

AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE FERRO EM MEIO SELETIVO PARA O CULTIVO DE *XANTHOMONAS ARBORICOLA* pv PRUNI

KATIELEN MOTA DA SILVA¹; GEOVANE DIEL DE OLIVEIRA²; FABÍOLA AQUINO³; KARINE LASTE MACAGNAN⁴; MARIANE IGANSI ALVES⁵; ANGELITA DA SILVEIRA MOREIRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – katielen_motta@outlook.com

²Universidade Federal de Pelotas – geovanedi@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – fabiola-aquino@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – karinemacagnan@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – marianeigansialves@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – angelitadasilveiramoreira@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Xanthomonas* são microrganismos gram-negativos, aeróbicos obrigatórios, quimiorganotróficos e fitopatogênicos da família Pseudomonadaceae sendo capazes de infectar diversas espécies de plantas (como cítricos, pêssego, bananas, arroz, feijão e alface). A cepa *Xanthomonas arboricola* pv pruni, causa manchas características do gênero *Prunus* (cerejeiras, pessegueiros e ameixeiras) (COSTA, 2023; GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

Essas bactérias produzem um biopolímero polissacarídeo extracelular denominado xantana que é utilizado nos setores industriais de alimentos, bebidas, laticínios, fármacos, cosméticos e também no setor petroquímico, entre outros. Seu amplo uso ocorre devido ao seu potencial como estabilizador de emulsões e agente de dispersão, possuindo estabilidade em ampla faixa de pH e temperatura, inocuidade e ótimas propriedades reológicas de viscosidade e pseudoplasticidade (COSTA, 2023).

A xantana é produzida em biorreatores, através de bioprocessamento líquido conduzido em profundidade, com agitação e aeração variável, na temperatura ideal de 28°C e pH neutro, onde a bactéria é nutrida por fontes de carbono (sacarose e glicose) e nitrogênio, além de minerais como magnésio e potássio. O primeiro passo do bioprocessamento consiste no crescimento do microrganismo em meio sólido, de forma a obter-se o pré-inóculo, depois, as colônias são transferidas para um meio líquido onde ocorre a multiplicação celular para obtenção do inóculo; posteriormente realiza-se um novo crescimento em meio adequado para a produção de xantana, que é então recuperada por precipitação com álcool e/ou sais, sendo, por fim, realizados os procedimentos de separação, lavagem, secagem e obtenção do produto final por moagem (COSTA, 2023; GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

Vários são os fatores que podem influenciar no rendimento e qualidade da goma xantana durante o processo de produção, tais como: a espécie e cepa de *Xanthomonas* usada, o tipo de biorreator, as condições de cultivo que incluem temperatura, pH e concentração de oxigênio, e a composição dos meios (COSTA, 2023). Além disso, a suplementação com nutrientes pode ser um fator importante para um melhor desenvolvimento microbiano, sendo o ferro um exemplo de micronutriente desejável no meio de cultivo.

O ferro é um elemento essencial para todos os organismos, incluindo bactérias, sendo considerado o quarto metal mais abundante na superfície terrestre. Este micronutriente pode constituir o grupo prostético ou ser cofator de

proteínas, participando de processos metabólicos como fixação de nitrogênio, ciclo do ácido cítrico, resistência a estresse redox, transporte de oxigênio, fotossíntese, regulação gênica e biossíntese de DNA (ANDREWS et al., 2003).

Com base nisso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar diferentes concentrações de ferro em meio de crescimento celular padrão usado para de *X. arboricola* pv *pruni* visando aprimorar o processo de produção de goma xantana e, assim, obter um aumento no custo-benefício da produção.

