



## Avaliação de condições de cultivo de *Escherichia coli* e *Salmonella sp.* visando a produção de vacina animal

## Evaluation of cultivation conditions for *Escherichia coli* and *Salmonella sp.* aiming at animal vaccine production

Maria Alice da Silva<sup>1</sup>, Priscila Vaz de Arruda<sup>2</sup>

### RESUMO

A produção de proteína animal é muito importante no oeste do Paraná, entretanto, infecções por patógenos como *Escherichia coli* e *Salmonella sp.* podem representar desafios. Para tratar tais infecções, a vacinação animal baseada em células inativadas ou atenuadas destas bactérias tem sido estudada. No entanto, para a produção em larga escala deste bioproduto, é fundamental obter uma grande quantidade de células. Nesse sentido, esse estudo avaliou diferentes condições de cultivo para *E. coli* e *Salmonella sp.*, incluindo variações na porcentagem de *headspace* nos frascos de cultivo e a adição de glicerol, como co-substrato em diferentes concentrações. De acordo com os resultados, tanto o *headspace*, como o uso de glicerol nos meios de cultura influenciaram o crescimento microbiano. Os resultados indicaram que *headspaces* de 70% e 80% favoreceram o crescimento de *Salmonella sp.*, enquanto a *E. coli* não apresentou diferenças significativas. Além disso, para a *E. coli* verificou-se que a adição de glicerol foi dependente das concentrações testadas, atingindo-se valor máximo de 7,43 g/L com 5,0 g/L de glicerol. Comportamento oposto foi verificado para *Salmonella sp.*, uma vez que o teste ANOVA não mostrou significância em função deste parâmetro em relação às diferentes concentrações de glicerol avaliadas.

**PALAVRAS-CHAVE:** biomassa celular; *headspace*; glicerol.

### ABSTRACT

The production of animal protein is very important in western Paraná, however, infections by pathogens such as *Escherichia coli* and *Salmonella sp.* can represent challenges. To address such infections, animal vaccination based on inactivated or attenuated cells of these bacteria has been studied. Nevertheless, for large-scale production of this bioproduct, it is essential to obtain a large quantity of cells. In this regard, this study evaluated different cultivation conditions for *E. coli* and *Salmonella sp.*, including variations in the *headspace* percentage in the culture flasks and the addition of glycerol as a co-substrate at different concentrations. According to the results, both the *headspace* and the use of glycerol in the culture media influenced microbial growth. The results indicated that *headspaces* of 70% and 80% favored the growth of *Salmonella sp.*, while *E. coli* showed no significant differences. Additionally, for *E. coli*, it was observed that the addition of glycerol depended on the tested concentrations, reaching a maximum value of 7.43 g/L with 5.0 g/L of glycerol. The opposite behavior was observed for *Salmonella sp.*, as the ANOVA test showed no significance with respect to this parameter in relation to the different concentrations of glycerol evaluated.

**KEYWORDS:** cellular biomass; *headspace*; glycerol.

### INTRODUÇÃO

A produção de proteína animal é um importante fator na economia do oeste do Paraná (IBGE, 2022), assim, há uma necessidade de manter os animais livres de doenças bacterianas, como infecções por *Escherichia coli* e a *Salmonella sp.* (Quinn *et al.*, 2018). Para tratar essas infecções, estão sendo realizados estudos envolvendo vacinas bacterianas nas quais se utilizam de células atenuadas ou inativadas (Jia *et al.*, 2020; Ramis *et al.*, 2022). Nesse contexto, para produzi-las em grande escala, é fundamental a

<sup>1</sup>Bolsista CNPq. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: maria.2001@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 5019611033969320.

<sup>2</sup>Docente no Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: priscilaarruda@utfpr.edu.br. ID Lattes: 1583339937667600.



avaliação de condições de cultivo que visam otimizar o crescimento microbiano, uma vez que este depende de nutrientes adequados e condições ambientais favoráveis (Lima, 2001).

Assim, sabendo que a *E. coli* e a *Salmonella sp.* são microrganismos aeróbios, a disponibilidade de oxigênio é crucial para seu crescimento (Nikakhtari e Gordon, 2006). De acordo com Takahashi e Aoyagi, (2022), o suprimento de O<sub>2</sub> para o meio de cultura depende da sua transferência através do *headspace*, o qual é o espaço livre entre o meio de cultura e o frasco de cultivo, onde se encontra a fase gasosa.

