



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**UTILIZAÇÃO DE MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM MEIO ALTERNATIVO
PARA CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM
PLANTAS**

FERNANDA MIKAINY ANTAS LUNGUINHO DANTAS

João Pessoa, 2020

FERNANDA MIKAINY ANTAS LUNGUINHO DANTAS

**UTILIZAÇÃO DE MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM MEIO ALTERNATIVO
PARA CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM
PLANTAS**

Trabalho Final do Curso submetido à Coordenação do Curso de Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de bacharel em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. Sharline Florentino de Melo Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Cosme Rafael Martínez Salinas

João Pessoa, 2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

D192u Dantas, Fernanda Mikainy Antas Lunguinho.
Utilização de Melaço de Cana-de-Açúcar em Meio
Alternativo para Crescimento de Bactérias Promotoras de
Crescimento em Plantas / Fernanda Mikainy Antas
Lunguinho Dantas. - João Pessoa, 2020.
51 f. : il.

Orientação: Sharline Florentino de Melo Santos.
Coorientação: Cosme Rafael Martínez Salinas.
TCC (Graduação) - UFPB/CT.

1. Meio Alternativo. 2. Melaço. 3. Endófitos. 4. BPCP.
5. Cana-de-Açúcar. I. Santos, Sharline Florentino de
Melo. II. Salinas, Cosme Rafael Martínez. III. Título.

UFPB/BS/CT CDU 54 (043.2)

FERNANDA MIKAINY ANTAS LUNGUINHO DANTAS

**UTILIZAÇÃO DE MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM MEIO ALTERNATIVO
PARA CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM
PLANTAS**

Trabalho Final de Curso submetido à Coordenação Curso de Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de bacharel em Engenharia Química.

Aprovado em 02 de dezembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Sharlaine

Profa. Dra. Sharline Florentino de Melo Santos – DEQ/CT/UFPB
(Orientadora)

Cosme Rafael Martinez Salinas

Prof. Dr. Cosme Rafael Martinez Salinas - DQ/CCEN/UFPB
(Co-orientador)

Laís Campos Teixeira de Carvalho Gonçalves

Profa. Dra. Laís Campos Teixeira de Carvalho Gonçalves – DTS/CTDR/UFPB
(Avaliadora)

*Com muita gratidão no coração dedico este
trabalho à Deus, aos meus pais e minha irmã.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me guiado e dado forças para enfrentar todas as situações, permanecendo sempre comigo.

Agradeço aos meus pais Francisco e Francisca pela dedicação, apoio e cuidados, o que possibilitou a conquista desse sonho.

Agradeço a minha irmã por todo cuidado, risadas e paciência comigo.

Aos professores da Universidade Federal da Paraíba pelo compartilhamento de conhecimentos e experiências, em especial ao professor Cosme Rafael Martínez, pela orientação nas atividades de iniciação científica e monitoria desde meu primeiro ano na instituição e a professora Sharline pela atenção durante o curso e orientação nesse trabalho.

Aos amigos de laboratório, que passaram a ser da vida, Ubiratan, Carlos e Andreza.

Aos amigos do curso que levarei sempre comigo, Herbet, Ellen, Alysson, Bruna, Mariana, Pedro pelas risadas, companheirismo, paciência e convivência.

E todos que contribuíram, direta ou indiretamente para conclusão de mais essa etapa.

RESUMO

O Brasil é considerado um dos maiores produtores agrícolas, com destaque no setor sucroalcooleiro onde a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é uma cultura de grande valor bioenergético principalmente na região Nordeste para produção de etanol, açúcar, cachaça, fonte de biomassa (produção energética) etc. Como é cultivada em zonas intertropicais onde estão sujeitas a intempéries ocasionadas pelo clima, temperatura, condições do solo e manejo que proporcionam deficiências hídricas/nutricionais. Como forma de aumentar a resistência a esses efeitos impostos pela seca, salinidade elevada, toxicidade de metais etc, auxiliando na fixação de nitrogênio que são utilizadas as bactérias endofíticas promotoras de crescimento em plantas (BPCP), que possuem efeito simbiótico com as culturas proporcionando economia produtiva com responsabilidade socioambiental. Para o crescimento dessas endofíticas são utilizados meios, específicos para diazotróficas, já consolidados na literatura como o DYGS que possui composição sintéticas, tornando-se oneroso para processos de escala semi ou industrial. Este trabalho avaliou o crescimento das BPCP em meios alternativos, compostos, principalmente, por melaço de cana-de-açúcar, que é um subproduto industrial, eficiente na produção de biomassa em diversos processos fermentativos, tendo destaque pelo alto teor de açúcares fermentescíveis, vitaminas, nutrientes, além do baixo custo. Foram testados os efeitos nas taxas de crescimento de 6 meios (I à VI), diferentes quali e quantitativamente, em comparação com meio de referência, DYGS e, 5 isolados bacterianos (B1, B2, B3, B4 e B5), os dados foram submetidos a ANOVA e médias comparadas pelo teste de Tukey ($p = 0,05$). O meio I não contribuiu para um melhor desenvolvimento bacteriano, tendo resultados insatisfatórios em alguns isolados como em B3 e B4. Mas os demais meios alternativos apresentarem bons desempenhos de taxas de crescimento, sendo que no isolado B1 esses valores foram superiores ($0,06 \text{ h}^{-1}$) ao meio DYGS. E o isolado B5 só mostrou maiores taxas de crescimento no meio referência, meio VII ($0,12 \text{ h}^{-1}$), nos demais os valores ficaram baixos ($\sim 0,05 \text{ h}^{-1}$). Outros experimentos são necessários para validação, mas mesmo assim foi possível perceber potenciais formulações de meios alternativos tendo melaço de cana-de-açúcar como um dos principais componentes para crescimento de BPCP.

PALAVRAS-CHAVE: Meio Alternativo. Melaço. Endófitos. BPCP. Cana-de-Açúcar.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura linear e cíclica da glicose.....	20
Figura 2. Estrutura linear e cíclica da frutose.....	21
Figura 3. Estrutura química da Dextrana.....	21
Figura 4. Estruturas química dos constituintes do amido, amilose e amilopectina.	22
Figura 5. Estrutura química da D-glicopirranose.....	23
Figura 6. Estrutura química da sacarose.....	23
Figura 7. Funcionamento de um espectrofotômetro.....	26
Figura 8. Curva de crescimento com fases delimitadas ao longo do tempo.....	27
Figura 9. Curva de crescimento de microrganismo em cultivo descontínuo, representado em ordenadas lineares (A) e semilogarítmicas (B).....	28
Figura 10. Configuração da microplaca.	35
Figura 11. Dinâmica de crescimento no Meio I.	36
Figura 12. Dinâmica de crescimento no Meio II.	37
Figura 13. Dinâmica de crescimento no Meio III.....	38
Figura 14. Dinâmica de crescimento no Meio IV.	39
Figura 15. Dinâmica de crescimento no Meio V.....	40
Figura 16. Dinâmica de crescimento no Meio VI.	41
Figura 17. Dinâmica de crescimento no Meio VII.	42
Figura 18. Seleção das Taxas Máximas de Crescimento.....	43
Figura 19. Taxa de Crescimento (h^{-1}) dos isolados B1 e B4 sob efeito dos meios alternativos (Meios I a VI) e meio referência DYGS (Meio VII) em microplacas fundo U (96 poços), após 24 h de cultivo (28 °C). Médias ($n = 2$) com as mesmas letras maiúsculas (efeito da composição do meio) diferem ($p < 0,05$) pelo teste de HSD Tukey.	44
Figura 20. Taxa de Crescimento (h^{-1}) dos isolados B2, B3 e B5 sob efeito dos meios alternativos (Meios I a VI) e meio referência DYGS (Meio VII) em microplacas fundo U (96 poços), após 24 h de cultivo (28 °C). Médias ($n = 2$) com as mesmas letras maiúsculas (efeito da composição do meio) diferem ($p < 0,05$) pelo teste de HSD Tukey.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Especificação técnica do Melaço de Cana-de-Açúcar Líquido.	19
Tabela 2. Resumo da quantidade de carbono (mol/kg) presente no melaço de cana-de-açúcar.	31
Tabela 3. Composição e especificações das substâncias presentes no meio DYGS modificado.	32
Tabela 4. Resumo da quantidade de carbono (mol/L) no meio DYGS.	33
Tabela 5. Composição dos meios alternativos com melaço de cana-de-açúcar (9,746 g/L).	34

LISTA DE QUADRO

Quadro 1. Tipos de medidas, métodos e características das metodologias de determinação de crescimento de microrganismos.	24
---	----

SUMÁRIO

Profa. Dra. Laís Campos Teixeira de Carvalho Gonçalves – DTS/CTDR/UFPB	4
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVO GERAL	14
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
3.1 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM PLANTAS	15
3.2 MEIOS DE CRESCIMENTO	16
3.2.1 MEIOS ALTERNATIVOS	18
3.2.1.1 MELAÇO	19
3.3 METODOLOGIAS DE AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO	24
3.4 DINÂMICA DE CRESCIMENTO	26
4. METODOLOGIA	29
4.1 BACTÉRIAS AVALIADAS	29
4.2 CÁLCULOS	29
4.2.1 CARBONO TOTAL NO MELAÇO	29
4.2.2 CARBONO TOTAL NO MEIO DYGS	32
4.3 PROCEDIMENTOS	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÃO	47
7. REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um dos maiores produtores no setor agrícola por possuir áreas propícias para o desenvolvimento de diversas culturas, além da variedade de clima, de solo e temperaturas. Dependendo da região e da produção que se quer obter, essa diversificação acaba se tornando algo desfavorável para aumento de produtividade e aproveitamento das áreas agricultáveis.

Dentre os setores com maior destaque, o sucroalcooleiro tem relevância no cenário bioeconômico com a integração de conceitos bastante abordados no mercado atual, como a responsabilidade socioambiental, visto que é notória a atenção que se tem dado ao desenvolvimento sustentável relacionado à utilização de combustíveis renováveis, além da sua capacidade de adequação aos diversos níveis econômicos, que vão desde pequenos agricultores à grandes usinas sucroalcooleiras, buscando maior produtividade, rendimento e excelência em custo de produção (VIDAL et al., 2006).

Nesse contexto bioenergético, a cana-de-açúcar destaca-se por sua versatilidade de conversão em produtos que vão desde a alimentação como: açúcar, bebidas alcoólicas e enzimas, energia como produção de combustíveis (etanol), bagaço (eletricidade, indústria química/farmacêutica etc.), e fertilizantes utilizados como alternativas de baixo impacto.

A cana-de-açúcar é geralmente cultivada em zonas intertropicais, onde o plantio ocorre, geralmente, sem nenhuma restrição climática/manejo, podendo demandar de correções da fertilidade do solo para melhoramento do desempenho da cultura em algumas localidades, mas nenhum recurso ou técnica que torne a produção dispendiosa (MARIN, 2015?). O Brasil possui condições adequadas para esse tipo de cultura, tanto no aspecto climático quanto na fertilidade e topografia do solo que facilitam as operações de plantio e colheita (ROSSETTO, 2015?).

Para aumentar produtividade, são utilizados fertilizantes químicos que, manuseados de forma indiscriminada, são responsáveis por danos à natureza como a eutrofização do solo e de águas superficiais/subterrâneas e emissão de gases de efeito estufa, e riscos ao ser humano na fase de consumo. Dentre as alternativas, para substituição ou diminuição da quantidade utilizada desses insumos, está o uso de inoculantes com bactérias promotoras de crescimento em plantas – BPCP (SPOLAOR, 2016).

As BPCP auxiliam na tolerância aos efeitos restritivos do crescimento impostos pela seca, salinidade elevada, toxicidade de metais e carga de pesticidas (BHATTACHARYYA, 2012), além de serem benéficas por constituírem um grupo de microrganismos capaz de

colonizar superfícies radiculares, rizosfera e filosferas, e os tecidos internos da planta, promovendo o crescimento, principalmente, pela fixação biológica de nitrogênio (HUNGRIA et al., 2010).

Para o crescimento dessas endofíticas são utilizados meios, específicos para diazotróficas, já consolidados na literatura como o DYGS (RODRIGUES-NETO; MALAVOLTA-JÚNIOR; VICTOR, 1986) que tem em sua composição substâncias sintéticas fontes de carbono e outros nutrientes como nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio etc. Porém, tornam-se meios onerosos quando se quer aumentar escala de produção e com isso faz-se necessário a busca por meios alternativos compostos por substituintes provenientes, geralmente, de fontes residuais ou subprodutos da indústria e que favoreçam o crescimento desses microrganismos.

Um dos subprodutos utilizados como aditivo em meios por seu baixo custo, facilidade de ser encontrado, possuir fontes de carbono, oligoelementos, vitaminas, entre outras características interessantes para o crescimento de microrganismos, é o melaço de cana-de-açúcar que é resultado da centrifugação do processo de fabricação do açúcar, além disso favorecem as condições de fermentação pela presença de amidos derivados da cana-de-açúcar (BRINGHENTI et al., 2007) e faz parte do ciclo tecnológico das BPCP.

