PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *Lactobacillus*

RENATA AGUIRRE TRINDADE[1], ADRIEL PENHA MUNHOZ[2], FERNANDA ALVES GERMANO GAUTÉRIO[3], CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT[4]

RESUMO

O preparo do inóculo representa um ponto crucial de um cultivo microbiano, pois é necessário o estabelecimento de uma densidade ótica (DO) adequada, que garanta a inoculação de micro-organismos na fase exponencial de crescimento e a padronização do procedimento, essenciais para a reprodutibilidade dos experimentos. Neste estudo, a DO de nove diferentes cepas de *Lactobacillus,* pertencentes a oito espécies, foi acompanhada durante o preparo do inóculo, em cultivos sem e com agitação (150 rpm). A diferença da DO para o inóculo com e sem agitação de um modo geral não foi expressiva, provavelmente pela característica microaerófila de *Lactobacillus*. O valor estabelecido para a DO foi 1,0, pois todas as bactérias encontravam-se na fase exponencial neste valor.

PALAVRAS CHAVES: BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS. DENSIDADE ÓTICA. INOCULAÇÃO.

INOCULUM PADRONIZATION OF DIFFERENT *Lactobacillus* SPECIES

ABSTRACT

The inoculum preparation represents a crucial point of a microbial cultivation, as it is necessary to establish an adequate optical density (OD), which ensure the inoculation of microorganisms in the exponential growth phase and the standardization of the procedure, essential factors for the reproductibility of the assays. In this study, the OD of nine different *Lactobacillus* strains, belonging to eight species, was monitored during inoculum preparation in cultivations without and with agitation (150 rpm). The difference in OD for the inoculum with and without agitation was generally not significant, probably due to the microaerophilic characteristic of *Lactobacillus*. The established value for OD was 1.0, since all bacteria were in the exponential phase at this value.

KEY WORDS: LACTIC ACID BACTERIA. OPTICAL DENSITY. INOCULATION.

1. INTRODUÇÃO

[1]Discente – Universidade Federal do Rio Grande (FURG)/EQA/PPG-ECA– e-mail: re_maps@hotmail.com
[2]Discente – Universidade Federal do Rio Grande (FURG)/EQA/PPG-ECA – e-mail: adrielmunhoz@hotmail.com
[3]Discente – Universidade Federal do Rio Grande (FURG)/EQA/PPG-ECA – e-mail: engfegeal@yahoo.com.br
[4]Docente – Universidade Federal do Rio Grande (FURG)/EQA/PPG-ECA – e-mail: burkert@vetorial.net

Bactérias láticas são consideradas micro-organismos fastidiosos, requerendo nutrientes complexos para seu crescimento, tais como vitaminas do complexo B, minerais específicos e diversos aminoácidos [3,13]. O meio de cultivo Man, Rogosa e Sharp (MRS) tem sido frequentemente utilizado no preparo do inóculo destas bactérias [1,5], por ser um meio bastante completo, contendo os nutrientes necessários para o crescimento destes micro-organismos. Pelo fato destas bactérias serem reconhecidas como produtoras de ácido lático, diversos estudos tem abordado a substituição da glicose, presente no meio MRS, por coprodutos agroindustriais, como o melaço [8], o soro de leite [1] e o glicerol oriundo do biodiesel [11]. A utilização destas matérias-primas de baixo custo em processos biotecnológicos para obtenção de ácido lático possui vantagens significativas em comparação à síntese química [2]. O ácido lático é um importante bioproduto, tendo aplicações na indústria química, farmacêutica e principalmente na indústria de alimentos, como acidulante e conservante de bebidas e alimentos [3,5].

Todos os processos biotecnológicos, que envolvem cultivos microbianos, apresentam uma etapa de preparo de inóculo. Esta etapa consiste na preparação de uma suspensão de micro-organismos a partir de uma cultura estoque, onde as células estão em estado latente, visando obter uma população de micro-organismos em quantidade e em atividade metabólica que garantam um desempenho adequado do processo, em termos de rendimento e produtividade do bioproduto de interesse. O preparo do inóculo geralmente é conduzido em laboratório e posteriormente transferido para a planta de produção industrial [10].

