA, D.<sup>1</sup>, ULSON DE SOUZA, A. A.<sup>1</sup>, GUELLI U. SOUZA, S. M. A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos

E-mails para contato: [marthinawj@gmail.com](mailto:marthinawj@gmail.com), [selene@enq.ufsc.br](mailto:selene@enq.ufsc.br)

**RESUMO** - O *Bacillus subtilis* é uma das 40 espécies de *Bacillus* mais estudadas na área de biotecnologia. Sua alta capacidade produtora de biosurfactantes torna-o uma bactéria de grande aplicabilidade na biotecnologia industrial e ambiental. O presente trabalho visou à formulação de um meio para o máximo crescimento celular. Com o intuito de avaliar a influência dos fatores físicos e quantidade de nutrientes empregada aos reatores, foi utilizada a técnica de planejamento experimental fracionário. A partir dos resultados verificou-se que a concentração de peptona, extrato de carne, extrato de levedura, concentração de NaCl e a influência da agitação são estatisticamente significativos, fatores estes, que intensificaram o crescimento do *B. subtilis*. Também foi observado que as interações entre agitação e quantidade de proteínas, bem como agitação e temperatura geram efeito positivo. Já as interações entre temperatura e os parâmetros concentração de NaCl e extrato de levedura possuem efeito negativo.

### **1. INTRODUÇÃO**

*Bacillus subtilis*, uma das 40 espécies do gênero *Bacillus*, são bactérias autóctones do solo, do tipo gram-positivas, aeróbias facultativas, não fotossintetizantes e com maior atividade em temperaturas médias de 25 a 35 °C, mas com alta capacidade de produzir esporos quando em condições adversas (PORTER, 1976).

Esse gênero específico de bactérias, *B. subtilis*, destaca-se por possuir capacidade natural para secretar antibiótico (bacitracina) e biosurfactante (surfactina) que são compostos de alto valor biotecnológico.

Bacitracina é o antibiótico mais utilizado no tratamento de infecções digestivas por atuar sobre a parede celular de bactérias do tipo gram positivas. Quando no sistema digestivo de porcos, coelhos, frangos, entre outros, influencia na absorção de nutrientes o que promove crescimento e controle sobre doenças entéricas (CASTELLANOS et al., 2011).

Surfactantes são os compostos que agem nas interfaces químicas, sendo utilizados principalmente nas indústrias têxteis, para detergentes, e alimentícias, como emulsificantes. Os biosurfactantes, como a surfactina, produzida por *B. Subtilis*, são vantajosos em relação aos surfactantes sintéticos, atualmente utilizados em alimentos e cosméticos, por sua maior biodegradabilidade e baixa toxicidade (BARROS et al., 2007).

Além da secreção de metabólitos extracelulares de grande relevância, *B. subtilis* desempenha funções de alta aplicabilidade na área agrícola. Estudos comprovaram sua interação mutualística benéfica com o rizoma de vegetais, o que o classifica como um bioregulador e promotor do crescimento de plantas. Surge, então, o interesse em encontrar um meio nutritivo que forneça condições para sua atividade plena (JAMIL, 2007; ARAÚJO et al., 2005).

Um meio para a cultura de células deve suprir todas as exigências para o crescimento microbiano: as condições físicas, como temperatura e agitação e os compostos essenciais que micro-organismos são incapazes de produzir. Neste trabalho a concentração de nitrogênio (extrato de levedura), concentração de proteínas (peptona e extrato de carne) e concentração de sal (NaCl), bem como as condições físicas impostas aos reatores (agitação e temperatura), foram avaliadas como parâmetros de um planejamento experimental fatorial  $2^{(6-1)}$  com o intuito de identificar sua influência no crescimento do *Bacillus subtilis*.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Obtenção das curvas de crescimento do *B. subtilis***

Inoculou-se duas alçadas de células do em frascos Erlenmeyer de 50 ml contendo meio de crescimento previamente autoclavado a 121 °C por 20 min. O mesmo foi deixado em incubadora por 24 horas a 24 °C e 150 rpm. Posteriormente transferiu-se 2,5 mL de inóculo para outro frasco Erlenmeyer de 100 ml contendo meio de crescimento esterilizado, que permaneceu em incubadora por mais 18 horas nas condições definidas pelo procedimento experimental.

