

IGOR VIANA BRANDI

AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DE
Clostridium perfringens TIPO B E DA PRODUÇÃO DE TOXINAS
UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE VACINAS VETERINÁRIAS

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2000

IGOR VIANA BRANDI

AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DE
Clostridium perfringens TIPO B E DA PRODUÇÃO DE TOXINAS
UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE VACINAS VETERINÁRIAS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de dezembro de 2000.

Prof^ª Flávia Maria Lopes Passos
(Conselheira)

Prof. Paulo Henrique Alves da Silva
(Conselheiro)

Prof. Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo

Prof. Nélio José de Andrade

Prof. Frederico José Vieira Passos
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais Ibsen e Francisca, pela sabedoria e educação que me transmitiram.

Aos meus ilustres irmãos Ibsen Jr., Iuri e Ivar, pela força constante.

À Mônica, pelo companheirismo, pela compreensão e pelos conselhos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, por tudo que lá vivi e aprendi.

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa de estudo.

À Vallée S.A., pela oportunidade de colocar em prática meus conhecimentos.

Ao professor Frederico J. V. Passos, pela orientação e confiança.

À professora Flávia Maria Lopes Passos, pelos ensinamentos e pelo apoio.

Ao meu colega Bernardo Hendler, pelo companheirismo no laboratório.

Ao professor Daison Olzani Silva, pela oportunidade de dar seqüência à minha formação em microbiologia.

À professora Elza Fernandes de Araújo, por me disponibilizar os fermentadores.

A todos os meus colegas do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos, pela troca de conhecimentos e convivência no dia-a-dia.

Às queridas Vaninha, Geralda, Maria Rita e Sueli, pela amizade e paciência.

Ao Otto D. Mozzer, pela confiança e pelo estímulo.

A Gleicelane e Jaqueline, pela presteza.

Aos funcionários da Vallée Láudio, Sr. Luis e Rogério, por todo o apoio que me deram no Biotério.

Aos meus caros amigos do LEF Adelson, Edson Vander, Alex e Ethel, pela amizade e ajuda.

A todos os meus amigos de graduação e pós-graduação, pelo que eles são.

BIOGRAFIA

IGOR VIANA BRANDI, nasceu em Itabirito, Minas Gerais, no ano de 1971.

Realizou seus estudos secundários no Instituto de Laticínios Cândido Tostes, em Juiz de Fora, MG, formando-se em 1989.

No ano de 1997, graduou-se em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG.

Em março de 1998, iniciou o Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Ciência e Tecnologia de Alimentos na UFV, submetendo-se à defesa de tese em dezembro de 2000.

Atualmente, exerce a função de Coordenador de Projetos de Pesquisa e Desenvolvimento no Laboratório Experimental de Fermentação na Vallée S.A., em Montes Claros, Minas Gerais.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. O <i>Clostridium perfringens</i> tipo B	3
2.2. Patogenicidade	4
2.3. Fatores fisiológicos que afetam a produção de toxinas por <i>C. perfringens</i>	6
2.4. Fatores nutricionais e produção de toxina	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Nomenclatura	11
3.2. Microrganismo.....	12
3.3. Condições de cultivo.....	12
3.3.1. Efeito do pH	13
3.3.2. Efeito da concentração de glicose.....	13
3.3.3. Correlação entre a concentração inicial de glicose e DO ₆₅₀ máx.	13

	Página
3.3.4. Efeito da fonte de proteína	15
3.4. Análises.....	16
3.4.1. Concentração celular	16
3.4.2. Título de toxinas	17
3.4.3. Ácidos, açúcares e etanol	19
3.4.4. Cálculos dos parâmetros cinéticos	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1. Efeito do pH no crescimento e produção de toxinas por <i>Clostridium perfringens</i> tipo B.....	23
4.2. Efeito da concentração de glicose no crescimento e produção de toxinas por <i>Clostridium perfringens</i> tipo B.....	27
4.3. Efeito da fonte protéica no crescimento e produção de toxinas por <i>Clostridium perfringens</i> tipo B.....	32
5. RESUMO E CONCLUSÕES	38
6. PROPOSTAS FUTURAS	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

RESUMO

BRANDI, Igor Viana, M. S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2000. **Avaliação das condições de crescimento de *Clostridium perfringens* tipo B e da produção de toxinas utilizadas na produção de vacinas veterinárias.** Orientador: Frederico José Vieira Passos. Conselheiros: Flávia Maria Lopes Passos e Paulo Henrique Alves da Silva.

Clostridium perfringens tipo B, bactéria anaeróbia, heterofermentativa, gram-positiva e produtora de toxina, é importante agente causador de doenças entéricas em animais. As toxinas inativadas α , β e ϵ produzidas por esse microrganismo estão presentes na composição das vacinas veterinárias contra clostridioses. Neste trabalho, estudou-se o efeito da composição do meio de cultura e do pH sobre o crescimento e produção de toxinas por *Clostridium perfringens* Tipo B para produção de vacinas veterinárias. Foram estudadas as concentrações iniciais da glicose e a presença de diferentes hidrolisados protéicos no meio – peptona de carne e peptona de caseína – e suas combinações. Os experimentos foram realizados em culturas conduzidas sob regime de batelada, com o uso de meio basal recomendado na literatura, observando-se a produção máxima de toxinas. Amostras foram coletadas a cada hora para determinação da concentração de células, ácido láctico, ácido acético, ácido propiônico, ácido

fórmico, etanol e glicose. Os melhores resultados foram obtidos quando o pH foi mantido em 6,5, utilizando-se 10,0 g.L⁻¹ de glicose e 10,0 g.L⁻¹ de hidrolisado protéico. A origem da proteína não teve influência significativa sobre o cultivo e a produção de toxinas. Pela análise da cinética de crescimento e produção, evidenciou-se que a formação de toxinas está associada ao crescimento. O presente estudo permitiu encontrar parâmetros satisfatórios de cultivo, que foram utilizados na ampliação de escala para produção industrial de vacinas contra clostridioses causadas por *C. perfringens* tipo B.

ABSTRACT

BRANDI, Igor Viana, M. S., Universidade Federal de Viçosa, December, 2000.
Evaluation of type B *Clostridium perfringens* growing conditions and the production of toxins for veterinary vaccines production. Adviser: Frederico José Vieira Passos. Committee Members: Flávia Maria Lopes Passos and Paulo Henrique Alves da Silva.

Type B *Clostridium perfringens*, anaerobic, hetero-fermentative, gram-positive and toxin producer bacteria is an important agent of enteric diseases in animals. The α , β and ϵ inactivated toxins produced by this microorganism are present in the composition of veterinary vaccines against diseases. In this work, the effects of culture medium composition and pH on growth and toxin production by the bacteria were studied. The initial glucose concentrations and the presence of different hydrolytic proteins in the medium – meat peptone and casein peptone – and their combination, were studied. The experiments were conducted in the batch system, using basal medium as recommended by literature. The best results were obtained when pH was kept at 6.5, using 10.0 gL^{-1} glucose and 10.0 gL^{-1} hydrolytic protein. The variation of the protein origin had no significant effect on the growth and toxin production. The analysis of the growth kinetics and production indicated that toxin formation is associated

with growth. The present study permitted the finding of optimum growth parameters which were used in the amplification of scale for industrial production of vaccines against clostridial diseases caused by type B *Clostridium perfringens*.

1. INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Clostridium* são agentes etiológicos de várias enfermidades em animais, conhecidas como clostridioses. Dentre estas bactérias estão o *Clostridium perfringens*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordelli*, *Clostridium novyi* e *Clostridium botulinum*.

As toxinas produzidas por *Clostridium perfringens* tipo B são conhecidas como causadoras da enterotoxemia, principalmente em rebanho de bovinos, ovinos e caprinos. O *C. perfringens* tipo B produz, principalmente, as toxinas α , β e ϵ . A enterotoxemia é acompanhada de enterite e extensiva hemorragia, além de ulceração no intestino delgado. Existem disponíveis no mercado diversas vacinas contra clostridioses. A maioria delas é combinada (polivacinas), isto é, contêm antígenos indutores de proteção contra várias clostridioses.

As vacinas contra clostridioses são produzidas a partir de suspensões de toxinas inativadas (toxóides) e corpo bacteriano também inativado (bacterinas). Na produção industrial de vacinas contra clostridioses, é importante a obtenção de altas concentrações de toxinas para que, após a formulação da vacina, se garantam altas concentrações de antígenos. Quanto maior for a concentração de antígenos na vacina, melhor será o seu poder imunogênico.

O presente trabalho teve como objetivo controlar o cultivo de *C. perfringens* tipo B de forma a maximizar a produção de toxinas e minimizar a

sua degradação. Foram estudados parâmetros cinéticos relacionados ao crescimento e produção de toxinas. Avaliaram-se o efeito do controle de pH e a composição do meio de cultivo quanto à concentração de glicose e fontes protéicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O *Clostridium perfringens* tipo B

Clostridium perfringens tipo B pertence à família *Bacillaceae* e apresenta-se na forma de bastonete curto, gram-positivo, anaeróbico e imóvel; em condições adversas, forma esporos. *C. perfringens* é dividido nos tipos A, B, C, D e E, de acordo com a capacidade de sintetizar toxinas. As toxinas apresentam características antigênicas e de solubilidade distintas, sendo detectadas em filtrados de culturas, cujos antígenos, em número de 12 e designados por letras gregas, ocorrem de maneira diversa nas cepas dos diferentes tipos (HOBBS et al., 1978).

C. perfringens tipo B é o agente etiológico das enterites hemorrágicas que ocorrem em bezerros, cabras e ovelhas. A enterotoxina, quando introduzida no intestino delgado, induz à acumulação de fluidos, causando diarreia em coelhos, carneiros e bezerros (DUNCAN e STRONG, 1969). Manifesta-se em cordeiros adultos com dor crônica, sem diarreia (FRANCK, 1956; ROBERTS, 1958; STUBBINGS). O resultado da enterotoxemia é acompanhado de enterite e extensiva hemorragia, além de ulceração no intestino delgado (FRANCK, 1956; ROBERTS, 1958).

Esse tipo de doença foi reportado, primeiramente, em regiões da Inglaterra e Escócia, bem como no País de Gales, na África do Sul e no Oriente Médio (TIMONEY et al., 1988). Uma doença similar foi reportada em Montana, EUA (TUNNICLIFF, 1933); embora isolado, *C. perfringens* tipo B é raro na América do Norte.

C. perfringens tipo B produz, principalmente, as toxinas α , β e ϵ . Apesar das diferentes circunstâncias e evidências indiretas do papel das várias toxinas e outras moléculas patogênicas nas infecções por *C. perfringens*, há somente prova direta do papel das toxinas α e θ em infecções histotóxicas (AWAD et al., 1995).

2.2. Patogenicidade

Clostridium perfringens pode ser considerada a principal bactéria patogênica causadora de clostridioses em animais (SMITH e WILLIAMS, 1984).

Embora se tenha pouco conhecimento da permeabilidade do intestino para toxina α , esta pode ser o fator de virulência em casos de enterotoxemia (DAUBE et al., 1994a; DAUBE et al., 1994b). Não se sabe dos efeitos individuais das toxinas α , β e ϵ ou se estes são aditivos ou sinérgicos. A toxina α , principal toxina letal do *Clostridium perfringens*, é uma fosfolipase multifuncional produzida em quantidades variadas, por todos os tipos de *C. perfringens*. Recentes evidências têm indicado diferença na seqüência de aminoácidos da toxina α de estirpes causadoras da gangrena gasosa e de estirpes que causam enterotoxemia, conferindo aumento da resistência para quimotripsina em toxinas da última estirpe (GINTER et al., 1995), talvez permitindo sua acumulação no intestino, a qual, subseqüentemente, entra na circulação. Grandes quantidades de toxina α podem ser encontradas em fezes de bovino doente. Estudos com porcos recém-nascidos revelaram que toxina α de *C. perfringens* pode causar enteropatia depois de substancial multiplicação do clostrídio no intestino, cuja multiplicação foi acompanhada de aderência e proliferação (JOHANNSEN et al., 1993a; JOHANNSEN et al., 1993b). Entretanto, toxina α administrada em leitões de uma a seis horas de vida causou ligeira enterite e edema das vilosidades

intestinais, com mínimo prejuízo do epitélio e dos vasos sangüíneos, mas não mudanças ultra-estruturais da vilosidades, linfáticos ou outros tecidos (JOHANNSEN et al., 1993a; JOHANNSEN et al., 1993b). Injeções endovenosas em cordeiro (NILO, 1971) ou bezerro (NILO, 1973) com toxina α produzem, transitoriamente, diarreia e hiperemia na mucosa intestinal.