Além da composição do meio, a agitação e a aeração são variáveis importantes para o crescimento dos micro-organismos, pois promove a homogeneização dos componentes do meio, fornecendo oxigênio para a atividade respiratória [12]. Entretanto, diferente dos micro-organismos aeróbios, que toleram um nível de O_2 até mesmo superior ao da atmosfera, os micro-organismos microaerófilos, como é o caso das bactérias láticas, requerem baixos níveis de oxigênio, não tolerando os níveis presentes no ar atmosférico, sendo o crescimento mais acentuado em níveis de 1 a 15% de oxigênio [9]. Por outro lado, a maioria dos estudos relacionados aos *Lactobacillus* cultivados em laboratório utilizam a agitação de 150 a 200 rpm [1,5,11,14,15], a fim de promover a homogeneização do meio e a aeração. Entretanto, uma vez que *Lactobacillus* são bactérias microaerófilas [9], o cultivo estático pode ser uma alternativa, com um menor custo energético.

O momento exato para transferência do micro-organismo do inóculo para o cultivo deve ser realizado na fase exponencial do crescimento celular, onde a

velocidade de crescimento do micro-organismo é máxima, pois anterior a esta fase encontra-se a fase de adaptação do micro-organismo ao ambiente e após tem-se a fase de declínio devido ao esgotamento de algum dos componentes do meio ou ao acúmulo de metabólitos inibidores, causando a morte das células [12].

Por outro lado, para garantir a reprodutibilidade de cultivos microbianos, faz-se necessária a padronização do inóculo. A medida da densidade ótica (DO) das culturas bacterianas é amplamente utilizada em microbiologia, como uma forma rápida e confiável de avaliar a concentração de células presentes, já que a mesma é proporcional ao número de células ou massa seca de células presentes [6]. Geralmente é utilizado o comprimento de onda de 600 nm [2,15], pois as medidas de suspensões celulares mais densas são mais precisas com comprimentos de onda mais longos [6].

De acordo com o acima exposto, tem-se como objetivo do presente trabalho padronizar o preparo do inóculo de nove cepas de *Lactobacillus*, definindo uma DO que garanta o uso de células na fase exponencial de crescimento, avaliando também a necessidade ou não da agitação no seu preparo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismos

As seguintes espécies de *Lactobacillus* foram utilizadas: *L. rhamnosus* INCQS 00223, *L. fermentum* INCQS 00224, *L. helveticus* INCQS 00227, *L. paracasei* subsp. *paracasei* INCQS 00222, *L. acidophilus* INCQS 00076, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* INCQS 00035, *L. leichmannii* INCQS 00008, *L. plantarum* INCQS 00007 e *L. rhamnosus* INCQS 00006. As mesmas foram disponibilizadas, na forma liofilizada, pelo Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde – Fundação Oswaldo Cruz, localizada no Rio de Janeiro - RJ.

2.2. Reidratação das culturas liofilizadas

As culturas acondicionadas em ampolas de vidro foram rompidas em condições assépticas. Foram adicionadas, na ampola, 5 gotas do Caldo Nutriente, contendo ($g.L^{-1}$) 5 peptona, 5 NaCl, 1,5 extrato de carne e 1,5 extrato de levedura. A suspensão foi vertida em placas de Petri com ágar *Man, Rogosa* e *Sharpe* (MRS), contendo ($g.L^{-1}$) 10 peptona, 10 extrato de carne, 5 extrato de levedura, 20 glicose, 1 polisorbato 80, 2 citrato de amônia, 5 acetato de sódio tri-hidratado, 0,1 sulfato de

magnésio hepta-hidratado, 0,05 sulfato de manganês tetra-hidratado, 2 fosfato de potássio dibásico e 10 ágar, sendo então incubadas em estufa (Quimis Q-316 M2, Brasil) a 37ºC durante 48 h [4].

2.3. Manutenção e reativação das culturas

Os micro-organismos foram mantidos refrigerados, sendo realizados repiques mensais. Para reativação das culturas estoques, foram realizados repiques sucessivos, sendo utilizado o meio MRS, incubando-se em temperatura controlada (37ºC) por 48 h.