2. OBJETIVO GERAL

Formulação de meio alternativo para crescimento de bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) tendo como um dos componentes principais o melaço de cana-de-açúcar para obtenção de taxas de crescimento satisfatórias em comparação com meio de referência na literatura.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar taxas de crescimento de inóculos bacterianos endofíticos promotores de crescimento de plantas em meios alternativos com melaço de cana-de-açúcar.
- Selecionar bactérias com base no crescimento em meios alternativos com melaço de cana-de-açúcar.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM PLANTAS

A produção agrícola demanda de quantidade significativa de insumos para combater pragas e doenças, deficiências hídricas e nutricionais, além de problemas mecânicos relacionados ao manejo inadequado. Com o objetivo de reverter a dependência sintética de produtos que auxiliam o crescimento de plantas e como alternativa para diminuir o impacto ambiental muitos produtores fazem uso de microrganismos (fungo, algas, bactérias etc.) e dentre os mais utilizados estão as bactérias promotoras de crescimento em plantas (ALBERNAS et al., 2019).

As bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) propiciam capacidade de suportar os efeitos negativos que estão vinculados com a seca, salinidade elevada, toxicidade de metais e carga de pesticidas (BHATTACHARYYA, 2012) e essas bactérias são benéficas para as plantas por representarem um grupo de microrganismos que colonizam superfícies radiculares, rizosfera e filosferas, e os tecidos internos da planta, secretando hormônios/enzimas que auxiliam na absorção de nutrientes e, conseqüentemente, promovem crescimento vegetativo muitas vezes associando a fixação biológica de nitrogênio (HUNGRIA et al., 2010; AQUINO et al., 2019).

As BPCP podem ser introduzidas através de sementes, explantes, mudas, sendo que a forma de aplicação no sistema de plantio pode dar-se a partir do próprio substrato, pulverização aérea, no tratamento de estacas, tubérculos e raízes. A produção de ácido cianídrico, fitohormônios, auxinas, enzimas como a ACC-deaminase, mineralização de nutrientes, solubilização de fosfatos, fixação do nitrogênio e aumento da absorção de água e nutrientes pelas raízes, entre outros (MARIANO et al., 2013) são estímulos fornecidos pelas BPCP para favorecer o crescimento vegetativo.

Bactérias endofíticas são encontradas em tecidos vegetais ou no interior das plantas. Como são não parasitoides, elas não competem por nutrientes e são eficientes por serem colonizadoras internas do sistema radicular facilitando o acesso aos compostos sintetizados.

A promoção de crescimento pode se dar de forma direta ou indireta, a primeira é quando as plantas estão sob condições normais e todo efeito benéfico é para auxiliar seu desenvolvimento, a segunda ocorre quando a infecção por patógenos influenciam no

crescimento e até mesmo sobrevivência dos sistema e as BPCP acabam atuando como agente de controle biológico tornando os sítios indisponíveis para os patógenos (MARIANO et al., 2013).

Uma agricultura sustentável requer a utilização de estratégias que permitam o aumento da produção de alimentos sem prejuízo ao meio ambiente e saúde, dentro do contexto econômico, social e político de cada região.

Para incentivar a pesquisa, a produção e uso de produtos biológicos frente aos insumos químicos/importados que o Ministério da Agricultura, Pecuário e Abastecimento lançou o Programa Nacional de Bioinsumos que vai aproveitar a biodiversidade brasileira como alternativa de fertilização e de defensivo agrícola para o desenvolvimento da agropecuária do país de forma sustentável (MAPA, 2020).

3.2 MEIOS DE CRESCIMENTO

A composição dos meios de cultivo encontrados na literatura contém fontes importantes como carbono, nitrogênio, magnésio, enxofre entre outros e, dependendo da constituição, tornam-se específicos para o desenvolvimento de determinadas culturas, ou seja, são preparações com formulações contendo nutrientes que proporcionam o crescimento de microrganismos.

Para a classificação dos meios são considerados o estado físico (sólido, semissólido, líquido), o objetivo da funcionalidade (enriquecimento, seletividade, diferenciar organismos, manutenção), composição química (se possuem extratos de vegetais, animais, microrganismos ou se são artificiais).

Tendo em vista a presença de agentes solidificantes nos meios de cultura é que influenciam no estado físico, sendo considerados como sólidos, semi-sólidos (apresentando de 0,075 a 0,5 % de ágar e/ou gelatina) e, os que não possuem esses agentes (aparentando ser como um caldo) são determinados de líquidos (SPLABOR, 2017).

De acordo com os objetivos funcionais, as especificações dos meios podem ser para enriquecimento (com quantidade de nutrientes para desenvolvimento de microrganismos), seletividade (inibem o desenvolvimento de alguns microrganismos e permite o crescimento de outros), diferenciais (permitem estabelecer diferenças entre microrganismos parecidos), manutenção (viabiliza a conservação de microrganismos) (SPLABOR, 2017).

A composição química influencia no desenvolvimento dos meios de cultivo, pois a presença de nutrientes em concentrações relevantes para que não ocorra inibição de crescimento é um fator importante, são categorizados de acordo com os extratos presentes em sua formulação (vegetais, animais, microrganismos, artificiais) (SPLABOR, 2017). Um meio em que os constituintes são conhecidos é chamado de quimicamente definido, já um meio complexo é aquele que apresenta extratos moídos ou digeridos de animais, peixes, leveduras e vegetais, que fornecem nutrientes, vitaminas e minerais necessários, porém sua quantidade exata não é conhecida.

Um meio bastante utilizado para crescimento de bactérias diazotróficas é o DYGS - 2 g de glicose, 1,5 g de peptona, 2 g de extrato de levedura, 0,5 g de fosfato monopotássico, 1,5 g de ácido glutâmico, 0,5 g de sulfato de magnésio heptahidratado (RODRIGUES-NETO; MALAVOLTA-JÚNIOR; VICTOR, 1986), que já está consolidado na literatura como os trabalhos recentes de SCHEIDT, W. et al. (2020), RÍOS ROCAFULL, Y. et al. (2019), ES, MATOSP et al. (2020), utilizaram para crescimento dos microrganismos.

Para utilização desses meios é necessário garantir que estejam livres de contaminação, por isso que a esterilização deve ser realizada após o preparo de cada meio de cultura com a finalidade de neutralizar a viabilidade dos organismos classificados como contaminantes.

Para constituição de um meio de cultura é necessário que alguns aspectos sejam levados em consideração, desde o valor econômico, que atenda às necessidades nutricionais do microrganismo, auxilie no controle do processo para evitar variações drásticas de pH, até meios que não dificultem a recuperação do produto, ter composição razoavelmente fixa, não causando dificuldades no tratamento final do efluente (SCHMIDELL et al., 2001).

Como fonte de carbono e energia são utilizados diversos açúcares como: glicose, sacarose, frutose, ou ainda polissacarídeos, como o amido e a celulose. Como fonte de fósforo e nitrogênio são os fosfatos solúveis (monoamônio fosfato - MAP, ou o diamônio fosfato - DAP). Outros elementos, como: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^+ , Co^{2+} etc, são adicionados em concentrações reduzidas, na forma de seus sais solúveis (SCHMIDELL et al., 2001).

Uma forma de tornar os meios mais baratos e otimizados para utilização em processos fermentativos de grande-escala é empregando matérias-primas naturais como caldo de cana-de-açúcar, melaços, farinhas diversas (farinha de trigo, milho, soja, cevada) etc, tendo em vista o custo envolvido e desempenho de favorecimento de crescimento (SCHMIDELL et al., 2001).

3.2.1 MEIOS ALTERNATIVOS

A produção em larga escala de microrganismos tendo como base meios de cultura comerciais eleva significativamente o custo, tornando inviável a produção. Com isso, diversas alternativas estão sendo desenvolvidas para tornar o processo mais acessível, como a utilização de subprodutos e matérias-primas da indústria de alimentos e/ou agroindústria devido à alta disponibilidade no mercado e baixo custo, além da pegada ecológica envolvida no uso de resíduos industriais e é indispensável que não necessite passar por tratamentos que resultam em custos exorbitantes (FIORENTINI N. M. et al., 2015).

A multiplicação das células ocorre através de processos fermentativos (bioprocessos), sendo necessários nutrientes suficientes para o desenvolvimento fisiológico. A utilização de subprodutos em meios de cultivo não é suficiente para suprir o equilíbrio nutricional adequado e requer a adição de fontes suplementares. Substâncias como o soro de leite, água de maceração de milho, xarope de milho, levedura de destilaria e melaços são subprodutos industriais que possuem propriedades que permitem a nutrição, o crescimento e a multiplicação de microrganismos (FIORENTINI et al., 2015).

O extrato de levedura possui origem natural por ser resultado de um processo que retira a parede celular e expõe o conteúdo das células. As etapas de produção consistem na (1) Fermentação, que é a parte de crescimento e multiplicação da levedura para formação do fermentado (Creme de levedura) que após resfriamento para interromper o crescimento seguirá para o (2) Rompimento da parede celular pelas enzimas presentes na levedura durante um processo térmico de aumento de temperatura (entre 45 a 55 °C), as macromoléculas da célula são divididas em moléculas menores, obtendo os seguintes componentes: peptídeos e aminoácidos livres, como o ácido glutâmico, por fim os componentes vão para (3) Separação por meio de lavagens e centrifugação (BIOSPRINGER, 2019?).

A peptona é um tipo proteína resultado da digestão por hidrólise de substratos realizada por enzimas como pepsina, papaína, pancreatina e tripsina que é secretada pelo pâncreas, servindo com fonte de nitrogênio e outras substâncias em bioprocessos industriais (CARDOSO, 2017?).

3.2.1.1 MELAÇO

O melaço de cana-de-açúcar é utilizado em formulações de meios alternativos por sua eficiência em produção de biomassa em diversos processos fermentativos, mas não é descartado a suplementação com fontes de nitrogênio, aminoácidos entre outros componentes que já vem sendo estudados por diversos autores, não só para substituição de produtos comerciais por subprodutos como também a suplementação desses meios modificados.

O melaço, particularmente se destaca nos processos fermentativos, pelo fato de apresentar alto teor de açúcares fermentescíveis, vitaminas e minerais tais como manganês, magnésio, fósforo, potássio, zinco, sódio e cálcio conforme tabela 1.

Tabela 1. Especificação técnica do Melaço de Cana-de-Açúcar Líquido.

Características	Unidades	Quantidade
Acidez total (Ácido acético)	g/kg	1,3
ART	%	59,16
Água – Karl Fischer	% m/m	1729
Amido	mg/kg	1729
Brix refratômetro 20 °C	%	82,92
Cálcio	mg/kg	121156
Cinzas	% m/v	9,8
Cobalto	mg/kg	3,1
Cobre	mg/kg	3,8
Dextrana	mg/kg	<10
Ferro	mg/kg	64
Fósforo total	mg/L	1,14
Frutose	% m/m	7,66
Glicose	% m/m	5,3
Magnésio	mg/kg	4270
Manganês	mg/kg	27,1
pH	-	5,7
Potássio	mg/kg	25470
Proteína	%	0,44
Pureza	%	48,19

Resíduos Insolúveis Gravimétrico	mg/kg	706
Sacarose	% m/m	39,41
Selênio	mg/kg	<0,05
Sódio	mg/kg	118
Sulfito	mg/kg	<10
Umidade	%	18,4
Zinco	mg/kg	6,3

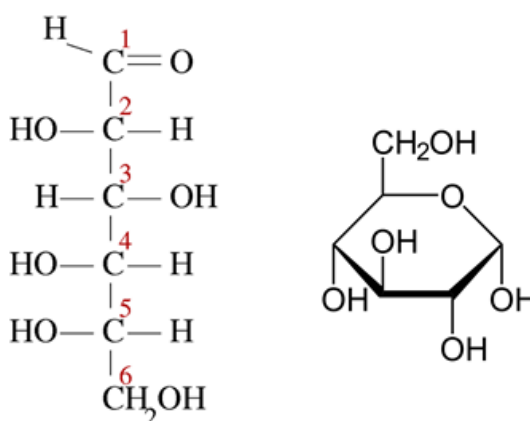
Fonte: Melaços Brasileiros, 2019.

Fontes de carbono são necessárias para o metabolismo dos organismos auxiliando no crescimento e geração de energia, o melaço é facilmente degradável e possui em sua composição como fontes a glicose, frutose, dextrana, amido e sacarose (AVNIMELECH, 2009; CRAB et al., 2009).

I. Glicose

Possui em sua composição seis átomos de carbono, doze átomos de hidrogênio e seis átomos de oxigênio, ou seja: $C_6H_{12}O_6$ conforme figura 1.

Figura 1 Estrutura linear e cíclica da glicose.

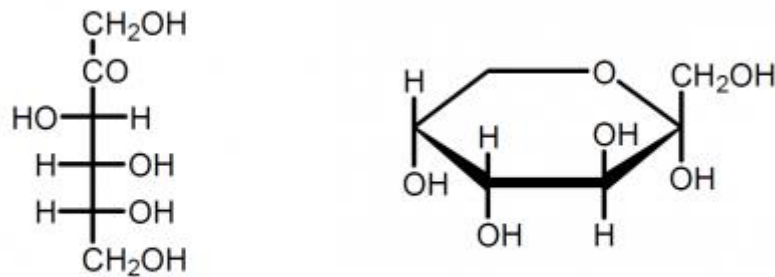


Fonte: Khan Academy, 2019.

II. Frutose

A frutose também conhecida como açúcar da fruta ou como levulose é um monossacarídeo, isto é, é uma unidade de açúcar simples $C_6H_{12}O_6$ conforme figura 2.

Figura 2. Estrutura linear e cíclica da frutose.

