

LEVANTAMENTO DA CURVA DE CRESCIMENTO DA BACTÉRIA *M. PHLEI* PARA OBTENÇÃO DE BIOMASSA EM ENSAIOS DE SEPARAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO

A.A.R. Assis¹, G.E.S. Valadão², P.S. Cisalpino³

¹ Curso de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas - Universidade Federal de Minas Gerais.
Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha - Bloco 2 - Sala 4236- CEP 31270-901
Belo Horizonte – MG. e-mail: alexandra.carisma@gmail.com

² Departamento de Engenharia de Minas - Universidade Federal de Minas Gerais. Rua Espírito Santo, Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha - Bloco 2 - Sala 4236- CEP 31270-901
Belo Horizonte – MG. e-mail: gvaladao@demin.ufmg.br

³ Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas -Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627, bloco C4, sala 191. Caixa Postal 486. CEP 31270-910 - Belo Horizonte – MG. e-mail: pscisalp@icb.ufmg.br

RESUMO

O emprego de micro-organismos no processamento mineral tem despertado grande interesse se tornando um campo da biotecnologia cada vez mais estudado e explorado. Estudos apontam a *Mycobacterium phlei* como agente agregante e coletor em potencial para hematita e combustíveis fósseis. No entanto, para utilização desta bactéria em ensaios de agregação em escala de laboratório ou piloto, é necessário obter biomassa em condições controladas de cultivo e dentro da fase log de crescimento. As fases de crescimento de um micro-organismo são: fase lag, fase log ou exponencial, fase estacionária e fase de declínio ou morte celular. A fase log corresponde ao período de maior atividade metabólica da célula e, portanto, o estágio preferido para fins industriais. O objetivo deste trabalho é identificar as fases de crescimento da *M. phlei* em meio líquido Pratt em condições controladas, a fim de obter massa cultivada na fase log de crescimento para realização de ensaios de agregação em escala de laboratório.

PALAVRAS-CHAVE: *M. phlei*; Curva de crescimento; obtenção de massa.

1. INTRODUÇÃO

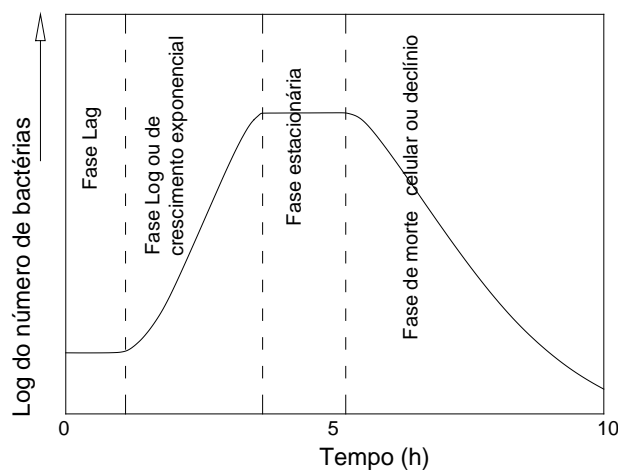
A utilização de micro-organismos em substituição a reagentes químicos em processos físicos e químicos de obtenção e purificação de materiais é uma possível alternativa na busca por processos industriais mais econômicos e que causem menor impacto ambiental.

Estudos apontam a *Mycobacterium phlei* como agente agregante e coletor em potencial para hematita (DUBEL *et al.*, 1992; MISRA *et al.*, 1993; SMITH *et al.*, 1993). A *M. phlei* apresenta carga de superfície altamente negativa para toda faixa de pH com ponto isoelétrico em pH na faixa de 2,0 a 2,5. Também é relatado que a *M. phlei* apresenta alta hidrofobicidade com ângulo de contato da ordem de 70° (RAICHUR *et al.*, 1996). O elevado grau de hidrofobicidade da *M. phlei* é devido à presença de lipídeos enquanto que a carga de superfície, altamente negativa, é devida à presença de ácidos graxos em sua parede tais como ácido oléico, linoléico e palmítico.

