

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

CAMILA KLEIN

INFLUÊNCIA DE FATORES NUTRICIONAIS
SOBRE O CRESCIMENTO DE *Streptococcus zooepidemicus*:
UM ESTUDO EXPERIMENTAL

CAXIAS DO SUL

2025

CAMILA KLEIN

**INFLUÊNCIA DE FATORES NUTRICIONAIS
SOBRE O CRESCIMENTO DE *Streptococcus zooepidemicus*:
UM ESTUDO EXPERIMENTAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como
requisito parcial à obtenção do título de bacharel em
biomedicina, da área de conhecimentos de ciências
da vida da Universidade de Caxias do Sul.
Orientadora prof. Dra. Eloane Malvessi

CAXIAS DO SUL

2025

INFLUÊNCIA DE FATORES NUTRICIONAIS SOBRE O CRESCIMENTO DE *Streptococcus zooepidemicus*: UM ESTUDO EXPERIMENTAL

Camila Klein^{*a} e Eloane Malvessi^a

^a Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, 95070-560 - Caxias do Sul – RS, Brasil.

*e-mail: cklein4@ucs.br

INFLUENCE OF NUTRITIONAL FACTORS ON THE GROWTH OF *Streptococcus zooepidemicus*: AN EXPERIMENTAL STUDY

Hyaluronic acid is an organic acid widely used in the cosmetic and pharmaceutical industries. This compound can be obtained by culturing *Streptococcus zooepidemicus*. This article evaluated the growth of *S. zooepidemicus* in different media formulations, exploring variations in glucose concentration (5, 10, 20, and 30 g L) and the effects of media supplementation with nutrient salt solution. Cell growth, glucose consumption, and pH were analyzed as a function of cultivation time. The higher results of growth were attained using N20 synthetic medium (supplemented) and S20 medium (unsupplemented), of 1.43 and 1.35 g L, respectively, both containing 20 g L of glucose, in 48 hours of cultivation. Considering N30 synthetic medium (supplemented), cell biomass of 1.26 g L was also quantified at 48 hours. The cultivations carried out with lower glucose concentration, S5 and S10, showed cell growth of 0.98 g L and 1.0 g L, respectively, in 48 hours of process. These results suggest that intermediate glucose concentrations (20 g L) and supplementation with mineral salts favored bacterial growth in synthetic medium. The acidification observed in all of conditions indicates a possible metabolic shift toward organic acids production, indicating the importance of further analysis.

Keywords: *Streptococcus zooepidemicus*; Nutritional Factors; Hyaluronic acid.

INTRODUÇÃO

A produção de insumos industriais por agentes microbianos vem ganhando foco nos últimos anos. Os microrganismos, dependendo das rotas metabólicas, secretam tipos distintos de compostos biologicamente ativos e de alto valor agregado para a indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética.¹ Além de serem alternativas à extração animal ou síntese química, os processos microbianos são passíveis de aumento de escala, também em função da fácil adaptação dos microrganismos e do reduzido impacto ambiental. Adicionalmente, e na maioria das vezes, conferem vantagens econômicas no contexto geral da cadeia produtiva.²

O ácido hialurônico (AH) consiste em um ácido orgânico que, devido às propriedades hidratantes e umectantes, tem sido adicionado em formulações cosméticas e farmacêuticas.³ A primeira fonte de obtenção do hialurônico comercial foi a extração animal de AH de fontes como cristas de galo e humor vítreo bovino^{4,5}. A extração animal foi reduzida gradativamente a partir da década de 80, em decorrência de observações relativas à produção espontânea, por bactérias do gênero *Streptococcus*.⁶ A rota fermentativa com o emprego de *S. zooepidemicus*, bactéria Gram-positiva, beta-hemolítica que pertence ao grupo C de Lancefield, consiste em uma das principais estratégias utilizadas para a produção de AH. O AH sintetizado pela população bacteriana é extravasado para o meio de cultivo, podendo ser posteriormente recuperado.⁷ Assim como em *Streptococcus* dos grupos A e C de Lancefield, o AH é sintetizado como cápsula extracelular, um fator de virulência que garante proteção contra a fagocitose durante infecções.⁸