Quanto aos nutrientes oferecidos aos microrganismos, o glicerol, um subproduto da produção de biodiesel (Asopa, Bhoi, Saariana, 2022), é uma fonte de carbono que pode ser valiosa para o cultivo bacteriano oferecendo também benefícios de osmorregulação, além de poder auxiliar no crescimento celular (Nevoigt e Stahl, 1997).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar diferentes condições de cultivo das bactérias *E. coli* e *Salmonella sp.* em frascos Erlenmeyer visando o aumento do número de células das referidas bactérias. Para isso, foi avaliado parâmetros como a porcentagem de *headspace* nos frascos Erlenmeyer e o acréscimo de glicerol, como co-substrato, em diferentes proporções no meio de cultivo.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### MICRORGANISMOS, INÓCULO E MEIO DE CULTIVO

Os microrganismos utilizados para avaliar as condições de cultivo foram cedidos pela empresa Halsa Biotecnologia Nutrição e Saúde Animal Ltda e por motivos de sigilo apenas foram descritos como *Escherichia coli*, denominado de microrganismo A (MOA) e a *Salmonella sp.* denominado de microrganismo B (MOB).

O procedimento de ativação e inoculação consistiu em cultivá-los em caldo Brain Heart Infusion (BHI) a 37 g/L por 24h em agitação de 200 rpm a 37 °C, de acordo com o protocolo da empresa que forneceu os microrganismos. Após o cultivo, as células foram centrifugadas a 3500 rpm por 10 minutos e ressuspensas em água para lavagem e retirada de qualquer fonte residual de meio, realizando-se esse procedimento por duas vezes, e por fim adicionou-se cerca de 10-20 mL de água a fim de concentrar as células obtidas.

### AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE HEADSPACE

As diferentes proporções de meio de cultivo nos frascos Erlenmeyer que proporcionou diferentes *headspace* estão apresentadas na Tabela 1. Os cultivos foram realizados em incubadora orbital shaker New Lab modelo NL 161-04 E1 por 24 h a 200 rpm a 37° C em duplicata. A concentração celular de cada uma das condições foi obtida por espectrofotômetro de bancada UV- Vis IL-0082 Kasuaki com densidade óptica (DO) de 600nm, sendo calculada através das equações das curvas padrão construídas previamente.

Tabela 1. Avaliação de diferentes condições de *headspace* durante o cultivo dos MOA e MOB.

| Condição experimental | Volume do frasco (mL) | Volume de meio de cultivo (mL) | Headspace (%) |
|-----------------------|-----------------------|--------------------------------|---------------|
| 1                     | 125                   | 62,5                           | 50%           |
| 2                     | 125                   | 50,0                           | 60%           |
| 3                     | 125                   | 37,5                           | 70%           |
| 4                     | 125                   | 25,0                           | 80%           |
| 5                     | 125                   | 12,5                           | 90%           |

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).



## AVALIAÇÃO DO GLICEROL NO MEIO DE CULTIVO

Após a determinação da condição que propiciou o melhor resultado de crescimento celular em função do *headspace*, os novos ensaios foram realizados a fim de se avaliar a adição de glicerol (PA) ao meio BHI em diferentes concentrações (g/L): 0,5; 1,0, 3,0 e 5,0. Meio controle, sem a presença de glicerol também foi avaliado. Os experimentos foram realizados em triplicata utilizando-se frascos Erlenmeyer de 125 mL com *headspace* apropriado (em função das condições que favoreceram o processo na etapa de avaliação do *headspace*) em incubadora orbital shaker New Lab modelo NL 161-04 E1 a 200 rpm por 24h a 37°C. Logo após, as concentrações celulares foram obtidas por meio de equação de curvas padrão previamente construídas.

### ANÁLISE DE RESULTADOS

A análise dos resultados foi realizada com o software Excel através da análise de variância (ANOVA) para indicar se ao menos uma condição dentre as estudadas apresentava crescimento celular médio significativamente diferente ( $p < 0,05$ ).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE HEADSPACE

As Tabelas 2 e 3 apresentam os resultados referente à avaliação do *headspace* (a) e análise de variância (b) dos cultivos dos microrganismos A e B, respectivamente.