As bactérias encontram-se, naturalmente, difundidas na natureza e podem multiplicar-se, rapidamente, quando cultivadas em meios de cultura específicos. A taxa de crescimento bacteriano é definida como variação do número de células por unidade de tempo. Devido à variação da taxa de crescimento microbiano ao longo do tempo pode-se traçar a curva de crescimento. A curva de crescimento pode ser dividida em quatro fases: fase *lag*, fase *log*, ou exponencial, fase estacionária e fase de declínio ou morte celular.

A fase *lag* corresponde ao período de tempo em que o número de células sofre pequenas variações, devido ao fato que as bactérias não se reproduzem imediatamente após a inoculação no meio de cultura. A fase *log* ou de crescimento exponencial corresponde ao período em que as células iniciam seu processo de divisão atingindo um tempo de geração constante. É o período de maior atividade metabólica da célula e, portanto, o estágio preferido para fins industriais. Na fase estacionária, o número de indivíduos que morrem é equivalente ao número de células novas e a população se torna estável. A fase de morte celular, ou fase de declínio, corresponde ao período em que o número de mortes excede o número de células novas, até existir uma fração ínfima do original e a população desaparece totalmente.

Figura 1– Curva de crescimento bacteriano típica mostrando as 4 fases típicas de crescimento (TORTORA *et al.*, 2000).



Sabe-se que o crescimento microbiano na fase exponencial ocorre em progressão geométrica, de base 2, podendo ser expressa pelas equações:

$$N = N_o 2^n \quad (1)$$

$$g = t / n \quad (2)$$

$$\log N = \log N_o + n \log 2 \quad (3)$$

$$n = 3,3 * (\log N - \log N_o)$$

Onde:

N= número de células no tempo t;

No= número de células no tempo t_o;

n= número de gerações formadas durante o período de crescimento exponencial;

g = tempo de geração da população celular;

t = tempo em horas ou minutos em que a cultura apresenta uma taxa de crescimento exponencial.

Dessa forma, conhecendo-se os parâmetros N, N_o na fase de crescimento exponencial é possível calcular n e, a partir de n e do tempo t , o tempo de geração g (MURRAY *et al.*, 1980)

Outro índice relacionado à taxa de crescimento é a constante de taxa de crescimento, k. Esta constante é uma medida do número de gerações formadas, por unidade de tempo e pode ser expressa pela equação:

$$k = \frac{\ln 2}{g} \quad (4)$$

MURRAY, *et al.*, (1980) relacionaram o valor da constante k com as diferentes fases de crescimento bacteriano como pode ser verificado na Tabela I e na Figura 3.6.

Tabela I – Fases da curva de crescimento bacteriano

Seção da curva	Fase	Taxa de crescimento (k)
A	Lag	Zero
B	Aceleração	Crescente
C	Exponencial	Constante
D	Retardamento	Decrescente
E	Estacionária	Zero
F	Morte ou Declínio	Negativa (morte)

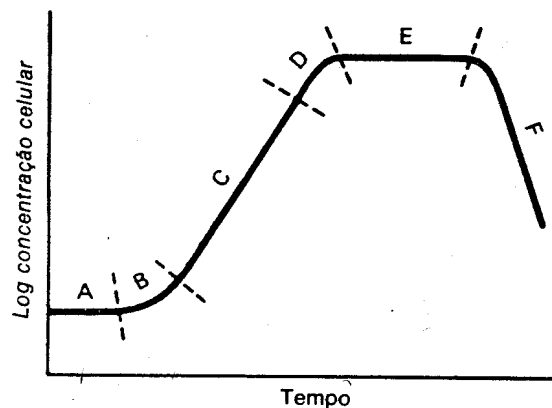


Figura 2 – Curva de crescimento bacteriano típica com seções (MURRAY *et al.*, 1980)

2. METODOLOGIA

O método utilizado para definição da curva de crescimento foi o cultivo em meio líquido, com amostragens de alíquotas ao longo do tempo e plaqueamento (Figura 3). Para a definição da curva de crescimento o ensaio foi repetido 3 vezes.