2. METODOLOGIA

O procedimento foi iniciado pelo repique multiplicativo em meio de cultivo SPA sólido (*Sucrose Peptone Agar* – composto de 20 g.L⁻¹ de sacarose, 5 g.L⁻¹ de peptona, 0,5 g.L⁻¹ de K₂HPO₄, 0,25 g.L⁻¹ de MgSO₄) (HAYWARD, 1964) acrescentado, individualmente, das concentrações de FeCl₃ como a seguir: 0 (controle); 0,0010; 0,0025; 0,0050; 0,0100; 0,0500 – em g.L⁻¹ – com incubação por 72 h em estufa a 28 °C para obtenção do pré-inóculo. A seguir, foram preparados os inóculos de cada tratamento, ou seja, a passagem das células do meio sólido para um meio YP líquido (que se distingue do meio SPA pela troca das 5 g.L⁻¹ de peptona pela combinação de 4,25 g.L⁻¹ de extrato de levedura com 0,75 g.L⁻¹ de peptona) (COSTA, 2023), do qual foram coletadas amostras de 100 uL para a determinação do crescimento celular (UFC.mL⁻¹) através de diluição seriada. Transcorridas 24 h em agitador incubador orbital a 28 °C e 150 rpm, novas amostras foram coletadas para a verificação do crescimento celular e os inóculos de cada tratamento foram adicionados ao meio de produção mineral (MPII – composto de 1,5 g.L⁻¹ de (NH₄)₃PO₄, 2,5 g.L⁻¹ de K₂HPO₄, 0,6 g.L⁻¹ de MgSO₄ – ajustado para pH 7) com 10 % de sacarose, que foram incubados a 28 °C e 200 rpm por 72 h. Ao final, realizou-se a recuperação da xantana com etanol 96 °GL na proporção 3:1 (v/v) de caldo fermentado acrescido de 1% (m/v) de KCl. Posteriormente, realizou-se a secagem em estufa a 56 °C por 72 h e determinou-se os rendimentos (g.L⁻¹) por gravimetria (COSTA, 2023; MACAGNAN, 2021; PEREZ, 2020).

Os resultados em UFC.mL⁻¹ das contagens foram convertidos a um fator de crescimento celular através da equação:

$$\text{Fator de crescimento} = \frac{\text{Concentração celular final}}{\text{Concentração celular inicial}}$$

Por fim, as análises estatísticas foram realizadas em triplicata e as médias foram comparadas pelo teste de *Tukey* ($p < 0,5$) no programa Statistix 9.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos sobre a concentração celular inicial e pós 24 h, os consequentes fatores de crescimento e o rendimento de xantana *pruni* estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração celular inicial (UFC.mL⁻¹) de *X. arboricola* pv *pruni* repicadas em meio de cultivo com diferentes concentrações de ferro e após 24 h de cultivo, em meio líquido sem ferro, fator de crescimento (adimensional) e rendimento de xantana *pruni* (g.L⁻¹).

Tratamento - Concentração de Fe (g.L ⁻¹)	Concentração celular inicial (UFC.mL ⁻¹)	Concentração celular 24h (UFC.mL ⁻¹)	Fator de crescimento	Rendimento (g.L ⁻¹)
1 – 0 (controle)	1,1 x 10 ⁹ ± 5,5 x 10 ⁷	6,9 x 10 ⁹ ± 8,3 x 10 ⁸	6,42 ^{AB} ± 0,92	4,14 ^C ± 0,38
2 - 0,0010	1,3 x 10 ⁹ ± 6,1 x 10 ⁸	8,0 x 10 ⁹ ± 6,5 x 10 ⁸	7,72 ^A ± 0,90	7,01 ^{AB} ± 0,07
3 - 0,0025	1,3 x 10 ⁹ ± 2,5 x 10 ⁸	6,7 x 10 ⁹ ± 4,2 x 10 ⁸	5,78 ^{AB} ± 0,14	7,05 ^A ± 0,27
4 - 0,0050	1,1 x 10 ⁹ ± 1,8 x 10 ⁸	5,8 x 10 ⁹ ± 3,3 x 10 ⁸	5,24 ^{BC} ± 1,05	7,08 ^A ± 0,11
5 - 0,0100	1,9 x 10 ⁹ ± 4,2 x 10 ⁸	5,5 x 10 ⁹ ± 8,4 x 10 ⁸	3,01 ^D ± 0,82	7,13 ^A ± 0,23
6 - 0,0500	9,1 x 10 ⁸ ± 3,7 x 10 ⁸	4,0 x 10 ⁹ ± 1,3 x 10 ⁹	3,34 ^{CD} ± 0,39	6,41 ^B ± 0,17

*Letras distintas indicam diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey p<0,5.