Tabela 2 – Concentração celular média para diferentes condições avaliando o *headspace* no tempo 0h e 24h para o MOA (a) e Análise de variância dos resultados para o MOA (b)

| <i>Headspace</i> | Concentração celular média MOA (g/L) |             | <i>Fonte da variação</i> | SQ    | gl | MQ    | F     | valor-P |
|------------------|--------------------------------------|-------------|--------------------------|-------|----|-------|-------|---------|
|                  | Tempo - 0h                           | Tempo - 24h |                          |       |    |       |       |         |
| 50%              | 0,2208                               | 2,5122      | Entre condições          | 0,119 | 4  | 0,029 | 1,817 | 0,2630  |
| 60%              | 0,2208                               | 2,5666      |                          |       |    |       |       |         |
| 70%              | 0,2208                               | 2,5911      |                          |       |    |       |       |         |
| 80%              | 0,2208                               | 2,7933      | Dentro das condições     | 0,082 | 5  | 0,016 |       |         |
| 90%              | 0,2208                               | 2,4808      |                          |       |    |       |       |         |

(a)

(b) Legenda: SQ - soma dos quadrados, gl – grau de liberdade, MQ - quadrado médio, F - valor de teste F, P - valor de significância.

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

De acordo com os resultados da Tabela 2(a), verificou-se que não houve diferença significativa na concentração celular do microrganismo A durante o cultivo, uma vez que valores na faixa de 2,48 à 2,79 g/L foram observados. Isso foi confirmado pelo teste ANOVA na Tabela 2(b), que mostrou um valor de p maior que 0,05. No entanto, os maiores valores de concentração celular para este microrganismo foram observados nos *headspaces* de 80% e 70%.



Tabela 3 –Concentração celular média para diferentes condições avaliando o *headspace* no tempo 0h e 24h para o MOB (a) eAnálise de variância dos resultados para o MOB (b)

| <i>Headspace</i> | Concentração celular média MOB (g/L) |             | <i>Fonte da variação</i> | SQ    | gl | MQ    | F      | valor-P |
|------------------|--------------------------------------|-------------|--------------------------|-------|----|-------|--------|---------|
|                  | Tempo - 0h                           | Tempo - 24h |                          |       |    |       |        |         |
| 50%              | 0,3058                               | 4,1543      | Entre condições          | 2,892 | 4  | 0,723 | 33,939 | 0,0008  |
| 60%              | 0,3058                               | 4,6026      |                          |       |    |       |        |         |
| 70%              | 0,3058                               | 5,6315      |                          |       |    |       |        |         |
| 80%              | 0,3058                               | 5,3889      | Dentro das condições     | 0,106 | 5  | 0,021 |        |         |
| 90%              | 0,3058                               | 5,1538      |                          |       |    |       |        |         |

(a)

(b) Legenda: SQ- soma dos quadrados, gl – grau de liberdade, MQ - quadrado médio, F - valor de teste F, P - valor de significância.

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

No caso do microrganismo B, os resultados da Tabela 3(a) mostram uma diferença significativa, independentemente do *headspace* avaliado. O teste ANOVA na Tabela 3(b) confirmou essa diferença, com um valor de p menor que 0,05. Notavelmente, o *headspace* de 70% resultou no maior crescimento para o microrganismo em questão, atingindo 5,63 g/L, enquanto o *headspace* de 80% resultou em 5,39 g/L.

Um estudo feito por Nikakhtari e Gordon (2006) sobre a transferência de oxigênio na fase gasosa em cultivos de *Pseudomonas putida* revelou que o *headspace* de 75% proporcionou os maiores coeficientes de transferência de massa de oxigênio (kga). Tal fato pode explicar o aumento no crescimento celular observado para o microrganismo B quando os *headspaces* foram de 70% e 80%, respectivamente. Assim, o *headspace* de 70% foi selecionado para estudos subsequentes, considerando a eficiência na disponibilidade de oxigênio para os microrganismos.