Primeiramente foi preparado um pré inóculo da seguinte maneira: 5 colônias isoladas de *M. phlei* cultivadas em meio TSA (15,0 g Triptona; 5,0 g Peptona de Soja; 5,0 g Cloreto de sódio; 15,0 g Ágar; 1000,00mL Água destilada) à 37°C, durante 72h, foram inoculadas em um erlenmeyer contendo 50mL de meio Pratt (10g Glicose; 1g extrato de carne; 1g extrato de levedura; 1g caseína enzimaticamente hidrolisada; 1000ml água destilada) previamente autoclavado. O pré-inóculo foi mantido a 36°C, 120rpm durante 72h. Após esse período, uma alíquota de 1ml (1000µl) do pré inóculo foi inoculada, assepticamente, em um segundo erlenmeyer de 250mL contendo 100mL de meio Pratt. Outra alíquota de 1mL foi analisada em espectrofotômetro de absorção para determinação da densidade ótica (DO) em 600nm.

O segundo erlenmeyer foi mantido a 36°C, 120rpm, durante 3 dias. Durante esse período foram realizadas 5 amostragens em diferentes espaços de tempo. Em cada amostragem foram coletadas 2 alíquotas de 1000µL cada, sendo que uma alíquota foi levada para determinação da densidade ótica e a outra alíquota foi coletada, assepticamente, em tubo estéril de 1500µL para a determinação da UFC/mL.

A determinação da UFC/mL foi realizada por diluições sucessivas da alíquota inicial em diferentes tubos (Figura 3). Uma alíquota de 100µl, proveniente de cada diluição, foi, então, inoculada em meio TSA e incubada por 72h. Após o período de incubação, as colônias formadas em cada placa, foram contadas de modo a realizar o cálculo de UFC/mL. Para efeito de cálculo, foram tomadas somente placas contendo entre 30 e 300 colônias. Dessa forma, o número de bactérias presente no erlenmeyer no tempo t da amostragem: UFC/mL é igual ao número de colônias contadas na placa vezes diluição da amostra.