A toxina β é responsável pela necrose da mucosa e, possivelmente, induz doenças no sistema nervoso central em animais domésticos (JOLIVET-REYNAUD et al., 1986).

Estudos com a toxina β têm sido concentrados, principalmente, na susceptibilidade do hospedeiro. A toxina β causa aumento da permeabilidade capilar, facilitando o acesso para o intestino e a circulação, promovendo, subseqüentemente, efeito sistêmico. A administração endovenosa da toxina β purificada é seguida de aumento da pressão sangüínea e diminuição da pulsação do coração, indicando um distúrbio eletrocardiográfico da região atrioventricular (SAKURAI et al., 1983).

Pequenas quantidades de toxina ϵ detectadas em intestino de animais normais são consideradas inócuas, mas altas concentrações induzem aumento de permeabilidade e absorção da toxina na circulação (BULLEN, 1970). O primeiro alvo da toxina ϵ é o sistema nervoso central, onde produz foco de necrose liquefativa, edema perivascular e hemorragia, especialmente nas meninges (BUXTON et al., 1978).

Um receptor para a toxina ϵ foi identificado em células endoteliais vasculares, apresentando alta afinidade, o que pode caracterizar a presença de um sítio para a toxina (NAGAHAMA e SAKURAI, 1991).

O extenso sinal clínico do sistema nervoso central degenerado inclui a falta de coordenação e convulsões, estando estes sinais diretamente relacionados com uma variedade de lesões (GRINER, 1961). Algumas vezes, em animais apresentando doenças subclínicas, a toxina ϵ estimula a produção de anticorpos específicos. Deduz-se que o gene *etx*, que codifica a toxina ϵ , esteja em um

plasmídeo, distinto do *pcb*, gene que codifica a toxina β e encontrado nos tipos B e D (COLE, 1995).

A toxina ϵ também induz o aumento da permeabilidade capilar com perda de proteína plasmática (FINNIE e HAJDUK, 1992) e água com rápida vazão do fluido, seguida de elevada pressão intracerebral (BUXTON e MORGAN, 1976).

A produção da toxina ϵ é co-regulada com esporulação e liberada pela lise da célula vegetativa. Remoção proteolítica do aminoácido 24 da extremidade aminoterminal ativa a molécula. A interação inicial de *cpe* com células resulta na formação de poros na membrana celular, alterando a permeabilidade, inibindo a síntese macromolecular, desintegrando o citoesqueleto e provocando a lise da célula (GRANUN, 1990; HANNA e McCLANE, 1991; HULKOWER et al., 1989; McCLANE e WNEK, 1990; McCLANE et al., 1988; McDONEL e McCLANE, 1988).

2.3. Fatores fisiológicos que afetam a produção de toxinas por *C. perfringens*

Clostridium perfringens tipo B é microaerofílico, resiste a 5,0% de oxigênio e não possui as enzimas citocromo oxidases e oxigenases (DECHER et al., 1970). Os clostrídios derivam sua energia da fermentação de compostos orgânicos (ANDREESEN et al., 1989). Nesse processo, tais compostos servem como doadores e receptores de elétrons (MORRIS, 1975), causando o acúmulo de produtos orgânicos como ácidos e etanol. Os clostrídios não realizam a redução dissimilatória do sulfato, a chamada respiração anaeróbia, em que este serve como acceptor final de elétrons (DECHER et al., 1970). Os clostrídios não possuem a catalase, embora tenham sido descobertos baixos índices de superóxido dismutase em algumas estirpes (MORRIS, 1976). O oxigênio pode interferir no metabolismo, oxidando NADH por reações catalisadas por NADH oxidases; muitas cepas possuem esta enzima em quantidades significativas (ANDREESEN et al., 1989).

Em relação ao pH, o crescimento ocorre no intervalo entre 5,5 e 8,0, sem evidências de multiplicação celular em valores abaixo de 5,0 ou acima de 9,0.

Em pH 5,5, o crescimento vegetativo é observado sem, no entanto, haver esporulação e produção de enterotoxina (Banwart, 1979, citado por ROITMAN, 1986).

Em estudos realizados com *C. perfringens* tipo C, SAKURAI e DUNCAN (1979) observaram que, em cultivos sem controle de pH, o nível de toxinas atinge o valor máximo entre o meio da fase exponencial e o início da fase estacionária. Os autores verificaram ainda que a estabilidade da toxina β depende do pH. STRINGER et al. (1982), citados por ROITMAN (1986), relataram que durante o processo de esporulação, na fase em que há ruptura da células com liberação dos esporos, ocorrem níveis máximos de enterotoxina livre no meio de cultura.

Clostridium perfringens pode crescer na presença de até 5% de NaCl, sendo inibido quando a concentração atinge 10% (Troller, 1973, citado por ROITMAN, 1986), que mencionou níveis limitantes de 6,0%, ao passo que Herson e Hulland (1980), citados por ROITMAN (1986), relataram valores de 5,7 a 7,4% como suficientes para impedir o crescimento.

Clostridium perfringens é uma bactéria mesófila que se desenvolve em temperaturas de 20 a 50 °C, com temperatura ótima de crescimento entre 37 e 47 °C, não se evidenciando crescimento em temperaturas inferiores a 6,5 °C; a velocidade específica de crescimento é sensivelmente reduzida em temperaturas inferiores a 15 °C (HOBBS et al., 1978).

ROBERTS (1958) verificou também que cepas não-hemolíticas, patogênicas, apresentam redução de 90% da população inicial (valor D) quando submetidas a uma temperatura de 100 °C e tempo entre 6 e 17 minutos, enquanto para cepas hemolíticas esse valor, na mesma temperatura, foi inferior a 1 min e a 3 a 5 min a 90 °C. A resistência térmica dos esporos de *Clostridium perfringens* é muito variável, em face da constatação da existência de cepas hemolíticas termo resistentes e termo sensíveis.

Por não produzir catalase, os anaeróbios são altamente susceptíveis ao efeito tóxico do peróxido de hidrogênio. Segundo Pasteur, citado por SEBALD e HAUSER (1995), o oxigênio atua nas células em estágios distintos. Na fase I,

considerada fase bacteriostática, quando os microrganismos anaeróbios são expostos ao oxigênio, os elétrons que estariam disponíveis para o metabolismo celular são desviados para a redução da molécula de oxigênio, diminuindo a geração de energia e novos materiais para a célula, interrompendo o crescimento. O efeito bacteriostático pode ser reversível se o período de exposição ao oxigênio for curto. A fase II é letal e irreversível ao efeito tóxico do oxigênio. A formação do ânion superóxido, do radical hidroxil e do peróxido de hidrogênio promove o efeito bactericida

Willis (1990), citado por ROITMAN (1986), reportou que o efeito inibitório do oxigênio pode ser atribuído ao aumento do potencial de oxir-redução, cujo efeito pode ser minimizado desde que se mantenha o potencial de oxir-redução suficientemente baixo. Isso pode ser conseguido através de substâncias redutoras, as quais agem, principalmente, absorvendo o oxigênio.

Os meios de cultivo para clostrídios contêm, normalmente, substâncias redutoras como cisteína, tioglicolato, glutatona, sulfetos de ferro ou compostos férricos reduzidos. Embora *Clostridium perfringens* não seja considerado um anaeróbio estrito, seu crescimento inicial é muito influenciado pelo potencial de oxirredução, com limite superior, oscilando entre +31 mV em pH 7,7 e + 230 mV em pH 6,0; no entanto, o valor ótimo para o crescimento parece ser próximo de -2.200 mV (Hobbs, 1979, citado por ROITMAN, 1986).

Em experimentos “in vitro”, nos quais células de *Clostridium perfringens* foram inoculadas em meio apropriado para esporulação, verificou-se que, três horas após a inoculação, começavam a se formar esporos acompanhados do acúmulo de enterotoxina no interior das células. O número máximo de esporos foi alcançado após 10 horas de incubação a 37 °C devido ao processo de ruptura das células e à liberação dos esporos, acompanhado da detecção de níveis máximos de enterotoxina livre no meio de cultura (Stringer et al., 1982, citados por ROITMAN, 1986).

Há perspectiva de produção da segunda geração de vacinas, talvez com base em toxinas recombinantes ou toxóides de *Clostridium perfringens*,

tornando-se evidente considerar o papel de várias toxinas e de outros atributos putativos de virulência e de infecções entéricas patogênicas (SONGER, 1996).

2.4. Fatores nutricionais e produção de toxinas

Segundo PAL et al. (1990), *C. perfringens* tipo B apresenta maior título em toxinas com quatro horas de cultivo. Verificaram ainda que, após esse tempo, o título diminui e as necessidades nutricionais para o crescimento são diferentes daqueles para síntese de toxinas, em que, mesmo com controle de nutrientes, pode ocorrer crescimento sem produção de toxinas. Em estudos com *Clostridium perfringens* tipo C, SAKURAI e DUNCAN (1979) citaram que 95% da toxicidade da cultura foi perdida após quatro horas do término do crescimento. De acordo com SONGER (1996), a produção de toxinas acompanha o crescimento celular.

Estudos com *Clostridium perfringens* PB6K evidenciaram a necessidade da presença no meio de cultivo de arginina em concentração acima de 10 g.L^{-1} e que, quando a presença de L-cisteína foi maior que $0,1 \text{ g.L}^{-1}$, uma diminuição na produção de α toxina foi observada (MURATA et al., 1965). Também quanto à presença de aminoácidos, MURATA et al. (1965) observaram que a adição de L-glutamina estimulou o crescimento. Esse fenômeno foi também observado pela adição de L-arginina, que não apenas afetou o crescimento, mas também a produção de toxinas, quando concentrações de até 16 g.L^{-1} foram utilizadas. A cisteína se mostrou indispensável para o crescimento em concentrações de até $0,5 \text{ g.L}^{-1}$. Acima desta concentração, houve inibição da produção de toxinas.

MURATA et al. (1965) observaram que em culturas de *Clostridium perfringens* PB6K o zinco e o manganês foram necessários para uma produção satisfatória de toxina, enquanto o excesso destes íons prejudicou a produção de toxinas, indicando concentração ótima na faixa de $1,0$ a $1,5 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$. O efeito do zinco é específico e não substituível por outro íon bivalente. Já MURATA et al. (1994) citaram que, entre os cátions bivalentes, o manganês é o único que pode substituir parcialmente o zinco. Concluíram ainda que o zinco tem papel peculiar

na produção de toxinas e que, em meio com altas concentrações de aminoácidos, pode ser quelado, devendo, assim, ser adicionado em excesso. SAKURAI e DUNCAN (1979) ressaltaram que a produção de toxinas diminui com o aumento da concentração de cátions bivalentes. Observaram ainda que a presença de ácidos, produzidos pelas células no meio, diminui o crescimento e a produção de toxinas. Houve diminuição na produção de toxinas também quando o pH atingiu valores menores que 6,0. O mesmo foi confirmado por SONGER (1996), que concluiu serem necessários valores de pH próximos a 7,0 para uma máxima produção de toxina. Segundo PAL et al. (1990), a deterioração da toxina β em tempos longos de incubação pode ser atribuída ao efeito do ácido presente no meio de crescimento.