### AVALIAÇÃO DO GLICEROL NO MEIO DE CULTIVO

As Tabelas 4 e 5 apresentam os resultados referente à avaliação da adição de glicerol (a) e análise de variância (b) dos cultivos dos microrganismos A e B respectivamente.

Tabela 4 –Concentração celular média para diferentes condições avaliando a adição de glicerol no tempo 0h e 24h para o MOA (a) eAnálise de variância dos resultados para o MOA (b).

| Concentração de glicerol (g/L) | Concentração celular média MOA (g/L) |             | <i>Fonte da variação</i> | SQ     | gl | MQ    | F      | valor-P |
|--------------------------------|--------------------------------------|-------------|--------------------------|--------|----|-------|--------|---------|
|                                | Tempo - 0h                           | Tempo - 24h |                          |        |    |       |        |         |
| 0                              | 0,3965                               | 5,0683      | Entre condições          | 10,665 | 4  | 2,666 | 14,736 | 0,0003  |
| 0,5                            | 0,4087                               | 5,6504      |                          |        |    |       |        |         |
| 1,0                            | 0,4241                               | 5,7934      |                          |        |    |       |        |         |
| 3,0                            | 0,4302                               | 6,7637      | Dentro das condições     | 1,809  | 10 | 0,181 |        |         |
| 5,0                            | 0,4669                               | 7,4246      |                          |        |    |       |        |         |

(a)

(b) Legenda: SQ- soma dos quadrados, gl – grau de liberdade, MQ - quadrado médio, F - valor de teste F, P - valor de significância.

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).



Tabela 5 – Concentração celular média para diferentes condições avaliando a adição de glicerol no tempo 0h e 24h para o MOB (a) e Análise de variância dos resultados para o MOB (b).

| Concentração de glicerol (g/L) | Concentração celular média MOB (g/L) |             | Fonte da variação    | SQ    | gl | MQ    | F     | valor-P |
|--------------------------------|--------------------------------------|-------------|----------------------|-------|----|-------|-------|---------|
|                                | Tempo - 0h                           | Tempo - 24h |                      |       |    |       |       |         |
| 0                              | 0,5168                               | 4,8189      | Entre condições      | 3,981 | 4  | 0,995 | 2,983 | 0,073   |
| 0,5                            | 0,5242                               | 5,2048      |                      |       |    |       |       |         |
| 1,0                            | 0,5425                               | 5,2170      |                      |       |    |       |       |         |
| 3,0                            | 0,5646                               | 5,0700      | Dentro das condições | 3,336 | 10 | 0,334 |       |         |
| 5,0                            | 0,5903                               | 3,9677      |                      |       |    |       |       |         |

(a)

(b) Legenda: SQ- soma dos quadrados, gl – grau de liberdade, MQ - quadrado médio, F - valor de teste F, P - valor de significância.

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Os resultados da Tabela 4(a) indicam uma diferença significativa na concentração celular do microrganismo A durante o cultivo, variando de 5,07 a 7,43 g/L, independentemente da concentração de glicerol adicionada. O teste ANOVA confirmou este resultado, pois obteve-se um valor de p menor que 0,05 (Tabela 4b). Além disso, a adição de glicerol no meio de cultura resultou em um aumento proporcional na concentração celular da *E. coli*, com a concentração máxima de 7,43 g/L obtida com 5,0 g/L de glicerol. Estudos anteriores também destacaram os efeitos benéficos do glicerol para *E. coli*, devido à rápida permeabilidade da membrana celular a esse composto e seus efeitos de osmorregulação (Bovell, Packer e Helgerson, 1963).

A adição de diferentes concentrações de glicerol ao meio de cultivo de *Salmonella sp.* não apresentou diferença significativa, com valores de p superiores a 0,05 (Tabela 5b). O crescimento de *Salmonella sp.* foi favorecido com 1,0 g/L de glicerol (5,22 g/L), porém, observou-se que a concentração de 5,0 g/L de glicerol resultou em sua diminuição (17,7%) em relação ao meio controle, ou seja, sem glicerol. Tal fato pode ser devido à possível interferência do glicerol na dissolubilidade de oxigênio, levando ao estresse celular devido à diminuição da sua disponibilidade, resultando em menor crescimento. Tal fenômeno foi observado em estudo similar feito por Arruda *et al.* (2005) com *Candida guilliermondii* visando a obtenção de xilitol, no qual, o efeito benéfico do glicerol nesse metabolismo também foi dependente de sua concentração.