2.4. Estudo do preparo do inóculo

Para o acompanhamento do crescimento bacteriano durante o preparo do inóculo foi utilizado um tubo da cultura reativada, sendo raspada com 10 mL de água peptonada 0,1% (m/v) e transferida para cada frasco *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 90 mL de caldo MRS. A suspensão foi incubada a 37ºC em incubadora com agitação (Tecnal TE-420, Brasil), sendo retiradas alíquotas a cada 3 h nas primeiras 12 h de cultivo e, após, de 6 em 6 h até 48 h de cultivo, sendo medida a densidade ótica (DO) a 600 nm em espectrofotômetro (Bioespectro SP-220, China).

Cultivos estáticos (sem agitação) e com agitação (150 rpm) foram realizados em triplicata. Os valores médios e desvios-padrão de ln (DO) foram calculados através do *software Statistica* 5.0 (StatSoft Inc., EUA) [7], sendo que para a construção das curvas de ln (DO) x tempo utilizou-se o *software OriginPro 8* (OriginLab, EUA*).*

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Figuras 1, 2 e 3 apresentam o acompanhamento de ln (DO) ao longo do tempo, para o cultivo estático e com 150 rpm de agitação, das nove diferentes cepas de *Lactobacillus* avaliadas, podendo-se observar claramente as fases de crescimento dos micro-organismos: a fase lag, ou fase de adaptação, caracterizada pela pequena variação de ln (DO), ocorre nas primeiras horas de cultivo; a fase exponencial, de rápido crescimento celular, caracterizada pela relação linear entre ln (DO) e tempo; e a fase estacionária, caracterizada pela estabilização no valor de ln (DO).