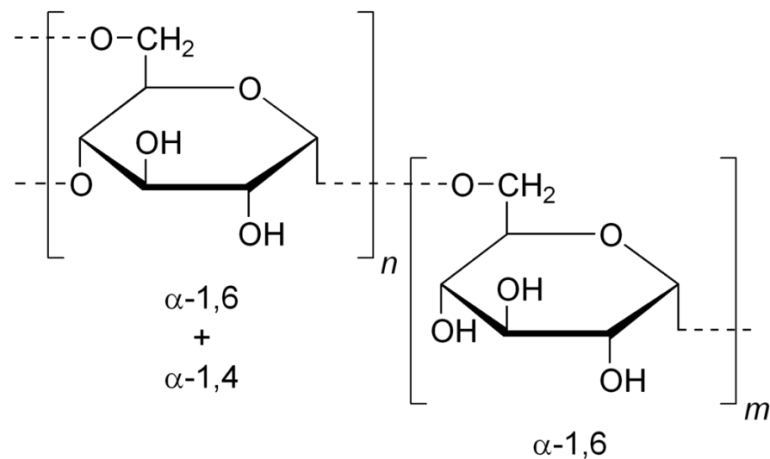


Fonte: Esteves, 2017.

III. Dextrana

Os dextranos são polissacarídeos que consistem em unidades de α -D-glicose ligadas predominantemente por ligações glicosídicas 1-6. Com fórmula molecular $H(C_6H_{10}O_5)_xOH$ e estrutura representada na figura 3.

Figura 3. Estrutura química da Dextrana.



Fonte: Edgar181, 2008.

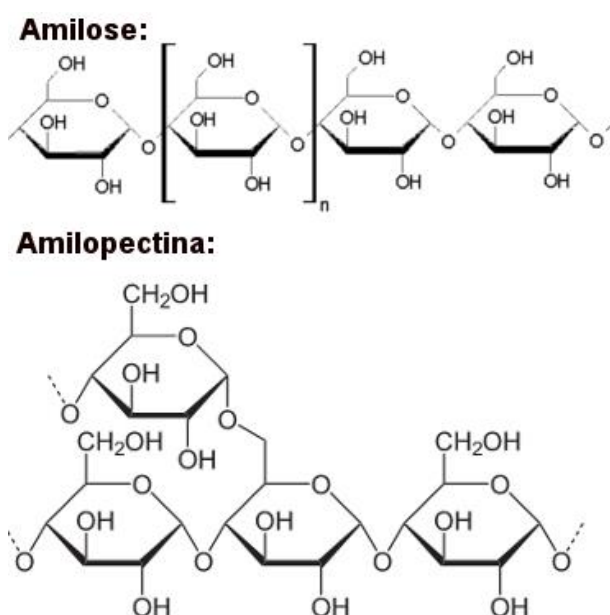
IV. Amido

O amido é homopolissacarídeo, ou seja, um polímero natural constituído por um único tipo de monossacarídeo, a glicose, ligado entre si por ligações glicosídicas, sendo pouco solúvel e de elevado peso molecular, é formado estruturalmente pela sequência de apenas dois

poliósidos: amilopectina e α -amilose, onde o primeiro corresponde a 80% dos polissacarídeos do grão de amido (LUÍS et al., 2017).

A figura 4 mostra como as moléculas são constituídas, a α -amilose possui resíduos de glicose ligados por pontes glicosídicas α -1,4 de forma linear dando origem a um polímero de 250 a 300 resíduos de D-glicopirranose, a amilopectina é uma macromolécula, menos hidrossolúvel que a α -amilose, formada por aproximadamente 1400 resíduos de α -glicose ligadas por pontes glicosídicas α -1,4 podendo ser também ligações α -1,6 (LUÍS et al., 2017).

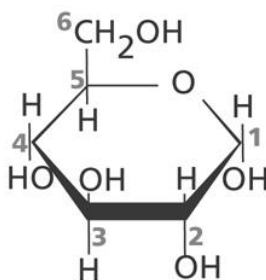
Figura 4. Estruturas química dos constituintes do amido, amilose e amilopectina.



Fonte: Luís et al., 2017.

Sendo considerados a quantidade de 275 resíduos de D-glicopirranose (Figura 5), em média, para a composição da amilose e 1400 resíduos para a amilopectina, como cada sequência está ligada entre si através de pontes glicosídicas, perdem, portanto, um átomo de H para formação da estrutura final, resultando em uma massa molar por resíduo equivalente a 179 g/mol.

Figura 5. Estrutura química da D-glicopirranose.

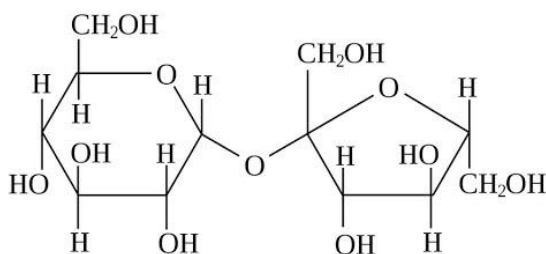


Fonte: Caçador & Dansa, 2011.

V. Sacarose

É um dissacarídeo encontrado em abundância na cana-de-açúcar, frutas e na beterraba e formado por uma molécula de glicose e uma de frutose que se ligam através da ligação éter entre o C1 da unidade glucosil e o C2 da unidade frutosil (Figura 6).

Figura 6. Estrutura química da sacarose.



Fonte: Rodrigues, 2012.

A reação de quebra por hidrólise é tão lenta que soluções de sacarose podem ser mantidas inalteradas por vários anos, mas pode ser catalisada pela enzima invertase ou por adição de um ácido (RODRIGUES, 2012).

Alguns suplementos são utilizados para os meios alternativos, como o extrato de levedura e a peptona por serem ricos em vitaminas do complexo B, aminoácidos, peptídeos, proteínas, carboidratos, indispensáveis para promover o crescimento satisfatório dos microrganismos e suprir com nutrientes déficits dos subprodutos.

Cada tonelada de cana produz de 40 a 60 kg de melaço (VARGAS et al., 2017). Segundo a plataforma de dados do setor sucroenergético Infocana, a Agroval tem capacidade instalada para moer 574 mil toneladas de cana por safra, a Japungu está capacitada para moer 976 mil

toneladas de cana por safra (JORNAL CANA, 2017). Considerando o consumo total de cana-de-açúcar por safra dessas usinas com localização em Santa Rita

$$574000 \text{ ton} + 976000 \text{ ton} = 1550000 \text{ ton}$$

Operando com 80 % de sua capacidade de moagem total

$$80\% \text{ de } 1550000 \text{ ton} = 1240000 \text{ ton}$$

E produção média de melaço de 50 kg de melaço/ton:

$$50 \text{ kg} \times 1240000 \text{ ton} \times \frac{1}{\text{ton}} = 62000000 \text{ kg}$$

Levando a 62 mil toneladas de melaço produzidas em apenas duas usinas da região metropolitana de João Pessoa, PB.

3.3 METODOLOGIAS DE AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO

É considerado crescimento de sistemas biológicos o fato de aumentar a biomassa e não o acúmulo de nutrientes ou a absorção de água em suas células, levando-se em conta o crescimento de uma população, representada em termos de massa total.

O crescimento de uma população microbiana em meio líquido pode ser determinado através do peso seco ou úmido, da química de componentes celulares, da turbidimetria, conforme quadro 1 (SCHMIDELL et al., 2008).

Quadro 1. Tipos de medidas, métodos e características das metodologias de determinação de crescimento de microrganismos.

Tipo de medida	Método	Vantagens	Desvantagens
Peso seco ou úmido	Centrifugar uma amostra da suspensão microbiana, retirar o sobrenadante e lavar o sedimento celular (pellet) com H ₂ O destilada ou solução salina. Após a última centrifugação, o pellet deverá ir para secagem	Peso seco é referência na padronização de outros métodos.	• Peso úmido necessita de amostras grandes, não sendo possível acompanhar o crescimento desde as fases iniciais, pois a massa tem que atingir um nível crítico. • A lavagem pode levar a perdas de material, de componentes celulares solúveis, não podendo ser

	em estufa até peso constante.		aplicado em meio de cultura que contém partículas sólidas em suspensão.
Química de componentes celulares	Calcular a massa microbiana pela dosagem de certos componentes celulares, como proteína e ácidos nucleicos.	Sensíveis, precisos e aplicáveis a amostras pequenas em condições determinadas.	• A composição química das células microbianas (bactérias) é altamente variável e depende das condições de crescimento: composição do meio de cultura, idade da cultura e velocidade de crescimento.
Turbidimetria	Medida da turvação de uma suspensão em um espectrofotômetro (absorbância) ou em um nefelômetro (capacidade de dispersar a luz).	Processo simples, resultados e curvas obtidas durante o desenvolvimento do sistema.	• Tamanho das células, composição química e presença de material particulado no meio de cultura, interferem na precisão do método.

Fonte: Modificado de Schmidell et al., 2008.

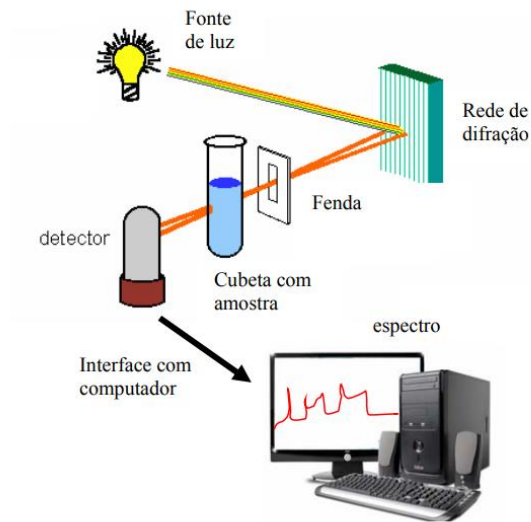
Nos sistemas em batelada, as determinações da cinética de crescimento podem ser através da turbidimetria utilizando detectores ópticos como espectrofotômetros (Figura 7) que relacionam a variação da intensidade do feixe de luz incidente com a solução em análise, onde a quantidade de luz absorvida é proporcional a concentração da amostra.

O termo espectrofotômetro é para instrumentos como espectrômetros que utiliza a radiação na zona do infravermelho e do ultravioleta (inclusive) e, existem espectrofotômetros UV-visível (ou apenas visível), de infravermelho e de fluorescência (ou fluorímetros). Os componentes básicos desse equipamento: são as fontes de radiação (ex. lâmpada UV, Fonte de IR, luz Síncrotron), Colimadores, Recipientes para amostras, Monocromadores (prismas ou redes de difração), Detectores/Transdutores (ex: fotodiodo, fotomultiplicador, CCD), Processador, Saída (ex: monitor de computador) (PILLING, 2018).

Os espectrofotômetros possibilitam a seleção do comprimento de onda (λ , lâmbda) de acordo com o componente em análise, no caso de microrganismos a faixa está entre 590 a 600

nm, além de converter o sinal recebido no detector em medida de absorbância, relacionando internamente a intensidade I (feixe emergente) com I_0 (feixe incidente) (PILLING, 2018).

Figura 7. Funcionamento de um espectrofotômetro.

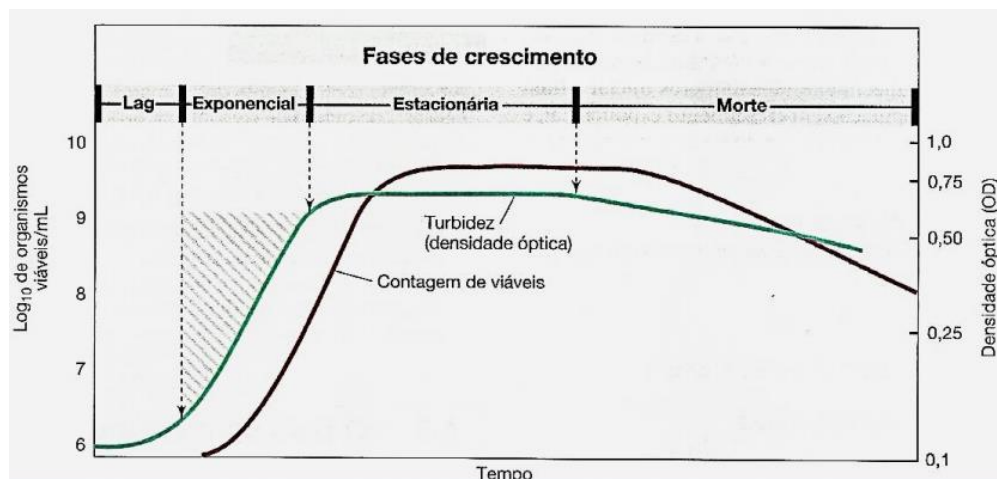


Fonte: Pilling, 2018.

3.4 DINÂMICA DE CRESCIMENTO

Em um processo descontínuo, as fases de crescimento acompanham as condições do meio, onde a quantidade de nutrientes diminui e de produtos do metabolismo aumentam com o passar do tempo. Essas modificações influenciam no comportamento e no ajuste das novas condições para o crescimento. A figura 8 apresenta o gráfico de crescimento microbiano em cultura descontínua em meio líquido, com detalhe representativo das fases desse crescimento (SCHMIDELL et al., 2008).

Figura 8. Curva de crescimento com fases delimitadas ao longo do tempo.



Fonte: Madigan, 2010.