SAKURAI e DUNCAN (1979) citaram que em cultivo de *C. perfringens* tipo C a quantidade de toxina produzida depende do carboidrato utilizado. MURATA et al. (1965), em estudo da cepa PB6K, obtiveram melhores resultados com frutose, em comparação com a glicose e sacarose, quando em concentrações de 7,5 a 10,0 g.L⁻¹.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Processos Fermentativos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais. A titulação de toxinas foi realizada no Biotério da Vallée S.A., em Uberlândia, Minas Gerais, e as análises cromatográficas foram no Laboratório Experimental de Fermentação da Vallée S.A., em Montes Claros, Minas Gerais.

3.1. Nomenclatura

DO = densidade ótica.

DL₅₀ = dose letal capaz de matar 50% dos animais inoculados.

Gli = concentração de glicose, mM.

P = concentração de ácidos orgânicos ou etanol, mM.

X = concentração de células, DO₆₅₀.

Y_{x/s} = fator de conversão de substrato em célula.

Y_{p/s} = fator de conversão de substrato em produto.

μ = velocidade específica de crescimento, h⁻¹.

μ_o = velocidade específica de crescimento máxima, h⁻¹.

rpm = rotações por minuto.

3.2. Microrganismo

A cepa de *C. perfringens* tipo B (ATCC 3626) foi obtida na Divisão de Produção Veterinária da Vallée S.A., onde é mantida na forma liofilizada. A ativação foi realizada em meio Tarozzi (BIER, 1955). Em tubo de 50 ml foram adicionados 20 ml do meio, inoculado com a cultura liofilizada, vedado com parafina na superfície do meio e incubado em estufa a 37 °C até a observação de crescimento demonstrado com a ascensão da parafina dentro do tubo. Em seguida, a cultura foi submetida a duas repicagens consecutivas, sendo a primeira utilizando-se 10% de inóculo em frasco de 40 mL, com volume de trabalho de aproximadamente 40 mL. Após incubação a 37 °C e crescimento até a fase exponencial, procedeu-se a uma segunda repicagem, também com 10% de inóculo, em frasco de 200 mL com aproximadamente 200 mL de meio. Após atingir crescimento exponencial, que foi acompanhado de medição da densidade ótica, antes de chegarem à fase de desaceleração as células foram centrifugadas a 9.000 g por 10 min e ressuspensas em meio sem o constituinte a ser analisado, isto é, na avaliação do efeito da glicose, as células eram ressuspensas em meio sem glicose e, quando se avaliou o efeito da fonte de proteína, este não continha peptona de carne e de caseína.

3.3. Condições de cultivo

Os cultivos foram conduzidos em frascos fermentadores com volume total de 250 mL e 150 mL de meio. Os fermentadores eram dotados de controle de pH e temperatura. O pH foi controlado pela adição automática de NaOH 3,0 N. Os fermentadores possuíam ainda filtro, membrana de 0,2 µm, para saída de gases, os quais foram mantidos fechados até o início do crescimento exponencial. Previamente à inoculação, borbulhou-se nitrogênio ao meio sob agitação por 5 min. O nitrogênio foi previamente filtrado em membrana de 0,2 µm.

O meio de cultura basal utilizado nos experimentos para avaliação das condições ótimas de crescimento e produção de toxinas tinha a seguinte

composição, em g.L⁻¹: proteose bacteriológica 10,0, casitona 10,0, extrato de levedura (Difco) 5,0, cloreto de sódio 5,0, Na₂HPO₄ 5,6, KH₂PO₄ 2,7, sulfato de magnésio 0,03 e L-cisteína 0,3.

A composição original foi modificada pela adição de 20,0 g.L⁻¹ de glicose e 0,05 g.L⁻¹ de antiespumante (Medical).

Na Figura 1 (a, b e c), apresenta-se uma visão do sistema de cultivo utilizado nos experimentos, com controle de temperatura e pH e agitação magnética.

3.3.1. Efeito do pH

Para avaliação do efeito do pH, utilizou-se o meio basal. Os cultivos foram conduzidos em duplicata, e o pH foi mantido constante durante toda a fermentação nos valores de 6,5; 7,0; e 7,5, controlado com adição de NaOH 3,0N. Paralelamente, foi realizado cultivo sem controle de pH.

3.3.2. Efeito da concentração de glicose

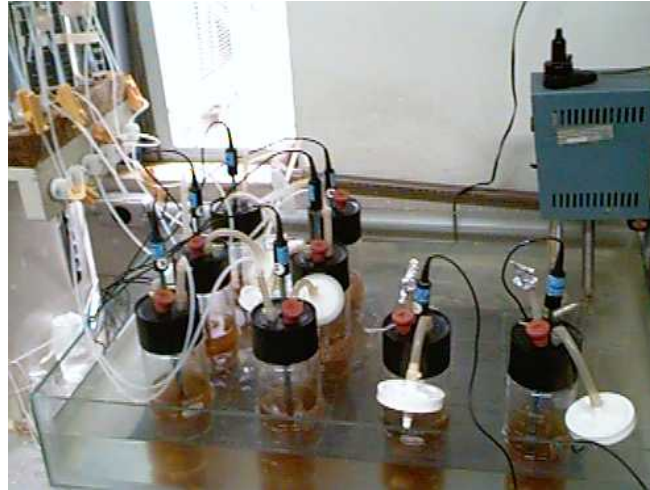
Para avaliação do efeito da concentração de glicose, utilizou-se o meio basal suplementado com as seguintes concentrações de glicose: 1,4 mM; 2,8 mM; 5,6 mM; 11,1 mM; 27,8 mM; 55,6 mM; 83,3 mM; e 111,1 mM. O pH foi mantido constante em 6,5 com a adição de NaOH 6,0N.

3.3.3. Correlação entre a concentração inicial de glicose e DO₆₅₀máx.

O coeficiente de rendimento celular foi obtido pela regressão linear da concentração inicial de glicose na faixa de 1,4 a 55,6 mM *versus* DO₆₅₀ máxima. Para determinação da correlação, usou-se o modelo

$$\frac{dGli}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \frac{dX}{dt} - m \cdot X$$

(a)



(b)



(c)



Figura 1 – Sistema de cultivo em batelada com temperatura controlada por banho-maria (a), agitação magnética (b) e controle de pH (c).

Assumindo consumo de glicose apenas para crescimento celular ou metabolismo primário, tem-se

$$\frac{d\text{Gli}}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dX}{dt}$$

Sendo $Y_{x/s}$ o coeficiente de rendimento celular, ou

$$Y_{x/s} = -\frac{dX}{dS}$$

3.3.4. Efeito da fonte de proteína

Para avaliação da fonte protéica, o meio basal foi suprimido de Proteose Peptona nº3 (Difco e Biobrás) e Casitona (Difco e Biobrás), conforme combinações apresentadas na Tabela 1. O meio de cultura continha ainda 20,0 g.L⁻¹ de glicose, sendo o pH controlado em 6,5.

Tabela 1 – Concentrações das diferentes fontes de proteínas testadas

Meio	Hidrolisado Protéico	Fabricante	Concentração (g.L ⁻¹)
1	Proteose peptona nº 3	Difco	10,0
	Casitona	Difco	10,0
2	Proteose peptona nº 3	Difco	10,0
	Peptona de caseína	Biobrás	10,0
3	Peptona de carne	Biobrás	10,0
	Casitona	Difco	10,0
4	Peptona de carne	Biobrás	10,0
	Peptona de caseína	Biobrás	10,0
5	Proteose peptona nº 3	Difco	10,0
6	Casitona	Difco	10,0
7	Proteose peptona nº 3	Difco	5,0
	Casitona	Difco	5,0
8	Ausência de peptona e casitona		

3.4. Análises

Amostras coletadas a cada hora, até que a cultura atingisse fase estacionária de crescimento, foram fracionadas para análise de açúcares, ácidos e etanol em HPLC, densidade ótica e titulação de toxinas. As amostras para análise de ácidos orgânicos, etanol e toxina foram mantidas congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da análise.



Figura 2 – Amostragem.

3.4.1. Concentração celular

Concentração total de células foi medida pela leitura da densidade ótica, em espectrofotômetro (Pharmacia LKB-Novaspec II). As leituras foram feitas na faixa de absorbância de 0,1 a 0,60, correspondente à faixa de relação linear da massa e densidade ótica (650 nm).

3.4.2. Título de toxinas

Avaliou-se a produção total de toxinas por titulação em camundongos. Nos animais pesando de 17 a 22 g era aplicado 0,2 mL do meio e das diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64, via endovenosa. Foram utilizados quatro camundongos por diluição. Quando a maior diluição era letal para todos os camundongos, novas diluições eram realizadas até que, para uma das diluições, um ou mais camundongos permanecessem vivos. As diluições do meio foram realizadas em solução salina peptonada, composta de 10,0 g.L⁻¹ de peptona, 2,5 g.L⁻¹ de NaCl e pH 7,2. As amostras eram mantidas sob refrigeração até a aplicação em camundongos. A DL₅₀ foi calculada pelo método de Reed & Muench (BIER, 1955). Nas Figuras 5 a 6, apresenta-se a seqüência de operações utilizadas para a aplicação da amostra nos camundongos.



Figura 3 – Caixa para aquecimento de camundongos inoculados com a amostra.



Figura 4 – Aplicação de toxinas endovenosa em camundongo.



Figura 5 – Camundongos em observação após a aplicação da toxina.



Figura 6 – Caixas de camundongos, cada uma contendo quatro indivíduos, correspondentes a cada diluição.

3.4.3. Ácidos, açúcares e etanol

As concentrações de ácidos orgânicos, açúcares e etanol formados durante o cultivo foram determinadas por HPLC (Waters). Cada amostra foi previamente diluída a 1:10 em H_2SO_4 500 mM e filtrada em filtro 0,22 μm . Foram utilizados detector de emissão de fluorescência (Waters 474 Scanning Fluorescence Detector) e coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California). A coluna foi eluída com H_2SO_4 500 mM a 50 °C e fluxo de 0,6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. As concentrações de glicose, ácidos orgânicos e etanol foram determinadas pela regressão linear de padrões externos (Sigma).

3.4.4. Cálculo dos parâmetros cinéticos

A velocidade específica de crescimento, μ , foi estimada a partir da regressão linear do logaritmo natural da densidade ótica da cultura versus tempo de crescimento, utilizando-se os dados da fase exponencial, de acordo com o modelo

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

ou

$$\ln(X) = \ln(X_0) + \mu \cdot t$$

O fator de conversão da glicose em ácidos orgânicos e etanol ($Y_{p/s}$) foi calculado, segundo a equação a seguir:

$$Y_{p/s} = \frac{P_{\text{final}} - P_{\text{inicial}}}{\text{Gli}_{\text{inicial}} - \text{Gli}_{\text{final}}}$$

sendo

$\text{Gli}_{\text{INICIAL}}$ a concentração de glicose no início do intervalo considerado,

$\text{Gli}_{\text{FINAL}}$ a concentração de glicose no final do intervalo considerado,

P_{INICIAL} a concentração de ácidos e etanol no início do intervalo considerado e

P_{FINAL} a concentração de ácidos e etanol no final do intervalo considerado.

Utilizou-se a Rotina *spline* (I.P.T., 1997 – Relatório Técnico Parcial Nº 35.453/97.156P) para suavização das curvas e cálculo da derivada das funções de crescimento celular, produção de toxinas, consumo de açúcar e produção de ácidos e etanol.

As curvas suavizadas foram usadas para cálculo da produtividade celular, da produtividade em toxinas e dos fatores de conversão de glicose em ácidos e etanol.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento e produção de toxinas de *Clostridium perfringens* tipo B no meio basal de crescimento com pH inicial de 6,5 e sem adição de base durante o cultivo são apresentados na Figura 7. A cultura deste clostrídio nas condições estabelecidas atingiu DO₆₅₀ máxima de 2,3. Verificou-se ainda que a DL₅₀ é crescente, acompanhando o crescimento celular e chegando a DL₅₀ máximo de 10^{2,26}. Durante o crescimento celular, como demonstrado na Figura 8, ocorre uma queda do pH de 7,0 para 5,2, em função da produção de ácidos orgânicos.