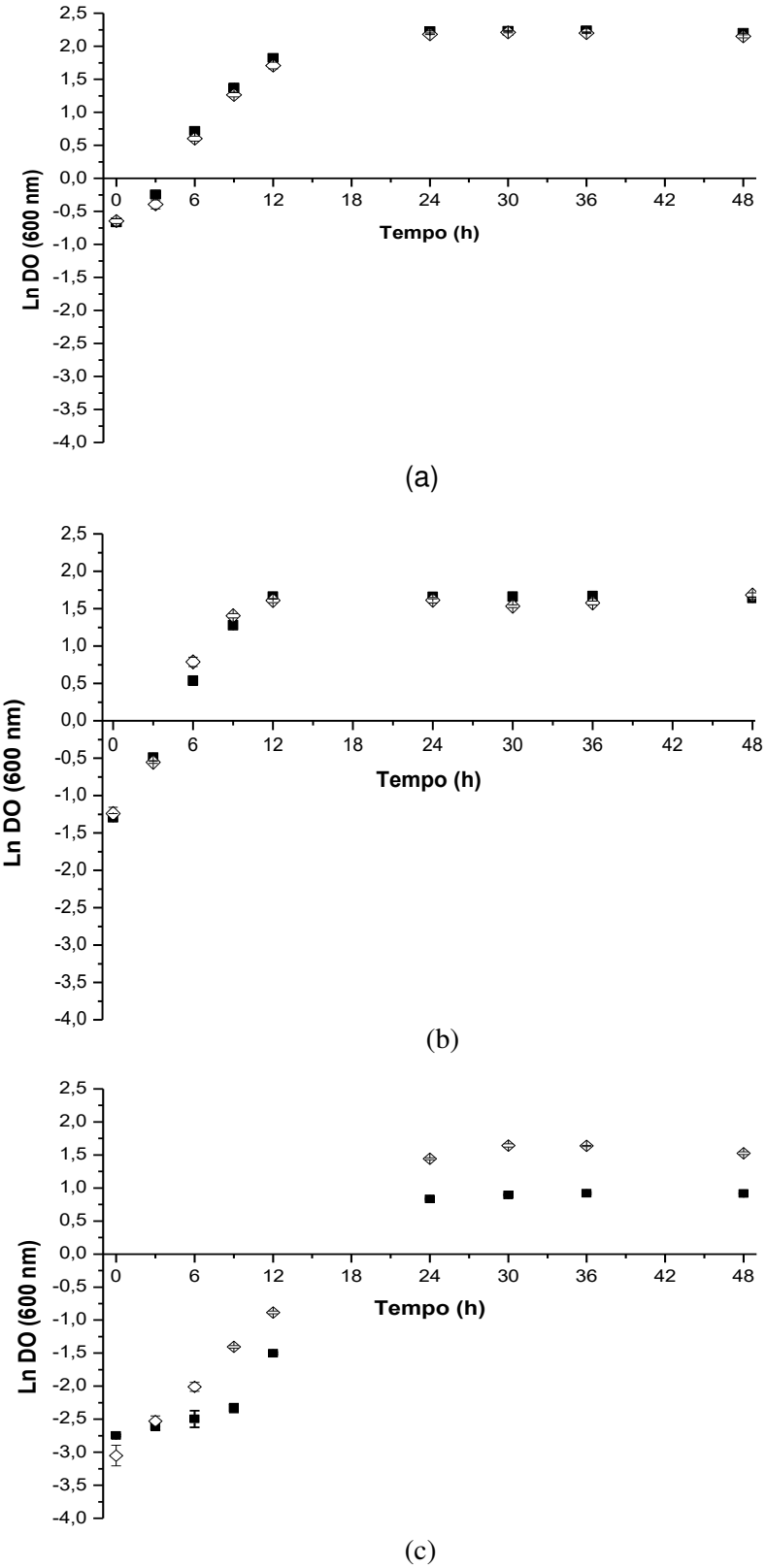
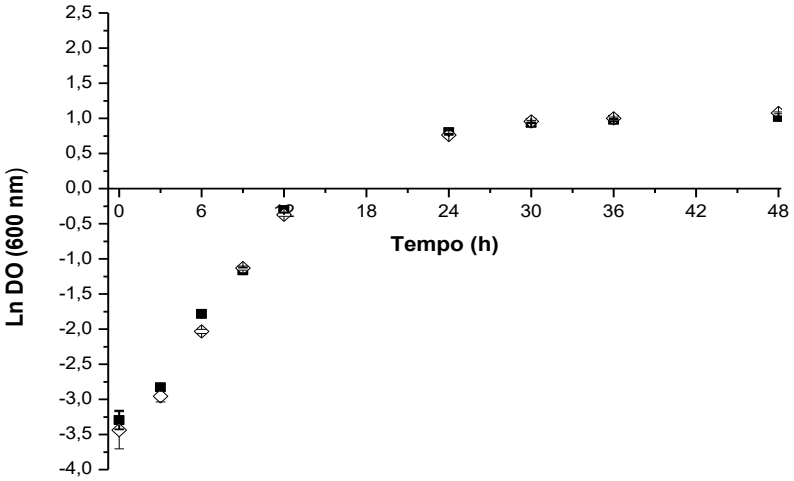
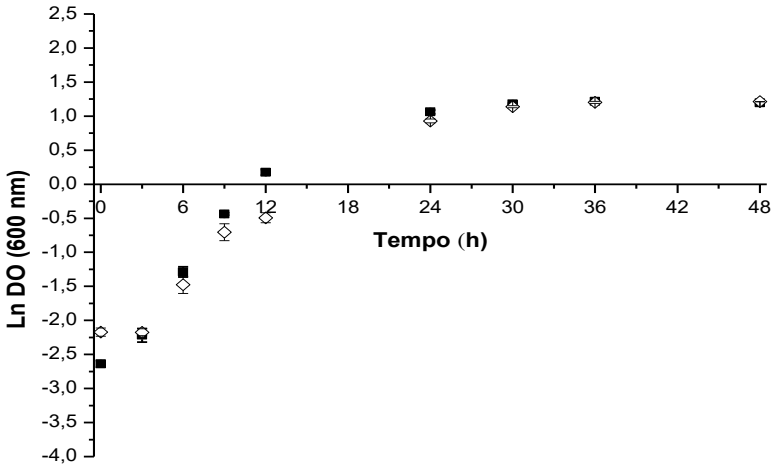