Amostras de 1 ml foram pipetadas, diluídas e avaliadas por turbidimetria em determinados intervalos de tempo para que a curva de crescimento celular em cada reator fosse construída.

### **2.2. Planejamento experimental**

Optou-se por um planejamento fracionário  $2^{(6-1)}$  com hexaplicata do ponto central, gerando um total de 38 experimentos. Após a escolha do tipo de planejamento, definiram-se os níveis de variação codificados -1, 0 e +1, para cada um dos três fatores

em estudo. As variáveis e seus respectivos níveis de variação são mostrados na Tabela 1.

**Tabela 1** Definição de parâmetros para o planejamento experimental

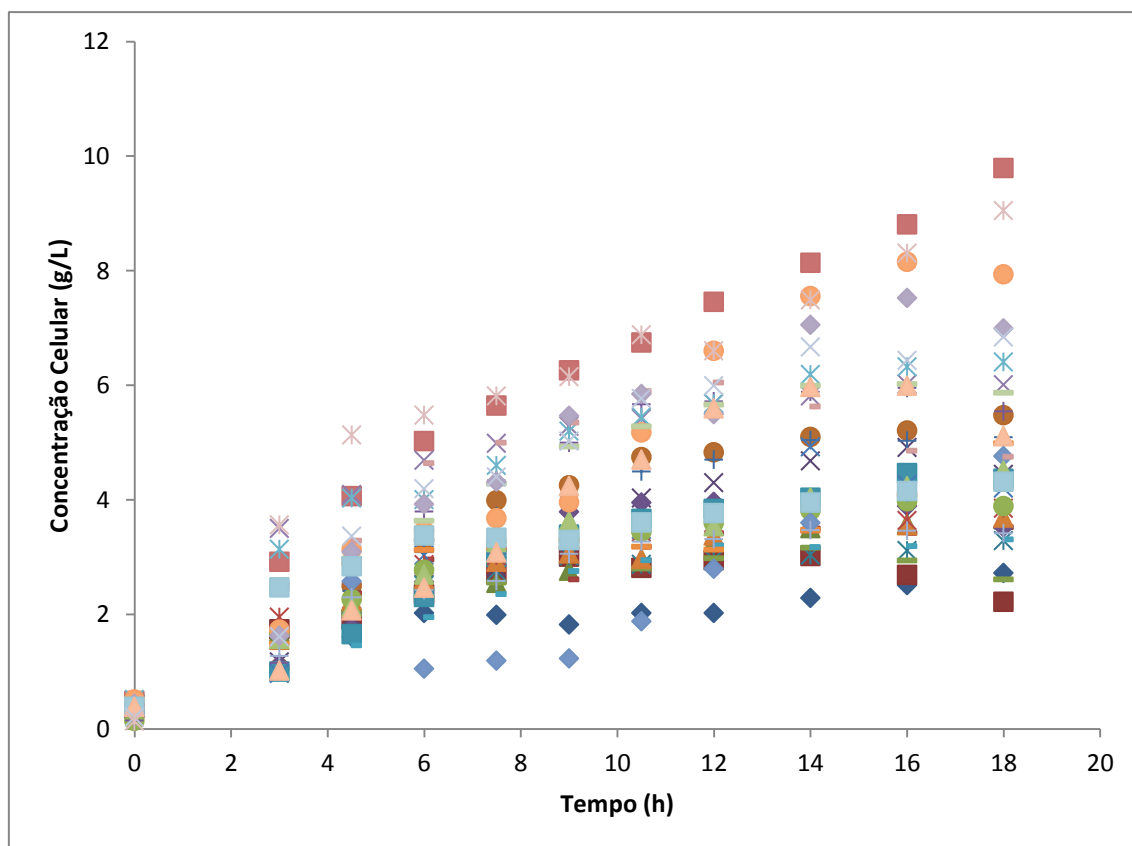
Parâmetro	-1	0	+1
(1) Concentração de extrato de carne (g/L)	0,5	1,0	1,5
(2) Concentração de peptona (g/L)	2,5	5,0	7,5
(3) Concentração de extrato de levedura (g/L)	1,0	2,0	3,0
(4) Sal NaCl (g/L)	2,5	5,0	7,5
(5) Agitação (rpm)	100	150	200
(6) Temperatura (°C)	28	32	36

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Cinéticas de crescimento

O Figura 1 apresenta a tendência das curvas de crescimento microbiano obtidas pelo planejamento experimental.