## CONCLUSÃO

Os resultados enfatizam a importância dos parâmetros de *headspace* e glicerol no crescimento de *E. coli* e *Salmonella sp.*. *Headspaces* de 70% e 80% beneficiaram a *Salmonella sp.*, enquanto a *E. coli* não mostrou diferenças significativas nas condições testadas segundo o teste ANOVA. O glicerol favoreceu o crescimento de *E. coli* em todas as concentrações, com valor máximo em 7,43 g/L com a adição de 5,0 g/L. Já para *Salmonella sp.*, 1,0 g/L de glicerol foi a concentração que favoreceu o crescimento e observou-se que para concentrações mais altas, este co-substrato inibiu o metabolismo celular. Com tais parâmetros bem estabelecidos, sua aplicação é importante para obtenção de uma alta concentração celular, o que é essencial para a produção de vacinas bacterianas em grande escala, no qual, se utiliza da célula do microrganismo ou parte delas.



## Agradecimentos

As autoras agradecem à Universidade Tecnológica Federal do Paraná e ao Biopark Educação pela infraestrutura utilizada, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico (PIBIT) e à empresa Halsa Biotecnologia Nutrição e Saúde Animal Ltda por fornecer os microrganismos para este estudo.

## Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

ARRUDA, P. V *et al.* Efeito da concentração de glicerol na bioconversão de xilose em xilitol em hidrolisado de bagaço de cana por *Candida guilliermondii*. In: IX Encontro Latino-Americano de Iniciação Científica e V Encontro latino-Americano de Pós Graduação, 2005, São José dos Campos. **Programação e Anais de Trabalhos Completos IX INIC/V EPG - 2005**, 2005.

ASOPA, R.P.; BHOI, R.; SAARIANA, V. K. Valorization of Glycerol into Value-Added Products: A Comprehensive Review on Biochemical Route. **Bioresource Technology Reports**, v. 20, p. 101290–101290, 2022.

BOVELL, R.; PACKER, L; HELGERSON, R. Permeability of *Escherichia Coli* to Organic Compounds and Inorganic Salts Measured by Light-Scattering. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 75, p. 257–266, 1963.

Em 2021, O Rebanho Bovino Bateu Recorde e Chegou a 224,6 Milhões de cabeças. **Agência de Notícias - IBGE**, 2022. Disponível em: [agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/34983-em-2021-o-rebanho-bovino-bateu-recorde-e-chegou-a-224-6-milhoes-de-cabecas#:~:text=O%20rebanho%20de%20su%C3%ADnos%20cresceu](https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/34983-em-2021-o-rebanho-bovino-bateu-recorde-e-chegou-a-224-6-milhoes-de-cabecas#:~:text=O%20rebanho%20de%20su%C3%ADnos%20cresceu). Acesso em: 20 de julho de 2023.

JIA, S. *et al.* Challenges in Vaccinating Layer Hens against *Salmonella typhimurium*. **Vaccines**, v. 8, n. 4, 2020.

LIMA, U. A. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. Editora Blucher, 2001. E-book.

NEVOIGT, E.; STAHL, U. Osmoregulation and Glycerol Metabolism in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 231–241, 1997.

NIKAKHTARI, H.; GORDON A. H. Closure Effects on Oxygen Transfer and Aerobic Growth in Shake Flasks. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 95, n. 1, p. 15-21, 2006.

QUINN, P. J. *et al.* **Microbiologia veterinária: essencial**. 2 ed., Artmed Editora, 2018.

RAMIS, G. *et al.* Oral and Parenteral Vaccination against *Escherichia coli* in Piglets Results in Different Responses. **Animals**, v. 12, n. 20, 2022.

TAKAHASHI, M.; AOYAGI, H. Control of Carbon Dioxide Concentration in *Headspace* of Multiple Flasks Using Both Non-Electric Bellows Pump and Shaking Incubator. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 134, n. 3, p. 240-247, 2022.