A produção de ácidos orgânicos e outros metabólitos por microrganismos é dependente de diversos fatores e, dentre estes, da composição de meios de cultivo. Componentes como a fonte de carbono, nitrogênio e sais minerais influenciam diretamente o crescimento microbiano e a obtenção da substância de interesse.⁸ A glicose é considerada a fonte de carbono mais utilizada em cultivos de *S.*

zooepidemicus, sendo necessária para a multiplicação celular e é essencial para a via de biossíntese de AH. Todavia, em altas concentrações, a glicose pode exercer efeito inibitório sob o crescimento bacteriano.¹¹ Assim, o meio de cultivo deve apresentar uma composição nutricional que atenda às exigências nutricionais, ou seja, que favoreça o crescimento bacteriano, mas também favoreça a biossíntese do metabólito de interesse.⁴

Neste contexto, se torna necessária a avaliação do efeito de diferentes composições de meios de cultivo, assim como a variação da concentração de glicose, sobre o metabolismo bacteriano. Este estudo teve como objetivo avaliar a influência de diferentes formulações de meio de cultivo sobre o metabolismo de *S. zooepidemicus*, com a identificação das condições de processo que favorecem o crescimento bacteriano.

PARTE EXPERIMENTAL

Microrganismo e inóculo

Foi utilizada a bactéria *Streptococcus zooepidemicus* (ATCC 39900), a qual foi mantida em Ágar Brain Heart Infusion (BHI), a 4°C. Para obtenção do inóculo, duas alçadas da cultura estoque foram transferidas para placas contendo meio BHI. As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 24 horas.

Meios de cultivo

O meio de cultivo sintético (denominado S) foi formulado com sais minerais, glicose e fonte de nitrogênio orgânica, conforme descrito por Silva *et al.* (2021), contendo (g L): extrato de levedura 7,5; KH₂PO₄ 0,5; K₂HPO₄ 0,5; MgSO₄ 0,5; (NH₄)₂SO₄ 0,5. A concentração da fonte de carbono foi

avaliada na concentração de 10, 20 e 30 g L. Além disso, o meio de cultivo sintético utilizado nos ensaios foi comparado com um meio sintético suplementado com uma solução de nutrientes (denominado N), composta por MgSO_4 0,3 g L, FeSO_4 0,044 g L, ZnSO_4 0,00765 g L, MnSO_4 0,0055 g L e CaCl_2 0,0088 g, descrito por Folle *et al* (2023). O caldo comercial Brain Heart Infusion (BHI, Kasvi) utilizado como controle (denominado B), continha infusão de coração suíno 10 g L, peptona de gelatina 10 g L, infusão de cérebro suíno 7,5 g L, cloreto de sódio 5 g L, fosfato dissódico 2,5 g L e dextrose 2 g L. O valor de pH inicial dos meios foi ajustado para 7,0 por meio da adição de solução de NaOH 1 mol L ou HCl 2 mol L.

Os meios de cultivo e a solução de glicose foram preparados separadamente e esterilizados em autoclave a 1 atm, por 15 minutos. Posteriormente, a partir da solução concentrada de glicose (300 g L), volumes correspondentes foram adicionados, assepticamente, em capela de fluxo laminar, de modo a obter a concentração final de glicose definida para cada meio. As especificações de cada meio de cultivo estão descritas na Tabela 1.

[TABELA 1]

Processo fermentativo

Os cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio, cobertos com uma fina manta de algodão hidrófobo e gaze. O preparo dos meios e adição do inóculo foi realizada assepticamente. Duas alçadas de uma cultura de *S. zooepidemicus* previamente crescida em ágar BHI foram transferidas para os frascos contendo meio de cultivo. Os frascos foram incubados a 37°C, em agitador orbital a 250 rpm (Certomat U, Sartorius). A amostragem foi feita com os frascos sendo retirados na íntegra (frascos destrutivos) em 24 e 48 horas de cultivo, em

duplicatas. Em 24 horas de cultivo, CaCO_3 foi adicionado aos meios, conforme necessário, com o objetivo de ajustar o pH para valor aproximado ao valor inicial.