A fase “lag” ocorre no início do crescimento e é um período em que contagens não revelam aumento de número de indivíduos, mas pode ocorrer aumento de massa reflexo da ambientação ao meio, pois essa fase só ocorre quando os microrganismos provêm de uma cultura velha ou o meio original é diferente, tanto qualitativa quanto quantitativamente, do novo. Essa fase é a consequência de uma necessidade de renovação de sistemas enzimáticos que foram danificados ou perdidos por esgotamento do substrato e de outros componentes importantes. Microrganismos crescendo em meios idênticos não apresentam essa fase ou apresentam de forma menos significativa, em meios mais rico que o original, pode ocorrer uma redução dessa etapa de condicionamento (SCHMIDELL et al., 2008).

Na fase de crescimento exponencial, também conhecida como fase log, os microrganismos já estão com suas atividades e capacidades nutricionais em pleno funcionamento, pois o meio de crescimento apresenta quantidade de suprimentos superior às necessidades do organismo naquele momento. A taxa de velocidade de crescimento (dX/dt) é uma função da massa (X), sendo a fase mais importante para o fornecimento de dados para os estudos de fisiologia, de cinética (velocidade específica), do consumo do substrato e formação dos produtos (SCHMIDELL et al., 2008), sendo a velocidade específica de crescimento, nessa fase, ($\mu_x = \mu_m$) constante e máxima. Ficando a velocidade de crescimento proporcional à concentração X , conforme equação 1:

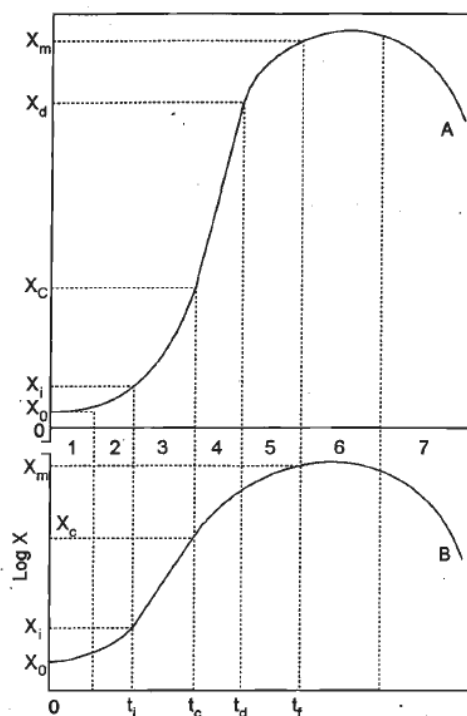
$$\frac{dX}{dt} = \mu_m X \quad (1)$$

Existem algumas fases intermediárias que consideram o esgotamento de componentes, o acúmulo de metabólitos no meio de cultura ocasionando na desaceleração do crescimento e que consiste na fase 5 na figura 9 (SCHMIDELL et al., 2001).

A fase estacionária é quando a quantidade de novos indivíduos é igual ao número dos que morrem, sendo as causas dessa etapa o acúmulo de metabólitos tóxicos, o esgotamento de nutrientes e de O_2 , onde a quantidade torna-se insuficiente para a população microbiana existente, afetando, assim, a velocidade de crescimento. Mas existem maneiras de tentar remediar a fase como a utilização de sistemas tamponantes para neutralização dos metabólitos tóxicos, a aeração/agitação para difusão de oxigênio no meio de cultivo (SCHMIDELL et al., 2008).

A última fase, a de declínio ou lise, ocorre quando o número de organismo que morre torna-se progressivamente superior ao dos que surgem (SCHMIDELL et al., 2001).

Figura 9. Curva de crescimento de microrganismo em cultivo descontínuo, representado em ordenadas lineares (A) e semilogarítmicas (B).



Fonte: Schmidell et al., 2001.

4. METODOLOGIA

4.1 BACTÉRIAS AVALIADAS

As bactérias avaliadas fazem parte da coleção do grupo de pesquisa de Bioprodutos & Bioprocessos do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da UFPB. Por questões de sigilo patenteário, posteriormente serão publicadas as identidades desses isolados.

4.2 CÁLCULOS

4.2.1 CARBONO TOTAL NO MELAÇO

Para os cálculos de carbono total no melaço (C_{TM}), mol/kg, foram utilizados os dados fornecidos na tabela 1, onde as fontes de carbono presentes no melaço são glicose, frutose, dextrana, amido e sacarose e a equação 1:

$$C_{TM} = Q_{CM} \times \frac{n_C}{MM} \quad (1)$$

Onde:

Q_{CM} = É a quantidade do composto presente no melaço de acordo com a unidade.

n_C = É o número de Carbono presente em uma molécula.

MM = Massa molar do componente (g/mol).

I. Glicose

Possui em sua composição seis átomos de carbono, doze átomos de hidrogênio e seis átomos de oxigênio, ou seja: $C_6H_{12}O_6$. Sendo sua massa molar igual a 180,156 g/mol e a quantidade presente no melaço 5,3 % m/m, temos que:

$$C_{TM} = 53 \frac{g}{kg} \times \frac{6 C}{180,156} \frac{mol}{g} = 1,77 C \frac{mol}{kg}$$

II. Frutose

Também possui seis átomos de carbono e considerando que a quantidade presente no melaço é de 7,66 % m/m, temos que:

$$C_{TM} = 76,6 \frac{g}{kg} \times \frac{6 C}{180,156} \frac{mol}{g} = 2,55 C \frac{mol}{kg}$$

III. Dextrana

Os cálculos seguiram as informações que uma dextrana possui 40 kDa que equivale a $6,64 \times 10^{-14}$ µg e a quantidade presente no melaço < 10 % m/m, temos que resultando em um valor próximo de zero.

IV. Amido

Sendo considerados a quantidade de 275 resíduos de D-glicopirranose (Figura 5), em média, para a composição da amilose e 1400 resíduos para a amilopectina, como cada sequência está ligada entre si através de pontes glicosídicas, perdemos, portanto, um átomo de H para formação da estrutura final, resultando em uma massa molar por resíduo equivalente a 179 g/mol.

Levando em consideração tais informações:

$$1 \text{ mol de amilose} \rightarrow 275 \text{ resíduos} \times 179 \frac{g}{mol} = 49225 \frac{g}{mol}$$

$$1 \text{ mol de amilopectina} \rightarrow 1400 \text{ resíduos} \times 179 \frac{g}{mol} = 250600 \frac{g}{mol}$$

A composição do amido consiste em 20 % de amilose, considerando 100 g de amido:

$$20 \text{ g de amilose} \times \frac{mol}{49225 \text{ g}} = 0,0004 \text{ mol de amilose}$$

$$275 \text{ resíduos} \times 6 C = 1650 C$$

$$1650 C \times 0,0004 \text{ mol de amilose} = 0,67 \text{ mol de } \frac{C}{100 \text{ g de Amido}}$$

Para a amilopectina que corresponde a 80 % da composição do amido, temos que em 100 g:

$$80 \text{ g de amilopectina} \times \frac{\text{mol}}{250600 \text{ g}} = 0,0003 \text{ mol de amilopectina}$$

$$1400 \text{ resíduos} \times 6 \text{ C} = 8400 \text{ C}$$

$$8400 \text{ C} \times 0,0003 \text{ mol de amilopectina} = 2,52 \text{ mol de } \frac{\text{C}}{100 \text{ g de Amido}}$$

De acordo com a tabela 2, a quantidade de amido presente no melaço é de 1729 % m/m e considerando a totalização de 3,19 mol de C/100 g de amido, temos que:

$$C_{TM} = 1,729 \frac{\text{g}}{\text{kg}} \times 3,19 \text{ mol de } \frac{\text{C}}{100 \text{ g de Amido}} = 0,06 \text{ mol de } \frac{\text{C}}{\text{kg}}$$

V. Sacarose

É um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose e uma de frutose, apresentando 12 átomos de carbono em sua estrutura e uma quantidade de 39,41 % m/m no melaço.

$$C_{TM} = 394,1 \frac{\text{g}}{\text{kg}} \times \frac{12 \text{ C}}{342,29} \frac{\text{mol}}{\text{g}} = 13,82 \text{ C } \frac{\text{mol}}{\text{kg}}$$

A tabela 2 apresenta um resumo da quantidade de carbono presente no melaço, em termos de mol/kg, tendo como referência os dados apresentados na tabela 1.

Tabela 2. Resumo da quantidade de carbono (mol/kg) presente no melaço de cana-de-açúcar.

Substância	% m/m	g/kg	C mol/kg
Glicose	5,3	53	1,77
Frutose	7,66	76,6	2,55
Dextrana	10	0,01	0,00
Amido	1729	1,729	0,06
Sacarose	39,41	394,1	13,82
TOTAL	-	-	18,19

Fonte: Autora, 2020.

4.2.2 CARBONO TOTAL NO MEIO DYGS

O meio DYGS modificado (RODRIGUES-NETO; MALAVOLTA-JÚNIOR; VICTOR, 1986) possui composição conforme tabela 3.

Tabela 3. Composição e especificações das substâncias presentes no meio DYGS modificado.

Substância	Fórmula	Quantidade (g/L)	Nº de C
Glicose	$C_6H_{12}O_6$	2	6
Ácido Málico	$C_4H_6O_5$	2	4
Ácido Glutâmico	$C_5H_9NO_4$	1,5	5
Peptona	-	1,5	-
Extrato de Levedura	-	2	-
Fosfato Monopotássico	KH_2PO_4	0,5	0
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,5	0
Hidróxido de Potássio	KOH	2,55	0

Fonte: Autora, 2020.

Para os cálculos da quantidade de carbono total presente no meio DYGS (CTD), utilizaram-se os componentes que apresentam maior proporção desse elemento em sua composição como a glicose, ácido málico e o ácido glutâmico, sendo assim, os cálculos foram determinados utilizando a equação 2:

$$C_{TD} = Q_D \times \frac{n_C}{MM} \quad (2)$$

Onde:

Q_D = É a quantidade do composto presente no DYGS.

n_C = É o número de Carbono presente em uma molécula.

MM = Massa molar do componente (g/mol).

I. Glicose

$$C_{TD} = 2 \frac{g}{L} \times \frac{6 C \times mol}{180,156 g} = 0,067 mol de \frac{C}{L}$$

II. Ácido Málico

$$C_{TD} = 2 \frac{g}{L} \times \frac{4 C \times mol}{134,06 g} = 0,060 mol de \frac{C}{L}$$

III. Ácido Glutâmico

$$C_{TD} = 1,5 \frac{g}{L} \times \frac{5 C \times mol}{147,11 g} = 0,051 mol de \frac{C}{L}$$

A tabela 4 apresenta um resumo da quantidade de carbono presente no meio DYGS, em termos de mol/L, tendo como referência a composição apresentada na tabela 3.

Tabela 4. Resumo da quantidade de carbono (mol/L) no meio DYGS.

Substância	g/L	C mol/L
Glicose	2	0,067
Ácido Málico	2	0,060
Ácido Glutâmico	1,5	0,051
TOTAL	-	0,177

Fonte: Autora, 2020.

Com isso, foi calculada a quantidade de melaço necessária para suprir a quantidade de carbono disponibilizada no meio DYGS, utilizando os dados fornecidos na tabela 2:

$$18,19 mol de C \rightarrow 1 kg de melaço$$

Para a composição do meio DYGS (Tabela 4):

$$0,177 mol de C \rightarrow 1 L$$

Com isso, temos que:

$$18,19 mol de C \rightarrow 1000 g de melaço$$

$$0,177 \frac{mol de C}{L} \rightarrow x$$

$$x = \frac{0,177 \frac{mol de C}{L} \times 1000g de melaço}{18,19 mol de C}$$

$$x = 9,746 \frac{g de melaço}{L}$$

Com isso, a quantidade que será utilizada para composição dos meios, que possui equivalência em termos de carbono com o meio referência (DYGS), será de 9,746 g de melaço/L.

4.3 PROCEDIMENTOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de Síntese Orgânica e Biocatálise, setor do grupo de pesquisa de Bioprodutos & Bioprocessos, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da UFPB, onde foram selecionados os isolados da coleção que seriam avaliados quanto o crescimento em meio alternativo.

O melaço foi obtido no laboratório de Bioengenharia do Centro de Tecnologia da UFPB e proveniente de usinas locais, os demais reagentes, comerciais, foram Glicose (VETEC), Peptona Bacteriológica (HIMEDIA), Extrato de Levedura, Ácido Málico, Ácido Glutâmico, Fosfato Monopotássico, Sulfato de Magnésio Heptahidratado, Hidróxido de Potássio.

O meio de cultivo referência para esse trabalho foi o DYGS – modificado (meio VII) com composição apresentada na tabela 3 e os meios alternativos seguiram composição apresentada na tabela 5, onde as fontes de carbono, magnésio e fósforo foram substituídas por melaço e, as concentrações de Peptona e Extrato de Levedura foram variadas. Após padronização dos pH para 6,0; foram autoclavados por 15 min (121 °C e 101 kPa).

Tabela 5. Composição dos meios alternativos com melaço de cana-de-açúcar (9,746 g/L).