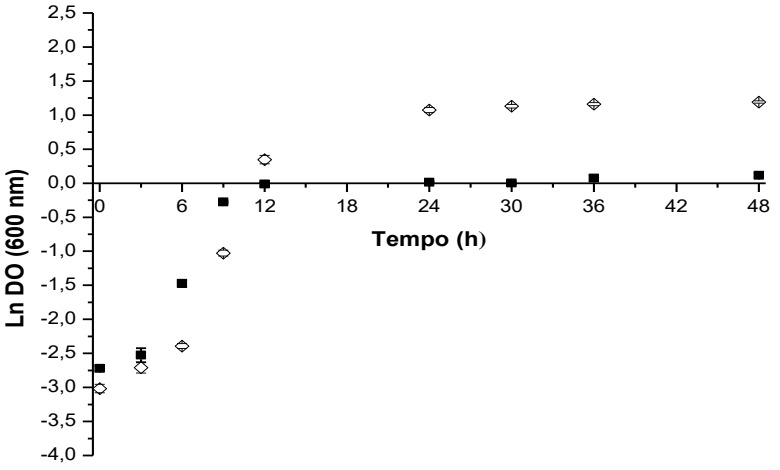
FIGURA 1. Acompanhamento de ln (DO) com (■) e sem (◊) agitação ao longo do tempo para (a) *L. rhamnosus* INCQS 00223, (b) *L. fermentum* INCQS 00224 e (c) *L. helveticus* INCQS 00227



(a)

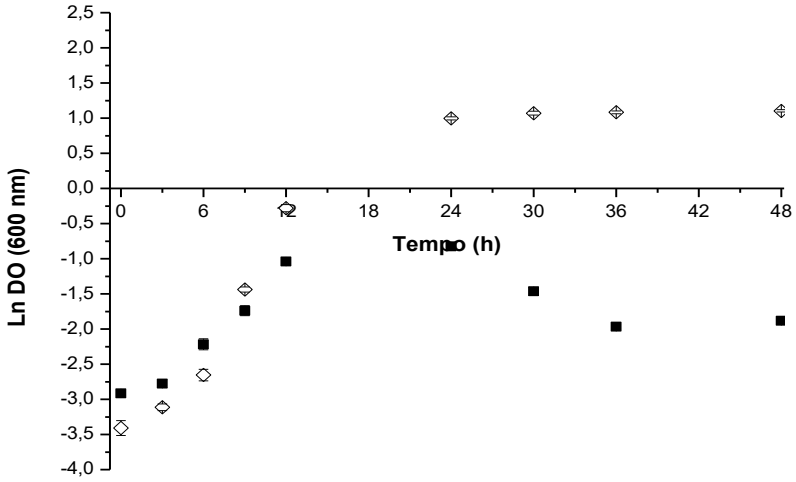


(b)

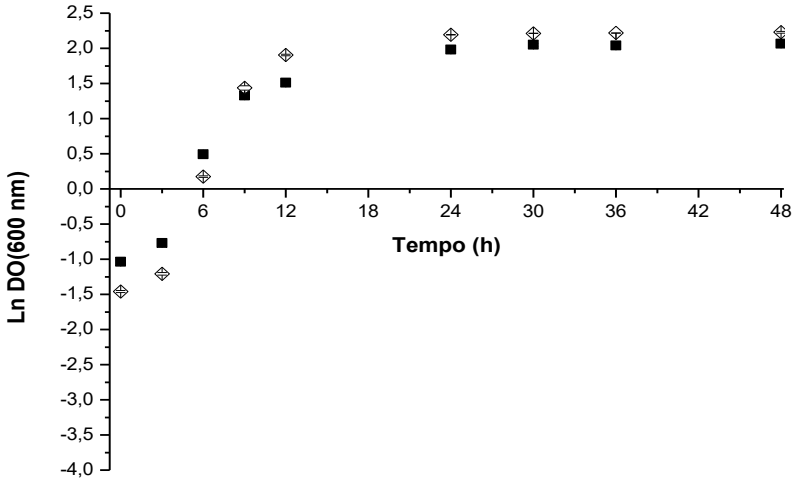


(c)