Métodos analíticos

Nos diferentes cultivos foram avaliados a concentração celular, a concentração da fonte de carbono e o perfil de pH em função do tempo de processo. A concentração celular foi quantificada por medidas de absorbância de suspensões diluídas do meio fermentado, a 690 nm, em espectrofotômetro (T80+ UV/VIS Spectrometer, PG Instruments Ltda). A conversão em concentração, massa de matéria seca por unidade de volume (g L), foi realizada por gravimetria. A quantificação de glicose foi realizada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), usado para a determinação de açúcares redutores (Miller, 1959). Os valores de pH durante o cultivo foram medidos utilizando pHmetro (Provitec modelo DosaTronic 2900). As análises foram realizadas em triplicata, e os resultados demonstrados em média e desvio padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de acompanhar o perfil metabólico bacteriano e avaliar estratégias de otimização do crescimento celular de *S. zooepidemicus*, distintas composições de meios de cultivo foram testadas, que envolveram o uso de meios sintéticos e caldo comercial, com diferentes concentrações de glicose e, ainda, o efeito da suplementação de sais minerais. Importante salientar que o caldo BHI é um meio rico em nutrientes, empregado no cultivo de organismos fastidiosos, como *S. zooepidemicus*.¹⁰ Porém, visando um processo livre de insumos animais, avaliaram-se meios formulados com sais minerais e glicose. Nesta etapa, a concentração de glicose dos meios foi

ajustada para 5 g L (B5 e S5) e, como controle, utilizou-se o meio BHI isento de glicose complementar (B2).

Os resultados preliminares, apresentados na Tabela 2, indicam o melhor desenvolvimento celular em meio comercial BHI, independente da concentração de glicose no meio (B2 e B5), quando comparado com o meio sintético (S5). Observa-se que, ao final do cultivo S5, em 48 horas, foi atingido 0,98 g L de biomassa celular, enquanto valores de 1,6 e 2,2 g L foram alcançados para B2 e B5, respectivamente, também em 48 horas de processo.

Microrganismos fastidiosos, tal como *S. zooepidemicus*, tem exigências nutricionais complexas, assim, o menor crescimento observado (S5) pode ser resultado da menor disponibilidade de fontes de nitrogênio, vitaminas ou aminoácidos que, por outro lado, podem ser naturalmente presentes no meio comercial através da infusão dos órgãos viscerais suínos. Assim, os ensaios subsequentes focaram na observação do metabolismo celular quando há o aumento da disponibilidade de nutrientes. Para isso, além da maior disponibilidade de glicose, explorou-se uma solução suplementar de sais minerais utilizada para cultivos fermentativos de *Paenibacillus*, com o intuito de melhorar a taxa de crescimento e a utilização da glicose presente no meio.⁹

[TABELA 2]

Deste modo, com o intuito de otimizar o crescimento, em um segundo momento, diferentes concentrações da fonte de carbono - 10, 20 e 30 g L de glicose - foram empregadas. Adicionalmente, a utilização de uma solução complementar de sais minerais e sua influência sobre o consumo de glicose e crescimento celular também foi avaliada. Os resultados são apresentados na Figura 1.

[FIGURA 1]

Nos cultivos S10, S20 e S30, formulados com meio sintético, observou-se o impacto da variação da concentração de glicose quando na ausência da solução nutricional complementar no meio. Como observado na Figura 1A, de modo geral, em 24 horas de cultivo, baixos níveis de consumo de glicose foram observados, indicando que o tempo usualmente adotado no cultivo – também descrito na literatura - pode não ser suficiente, sobretudo em cultivos voltados à obtenção de ácido hialurônico, visto que a glicose é a principal molécula precursora na síntese de AH por *S. zooepidemicus*.³ Além disso, nos cultivos com 20 e 30 g L de glicose (S20 e S30) quantidades relevantes (9,09 e 11,8 g L, respectivamente) de glicose residual foram quantificadas em 48 horas de cultivo (Figura 1B). Esses valores representam que 45% (S20) e 43% (S30) da glicose inicialmente disponibilizada não foi metabolizada pela população microbiana.