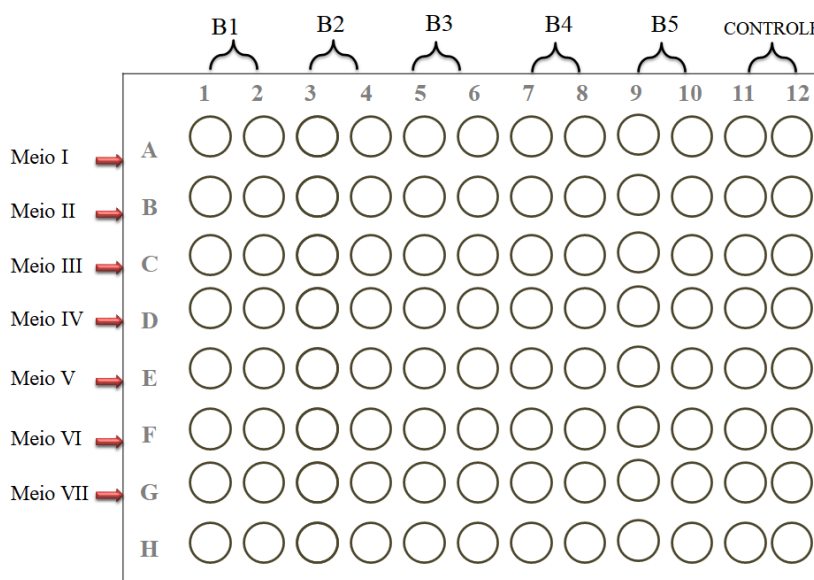
Meio	Substâncias	
	Peptona Bacteriológica (g/L)	Extrato de Levedura (g/L)
I	0	0
II	1,5	0
III	3,5	0
IV	0	2,0
V	0	3,5
VI	1,5	2,0

Fonte: Autora, 2020.

Os isolados foram selecionados conforme efeito promotor de crescimento na cana-de-açúcar em sistema de mudas pré-brotadas (MPB), dos quais foram avaliados 5 isolados (B1, B2, B3, B4 e B5).

As dinâmicas de crescimento foram realizadas em microplacas (96 poços, fundo U, VIS) e acompanhadas utilizando leitora de ELISA Thermo Scientific, Multiskan GO, auxiliado por SkanIt software - 3.2, conforme esquema da figura 10.

Figura 10. Configuração da microplaca.



Fonte: Autora, 2020.

Os isolados foram pré-inoculados em meio DYGS (25 mL) e incubados a 28 °C por 24 h em Shaker orbital (150 rpm). Após o crescimento as culturas foram padronizadas (λ_{600} , A_{500} equivale a aproximadamente 10^8 UFC/mL).

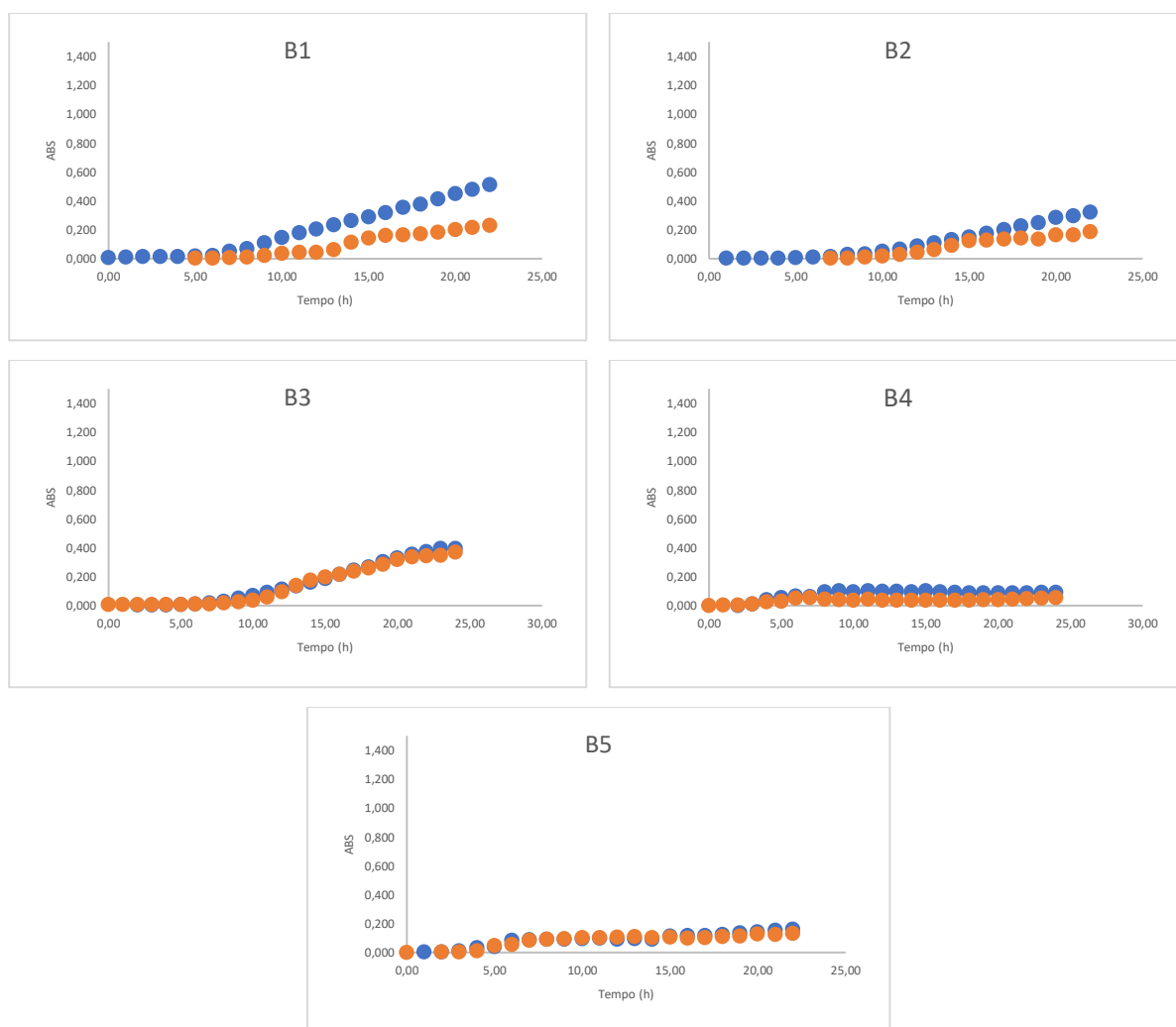
O procedimento de inoculação em microplacas, foi realizado em câmara de fluxo laminar, onde as soluções padronizadas dos isolados foram adicionadas em duplicata, 8 μ L/poço, conforme desenho experimental da figura 10, os meios avaliados foram distribuídos em reservatório para multicanal, facilitando, assim, a transferência para microplaca, 210 μ L/poço com inclusão de controle sem inoculação. Ao término desse processo, as avaliações foram iniciadas, com incubação e leituras, no ELISA (temperatura interna a 28 °C, agitação de 5s no início de cada leitura, λ_{600} , 24 h).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos foram avaliados quanto o efeito da influência da composição do meio nas dinâmicas de crescimento das bactérias. Com isso, as curvas geradas durante esse processo, em dois momentos distintos estão representadas nas figuras 11 a 17.

A figura 11 representa as dinâmicas de crescimento das bactérias no meio I (solução com melaço), onde as bactérias, B4 e B5, não apresentaram desenvolvimento satisfatório, mesmo com 24 h de incubação e, a fase “lag” foi bastante estendida chegando até 11 h para os isolados B2 e B3, podendo ser devido à falta de alguns nutrientes essenciais para o desenvolvimento celular e/ou meio de origem ser diferente do de cultivo. Alguns dos isolados (B3, B4 e B5) chegaram na fase estacionária com 24 h de cultivo, cessando ou apresentando crescimento lento.

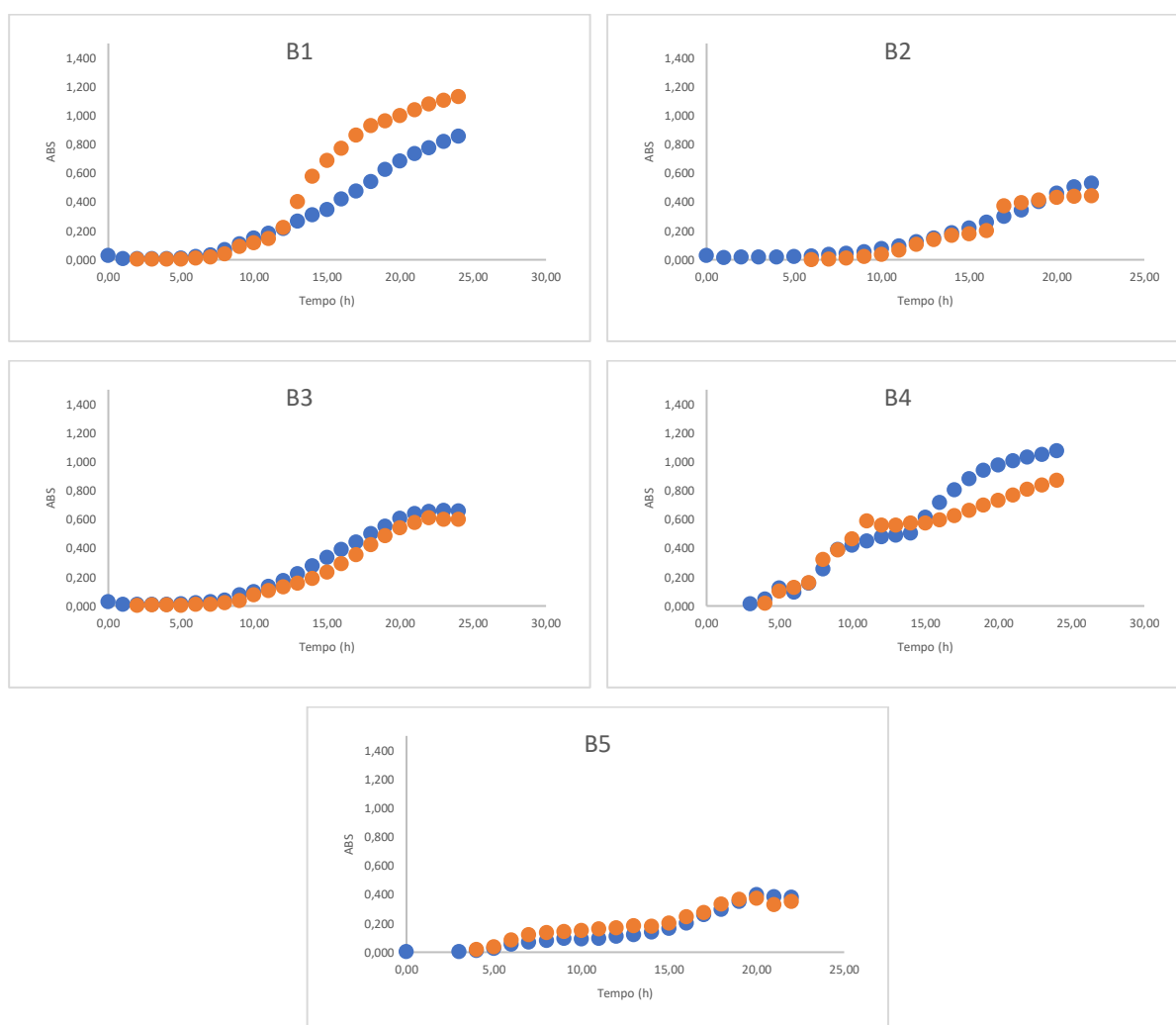
Figura 11. Dinâmica de crescimento no Meio I.



Fonte: Autora, 2020.

As dinâmicas de crescimento para o meio II (Figura 12), que contém em sua composição melaço, peptona (fonte de nitrogênio entre outros nutrientes), foram um pouco mais satisfatórias, apresentando absorvâncias superiores a 1,00 (B1 e B4), porém a fase “lag” de algumas bactérias (B1, B2 e B3) continuam estendidas, com início da fase exponencial sendo após as 10 h, aproximadamente. Alguns isolados, B1 e B4, continuaram o crescimento, não alcançando, assim, a fase estacionária mesmo com 24 h de cultivo. Os isolados que apresentaram a fase estacionária na curva de crescimento, ou seja, multiplicação lenta/ausente, com 24 h de cultivo, foram B2, B3 e B5.

Figura 12. Dinâmica de crescimento no Meio II.