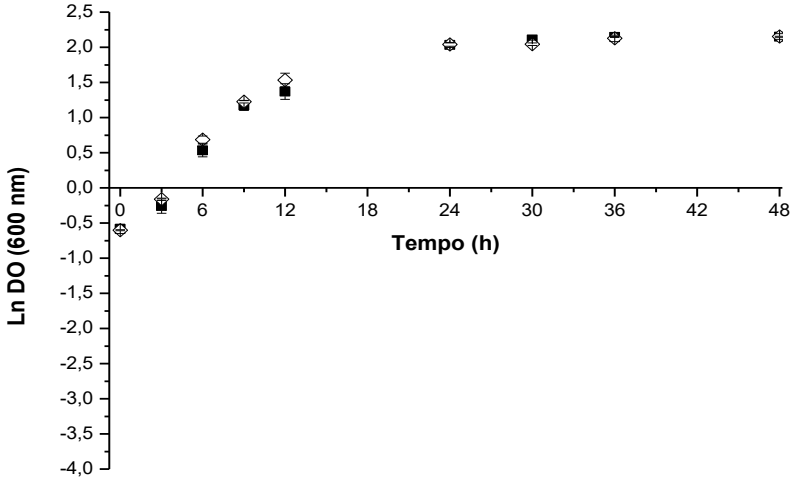
FIGURA 2. Acompanhamento de ln (DO) com (■) e sem (◊) agitação ao longo do tempo para (a) *L. paracasei* subsp. *paracasei* INCQS 00222, (b) *L. acidophilus* INCQS 00076 e (c) *L. delbrueckii* subsp. *lactis* INCQS 00035



(a)



(b)



(c)

FIGURA 3. Acompanhamento de ln (DO) com (■) e sem (◊) agitação ao longo do tempo para (a) *L. leichmannii* INCQS 00008, (b) *L. plantarum* INCQS 00007 e (c) *L. rhamnosus* INCQS 00006.

A partir da análise das curvas, para a padronização dos inóculos das diferentes cepas foi escolhida a DO igual a 1,0, pois todos os micro-organismos utilizados encontravam-se na fase exponencial de crescimento neste valor. Este valor corresponde a ln (DO) igual a zero. Cabe ressaltar que alguns destes micro-organismos alcançaram valores de DO bem mais elevados, indicando um crescimento bem mais acentuado.

Para *L. rhamnosus* INCQS 00223 (Figura 1a), em ambos os cultivos, com e sem agitação, este valor de DO foi alcançado em pouco mais de 3 h de cultivo, sendo que o mesmo comportamento foi observado para *L. rhamnosus* INCQS 00006 (FIGURA 3c), *L. fermentum* INCQS 00224 (Figura 1b) e *L. plantarum* INCQS 00007 (FIGURA 3b). Já *L. helveticus* INCQS 00227 (Figura 1c) e *L. paracasei* subsp. *paracasei* INCQS 00222 (Figura 2a), a DO estipulada foi somente alcançada em aproximadamente 14 h de cultivo, sendo o mesmo comportamento observado para *L. leichmanii* INCQS 00008 (Figura 3a), mas apenas alcançada para o cultivo estático. Para *L. delbrueckii* subsp. *lactis* INCQS 00035 (Figura 2c), a DO foi alcançada em torno de 12 h de cultivo ao utilizar agitação, sendo em torno de 9-12 h ao utilizar o cultivo estático. *L. acidophillus* INCQS 00076 (Figura 2 b) também alcançou a DO estipulada em torno de 9-12 h para o cultivo agitado, sendo que para o cultivo estático a DO foi alcançada em torno de 16 h.

A diferença da DO para os cultivos com e sem agitação das nove cepas de *Lactobacillus* de um modo geral não foi expressiva, sendo ainda observado que para todas as bactérias estudadas houve maior ou igual crescimento em cultivo estático quando comparado ao cultivo agitado, provavelmente pela característica microaerófila de *Lactobacillus*. Inclusive *L. leichmanii* INCQS 00008 não cresceu satisfatoriamente quando utilizada a agitação de 150 rpm, crescendo bem apenas no cultivo estático. Dessa maneira foi escolhido o cultivo sem agitação para o preparo do inóculo, com a vantagem de minimizar gastos com energia.