O maior crescimento foi identificado no cultivo S20, de 1,35 g L em contraste com S10, de 1,0 g L, o que pode estar associado, no último caso, à limitação energética em função da baixa concentração da fonte de carbono, tal como observado no cultivo S5 (Figura 1C). Por outro lado, em S30, que continha a maior concentração de glicose (30 g L), menor crescimento foi identificado entre todos os cultivos, de 0,6 g L e com residual de glicose de 11,8 g L em 48 horas de processo (Figura 1D).

Mashitah e Shoparwe (2010) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de glicose (10 a 60 g L) sobre o crescimento e produção de AH em processo fermentativo de *S. zooepidemicus*. Os autores relatam a tolerância bacteriana em até 40 g L de glicose no meio e inibição do crescimento celular em concentrações superiores, o que poderia estar relacionado ao lactato formado como resultado do catabolismo de glicose.¹¹ Sendo assim, os resultados obtidos no cultivo S30 podem ter sido decorrentes de desvios das rotas metabólicas para a produção de lactato, sendo esta influenciada pela maior concentração inicial de glicose e/ou outros parâmetros operacionais não controlados ao decorrer do cultivo, como a disponibilidade de oxigênio e o pH.

Estes resultados sugerem que concentração intermediária de glicose favoreceria a atividade metabólica de *S. zooepidemicus* e que apenas a elevação da concentração de substrato no meio não garantiria o maior consumo e otimização dos cultivos. Esta limitação de consumo de açúcar pode estar relacionado à possível carência de nutrientes no meio sintético. Diante disso, solução suplementar de sais minerais foi adicionada aos meios no intuito de aumentar a eficiência na utilização da glicose presente no meio e a conversão desta em biomassa celular, em particular nos cultivos N20 e N30, com o uso de 20 e 30 g L de glicose, respectivamente.

Como também observado, e de forma comparativa na Figura 1C e Figura 1D, o melhor desempenho, quando avaliado o consumo de açúcar no decorrer do tempo de cultivo, foi atingido no cultivo N20. Em 24 horas, cerca de 68% do açúcar inicial foi consumido. Finalizado o processo fermentativo, o residual de glicose foi de 3 g L de glicose (Figura 1C). Consequentemente, quando comparado às amostras anteriores, este meio também favoreceu o desempenho bacteriano em termos de crescimento (1,43 g L). No meio N30, a adição dos sais favoreceu o crescimento bacteriano, após 48 horas de incubação, 1,26 g L de biomassa foi atingido, representando aumento do crescimento de 52% quando comparado a S30, que obteve 0,6 g L de biomassa no mesmo período (Figura 1D).

A adição da solução suplementar de sais minerais teve efeito positivo em relação ao crescimento e consumo de açúcar, o que pode estar relacionado à disponibilidade de íons ou cofatores que favoreceriam as vias metabólicas bacterianas. Além de estimular o crescimento, essa estratégia pode também favorecer a biossíntese de AH, uma vez que a suplementação com cofatores (como o magnésio) é uma abordagem relatada na literatura em cultivos de *S. zooepidemicus* para a maximização da produção de AH.³

Todavia, mesmo com a suplementação de nutrientes e suposta melhoria na metabolização de glicose disponível no meio, no cultivo em que foi usado caldo BHI, isento de adição de glicose, foi obtido o

melhor resultado no que tange ao crescimento de *S. zooepidemicus* em 48 horas de cultivo (Figura 1D). Levando em consideração que o caldo BHI possui em sua composição 2 g L de glicose, acredita-se que uma parte da glicose presente nos meios sintéticos seja desviada para outras rotas metabólicas realizadas por *S. zooepidemicus*, como por exemplo, a produção de ácidos orgânicos, sendo mais frequentemente identificados, além de ácido hialurônico, ácido lático e ácido acético nestas fermentações.¹²

Inicialmente, o pH de todos os cultivos foi ajustado para 7,0 e o monitoramento do perfil de pH foi feito em 24 e 48 horas de cultivo, conforme apresentado na Tabela 3.