A velocidade específica de crescimento foi de 0,8 h⁻¹, com a fase exponencial estendendo-se por até aproximadamente 5 h de cultivo. O início da fase estacionária coincide com o pH de 5,3, após 7 h de cultivo. Este fato, por si, não significa que este é o valor de pH limitante para o crescimento. De acordo com Banwart (1979), bactérias do gênero *Clostridium* apresentam crescimento em valores de pH entre 5,5 e 8,0, sem evidências de multiplicação em valores abaixo de 5,0. Verifica-se na Figura 8 que, mesmo após 10 h de crescimento, a concentração residual de glicose foi de aproximadamente 75 mM, evidenciando não ser a fonte de carbono o fator limitante do crescimento dessas bactérias. Considerando o meio composto de 20 g.L⁻¹ de hidrolisado protéico, 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura e sais, acredita-se que o fator inibidor do crescimento seja algum produto do metabolismo da bactéria.

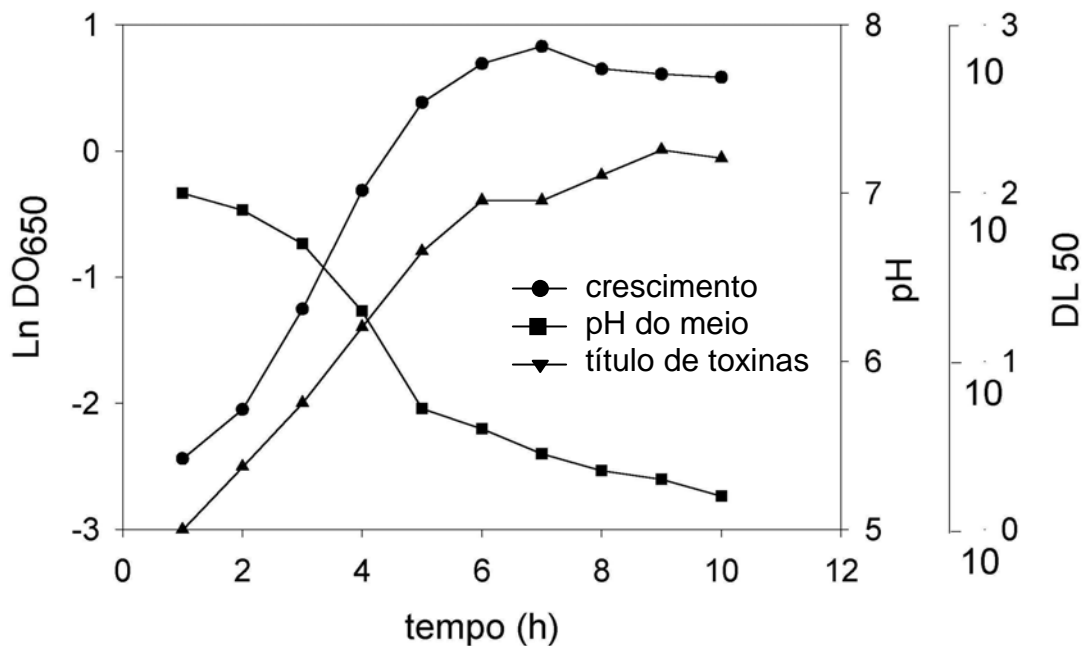


Figura 7 – Massa celular (DO), produção de toxina (DL 50) e pH do meio de cultivo durante o crescimento de *Clostridium perfringens* tipo B em fermentador do tipo batelada, sem controle de pH, a 37 °C e agitação de 200 rpm (cada ponto representa a média de duas repetições).

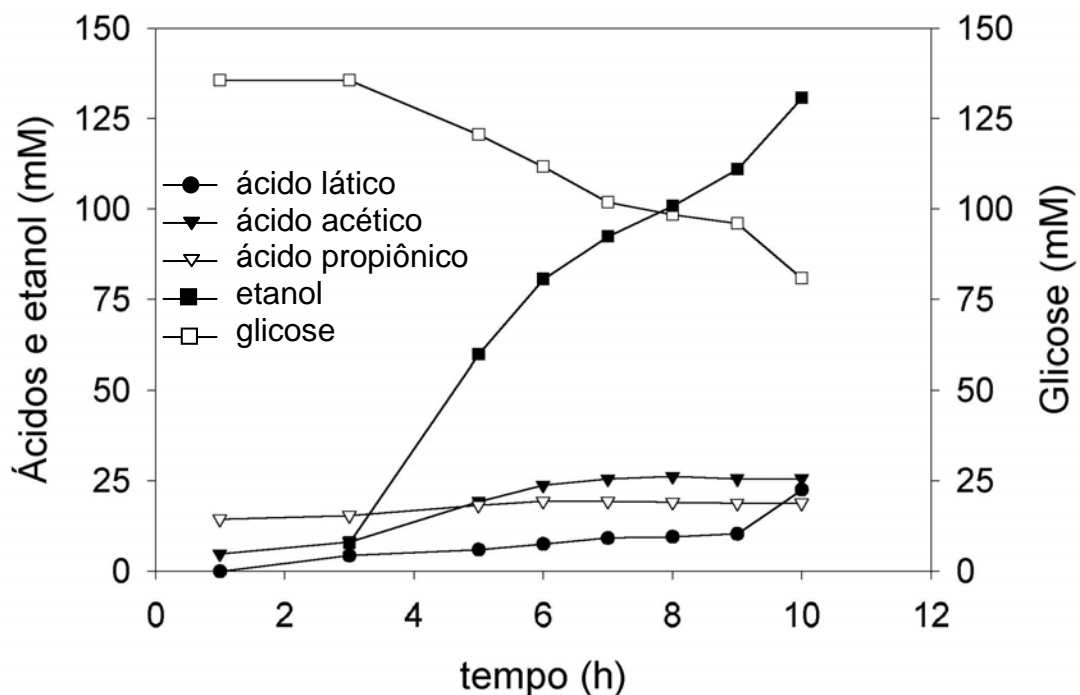


Figura 8 – Variação da concentração de ácidos orgânicos, glicose e etanol durante o crescimento de *Clostridium perfringens* tipo B no meio sem controle de pH.

As condições adversas do meio de cultura no final da fase de crescimento exponencial, surgidas pelo acúmulo de ácidos e etanol com conseqüente redução do pH, reduzem a velocidade específica de crescimento celular e levam à estagnação da produção de toxinas. A Figura 8 ilustra o consumo de glicose, bem como a produção de ácidos orgânicos e etanol. O acúmulo de ácidos no meio de cultivo provoca queda brusca do pH, o que é um fator inibitório do crescimento celular.

A produção de toxina (Figura 7), expressa como valor DL₅₀, acompanha o crescimento celular, comportamento também observado por SONGER (1996). O título máximo observado foi 10^{2,26}.

4.1. Efeito do pH no crescimento e produção de toxinas por *Clostridium perfringens* tipo B

Na Figura 9, apresenta-se o efeito do controle de pH do meio no crescimento celular em meio basal a 37 °C. Verificou-se que os cultivos nos quais os valores do pH foram mantidos constantes em 6,5 e 7,0 apresentaram comportamentos semelhantes e atingiram densidade ótica máxima de 2,30 e 1,92, respectivamente. A produção de toxinas nessas condições está demonstrada no Quadro 1.

No Quadro 1, apresentam-se a produção de toxina, o crescimento e constantes cinéticas obtidas na cultura sem controle de pH e nas culturas em que se manteve constante o pH, com adição de base, nos valores de 6,5; 7,0; e 7,5, até que se atingisse a fase estacionária de crescimento celular. Observou-se que o cultivo no qual o pH do meio foi mantido fixo em 6,5 apresentou valores mais elevados de DL₅₀, apesar de exibir a mesma DO₆₅₀ máxima, em comparação com o cultivo sem controle de pH. A duração da fase exponencial de 4 h foi semelhante em todos os cultivos.

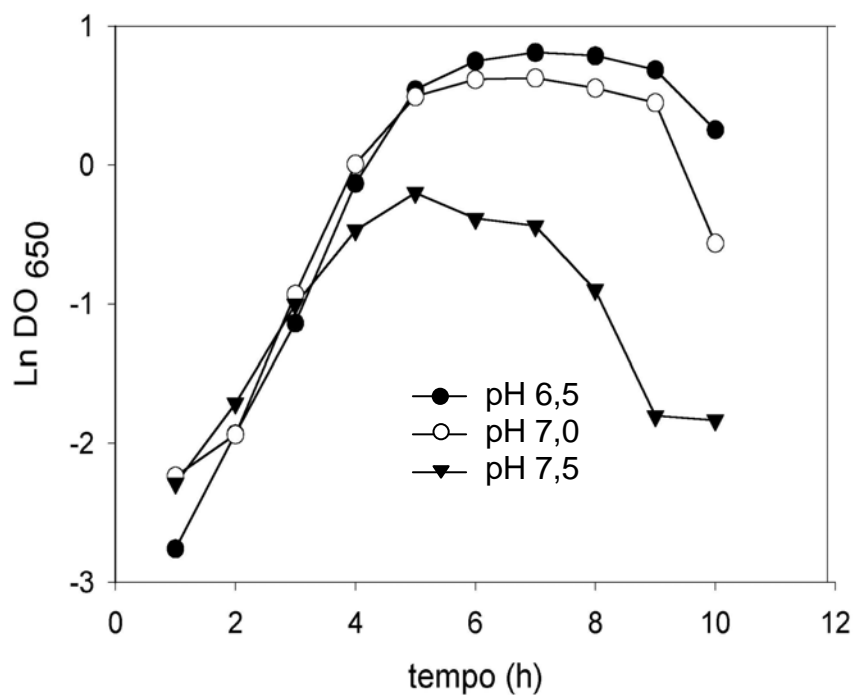


Figura 9 – Crescimento de *Clostridium perfringens* tipo B em diferentes pH a 37 °C e agitação de 200 rpm (cada ponto representa a média de duas repetições).

Quadro 1 – Efeito do pH do meio na velocidade específica de crescimento, na densidade ótica máxima, na DL₅₀ máxima e na duração da fase exponencial (FE) de crescimento de *Clostridium perfringens* tipo B a 37 °C e agitação de 200 rpm

pH	μ máx.(h ⁻¹)	DO ₆₅₀ máx.	DL ₅₀ máx.	FE (h)*
6,5	0,900	2,300	10 ^{2,56}	4,0
7,0	0,700	1,920	10 ^{2,41}	3,0
7,5	0,700	0,835	< 10 ^{1,96}	4,0
Sem controle	0,800	2,300	10 ^{2,26}	3,5

* Duração da fase exponencial de crescimento.

No Quadro 2, apresentam-se os fatores de conversão da glicose em ácidos orgânicos e em etanol. Esses coeficientes confirmam os resultados apresentados na Figura 10, porém expressos em termos de conversão metabólica. Além de o fator global de conversão da glicose em ácidos orgânicos e etanol ser maior em pH 6,5, nota-se que a produção de ácido lático, ácido acético e etanol é maior quando comparada com a produção de ácidos fórmico e propiônico, à exceção do pH 7,0, em que há baixa produção de ácido lático.

Quadro 2 – Fatores de conversão da glicose em ácidos orgânicos e etanol, em função do pH de cultivo de *Clostridium perfringens* tipo B a 37 °C e agitação de 200 rpm

pH	q ác.lático/ glicose	q ác.fórmico/ glicose	q ác.acético/ glicose	q ác.propiônico/ glicose	q etanol/ glicose	q global
6,50	0,262	0,035	0,165	0,045	0,462	5,44
7,00	0,009	0,055	0,114	0,064	0,363	2,22
7,50	0,224	0,055	0,100	0,054	0,178	4,69
livre	0,166	0,000	0,127	0,037	0,574	3,84

q global = a conversão da glicose em ácido lático, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico e etanol.