**Figura 1** Curvas de crescimento.



Existem quatro fases de crescimento bacteriano: a fase lag, a fase log, a fase estacionária e a fase de morte. Na fase log, o crescimento é mais ativo atingindo um tempo de geração constante. A fase log é o momento de maior atividade metabólica sendo o preferido para fins industriais, já que o produto precisa ser produzido de maneira eficiente. Considerou-se que a fase log, ou exponencial, ocorreu no intervalo inicial de tempo de 14 horas. Passado este período a concentração celular permaneceu constante devido à aglomeração das células, o que impossibilita a medida por turbidimetria (TORTORA et al., 2012).

### 3.2. Estudo estatístico dos fatores de crescimento

Por meio dos resultados obtidos nos experimentos, realizou-se uma análise dos efeitos dos seis fatores estudados, em relação à resposta do experimento (crescimento celular).

**Tabela 2 Resultados estatísticos do planejamento experimental**

	Efeito	Erro Padrão	Teste <i>t</i> de student	Nível p	Limite de confiança		Coeficiente
					-95%	+95%	
<b>Média</b>	<b>4,56</b>	<b>0,068</b>	<b>67,2</b>	<b>0,000</b>	<b>4,42</b>	<b>4,71</b>	<b>4,56</b>
<b>1</b>							
<b>Ex. Carne</b>	<b>1,09</b>	<b>0,148</b>	<b>7,37</b>	<b>0,000</b>	<b>0,777</b>	<b>1,406</b>	<b>0,546</b>
<b>2</b>							
<b>Peptona</b>	<b>1,387</b>	<b>0,148</b>	<b>9,36</b>	<b>0,000</b>	<b>1,07</b>	<b>1,70</b>	<b>0,693</b>
<b>3</b>							
<b>Ex. Levedura</b>	<b>0,873</b>	<b>0,148</b>	<b>5,89</b>	<b>0,000</b>	<b>0,559</b>	<b>1,18</b>	<b>0,436</b>
<b>4</b>							
<b>NaCl</b>	<b>0,433</b>	<b>0,148</b>	<b>2,92</b>	<b>0,009</b>	<b>0,119</b>	<b>0,748</b>	<b>0,216</b>
<b>5</b>							
<b>Agitação</b>	<b>1,57</b>	<b>0,148</b>	<b>10,6</b>	<b>0,000</b>	<b>1,26</b>	<b>1,88</b>	<b>0,786</b>
<b>6</b>							
<b>Temperatura</b>	<b>-0,247</b>	<b>0,148</b>	<b>-1,67</b>	<b>0,114</b>	<b>-0,561</b>	<b>0,066</b>	<b>-0,123</b>
<b>Interação (1) e (5)</b>	<b>0,663</b>	<b>0,148</b>	<b>4,47</b>	<b>0,000</b>	<b>0,349</b>	<b>0,977</b>	<b>0,331</b>
<b>Interação (2) e (5)</b>	<b>0,756</b>	<b>0,148</b>	<b>5,10</b>	<b>0,000</b>	<b>0,442</b>	<b>1,07</b>	<b>0,378</b>
<b>Interação (3) e (6)</b>	<b>-0,720</b>	<b>0,148</b>	<b>-4,86</b>	<b>0,000</b>	<b>-1,03</b>	<b>-0,405</b>	<b>-0,360</b>
<b>Interação (5) e (6)</b>	<b>0,815</b>	<b>0,148</b>	<b>5,50</b>	<b>0,000</b>	<b>0,501</b>	<b>1,13</b>	<b>0,407</b>