[TABELA 3]

Como observado na Tabela 3, na primeira amostragem, em 24 horas, foi observada a acidificação dos meios nos quais foi usado glicose quando comparada ao cultivo controle, que possui 2 g L de glicose em sua composição (B2). Os valores mais baixos foram observados nas amostras S20 e N20, de pH 4,38 e 4,33, respectivamente, o que coincide com o maior consumo de glicose nos meios no período de processo (Figura 1). Após a amostragem de 24 horas, CaCO_3 foi adicionado aos meios com o intuito de minimizar a variação de pH do meio, no intuito de evitar excessos em termos de acidificação a ponto de impactar o metabolismo celular. Esta tendência de valores ácidos de pH foi novamente observada em 48 h, sobretudo nos cultivos com 20 e 30 g L de glicose inicial. Em contraste, no meio controle B2, em que não houve adição de glicose e nos cultivos com menor concentração de fonte de carbono adicionada (B5 e S10) foram observadas tendências de pH alcalino (Tabela 3).

De forma geral, mesmo não sendo realizada a etapa de quantificação dos produtos, os resultados aqui apresentados sugerem a probabilidade de ter ocorrido a conversão da glicose livre em ácido

hialurônico ou, ainda, em outros ácidos orgânicos (lactato e acetato), provenientes do metabolismo bacteriano.

CONCLUSÕES

Neste estudo, foi observado o impacto de fatores nutricionais em meios sintéticos sobre o crescimento de *S. zooepidemicus*. Deste modo, a partir dos resultados obtidos, nota-se que concentrações intermediárias de glicose (20 g L) favorecem o crescimento celular e também o maior consumo de substrato do meio quando comparadas o emprego de concentrações superiores de glicose (30 g L). A suplementação de sais também teve impacto positivo, favorecendo o crescimento celular e o consumo de açúcar. No meio controle, caldo comercial BHI, maior crescimento celular foi identificado, mesmo isento de complementação de glicose, sugerindo que esta fonte de carbono pode ser necessária para o metabolismo celular em baixas concentrações. Supõem-se, preliminarmente, que a glicose contida no meio sintético possa ser parcialmente desviada para produção de ácidos, tendo em vista a acidificação dos meios, sobretudo quando observado o maior consumo de glicose. Neste sentido, são imprescindíveis os estudos para a devida identificação e quantificação de ácido hialurônico e outros ácidos orgânicos nos cultivos.