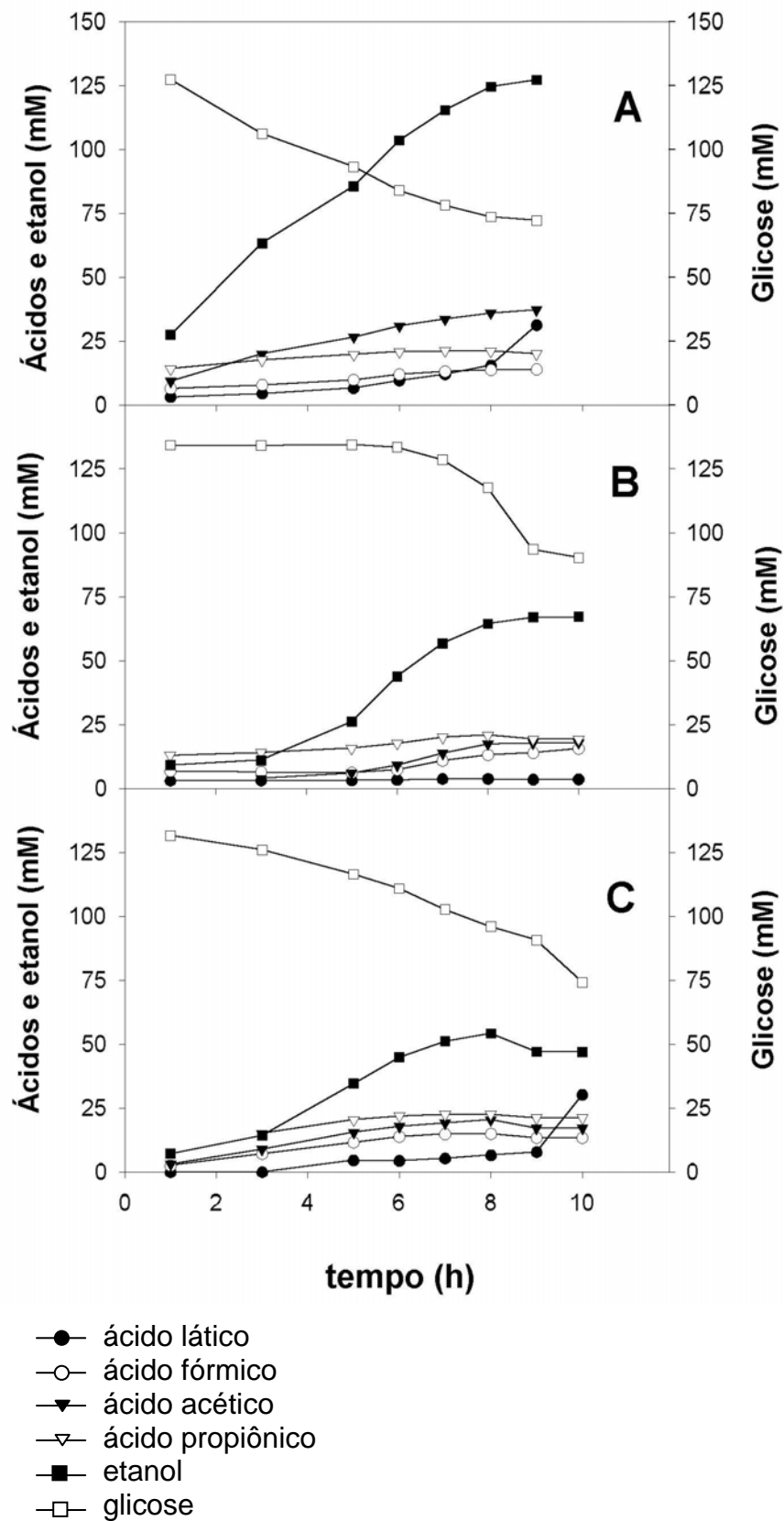


Figura 10 – Concentração de ácidos orgânicos, glicose e etanol durante o crescimento de *Clostridium perfringens* tipo B em culturas sob controle de pH (A = pH 6,5, B = pH 7,0 e C = pH 7,5).

Avaliou-se também o consumo de glicose e produção de ácidos orgânicos e etanol em cada pH estudado. Observa-se, na Figura 10, a presença de glicose residual em todas as condições estudadas, com concentrações finais variando entre 75 e 85 mM, confirmando a pertinência de um estudo sobre a composição do meio de cultivo. A produção de etanol atingiu 125 mM em pH controlado 6,5. Em pH controlado em 7,0 e 7,5, a produção de etanol atingiu 70,0 mM e 50 mM respectivamente. Além de a produção de etanol ser mais expressiva em pH 6,5, tem-se uma maior produção de ácidos orgânicos em comparação com os cultivos em pH 7,0 e 7,5. Paralelo à maior produção de ácidos orgânicos e etanol, observou-se aumento no título em toxinas.

Com base nos resultados obtidos, o pH 6,5 foi selecionado para a realização dos experimentos sobre o efeito da concentração inicial de glicose e da fonte protéica no crescimento e produção de toxina.

4.2. Efeito da concentração de glicose no crescimento e produção de toxina por *C. perfringens* tipo B

Na Figura 11, apresenta-se o efeito da concentração inicial de glicose do meio de cultura no crescimento de *Clostridium perfringens* tipo B, em pH 6,5 e temperatura de 37 °C. No Quadro 3 são apresentados os parâmetros cinéticos de crescimento e, na Figura 12, as variações das concentrações de ácidos orgânicos, etanol e glicose durante o crescimento, para cada concentração inicial de glicose estudada. Foram avaliadas concentrações entre 1,4 mM e 111,1 mM. Não foram observadas diferenças entre as velocidades específicas de crescimento nas concentrações de glicose estudadas. De acordo com YABANNAVAR e WANG (1991), o valor médio da constante de afinidade (K_s) do modelo proposto por Monod para relacionar efeito da concentração de glicose na velocidade específica de crescimento de bactérias é de 56 μ M. Esse valor de K_s justifica os resultados obtidos.

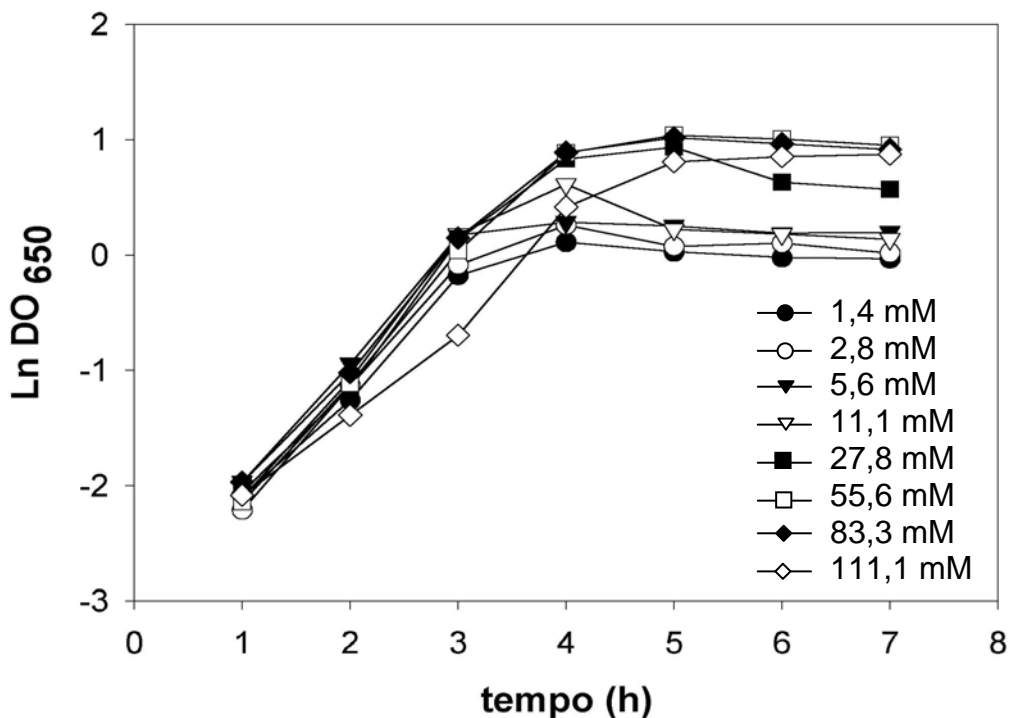


Figura 11 – Crescimento de *Clostridium perfringens* tipo B a 37 °C, agitação de 200 rpm e pH controlado em 6,5, sob diferentes concentrações de glicose.

Quadro 3 – Efeito da concentração inicial de glicose na velocidade específica de crescimento, na população máxima (DO_{650}), na atividade de toxina (DL_{50}) e na duração da fase exponencial (FE) de culturas de *Clostridium perfringens* tipo B a 37 °C, agitação de 200 rpm e sob pH controlado em 6,5

Concentração de glicose (mM)	$\mu_{\text{máx.}}(\text{h}^{-1})$	DO_{650} máx.	DL_{50} máx	F.E.(h)
1,4	0,900	1,12	$10^{1,30}$	2,0
2,8	1,000	1,30	$10^{1,30}$	2,0
5,6	1,100	1,33	$10^{1,40}$	2,0
11,1	1,100	1,85	$10^{1,51}$	2,8
27,8	1,100	2,30	$10^{1,66}$	3,0
55,6	1,100	2,83	$10^{1,96}$	3,0
83,3	1,100	2,77	$10^{2,01}$	3,0
111,1	1,000	2,90	$10^{2,11}$	3,5