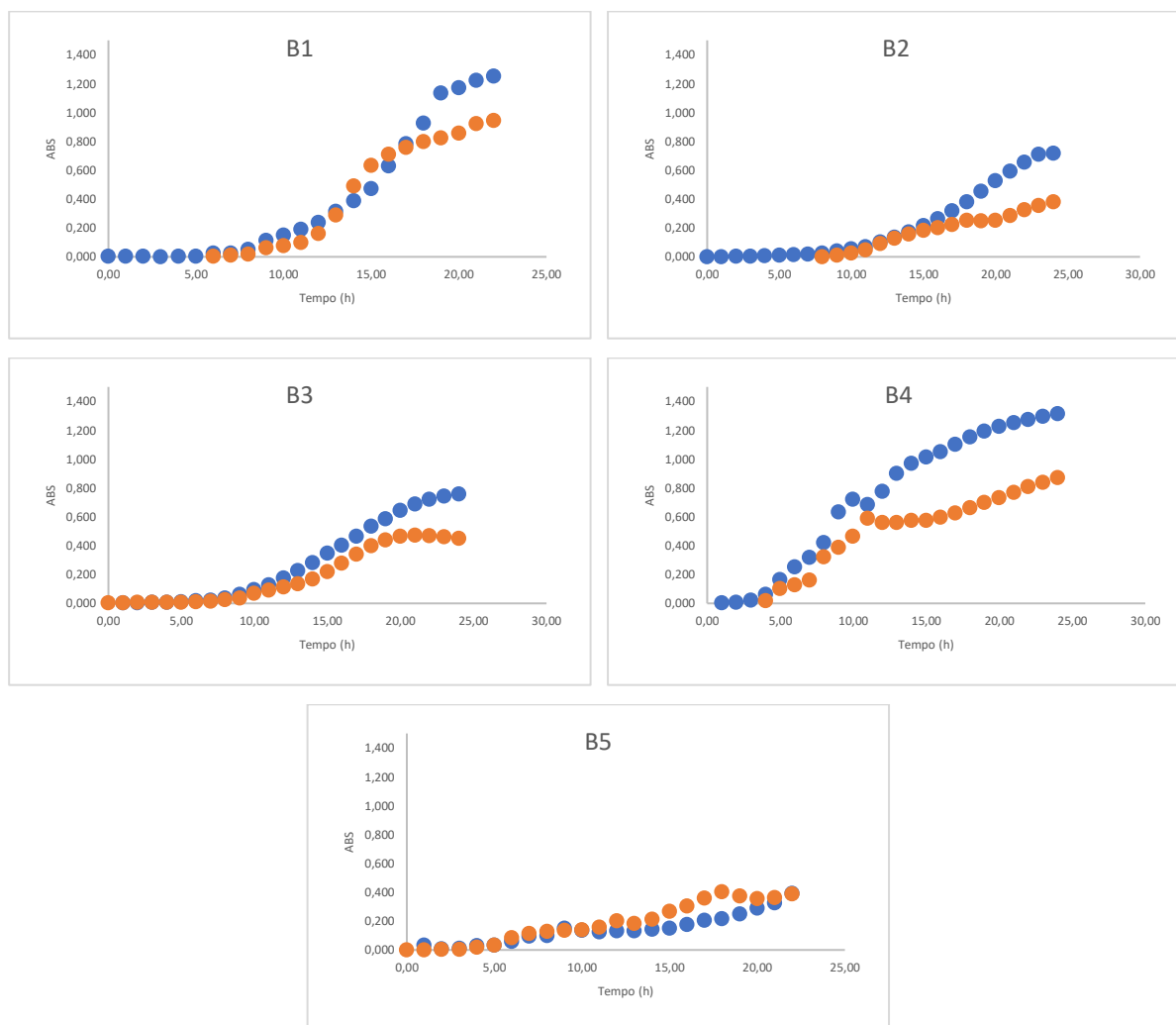


Fonte: Autora, 2020.

O meio III (Figura 13) contém em sua composição melaço e peptona (maior quantidade) e, essa quantidade nutricional pode ser uma das condições responsáveis por absorvâncias superiores a 1,20 (B1 e B4) e valores intermediários, próximos de 0,800 de absorvância com

24 h, aproximadamente, de crescimento (B2 e B3). Os isolados apresentaram a fase estacionária na curva de crescimento, ou seja, multiplicação lenta/ausente, com 24 h de cultivo.

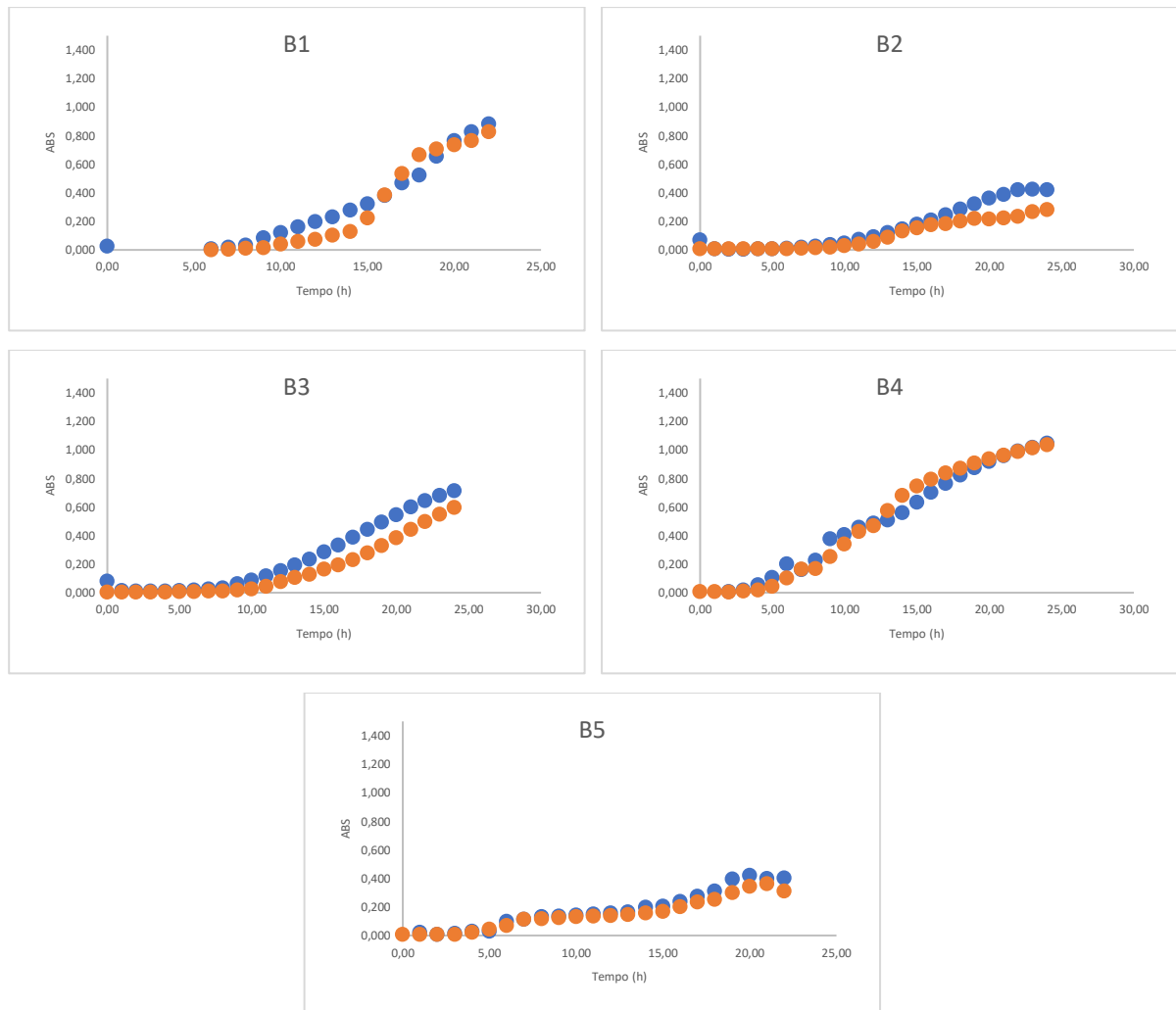
Figura 13. Dinâmica de crescimento no Meio III.



Fonte: Autora, 2020.

Os isolados crescidos no meio IV (Figura 14) que contém em sua composição melaço e extrato de levedura, tiveram valores de absorbâncias, das dinâmicas de crescimento, altos entre 0,8 e 1,00 (B1, B3 e B4), a fase “lag” do B4 é relativamente pequena, onde a fase exponencial tem início após, aproximadamente, 5 h de cultivo. Alguns isolados, B1, B3 e B4, continuaram o crescimento, não alcançando, assim, a fase estacionária mesmo com 24 h de cultivo. Os isolados que apresentaram a fase estacionária na curva de crescimento, ou seja, multiplicação lenta/ausente, com 24 h de cultivo, foram B2, e B5.

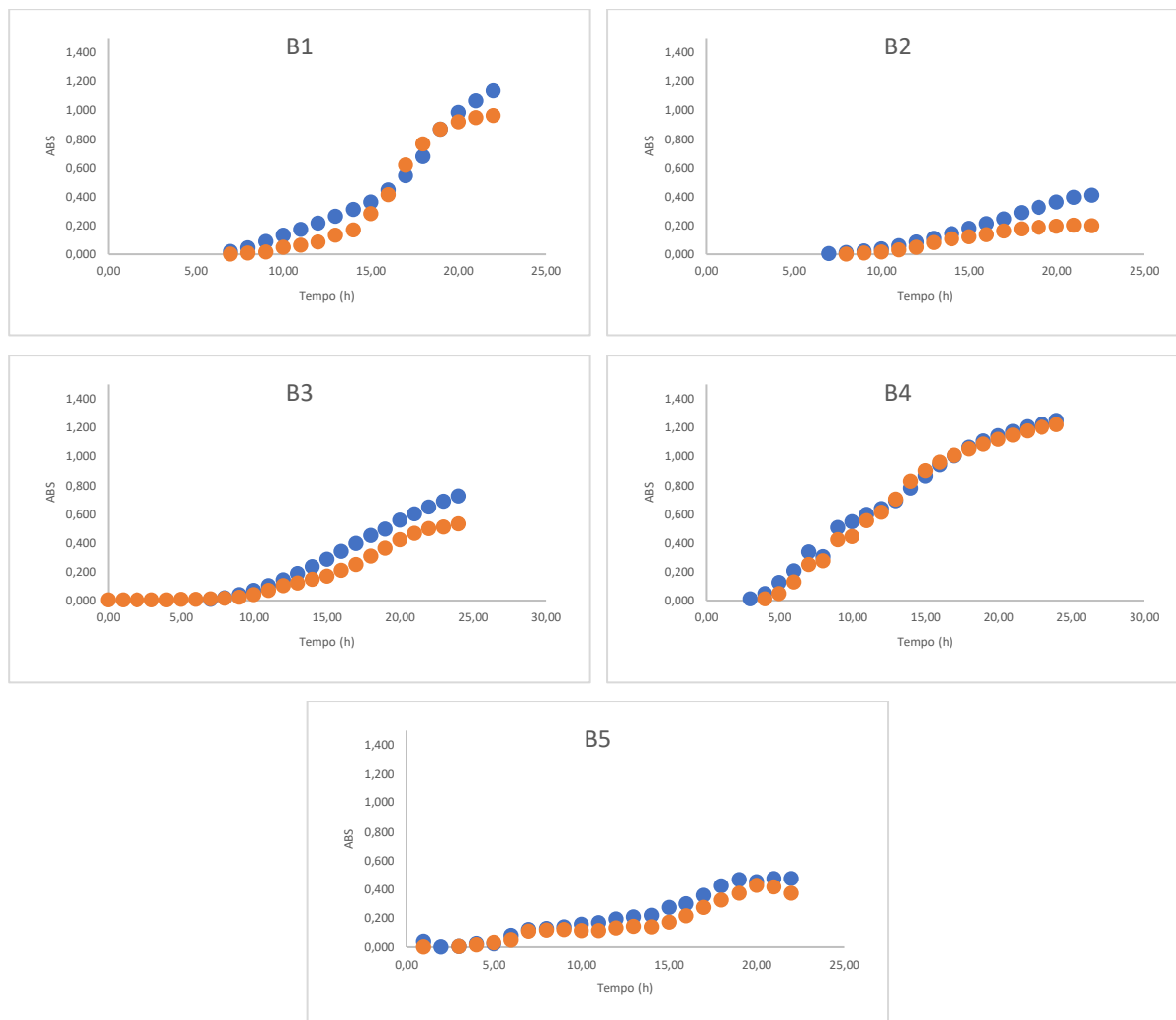
Figura 14. Dinâmica de crescimento no Meio IV.



Fonte: Autora, 2020.

As dinâmicas de crescimento para o meio V (Figura 15), que contém em sua composição melaço e extrato de levedura (maior quantidade) e, isso pode ser uma das condições responsáveis por absorvâncias superiores a 1,20 (B1 e B4) e valores intermediários, próximos de 0,800 de absorvância com 24 h, aproximadamente, de crescimento (B3). Alguns isolados, B1 e B3, continuaram o crescimento, não alcançando, assim, a fase estacionária, mesmo com 24 h de cultivo. Os isolados que apresentaram na curva de crescimento a fase estacionária ou início, ou seja, multiplicação lenta/ausente, com 24 h de cultivo, foram B2, B4 e B5.