AGRADECIMENTOS

A autora agradece a toda a equipe do Laboratório de Bioprocessos da Universidade de Caxias do Sul pela dedicação, disponibilidade e valiosas contribuições ao longo deste trabalho. Agradecimentos especiais a Dra. S. Carra. e Profa. Dra. E. Malvessi, minha orientadora, cujos ensinamentos, apoio e orientação foram peça-chave no desenvolvimento do trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Ucm, R.; Aem, M.; Lhb, Z.; Kumar, V.; Taherzadeh, M. J.; Garlapati, V. K.; Chandel, A. K.; *Bioengineered* **2022**, *13*, 9645. [<https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2057760>]
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35436410>
2. Gupta, P. L.; Rajput, M.; Oza, T.; Trivedi, U.; Sanghvi, G.; *Nat Prod Bioprospect* **2019**, *9*, 267.
[<https://doi.org/10.1007/s13659-019-0215-0>]
3. Iaconisi, G. N.; Lunetti, P.; Gallo, N.; Cappello, A. R.; Fiermonte, G.; Dolce, V.; Capobianco, L.; *Int J Mol Sci* **2023**, *24*, [<https://doi.org/10.3390/ijms241210296>]
4. Da Rosa, C. S.; Tovar, A. F.; Mourão, P.; Pereira, R.; Barreto, P.; Beirão, L. H.; **2012**, 1682.
5. Callejas-Quijada Graciela; Chávez, J. J. E.; Lozada, G. C.; Marroquín Alejandra Xóchitl Pérez; Álvarez, G. A.; *Polymers (Basel)* **2023**, *15*, [<https://doi.org/10.3390/polym15163473>]
6. Rigo, D.; da Silva, L. M.; Fischer, B.; Colet, R.; Dallago, R. M.; Zeni, J.; *Biointerface Res Appl Chem* **2023**, *13*, [<https://doi.org/10.33263/BRIAC133.211>]
7. Pan, N. C.; Vignoli, J. A.; Baldo, C.; Celligoi, M. A. P. C.; *BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports* **2013**, *2*, 42. [<https://doi.org/10.5433/2316-5200.2013v2n4p42>]
8. Meirelles Da Silva, L.; Rigo, D.; Dallago, R. M.; Zeni, J.; *PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS ATCC 39920 EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA* Santo Ângelo, 2021.
9. Folle, A. B.; de Souza, B. C.; Reginatto, C.; Carra, S.; da Silveira, M. M.; Malvessi, E.; Dillon, A. J. P.; *Arch Microbiol* **2023**, *205*, [<https://doi.org/10.1007/s00203-023-03521-z>]
10. ALI, J.; Joshi, M.; Ahmadi, A.; Strætkvern, K.O.; Ahmad, R.; F1000Research, **2023**, *12*, 131
[10.12688/f1000research.129668.2]
11. Mashitah, D. M., Shoparwe F. N. *Biochemical Engineering Journal*, **2010**, *49*,
[<https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.12.001>]
12. Pan, N. C., Biz, G., Baldo C., Celligio, M.. *Acta Scientiarum - Technology*, **2020**, *42*, 1.

TABELAS

Tabela 1. *Composição dos meios usados nos cultivos de Streptococcus zooepidemicus*

Meios de cultivo	B2	B5	S5	S10	S20	N20	S30	N30
Glicose	2 g L	5 g L	5 g L	10 g L	20 g L	20 g L	30 g L	30 g L
Extrato de levedura	Ausente	Ausente	7,5 g L	7,5 g L	7,5 g L	7,5 g L	7,5 g L	7,5 g L
Sais nutrientes	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
Solução nutriente complementar	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Presente

B: caldo BHI;

S: meio sintético; contendo em g L: extrato de levedura 7,5; KH_2PO_4 0,5; K_2HPO_4 0,5; MgSO_4 0,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5.

N: meio sintético com adição de solução complementar de sais minerais.

Tabela 2. *Comparação de crescimento e de consumo de glicose em cultivos de Streptococcus zooepidemicus em meios com distintas composições*

Amostra	Glicose (g L)		Células (g L)	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
B2	0	0	1,21	1,60
B5	0,84	0,59	1,23	2,20
S5	0,78	0,16	0,86	0,98

B: caldo BHI;

S: meio sintético; contendo em g L: extrato de levedura 7,5; KH_2PO_4 0,5; K_2HPO_4 0,5; MgSO_4 0,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5.

Tabela 3. *Perfil de pH do cultivo de Streptococcus zooepidemicus em função do tempo*

Amostra	pH	
	24 horas	48 horas
B2	8,14	9,30
B5	5,60	8,70
S5	5,10	8,60
S10	5,56	6,30
S20	4,38	5,33
S30	5,21	5,59
N20	4,33	5,00
N30	5,20	5,30