$R^2 = 0,95466$ ; Erro Residual = 0,2157371; Ajuste: 0,89515

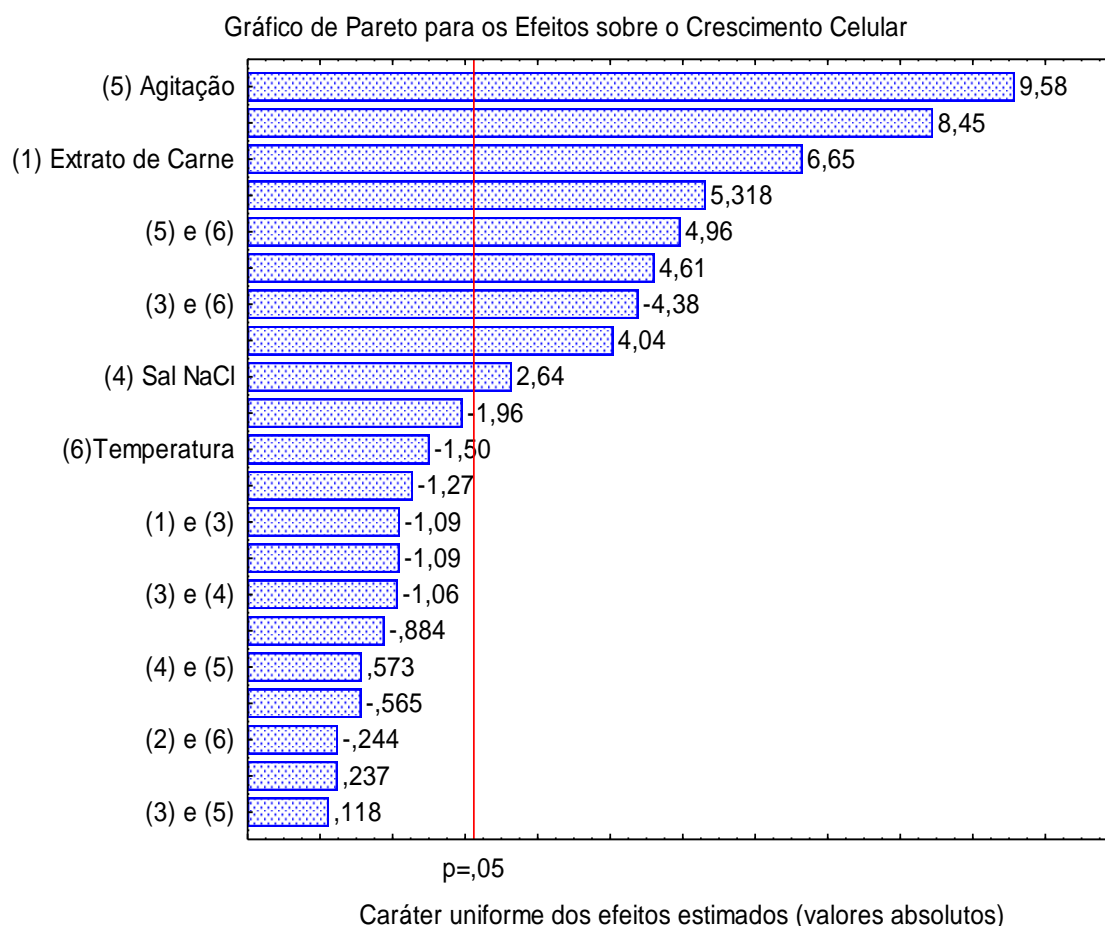
A coluna nível p de significância indica o quão representativos são os resultados obtidos. Estatisticamente pretende-se um valor p mínimo igual a 0,05. Ou seja, ao menos uma a cada vinte replicatas será análoga ao estudo. O efeito, na primeira coluna

da tabela, mensura a proporcionalidade linear da variável dependente aos fatores e suas interações.

A partir dos dados da Tabela 2, conclui-se que é positiva para o crescimento do *B. subtilis* a influência da agitação, da concentração de extrato de carne, da concentração de peptona, de extrato de levedura e de NaCl, nesta ordem decrescente de relevância. Já a temperatura, por si só, não mostrou-se estatisticamente significativa ( $p=0,114$ ).

Quando levadas em conta as interações entre os parâmetros, é significativo o efeito favorável provocado pela agitação associada ao extrato de carne, peptona ou à temperatura. Entretanto, quando associada ao extrato de levedura, a temperatura prejudica o crescimento do *B. subtilis*.