Com base na tabela, podemos verificar que os tratamentos que resultaram em maior crescimento celular foram os meios de cultivo controle e aqueles com menores concentrações de ferro (T1, T2 e T3), não apresentando diferença estatística entre eles. Além disso, a adição de ferro ao meio sólido de crescimento celular (para obtenção de pré-inóculo) resultou em aumento do rendimento de xantana pruni; com exceção do tratamento 6, o rendimento passou de 6,4 g.L⁻¹ (controle) para acima de 7,0 g.L⁻¹.

Em bactérias Gram-negativas, o ferro é reconhecido por receptores específicos da superfície celular e transportados ativamente contra um gradiente de concentração para o periplasma bacteriano (WANDERSMAN; STOJILIKOVIC, 2000). A proteína TonB localizada no espaço periplasmático, juntamente com as proteínas ExbB e ExbD, ambas ancoradas à membrana interna, formam uma unidade funcional denominada sistema TonB-ExbB-ExbD, capaz de acoplar o transporte mediado pelo receptor de membrana externa ao potencial eletroquímico através da membrana interna, permitindo abertura do canal e transporte de moléculas para o periplasma (KÖSTER, 2001; ANDREWS et al., 2003). Dessa forma, as proteínas de ligação periplasmáticas transferem ferrisideróforos dos receptores de membrana externa para transportadores cassetes de ligação de ATP (ABC) na membrana citosólica que, por sua vez, liberam os ferrisideróforos para o citosol onde os complexos são dissociados por redução, liberando o ferro complexado para utilização no metabolismo celular (WANDERSMAN; STOJILIKOVIC, 2000). Desta forma, o ferro pode auxiliar na liberação do biopolímero extracelularmente.

Portanto, observou-se que a adição de ferro influenciou negativamente no crescimento celular, mas positivamente no rendimento de xantana pruni, que é o mais desejado, representando uma melhoria no bioprocessamento.

4. CONCLUSÕES

Tendo em vista o maior rendimento de xantana pruni observado nos meios que receberam o ferro em sua composição, a falta de diferença estatística entre as concentrações 2, 3, 4 e 5 e o menor rendimento do tratamento 6, pode-se concluir que a concentração 2 (0,0010 g.L⁻¹) é a melhor escolha de tratamento quando se diz respeito ao custo-benefício, pois os gastos extras no processo são mínimos e há um aumento na quantidade final do produto, sendo este o meio de cultivo mais econômico e eficiente. Portanto, este trabalho resulta em um aprimoramento da atual metodologia de produção da xantana pruni.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS, S.C.; ROBINSON, A.K.; RODRIGUEZ-QUIÑONES, F. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiology Reviews**, v.27, p.215-237, 2003.
- COSTA, E. S. M. **Efeito da concentração das fontes de nitrogênio nos meios de crescimento celular na produção e qualidade de xantana pruni**. 2023. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: Production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 549-579, 2000.
- HAYWARD, A.C. Characteristes of *Pseudomonas solonacearum*. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 27, n. 2, p. 265-277,1964.
- Köster, W. ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. **Research in Microbiology**, v.152, p.291–301, 2001.
- MACAGNAN, K. L.; PEREZ, I. A.; COSTA, E. S. M.; AMES, C. W.; SOARES, J. C. M.; SOURABIE, A.; VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S. Influência de diferentes extratos de levedura (insumos) no crescimento celular de *Xanthomonas arboricola* pv pruni cepa 101. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, p. 15816-15824, 2021.
- PEREZ, I. A.; MACAGNAN, K. L.; COSTA, E. S. M.; OLIVEIRA, G. D.; AMES, C. W.; ROSSI, D.; VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S. Efeito de novos extratos de levedura no crescimento celular, produção e viscosidade de xantana pruni por *xanthomonas arboricola* pv pruni cepa 106. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, p. 21543-21552, 2020.
- WANDERSMAN, C; STOJILJKOVIC, I. Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. **Current Opinion in Microbiology**, v.3, p.215–220, 2000.