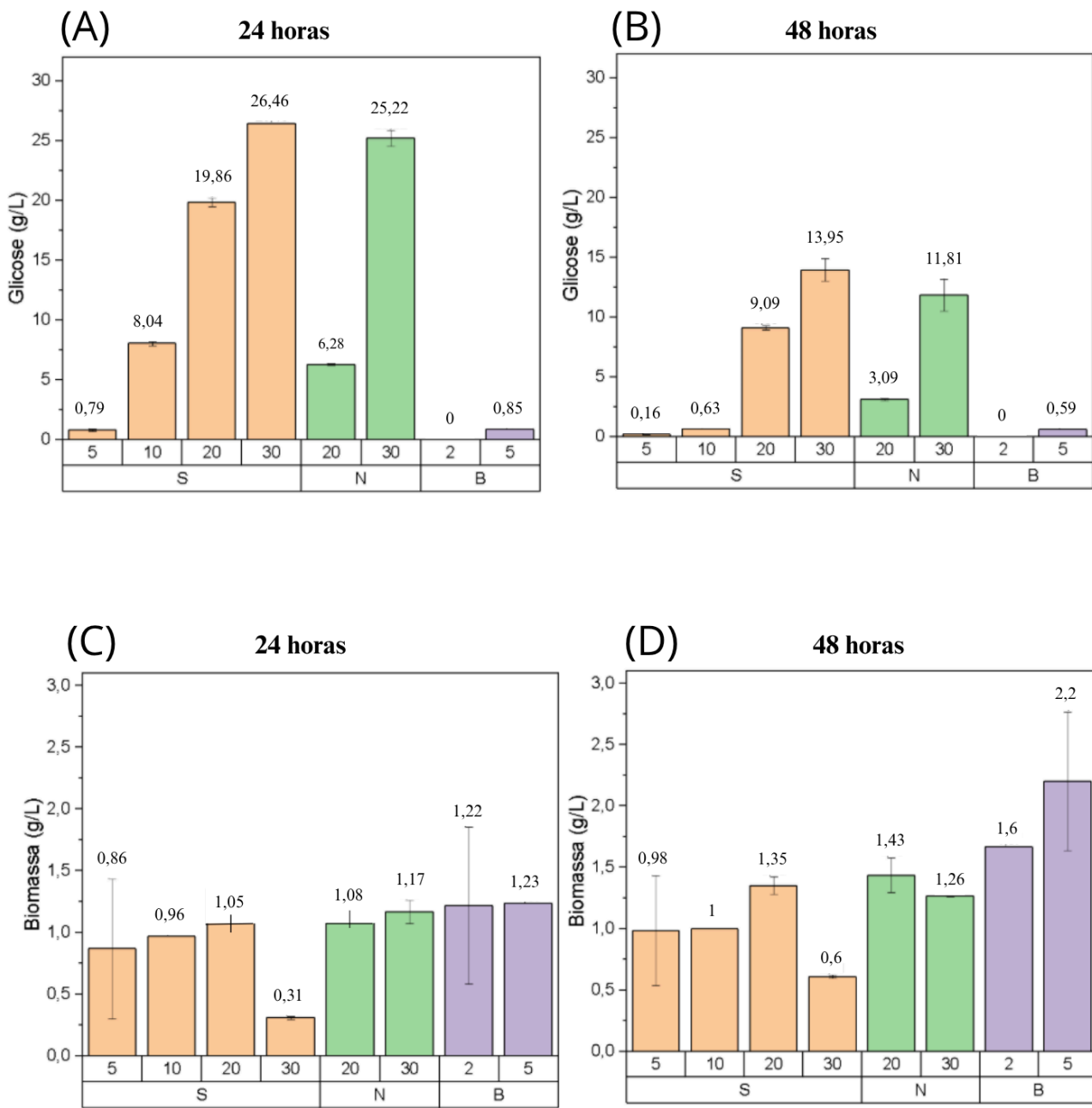
B: caldo BHI;

S: meio sintético; contendo em g L: extrato de levedura 7,5; KH_2PO_4 0,5; K_2HPO_4 0,5; MgSO_4 0,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5.

N: meio sintético com adição de solução complementar de sais minerais.

FIGURAS

Figura 1. Efeito de diferentes concentrações de glicose e da suplementação de sais sobre o metabolismo celular de *Streptococcus zooepidemicus*



(A) Perfil de glicose residual em 24 h de cultivo. (B) Perfil de glicose residual em 48 h de cultivo. (C) crescimento celular em 24 h de cultivo. (D) crescimento celular em 48 h de cultivo.