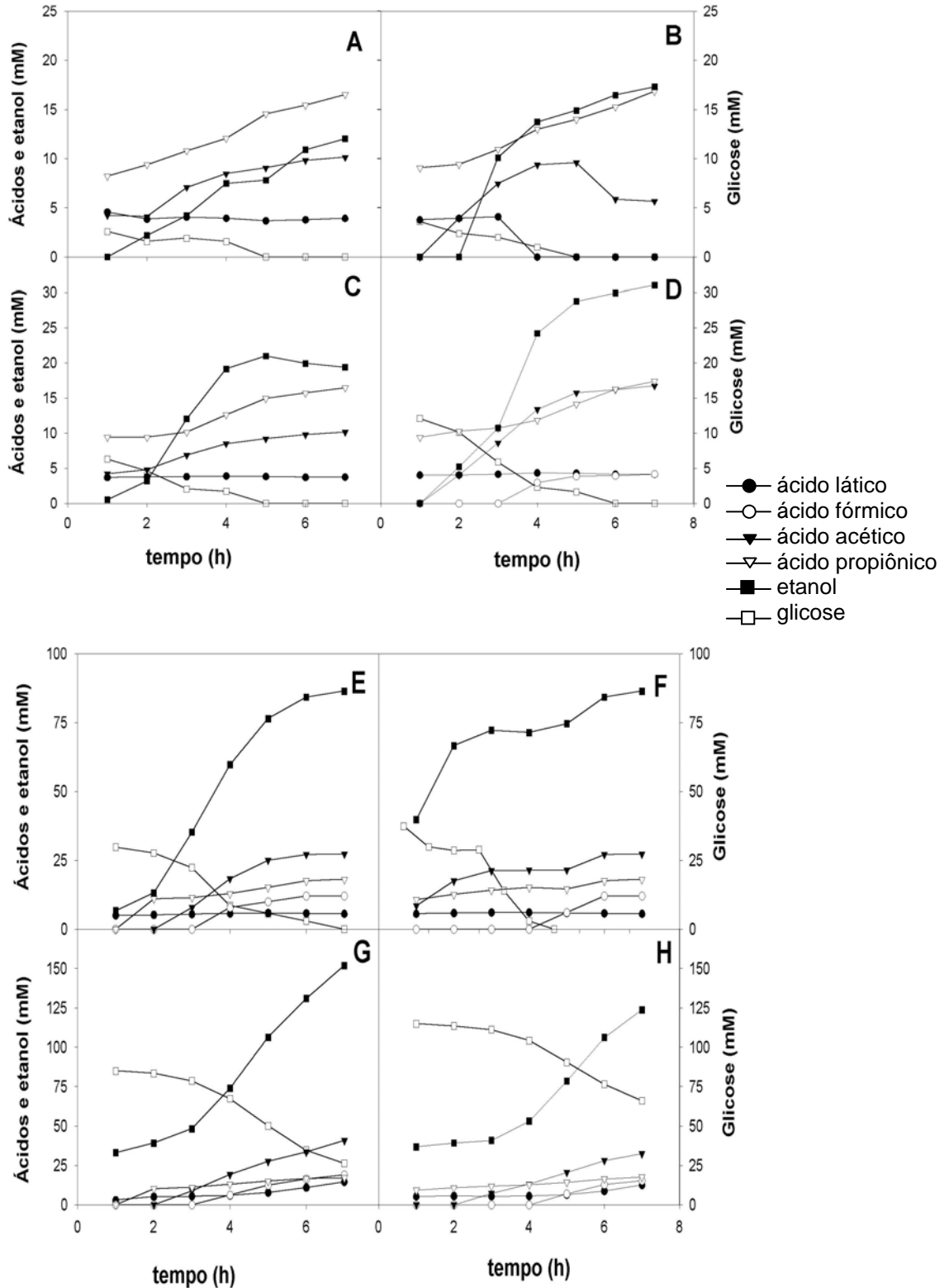


Figura 12 – Concentração de ácidos orgânicos, glicose e etanol durante o crescimento de *Clostridium perfringens* tipo B em culturas sob diferentes concentrações iniciais de glicose (A = 1,4 mM, B = 2,8 mM, C = 5,6 mM, D = 11,1 mM, E = 27,8 mM, F = 55,6 mM, G = 83,3 mM e H = 111,1 mM).

Verifica-se, pela Figura 12, que, quando a concentração inicial de glicose foi igual ou inferior a 55,6 mM, toda a glicose foi consumida durante o crescimento. Sugere-se que parte dessa fonte de carbono foi utilizada para manutenção celular, entretanto é possível estimar o coeficiente de rendimento celular ($Y_{X/Gli}$) utilizando os dados de crescimento nas concentrações em que toda a glicose foi consumida (1,4 até 55,6 mM). Na Figura 13, apresenta-se o efeito da concentração inicial de glicose na DO_{max} da cultura. A partir da regressão linear dos dados de concentração de glicose entre 1,4 e 55,6 mM em função da DO_{max} , é possível estimar o valor do coeficiente de rendimento de 0,0307 unidade de DO/mM de glicose.

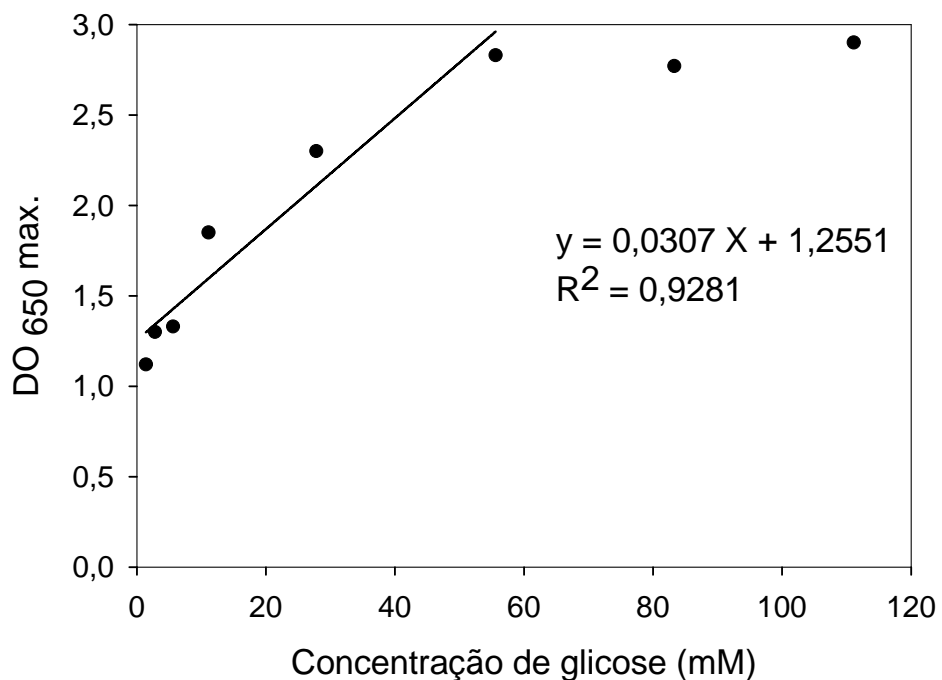


Figura 13 – Efeito da concentração inicial de glicose na concentração máxima de células na cultura de *C. perfringens* tipo B.

De acordo com o Quadro 3, verifica-se um aumento da DO₆₅₀máx. quando a concentração inicial de glicose do meio é aumentada. A mesma tendência é observada com a DL₅₀máx. Na maior concentração de glicose analisada, 111,1 mM, obtiveram-se as maiores DO₆₅₀máx. e DL₅₀máx., 2,90 e 10^{2,11}, respectivamente. A velocidade específica de crescimento, entretanto, foi muito semelhante nas condições analisadas à medida, entretanto, que se aumentou a concentração de glicose no meio de cultura.

Com base nos valores de DL₅₀ máxima, foi escolhida a concentração inicial de glicose de 111,1 mM para os testes subsequentes.

No Quadro 4, apresentam-se os fatores de conversão da glicose em ácidos orgânicos e em etanol. Verificou-se aumento da produção de ácidos e etanol com a elevação da concentração inicial de glicose.

Quadro 4 – Fatores de conversão da glicose em ácidos orgânicos e etanol, em função da concentração de glicose no meio de cultivo de *Clostridium perfringens* tipo B a 37 °C, agitação de 200 rpm e sob pH controlado em 6,5

Glicose mM	ác.lático/ glicose	ác.fórmico/ glicose	c.acético/ glicose	c.propiônico/ glicose	etanol/ glicose	q global
1,40	0,000	0,000	1,964	1,008	1,989	2,53
2,80	0,099	0,000	1,175	1,997	1,148	2,01
5,60	0,000	0,000	0,428	0,629	1,047	1,93
11,10	0,005	0,030	0,405	0,315	0,496	2,61
27,80	0,015	0,020	0,306	0,137	0,961	2,2
55,60	0,029	0,000	0,508	0,186	1,043	4,29
83,30	0,099	0,028	0,181	0,048	0,517	3,63
111,10	0,074	0,044	0,172	0,071	0,455	

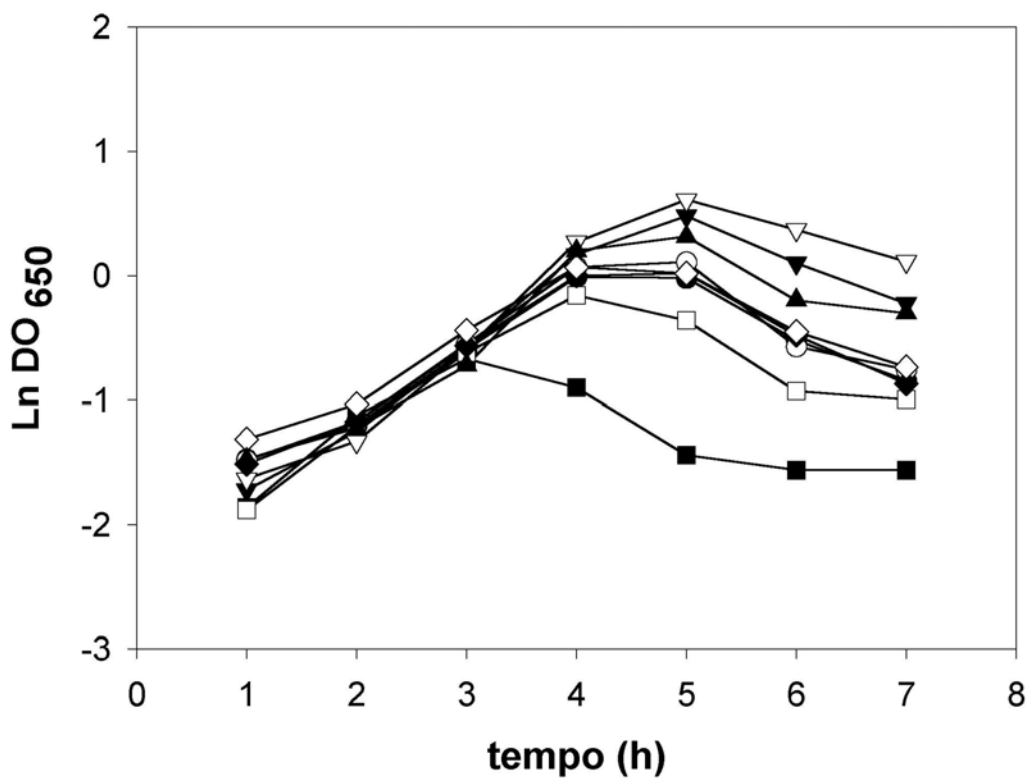
q global = a conversão da glicose em ácido lático, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico e etanol.

4.3. Efeito da fonte protéica do meio de cultura no crescimento de *C. perfringens*

A Figura 14 representa as curvas de crescimento em função da fonte protéica analisada. Foram avaliadas combinações de peptonas de carne e de caseína da Biobrás e da Difco, em concentrações de 5,0 g.L⁻¹ e 10,0 g.L⁻¹. No Quadro 5, apresentam-se os coeficientes cinéticos do crescimento.

A partir dessas informações, constata-se que, tanto os produtos testados quanto as concentrações de 5 ou 10 g.L⁻¹ de peptonas, não influenciaram os valores dos parâmetros estudados. A ausência de uma das fontes de hidrolisado protéico ou de ambos é refletida nos valores da concentração celular máxima e no título máximo de toxina.

A Figura 15 ilustra as variações das concentrações de glicose, ácidos orgânicos e etanol durante o crescimento da célula nas diferentes condições estudadas. No Quadro 6, apresentam-se os fatores de conversão da glicose em relação aos produtos formados. Verificou-se que as combinações de peptonas com concentração de 10 g.L⁻¹ apresentaram maior conversão da glicose em ácidos orgânicos e etanol. Observou-se ainda que, quando foram utilizadas peptonas da marca Biobrás, essa conversão foi mais expressiva. No uso de apenas uma fonte de peptona, tanto para a peptona de carne quanto para a peptona de caseína, houve queda acentuada no metabolismo celular.



- peptona bacteriológica Nº 3 Difco 10,0 g.L⁻¹ e casitona Difco 10,0 g.L⁻¹
- peptona bacteriológica Nº 3 Difco 10,0 g.L⁻¹ e casitona Biobrás 10,0 g.L⁻¹
- ▼ peptona de carne Biobrás 10,0 g.L⁻¹ e casitona Difco 10,0 g.L⁻¹
- ▽ peptona de carne Biobrás 10,0 g.L⁻¹ e casitona Biobrás 10,0 g.L⁻¹
- ausência de peptona e casitona
- peptona bacteriológica Nº 3 Difco 10,0 g.L⁻¹
- ◆ casitona Difco 10,0 g.L⁻¹
- ◇ peptona bacteriológica Nº 3 Difco 5,0 g.L⁻¹ e casitona Difco 5,0 g.L⁻¹
- ▲ peptona bacteriológica Difco 10,0 g.L⁻¹ e casitona Difco 10,0 g.L⁻¹

Figura 14 – Crescimento de *Clostridium perfringens* tipo B em diferentes fontes protéicas a 37 °C, agitação de 200 rpm e sob pH controlado em 6,5.