São poucos os trabalhos encontrados relacionados ao estudo do preparo do inóculo, sendo que em alguns estudos a padronização se dá através do tempo de incubação. LIMA, COELHO e CONTIERO [5] e BERNARDO et al. [1] estabeleceram que em 18 h as bactérias *Lactobacillus* sp. LMI8 e *Lactobacillus rhamnosus* B103, respectivamente, encontravam-se na fase exponencial

.

4. CONCLUSÕES

De acordo com o crescimento celular das bactérias, foi possível estabelecer uma DO de 1,0 para a padronização do inóculo de diferentes espécies de *Lactobacillus*, sendo todas capazes de alcançar este valor de DO, garantindo que todas as espécies se encontravam na fase de crescimento exponencial, estabelecendo assim o momento em que o inóculo será transferido para o cultivo, garantindo assim a reprodutibilidade do processo. A diferença da DO para o inóculo com e sem agitação de um modo geral não foi expressiva, provavelmente pela característica microaerófila de *Lactobacillus,* podendo o preparo do inóculo ser conduzido em cultivo estático, com um menor gasto energético.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] BERNARDO, M.P.; COELHO, L.F.; SASS, D.C.; CONTIERO, J. L-(+)-Lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* B103 from dairy industry waste. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 640-646, 2016.

[2] CAPELLARI, J. **Biossíntese de ácido lático por *Lactobacillus amylovorus* a partir de resíduos agroindustriais**. 70f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos), Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2010.

[3] GUILHERME, A.A., PINTO, G.A.S.; RODRIGUES, S. Avaliação da produção de ácido lático por *Leuconostoc mesenteroides* B512F em xarope de caju. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 738-747, 2009.

[4] INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE E QUALIDADE EM SAÚDE (INCQS) – Fundação Oswaldo Cruz. **Instruções para reidratação das culturas**. Manguinhos, Rio de Janeiro, 2015.

[5] LIMA, C.J.B.; COELHO, L.F.; CONTIERO, J. The use of response surface methodology in optimization of lactic acid production: focus on medium, supplementation, temperatura and pH control. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 175-181, 2010.

[6] MADDIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; BENDER, K.S.; BUCKLEY, D.H.; STAHL, D. A. 14ª ed. Microbiologia de Brock. Porto Alegre, Brasil. Artmed, 2016.

[7] MONTGOMERY, D.C. **Introdução ao controle estatístico de qualidade**. 4ª ed. Rio de Janeiro, Brasil. Editora LTC, 2004.

[8] OLIVEIRA, R.F.; SOUSDALEFF, M.; LIMA, M.V.S.; LIMA, H.O.S. Produção fermentativa de ácido lático a partir do melaço da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*. **Brazilian Journal of Food Technology**, VII BMCFB, p. 34-40, 2009.

[9] PELCZAR Jr. M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2ª ed. São Paulo, Brasil. Makron Books, 1996.

[10] PIO, T.F.; FRAGA, L.P.; MACEDO, G.A.; Inoculum padronization for the production of cutinase by *Fusarium oxysporum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 74-77, 2008.

[11] RIVALDI, J.D.; SILVA, M.L.C.S.; DUARTE, L.C.; FERREIRA, A.E.N.; CORDEIRO, C.; FELIPE, M.G.A.; FREIRE, A.P.; MANCILHA, I.M. Metabolism of biodiesel derived glycerol in probiotic *Lactobacillus* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 1735-1743, 2013.

[12] SCHMIDELL, W.; BORZANI, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia industrial**. São Paulo, Brasil. Edgard Blucher, 2001.

[13] STANIER, R.Y.; INGRAHAM, J.L.; WHEELIS, J.L.; PAINTER, P.R. **General microbiology**, 5th ed. London, England. Macmillan Education, 1986.

[14] WANG, Y.; CHEN, C.; CAI, D.; WANG, Z.; QIN, P.; TAN, T. The optimization of L-lactic acid production from sweet sorghum juice by mixed fermentation of *Bacillus coagulans* and *Lactobacillus rhamnosus* under unsteril e conditions. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 1098-1105, 2016.

[15] ZHANG, Y.; VADLANI, P. Lactic acid production from biomass-derived sugars via co-fermentation of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 6, p. 694-699, 2015.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem FAPERGS, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.