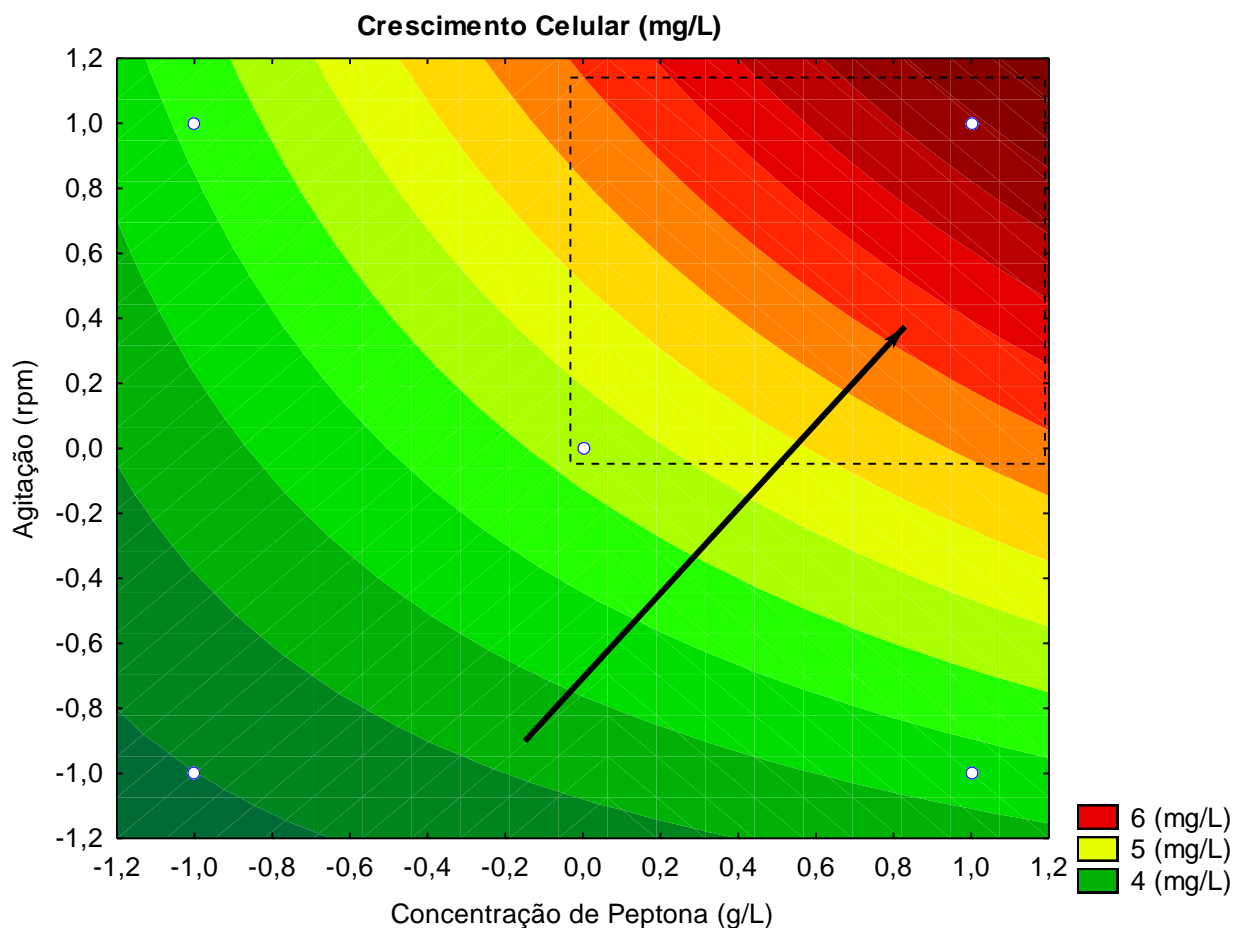
**Figura 2** Gráfico do pareto para o planejamento experimental.



A Figura 2 aponta os fatores estatisticamente significativos. Todos os parâmetros e interações, cujas colunas ultrapassam a linha vermelha (representando nível de significância igual a 0,05) são importantes nas faixas estudadas.

A Figura 3 representa secções horizontais projetadas sobre uma superfície bidimensional e retrata como as interações entre os fatores estudados pelo planejamento experimental interferem no crescimento microbológico do *Bacillus subtilis*.