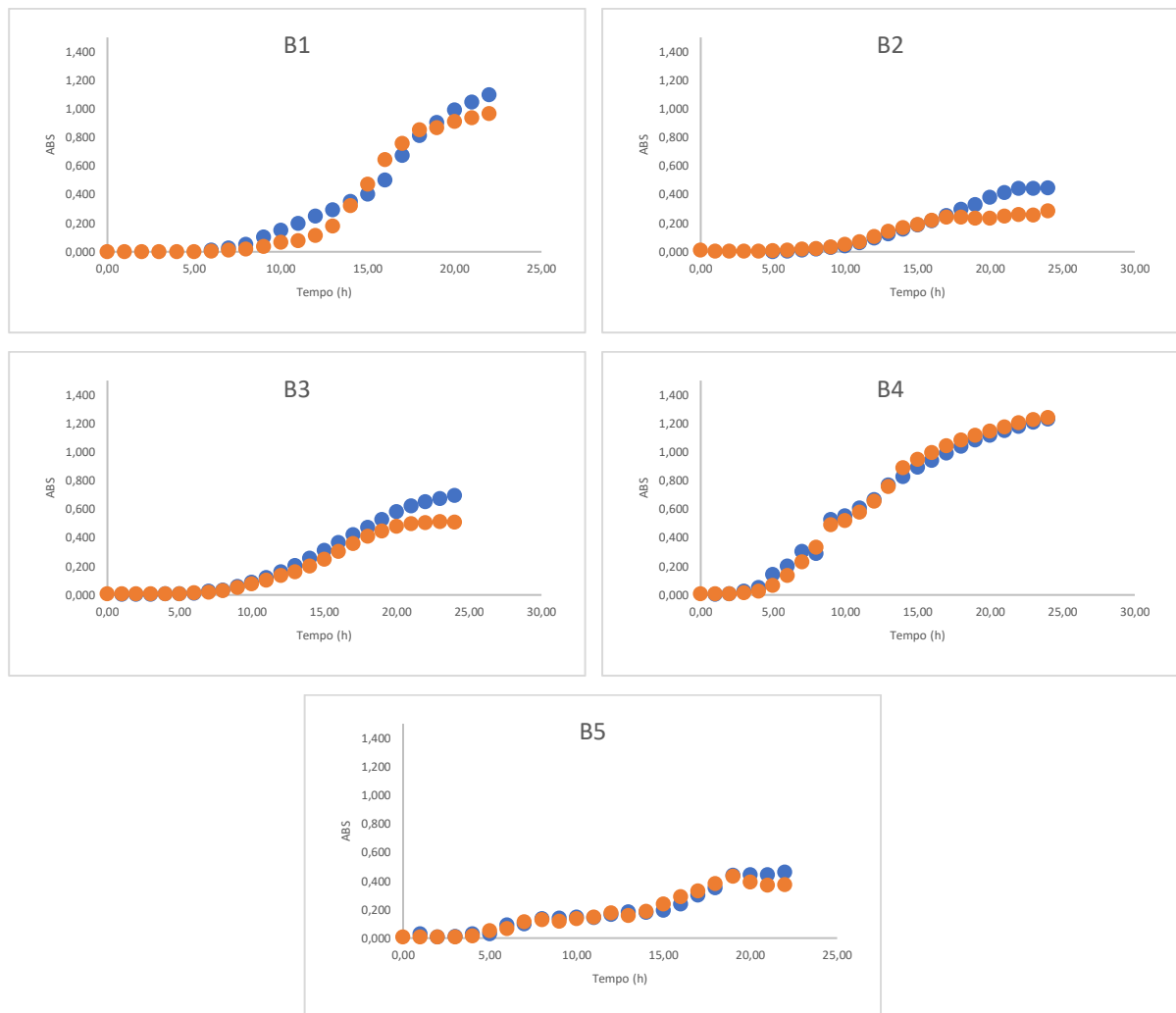
Figura 15. Dinâmica de crescimento no Meio V.



Fonte: Autora, 2020.

Os isolados que cresceram no meio VI (Figura 16), que contém em sua composição melaço, peptona e extrato de levedura, apresentaram dinâmicas de crescimento com absorvâncias superiores a 1,20 (B1 e B4), além de valores intermediários, próximos de 0,800 de absorvância com 24 h de crescimento (B3). A fase “lag” do B4 é relativamente pequena, onde a fase exponencial tem início após, aproximadamente, 5 h de cultivo. O isolado B1 continuou o crescimento não alcançando, assim, a fase estacionária, mesmo com 24 h de cultivo. Os demais isolados apresentaram a fase estacionária na curva de crescimento, ou seja, multiplicação lenta/ausente, com 24 h de cultivo.

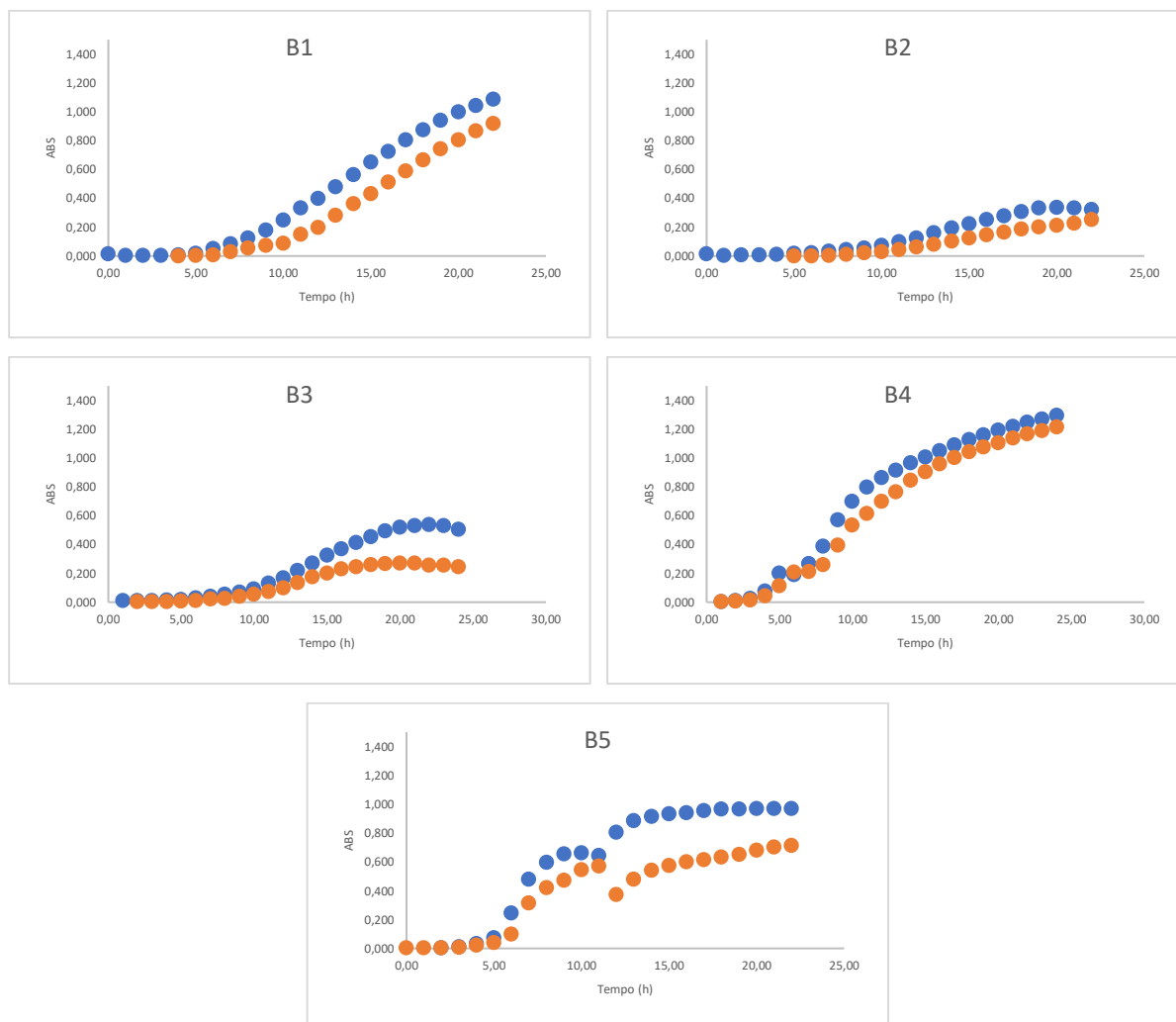
Figura 16. Dinâmica de crescimento no Meio VI.



Fonte: Autora, 2020.

Os isolados cultivados no meio de referência VII, que é o DYGS, (Figura 17), apresentaram dinâmicas de crescimento com absorbâncias superiores a 1,20 (B1 e B4). O isolado B5 com absorbância chegando a aproximadamente 1,00, nos demais meios de cultivo não teve crescimento tão expressivo. E como o meio de origem do pré-inóculo é o mesmo do cultivo, a fase “lag” de cada isolado foi relativamente pequena, onde a fase exponencial tem início após, aproximadamente, 5 h de cultivo, exceto o isolado B3 com fase “lag” se estendendo até 10 h de cultivo. O isolado B1 continua o crescimento, não alcançando a fase estacionária, mesmo com 24 h de cultivo. Os isolados que apresentaram na curva de crescimento a fase estacionária ou início, ou seja, multiplicação lenta/ausente, com 24 h de cultivo, foram B2, B4 e B5. O isolado B3, após 22 h de cultivo, começou tendência para apresentar a fase de declínio ou lise.

Figura 17. Dinâmica de crescimento no Meio VII.



Fonte: Autora, 2020.

Nos meios alternativos avaliados, alguns isolados (B1 e B4) tiveram crescimentos elevados na maioria desses substratos. Os isolados B2, B3 e B5 têm crescimento mais lento sendo que esta última se desenvolve melhor no meio DYGS (Meio VII). Os meios II, III, IV, V e VI apresentaram desempenho semelhante ao meio de referência.

A partir das curvas, as taxas de crescimento foram obtidas utilizando como parâmetros as máximas cinéticas, independentes do tempo em que foram alcançadas, tendo janela de avaliação com cinco pontos (Figura 18). Após a seleção da faixa, adicionou-se a linha de tendência com respectiva equação representativa e a cinética de crescimento como sendo a derivada dessa equação que é a taxa em função do tempo.

Então, as equações obtidas (Figura 18):

$$y = 0,1285x - 0,6091$$

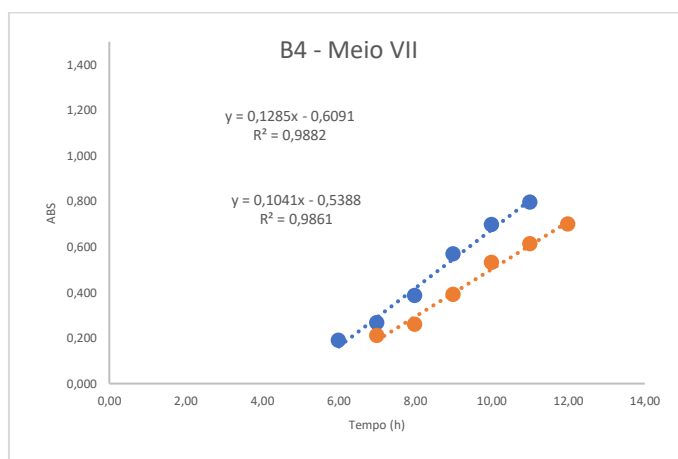
$$y = 0,1041x - 0,5388$$

E fazendo as derivadas dessas equações, temos que as taxas de crescimento serão respectivamente:

$$y' = 0,1285$$

$$y' = 0,1041$$

Figura 18. Seleção das Taxas Máximas de Crescimento.



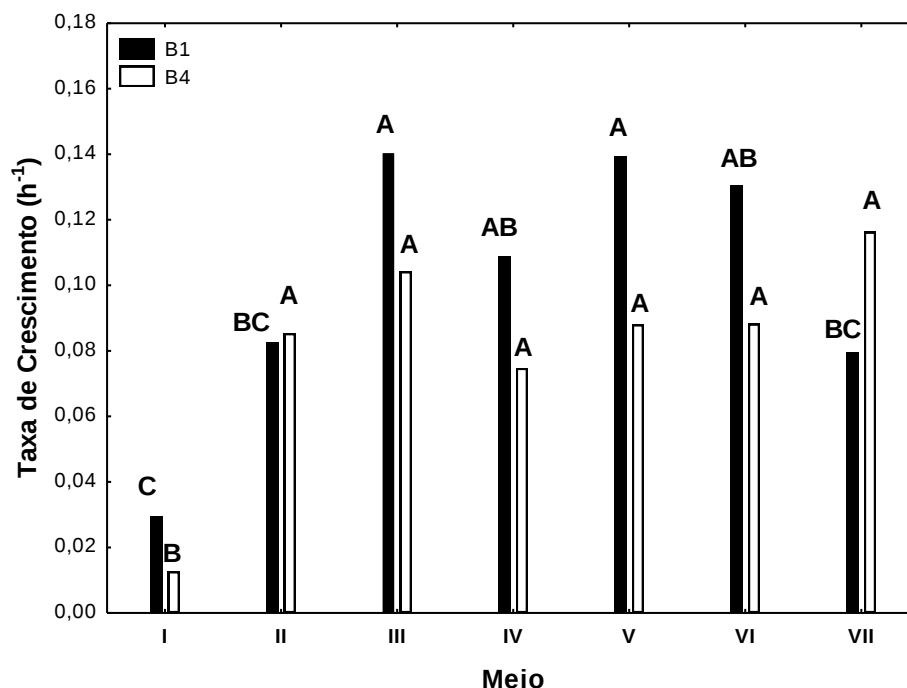
Fonte: Autora, 2020.

Esse procedimento de seleção e obtenção da taxa máxima de crescimento foi realizado para todos os isolados nos meios avaliados, onde os dados foram submetidos a ANOVA e médias comparadas por Tukey ($p \leq 0,05$).

Os isolados foram separados em grupos de acordo com as taxas de crescimento para análise dos dados, sendo B1 e B4 juntos no grupo com taxas elevadas e B2, B3 e B5 no grupo de taxas menores.