Quadro 5 – Efeito da fonte de proteína na velocidade específica de crescimento, na densidade ótica máxima e na DL50 máx. e duração da fase exponencial de crescimento de *Clostridium perfringens* tipo B a 37°C, agitação de 200 rpm e pH controlado em 6,5

Meio	Fonte protéica	μ_{\max} (h ⁻¹)	DO ₆₅₀ máx.	LD ₅₀ máx.	Fase Log (h)
1	Peptona bacteriológica nº3 Difco 10,0 g.L ⁻¹ e casitona Difco 10,0 g.L ⁻¹	0,600	1,09	10 ^{2,01}	3,0
2	Peptona bacteriológica nº3 Difco 10,0 g.L ⁻¹ e casitona Biobrás 10,0 g.L ⁻¹	0,700	1,18	10 ^{2,10}	3,0
3	Peptona de carne Biobrás 10,0 g.L ⁻¹ e casitona Difco 10,0 g.L ⁻¹	0,600	1,60	10 ^{1,96}	3,5
4	Peptona de carne Biobrás 10,0 g.L ⁻¹ e casitona Biobrás 10,0 g.L ⁻¹	0,600	1,90	10 ^{1,81}	3,5
5	Ausência de peptona e casitona	0,600	0,57	10 ^{1,20}	3,0
6	Peptona bacteriológica nº3 Difco 10,0 g.L ⁻¹	0,600	0,95	10 ^{1,50}	3,0
7	Casitona Difco 10,0 g.L ⁻¹	0,500	1,09	10 ^{1,71}	3,3
8	Peptona bacteriológica nº3 Difco 5,0 g.L ⁻¹ e casitona Biobrás 5,0 g.L ⁻¹	0,600	1,16	10 ^{2,01}	3,1

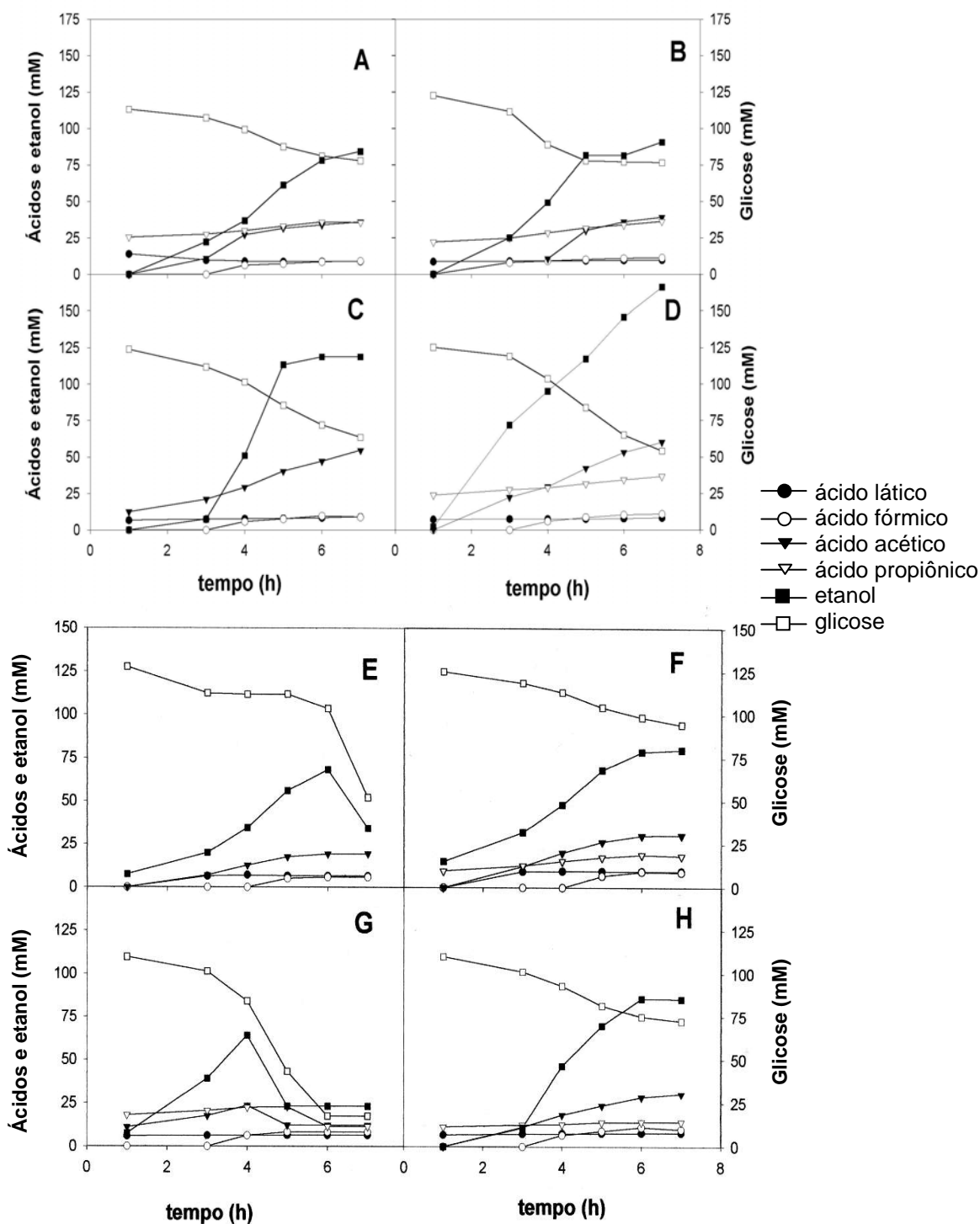


Figura 15 – Ácidos orgânicos, glicose e etanol em diferentes culturas de *Clostridium perfringens* tipo B em diferentes fontes de proteínas. (A = meio 1, B = meio 2, C = meio 3, D = meio 4, E = meio 5, F = meio 6, G = meio 7 e H = meio 8 (Quadro 5).

Quadro 6 – Fatores de conversão da glicose em ácidos orgânicos e etanol, em culturas de *Clostridium perfringens* tipo B com diferentes fontes protéicas a 37 °C, agitação de 200 rpm e pH controlado em 6,5

Fonte de N (meio)	ác.lático/ glicose	ác.fórmico/ glicose	ác.acético/ glicose	ác.propiônico/ glicose	etanol/ glicose	q global
1	0,000	0,021	0,235	0,115	0,447	2,61
2	0,011	0,019	0,211	0,131	0,236	3,23
3	0,019	0,013	0,232	0,000	0,470	3,34
4	0,005	0,019	0,194	0,058	0,370	4,18
5	0,015	0,032	0,170	0,031	0,507	2,17
6	0,000	0,022	0,251	0,107	0,509	2,4
7	0,003	0,006	0,045	0,021	0,157	1,39
8	0,004	0,002	0,054	0,000	0,206	0,97

q global = a conversão da glicose em ácido lático, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico e etanol.

Quadro 7 – Percentagem de aminoácidos dos meios de cultivo nos ensaio de avaliação da fonte protéica

Aminoácidos % (composição média)																		
Fonte Protéica	Alanina	Arginina	Ácido aspártico	Cystina	Ácido glutâmico	Glycina	Histidina	Isoleucina	Leucina	Lisina	Metionina	Fenil alanina	Prolina	Serina	Treonina	Tripfano	Tirosina	Valina
Peptona bacteriológica	8,67	6,76	5,6	0,2	10,21	15,59	0,58	1,45	3,01	3,42	1,19	1,81	8,8	2,87	1,81	0,36	0,64	2,35
Proteose peptona no 3 α (Difco)	5,99	5,49	6,92	1,12	12,38	9,26	1,74	2,65	5,70	5,02	1,86	2,72	4,94	3,65	3,32	0,59	1,96	3,62
Casitona Difco	3,01	3,76	6,61	0,02	20,03	1,97	2,17	4,16	8,74	13,62	1,71	4,02	8,57	4,82	3,74	0,14	2,09	4,06
Peptona de caseína Biobrás	2,50	3,40	6,40	0,50	19,90	1,50	2,60	4,60	8,50	13,80	2,40	4,30	9,60	4,60	3,40	1,10	2,40	5,60
Peptona de carne Biobrás	6,55	4,95	7,11	0,43	10,50	11,70	1,11	3,03	7,03	4,10	0,96	4,05	7,55	3,07	2,11	0,52	2,02	4,54
Extrato de levedura (Difco)	5,36	3,02	6,69	0,74	14,20	3,25	1,20	3,23	4,96	5,15	1,05	2,53	2,60	2,84	2,95	1,36	1,20	3,79
Concentração total (%) dos aminoácidos em cada meio de cultura na avaliação da fonte protéica																		
meio																		
1	1,44	1,23	2,02	0,19	4,66	1,45	0,51	1,00	1,94	2,38	0,46	0,93	1,61	1,13	1,00	0,21	0,53	1,15
2	1,39	1,19	2,00	0,24	4,65	1,40	0,55	1,05	1,92	2,40	0,53	0,96	1,71	1,11	0,97	0,31	0,56	1,30
3	1,49	1,17	2,04	0,12	4,47	1,69	0,45	1,04	2,07	2,29	0,37	1,06	1,87	1,07	0,88	0,20	0,53	1,24
4	1,44	1,14	2,02	0,17	4,46	1,65	0,49	1,09	2,05	2,31	0,44	1,09	1,98	1,05	0,85	0,30	0,56	1,39
5	1,14	0,85	1,36	0,19	2,66	1,25	0,29	0,59	1,07	1,02	0,29	0,53	0,75	0,65	0,63	0,20	0,32	0,74
6	0,84	0,68	1,33	0,08	3,42	0,52	0,34	0,74	1,37	1,88	0,28	0,66	1,12	0,77	0,67	0,15	0,33	0,79
7	1,09	0,92	1,66	0,18	4,03	0,94	0,47	0,92	1,63	2,15	0,44	0,82	1,47	0,93	0,80	0,28	0,46	1,12
8	0,54	0,30	0,67	0,07	1,42	0,33	0,12	0,32	0,50	0,52	0,11	0,25	0,26	0,28	0,30	0,14	0,12	0,38

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Clostridium perfringens tipo B, bactéria anaeróbia, heterofermentativa, gram-positiva e produtora de toxinas α , β e ϵ , é fonte dessas toxinas presentes na composição das vacinas veterinárias contra clostridioses. Neste trabalho, estudou-se o efeito da composição do meio de cultura e do pH sobre o crescimento da bactéria e da produção de toxinas destinadas à formulação de vacinas para uso comercial. Foram estudadas as concentrações iniciais da glicose e dos hidrolisados protéicos de diferentes tipos de peptona de carne e peptona de caseína, além de suas combinações. Os experimentos foram conduzidos em sistema de batelada. Amostras foram coletadas a cada hora para determinação da concentração de células, produtos do metabolismo ácido láctico, ácido acético, ácido propiônico, ácido fórmico, etanol e glicose.

A análise da cinética de crescimento e da produção indicou que a formação de toxinas está associada ao crescimento. No cultivo sem controle de pH, observou-se que a DL_{50} é crescente, apresentando uma curva de perfil similar ao do crescimento celular.

Verificou-se que, apesar de em pH 6,5 ter havido o mesmo crescimento celular no cultivo sem controle de pH (pH livre) e com velocidade específica de crescimento muito semelhante, a maior DL_{50} máx. foi mantida em pH 6,5, indicando este pH para o crescimento e produção de toxinas.

A variação da concentração inicial de glicose no meio de crescimento entre 1,4 e 111,1 mM não afetou a velocidade específica de crescimento, entretanto a concentração celular máxima aumentou à medida que se elevou a concentração de glicose no meio, o que foi verificado também com a DL_{50} máx. O maior valor da DL_{50} , de $10^{2,11}$, foi atingido para concentração de 111,1 mM.