Figura 3 Superfície de resposta do crescimento pela interação entre agitação e concentração de peptona.



Cada ponto do gráfico representa uma combinação dos fatores, que variam entre os níveis máximo (1), central (0) e mínimo (-1) do planejamento, enquanto as cores definem o crescimento da variável dependente, no caso, o crescimento celular. Entre o par agitação e concentração de peptona nota-se que o crescimento celular só atinge concentrações maiores que 5,0 g/L no quarto superior direito, onde os níveis são máximos tanto para agitação (200 rpm) quanto para a concentração de peptona (7,5 g/L). Além disso as curvas de nível nessa mesma região estão menos espaçadas, indicando que a taxa de variação da concentração celular é muito maior quando comparada aos outros pontos, ou, em outras palavras, pequenas variações nos parâmetros geram consideráveis alterações nos resultados.

### 3.3. Carbono

Segundo TORTORA et al. (2012), todos os micro-organismos requerem uma fonte de carbono; os quimio-heterotróficos, como o *B. subtilis*, utilizam uma molécula orgânica, e os autotófricos em geral utilizam o dióxido de carbono. Isso explica a proporcionalidade entre a concentração de extrato de carne e a concentração celular. Quanto maior a disponibilidade de carbono, maior a tendência de crescimento celular.

### **3.4. Oxigênio**

Como se sabe, do ponto de vista bioquímico, o oxigênio é o elemento que vincula o fim da cadeia respiratória à glicólise e ao ciclo de Krebs, e ainda permite o armazenamento de energia através da transformação de moléculas de ADP para ATP. Sabe-se também que o *Bacillus* em questão é aeróbico facultativo, porém para cultivá-lo em condições anaeróbias é necessário nitrato ou nitrito como aceptor de elétrons ou por fermentação. Por outro lado, a agitação permite ampliar a área de contato entre a solução e o headspace do reator, além de forçar a transferência de massa por convecção, fatores determinantes à solubilização do oxigênio. Consequentemente, quanto mais intensa a agitação dos bioreatores, maior a concentração final de células do *Bacillus* (NAKANO e ZUBER, 1998).

### **3.5. Nitrogênio**

O nitrogênio constitui cerca de 14% em massa seca da célula bacteriana, e é também importante para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, assim como para síntese de ATP, molécula responsável pelo armazenamento e pela transferência de energia dentro da célula. Interpreta-se a relação de equivalência entre o extrato de levedura e peptona (fonte de nitrogênio) e a concentração de células, como a necessidade de ATP para a divisão binária das células, entre as outras funções do nitrogênio para a bactéria (TORTORA et al., 2012).

## **4. CONCLUSÃO**

Através do planejamento experimental demonstrou-se que o fator de maior influência sobre o crescimento celular do *Bacillus subtilis* é a agitação; além disso concluiu-se que a temperatura não é estatisticamente significativa na faixa entre 28 e 34 graus. Em determinadas condições, este gênero de bactérias cumpre as exigências do processo biotecnológico, adaptando-se facilmente em meios de cultura sem altos custos energéticos e/ou financeiros.

## **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ARAUJO, F. F., HENNING, A., HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 21, p. 1639-1645, 2005.

BARROS, F. F. C., QUADROS, C. P., MAROSTICA JUNIOR, M. R., PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Quím. Nova*, v. 30, n. 2, p. 409-414, 2007.

CASTELLANOS, C. V., PEÑA, V. P., ARIAS, J. P. Validación del método analítico para la cuantificación de bacitracina. *Revista Cubana de Farmácia*, v. 45, n. 2, p. 216-225, 2011.

JAMIL, B., HASAN, F., HAMEED, A. Isolation of *Bacillus subtilis* MH-4 from soil and its potential of polypeptidic antibiotic production. *Pak. J. Pharm. Sci.*, v. 20, n. 1, p. 26-31, 2007.

NAKANO, M. M., ZUBER, P. Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 52, p. 165-190, 1998.

PORTER, J. R. Antony van Leeuwenhoek: Tercentenary of his discovery of bacteria. *Bacteriolog. Rev.*, v. 40, n. 2, p. 260-269, 1976.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, L. C. *Microbiologia* – 10. edição – Porto Alegre: Artmed, 2012.