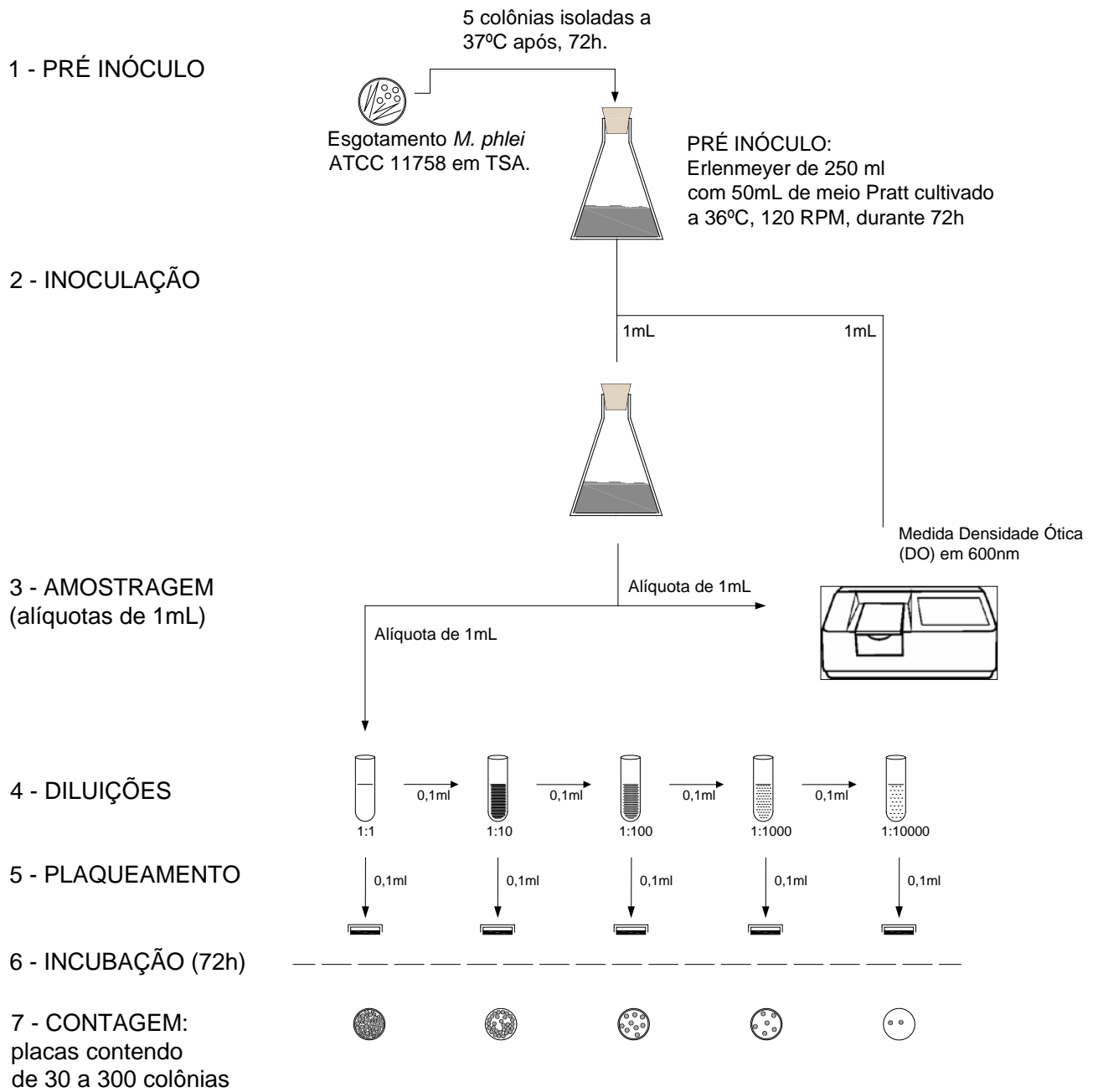


Figura 3 – Método de amostragem com diluições sucessivas para obtenção da curva de crescimento.

3. RESULTADOS

Na Tabela II são apresentados os resultados do levantamento da curva de crescimento da *M. phlei*. As variáveis n (número de gerações), g (tempo de geração) e K (taxa de crescimento) foram calculadas. De acordo com o valor de k pode-se constatar que a fase de crescimento exponencial tem início após 48h da inoculação, uma vez que o valor de k cresce até 48h e depois tem um decréscimo após 72h.

Tabela II– Resultado da curva de crescimento *M. phlei*.

Tempo (h)	UFC/mL	Absorbância (600nm)	n Nº de gerações	g Tempo de geração (h)	K Taxa de crescimento
0,00	4,87E+04	0,0001			
7,58	8,90E+03	0,009	-2,45	-3,09	-0,224
23,75	9,00E+04	0,008	0,89	26,81	0,026
31,43	2,90E+05	0,008	2,57	12,21	0,057
47,93	4,52E+06	0,009	6,54	7,33	0,095
72,05	3,00E+07	0,106	9,27	7,78	0,089

A curva de crescimento da *M. phlei* (Figura 4) confirma, também, que a fase exponencial de crescimento tem início após 48h, aproximadamente. O resultado encontrado está de acordo com a bibliografia existente: BARDOUNIOTIS *et al.*, (2001) levantaram a curva de crescimento para *M. phlei* em meio Middlebrook 7H9, constatando o início da fase de crescimento exponencial após 48h. Apesar do meio utilizado por BARDOUNIOTIS *et al.*, (2001) ser mais rico em nutrientes do que o meio Pratt, a bactéria apresentou curvas de crescimento bem semelhantes tanto para o meio mais rico quanto para o meio mais pobre.