Quanto ao consumo de glicose, observou-se que, quando concentrações iniciais de glicose inferiores a 55,6 mM são utilizadas, a fonte de carbono torna-se fator limitante do crescimento da bactéria.

Já na avaliação da fonte protéica não houve diferenças entre as marcas testadas. Maiores títulos de toxina foram obtidos na combinação de uma fonte protéica de carne e de caseína, além de demonstrarem que concentrações de 5 g.L^{-1} de cada hidrolisado são satisfatórias para o crescimento e produção de toxinas, reduzindo pela metade as concentrações usuais.

Assim, propõe-se como sistema de produção em fermentadores do tipo batelada o meio basal com no mínimo 55,6 mM de glicose, $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de cada um dos hidrolisados protéicos, de carne e de caseína, e pH de 6,5, sob controle durante todo o processo.

O presente estudo permitiu encontrar parâmetros satisfatórios de cultivo, que foram utilizados na ampliação de escala para produção industrial de vacinas contra clostridioses causadas por *Clostridium perfringens* tipo B.

6. PROPOSTAS FUTURAS

Comparar os níveis de toxinas de *C. perfringens* tipo B em fermentador escala-piloto com aqueles obtidos em escala laboratorial, utilizando-se o sistema de produção sugerido neste trabalho.

Estudar a cinética de produção de toxina durante a fase estacionária de crescimento.

Quantificar a toxina ϵ durante o crescimento de *C. perfringens* tipo B.

Estudar o efeito inibitório do etanol sobre o crescimento e produção de toxinas do *Clostridium perfringens* tipo B.

Avaliar outros métodos senão o de batelada, como batelada com alimentação, com reutilização da célula, fermentação contínua e, ou, sistemas com eliminação contínua dos compostos inibidores, de maneira a se obterem sistemas de produção otimizados.

Estudar a purificação e concentração das toxinas no meio, obtendo-se uma vacina mais pura, mais concentrada e de melhor qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREESEN, J. R., BAHL, H., GOTTSCHALK, G. Introduction to the physiology and biochemistry of the genus *Clostridium*. In: MINTON, N. P., CLARKE, D. J. **Clostridia**. New York: [s.m.], 1989. p.27-62.
- AWAD, M. M., BRYANT, A. E., STEVENS, D. L., ROOD, J. I. Virulence studies on chromosomal α -toxinas and θ toxin mutants constructed by allelic exchange provide genetic evidence for the essential roller of α -toxin in *Clostridium perfringens*-mediated gas gangrene. **Mol. Microbiol.**, v.15, p.191-202, 1995.
- BIER, O. **Bacteriologia e Imunologia**, v.10, p.724, 1955.
- BULLEN, J. J. Role of toxins in host-parasite relationships, p. 233-276. In: AJL, S. J., KADIS, S., MONTIE, T. C. (Eds.). **Microbiol toxins**. New York: Academic Press, 1970. v.1, p.233-276.
- BUXTON, D., LINKLATER, K. A., DYSON, D. A. Pulpy kidney disease and its diagnosis by histological examination. **Vet. Rec.**, v.102, p.241, 1978.
- BUXTON, D., MORGAN, K. T. Studies of lesions produced in brains of colostrum-deprived lambs by *Clostridium welchii* (*C. perfringens*) type D toxin. **J. Comp. Pathol.**, v.86, p.435-447, 1976.
- COLE, S. T. Genome structure and location of virulence genes in *Clostridium perfringens*. In: **International conference on the molecular genetics and Pathogenesis of the Clostridia**, 1995. p.10.

- DAUBE, G., CHINA, B., SIMON, P., HVALA, K., MAINIL, J. Typing of *Clostridium perfringens* by *in vitro* amplification of toxin genes. **J. Appl. Bacteriol.**, v.77, p.650-655, 1994a.
- DAUBE, G., SIMON, P., LIMBOURG, B., RENIER, K., KAECKENBEECK, A. Molecular typing of *Clostridium perfringens*. **Ann. Med. Vet.**, v.138, p.183-191, 1994b.
- DECHER, K., JUNGERMAN, K., THAUWER, R. K. Energy production in anaerobic organisms, **Angew Chem. (Int. Ed.)**, v.9, p.138-58, 1970.
- DUNCAN, C. L., STRONG, D. H. Experimental production of diarrhe in rabbits with *Clostridium perfringens*. **Can. J. Microbiol.**, v.15, p.765-770, 1969.
- FINNIE, J. W., HAJDUK, P. An immunohistochemical study of plasma albumin extravasation in the brain of mice after the administration of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. **Aust. Vet. J.**, v.69, p.261-262, 1992.
- FRANCK, F. W. *Clostridium perfringens* type B from enterotoxemia in Young ruminants. **Am. J. Vet. Res.**, v.17, p.492-494, 1956.
- GINTER, A., WILLIAMSON, E. D., DESSY, F., COPPE, P., FEARN, A., TITBALL, R. W. Comparison of the a-toxin produced by bovine enteric and gas gangrene strains of *C. Perfringens*. In: International Conference on the Molecular Genetics and Pathogenesis of the Clostridia, 1995. **Abstr.** A17, 1995. p.19.
- GRANUM, P. E. *Clostridium perfringens* toxins involved in food poisoning. **Int. J. Food Microbiol.**, v.10, p.101-112, 1990.
- GRANUM, P. E., STEWART, G. Molecular biology of *Clostridium perfringens* enterotoxin, p. 177-191. In: SEBALD, M. (Ed.). **Genetics and molecular biology of anaerobes**. Stuttgart, Germany: Springer-Verlag, 1993. p.177-191.
- GRINER, L. A. Enterotoxemia of sheep. I. Effect of *Clostridium perfringens* type D toxin on the brains of sheep and mice. **Am. J. Vet. Res.**, v.22, p.429-442, 1961.
- HANNA, P. C., MCCLANE, B. A. A recombinant C-terminal toxin fragment provides evidence that membrane insertion is important for *Clostridium perfringens* enterotoxin cytotoxicity. **Mol. Microbiol.**, v.5, p.225-230, 1991.
- HOBBS S. N., MISRA D. S., SING, N. P. Studies on the pathogenesis of *Clostridium perfringens* type A serotypes. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.48, n.1, p.42-47, 1978.

- HULKOWER, K. I., WNEK, A. P., MCCLANE, B. A. Evidence that alterations in small molecule permeability are involved in the *Clostridium perfringens* type A enterotoxin-induced inhibition of macromolecular synthesis in Vero cells. **J. Cell. Physiol.**, v.140, p.498-504, 1989.
- JOHANNSEN, U., ARNOLD, P., KOHLER, B., SELBITZ, H. J. Experimental *Clostridium perfringens* type A enterotoxaemia in unweaned piglets. **Monatsh. Veterinaermed**, v.48, p.267-273, 1993.
- JOHANNSEN, U., ARNOLD, P., KOHLER, B., SELBITZ, H. J. Studies into experimental provocation of the disease by *Clostridium perfringens* type A intoxication and infection, **Monatsh. Veterinaermed**, v.48, p.129-136, 1993a.
- JOLIVET-REYNAUD, C., POPOFF, M. R., VINIT, M. A. Enteropathogenicity of *Clostridium perfringens* β -toxin and other clostridial toxins. **Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. Suppl.**, v.15, p.145-151, 1986.
- MCCLANE, B. A., WNEK, A. P. Studies of *Clostridium perfringens* enterotoxin action at different temperatures demonstrate a correlation between complex formation and cytotoxicity. **Infect. Immun.**, v.58, p.3109-3115, 1990.
- MCCLANE, B. A., WNEK, A. P., HULTKOWER, K. I. HANNA, P. C. Divalent cation involvement in the action of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. **J. Biol. Chem.**, v.263, p.2423-2435, 1988.
- MCDONEL, J. L. Toxins of *Clostridium perfringens* types A, B, C, D and E. In: DORNER, F., DREWS, J. (Eds.). **Pharmacology of bacterial toxins**. Oxford: Pergamon Press, 1986. p. 477-517.
- MCDONEL, J. L., MCCLANE, B. A. Production, purification, and assay of *Clostridium perfringens* enterotoxin. **Methods Enzymol.**, v.165, p.94-103, 1988.
- MORRIS, J. G. Fifth Stenhouse-Williams Memorial Lecture: oxygen and the obligate anaerobe. **J. Appl. Bacteriol.**, v.40, p.229-44, 1976.
- MORRIS, J. G. The physiology of obligate anaerobiosis. **Adv Microbiol Physiol**, v.12, p.169-245, 1975.
- MURATA, R., SODA, S., YAMAMOTO, A., SATO, H., ITO, A., The effect of zinc on the production of various toxins of *Clostridium perfringens*. **Japan J. Med. Sci. Biol.**, v.22, p.133-148, 1994.
- MURATA, R., YAMAMOTO, A., SODA, S. ITO, nutritional requirements of *Clostridium perfringens* PBK for α -toxin production. **Japan J. Med. Sci. Biol.**, v.18, p.189-202, 1965.

- NAGAHAMA, M., SAKURAI, J. Distribution of *labeled Clostridium perfringens* epsilon toxin in mice. **Toxicon**, v.29, p.211-217, 1991.
- NILO, L. Effect on calves of the intravenous injection of the entero-toxin of the *Clostridium welchii* type A. **J. Comp. Pathol.**, v.83, p.265-269, 1973.
- NILO, L. Mechanism of action of the enteropathogenic factor of *Clostridium perfringens* type A. **Infect. Immun.**, v.3, p.100-106, 1971.
- PAL, K. K., HARBOLA, P. C., SIKDAR, A., KUMAR, A. A. Different physico-chemical factors on the b-toxin production of *Clostridium perfringens* type B. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.60, p.424-425, 1990.
- ROBERTS, R. S. Clostridial diseases. In: STABLEFORTH, A. W., GALLOWAY, I. A. (Eds.). **Diseases due to bacteria**, New York: Academic Press, 1958. v.1.
- ROITMAN, I., TRAVASSOS, L. R., AZEVEDO, J. L. **Tratado de Microbiologia**. [S. l.]: Manole, 1986.
- SAKURAI, J., DUNCAN, Ch. L. Effect of carbohydrates and control of culture pH on α -toxin production by *Clostridium perfringens* type C. **Microbiol. Immunol.**, v.23, p.313-318, 1979.
- SAKURAI, J., NAGAHAMA, M., FUJII, Y. Effect of *Clostridium perfringens* epsilon toxin on the cardiovascular system of rats. **Infect. Immunol.**, v.42, p.1183-1186, 1983.
- SEBALD, M., HAUSER, D. Oxygen and the anaerobes revisited. **Anaerobe**, v.1, p.11-16, 1995.
- SMITH, L., WILLIAMS, B. L. **The pathogenic anaerobic bacteria**. 3rd ed. Charles C Thomas. 1984. (Springfield, III).
- SONGER, J. G. Clostridial enteric diseases of domestic animals, Department of Arizona, Tucson, Arizona 85721. **Clinical Microbiology Reviews**, p.216-234, 1995; Apr. 1996.
- STUBBINGS, D. P. *Clostridium perfringens* enterotoxaemia in two young horses. **Vet. Rec.**, v.127, p.431, 1990.
- TIMONEY, J. F., GILLESPIE, J. H., SCOTT, F. W., BARLOUGH, J. E. **Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals**. Ithaca, N. Y: Comstock Publishing Associate, 1988.

TUNNICLIFF, E. A. A strain of *Clostridium welchii* producing fatal dysentery in lambs. **J. Infect. Dis.**, v.52, p.407-412, 1933.

YABANNAVAR, V. M., WANG, D. I. Analysis of mass transfer for immobilized cells in a extractive lactic acid fermentation. **Biotech. Bioeng.**, v37, p.544-550, 1991.