A figura 19 representa as taxas de crescimento dos isolados B1 e B4 nos meios alternativos e no de referência. Onde o isolado B1 apresentou maiores taxas de crescimento nos meios III e V, não diferenciaram significativamente das dos meios IV e VI, mas foram superiores às do meio de referência. No isolado B4, apenas o meio I que apresentou menor taxa de crescimento e os demais meios não se diferenciaram significativamente.

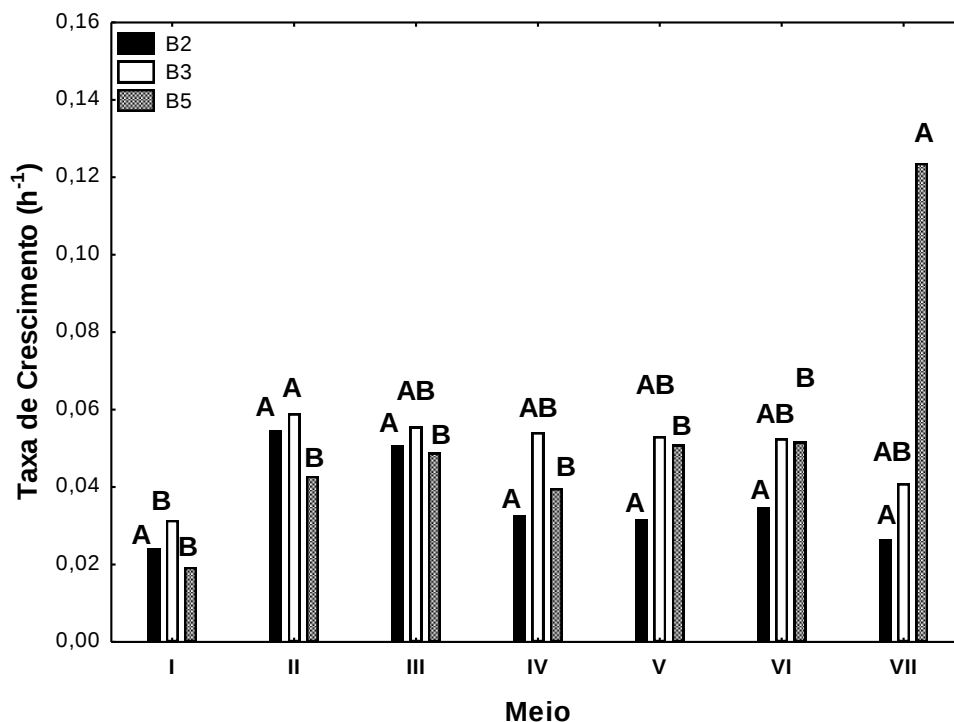
Figura 19. Taxa de Crescimento (h^{-1}) dos isolados B1 e B4 sob efeito dos meios alternativos (Meios I a VI) e meio referência DYGS (Meio VII) em microplacas fundo U (96 poços), após 24 h de cultivo (28 °C). Médias ($n = 2$) com as mesmas letras maiúsculas (efeito da composição do meio) diferem ($p < 0,05$) pelo teste de HSD Tukey.



Fonte: Autora, 2020.

A figura 20 representa as taxas de crescimento dos isolados B2, B3 e B4 nos meios alternativos e no de referência. O isolado B2 não apresentou diferenças significativas nos valores avaliados. O isolado B3 mostrou taxa de crescimento menor apenas no meio I e nos demais meios não houve diferenças significativas. O isolado B5 apresentou maiores taxas de crescimento no meio VII (referência) e não diferenciou significativamente nos demais meios.

Figura 20. Taxa de Crescimento (h^{-1}) dos isolados B2, B3 e B5 sob efeito dos meios alternativos (Meios I a VI) e meio referência DYGS (Meio VII) em microplacas fundo U (96 poços), após 24 h de cultivo (28°C). Médias ($n = 2$) com as mesmas letras maiúsculas (efeito da composição do meio) diferem ($p < 0,05$) pelo teste de HSD Tukey.



Fonte: Autora, 2020.

Nas composições avaliadas, o meio V que é formulado com subprodutos do setor sucroalcooleiro (melaço e extrato de levedura) é uma boa alternativa como opção para crescimento bacteriano imaginando a utilização do ciclo de aplicação destes isolados no cultivo de cana-de-açúcar e aproveitando substâncias desse processo.

Dentre os meios alternativos analisados e as taxas de crescimento do grupo com maiores valores, o isolado B1 nos meios III e V demonstrou taxas mais eficientes, onde foi observado valores superiores ($0,14 \text{ h}^{-1}$) ao meio referência, que é o DYGS ($0,08 \text{ h}^{-1}$). O isolado B4 teve taxas de crescimento adequadas para todos os meios avaliados ($0,08 - 0,12 \text{ h}^{-1}$) exceto no meio I ($0,01 \text{ h}^{-1}$). Villavicencio et al. (1999) obteve bons resultados quando *Lactobacillus plantarum* foi cultivado em meio com melaço enriquecido com extrato de levedura, mostrando que essa combinação propicia o crescimento de microrganismos.

Com o mesmo parâmetro, agora sendo no grupo com menores taxas de crescimento, temos que o isolado B2 não diferenciou significativamente nos meios avaliados. O isolado B3 teve taxas de crescimento adequadas para todos os meios avaliados ($\sim 0,06 \text{ h}^{-1}$) exceto no meio

I (0,03 h⁻¹). O isolado B5 só mostrou maiores taxas de crescimento no meio referência, meio VII (0,12 h⁻¹), nos demais os valores ficaram baixos (~ 0,05 h⁻¹). Cazetta et al. (2005) observaram que produções similares de biomassas de *Cândida lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Corynebacterium glutamicum* foram obtidas tanto em vinhaça quanto em melaço, mostrando a utilização desses subprodutos no meio de crescimento de vários microrganismos diferentes.

6. CONCLUSÃO

Sendo assim, alguns meios alternativos mostraram serem promissores para alguns microrganismos em sistemas de cultivo em microplacas, com resultados semelhantes ou melhores que o meio referência já bastante consolidado na literatura para crescimento de bactérias diazotróficas, caso dos meios II, III, IV, V e VI., onde a maioria dos isolados mostraram serem ajustáveis aos meios alternativos.

Seriam necessários outros experimentos para verificar o impacto na fase “lag” sendo o pré-inóculo no respectivo meio de crescimento, acréscimo de meios com composições que complementariam o delineamento proposto nesse trabalho para formação de um fatorial completo, após seleção do(s) meio(s) o sistema passaria por um aumento de escala para observar o comportamento do crescimento em processos fermentativos maiores e verificação (mantidas ou alteradas) das funções bioquímicas dos microrganismos.

7. REFERÊNCIAS

ALBERNAS, Kayo Kennedy et al. Viabilidade agrônômica da inoculação de bactérias promotoras de crescimento na cultura do milho. 2019.

AVNIMELECH, Yoram. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 176, n. 3-4, p. 227-235, 1999.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plantgrowth-promotingrhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World JournalofMicrobiologyandBiotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327-1350, 2012.

BIOSPRINGER. Extrato de Levedura. **Processo Produtivo**. [2019?]. Disponível em:<<https://biospringer.com/pt-br/processo-produtivo/>>. Acesso em: 11 de nov. de 2020.

BRINGHENTI, Lizandra; CABELLO, Claudio; URBANO, Luiz Henrique. Fermentação alcoólica de substrato amiláceo e hidrolisado enriquecido com melaço de cana. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 429-432, 2007.

CARDOSO, M. Infoescola. **Peptonas**. [2017?]. Disponível em: <<https://www.infoescola.com/bioquimica/peptonas/>>. Acesso em: 20 de nov. de 2020.

CAZETTA, Marcia Luciana; CELLIGOI, Maria Antonia Pedrine Colabone. Aproveitamento do melaço e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactéria. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 26, n. 2, p. 105-112, 2005.

CRAB, Roselien et al. Bio-flocs technology application in over-wintering of tilapia. **Aquacultural Engineering**, v. 40, n. 3, p. 105-112, 2009.

ES, MATOSP et al. Diazotrophic bacteria and substrates in the growth and nitrogen accumulation of sugarcane seedlings. **Embrapa Agrobiologia-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2020

ESTEVES, C. **Knoow.net Enciclopédia temática**. 2017. Disponível em: <<https://knoow.net/ciencterravida/biologia/frutose/>>. Acesso em: 15 de nov. de 2020.

FIORENTINI, N. M. et al. **Meio de cultura de micro-organismos à base de melaço de cana-de-açúcar**. Fundacao de Integracao, Desenvolvimento e Educacao do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – Fidene. Leão Propriedade Intelectual (LEAO). BR. 10 2013 010437 0 A2. 2015. Disponível em: <<https://www.escavador.com/patentes/53563/meio-de-cultura-de-micro-organismos-a-base-de-melaco-de-cana-de-acucar>>. Acesso em: 05 de nov. de 2020.

HUNGRIA, Mariangela et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1-2, p. 413-425, 2010.

JORNAL CANA. Com a Usina Vale do Paranaíba, moagem do Grupo Japungu supera 6 milhões de toneladas de cana. **Jornal Cana**, 2017. Disponível em: <<https://tecnoblog.net/247956/referencia-site-abnt-artigos/>>. Acesso em: 10 de out. de 2020.

Khan Academy. **Glicose como fonte de energia celular**. 2019. Disponível em: <<https://pt.khanacademy.org/science/5-ano/vida-e-evolucao-5-ano/integracao-dos-sistemas-do-corpo-humano/a/glicose-como-fonte-de-energia-celular>>. Acesso em: 05 de nov. de 2020.

LUÍS, A. et al. **Mundo da Bioquímica**. Amido. 2017. Disponível em: <<http://mundodabioquimica.blogspot.com/2017/11/o-amido-tambem-conhecido-como-amilo-e.html>>. Acesso: 15 de nov. de 2020.

Madigan, M.T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. São Paulo. Artmed, 2010.

MARIANO, Rosa de Lima Ramos et al. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 1, p. 89-111, 2013.

MARIN, F. R. Árvore do conhecimento - Cana-de-açúcar. Clima. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica**. [2015?]. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_10_711200516716.html>. Acesso em: 11 de set. de 2019.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Governo Federal**. Programa Nacional de Bioinsumos é lançado e vai impulsionar uso de recursos biológicos na agropecuária. 2020. Disponível em: < <https://www.gov.br/agricultura/pt->

br/assuntos/noticias/programa-nacional-de-bioinsumos-e-lancado-e-vai-impulsionar-uso-de-recursos-biologicos-na-agropecuaria-brasileira>. Acesso em; 10 de nov. de 2020.

MELAÇOS BRASILEIROS. Especificações Técnicas. Especificação técnica do Melaço de Cana Líquido. 2019. Disponível em: < <https://melacos.com.br/especificacoes-tecnicas>>. Acesso em: 02 de jan. de 2020.

PILLING, S. **Físico-Química Experimental II**. Universidade do Vale do Paraíba, SP. 2018. Disponível em: < https://www1.univap.br/spilling/FQE2/FQE2_EXP10_Espectrofotometria.pdf >. Acesso em 17 de nov. 2020.

RÍOS ROCAFULL, Y. et al. The culture medium effect in plant growth promotion activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in carrot and sugar beet. **Revista bio ciencias**, v. 6, 2019.

RODRIGUES, J. Sacarose – Molécula da Semana. **FCiências**. 2012. Disponível em:< <https://www.fciencias.com/2012/12/20/molecula-da-semana-sacarose-2/>>. Acesso em: 10 de nov. de 2020.

RODRIGUES-NETO, J.; MALAVOLTA, V.A.J.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopathologica**, Campinas, v.12, n.1-2, p.16. 1986.

ROSSETTO, R. et al. Árvore do conhecimento - Cana-de-açúcar. Plantio da cana-de-açúcar. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica**. [2015?]. Disponível em<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_33_711200516717.html>. Acesso em: 11 de set. de 2019.

SCHEIDT, W. et al. Optimization of culture medium and growth conditions of the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* BR11417 for its use as an agricultural inoculant using response surface methodology (RSM). **Plant and Soil**, v. 451, n. 1, p. 75-87, 2020.

SCHMIDELL, W. LIMA, U. A. AQUARONE, E. BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: volume 1: fundamentos**. Editora Edgard Blücher LTDA. São Paulo-SP, 2008.

SCHMIDELL, W. LIMA, U. A. AQUARONE, E. BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: volume 2: engenharia bioquímica**. Editora Edgard Blücher LTDA. São Paulo-SP, 2001.

SPLABOR. O que é meio de cultura?. **Blog Splabor – Equipamentos para laboratórios**. 2017. Disponível em: < <https://www.splabor.com.br/blog/meio-de-cultura-2/meio-de-cultura-identificacao-e-cultivo-de-microorganismos/>>. Acesso em: 01 de nov. de 2020.

SPOLAOR, Leandro Teodoski et al. Bactérias promotoras de crescimento associadas a adubação nitrogenada de cobertura no desempenho agrônômico de milho pipoca. **Bragantia**, v. 75, n. 1, p. 33-40, 2016.

VARGAS, André Luiz Vasconcellos et al. Análise do custo operacional da produção de ácido láctico e de lactobacillus plantarum cct 0580 utilizando melaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais (Online)**, n. 46, p. 102-116, 2017.

VILLAVICENCIO, Angel; SANT ANNA, Ernani S.; TÔRRES, Regina CO. Produção de Lactobacillus plantarum em Melaço de Cana-de-açúcar. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, n. 2, p. 0-0, 1999.