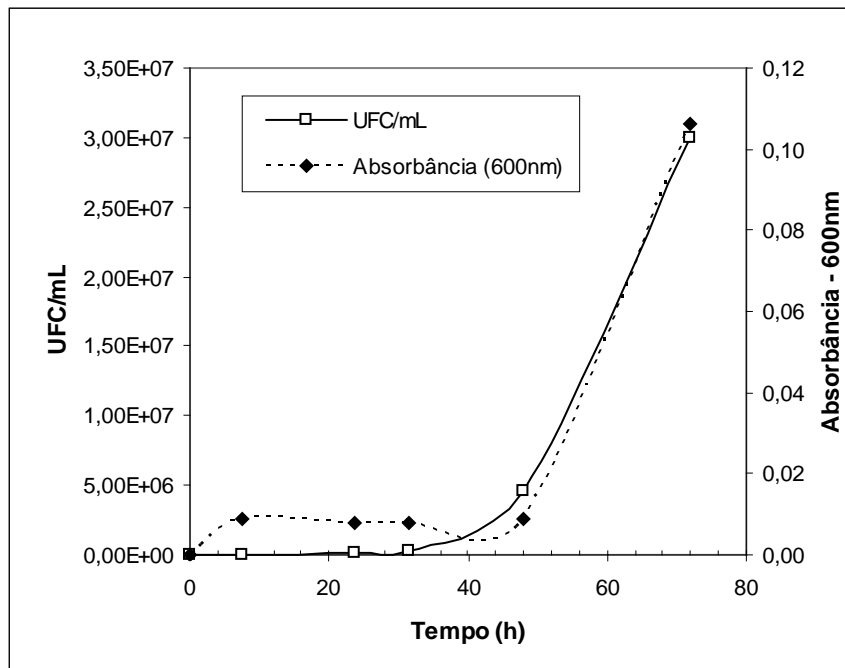


Figura 4 – Curva de Crescimento da *M. phlei* em meio Pratt, 36°C, 120rpm

RAICHUR *et al.*,(1996) e MISRA *et al.*, (1993), também cultivaram a *M. phlei* em meio Pratt, a 35°C, durante 48h para realização de testes de flotação e floculação com amostras minerais.

Dessa forma, de acordo com os resultados obtidos, a fase *log* de crescimento da *M. phlei* em meio Pratt tem início a partir das 48h de cultivo, indicando ser este o tempo de crescimento adequado para obtenção de biomassa para realização dos ensaios de sedimentação com amostras minerais.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARDOUNIOTIS, E; HUDDLESTON, W.; CERI, H.; OLSON, M. E. Characterization of biofilm growth and biocide susceptibility testing *Mycobacterium phlei* using the MBEC assay system. *FEMS Microbiology Letters*, v.203, p.263-267, 2001.

DUBEL, J.; SMITH, R.W.; MISRA, M.; CHEN, S. Microorganisms as Chemical Reagents: The Hematite System. *Minerals Engineering*, v.5, n.3-5. p.547-556, 1992.

MISRA, M.; CHEN, S.; SMITH, R.W.; RAICHUR, A.M. *Mycobacterium phlei* as a flotation collector for hematite. *Minerals Metall. Processing*, v.10, p.170-175, nov. 1993b.

MURRAY, P.R. et al. *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 513p., 1992.

RAICHUR, A. M.; MISRA, AM.; BUKKA, K.; SMITH, R.W. Flocculation and flotation of coal by adhesion of hydrophobic *Mycobacterium phlei*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 8, p.13-24, mai. 1996.

SMITH, R.W.; MISRA, M.; CHEN, S. Adsorption of a hydrophobic bacterium onto hematite: implications in the froth flotation of the mineral. *J. Ind. Microbiol.*, v.11, p. 63-67, set. 1993.

TORTORA, G.J. et al. *Microbiologia*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 827p., 2000.