



## I Encontro Regional de Estudos Agroambientais

Responsabilidade Socioambiental da Pesquisa Científica

03 a 05 de dezembro de 2018, Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Alagoas

### **Isolamento, seleção e purificação de *Lactobacillus* de diferentes estádios fenológicos da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**

Antonia Juliana Xavier Fernandes<sup>1</sup>, Adrielle de Melo Cezar Almeida Canabarro<sup>1</sup>, Crisea Cristina Nascimento de Cristo<sup>1</sup>, Yamina Coentro Montaldo<sup>1</sup>, Lívia Ribeiro da Silva<sup>1</sup>, Bruna Brasil Oliveira<sup>1</sup>, Elizabeth Simões do Amaral Alves<sup>1</sup>, Tania Marta Carvalho dos Santos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo. E-mail: adriellcanabarro@hotmail.com; ju93fernandes@gmail.com; criseacncristo@gmail.com; yaminacm@hotmail.com; ribeirolivia@gmail.com; brunabrasilov@hotmail.com; jm.agro@hotmail.com; tmcs@ceca.ufal.br.

**Resumo:** A mandioca é uma planta de alto valor econômico e nutricional, sendo utilizada na dieta humana e também para a alimentação animal por meio dos processos de ensilagem. Dentre as bactérias responsáveis pelos processos de fermentação de ensilagem, destaca-se o gênero *Lactobacillus* que pode ser utilizado como aditivo para esse processo por meio de inoculantes. Diante disso, objetivou-se por meio desse trabalho, o isolamento, seleção e purificação de *Lactobacillus* de folhas de mandioca em diferentes estádios fenológicos. Para tanto, foram coletadas folhas em três estádios fenológicos. As amostras foram encaminhadas ao laboratório onde foi procedido a diluição seriada decimal, seguida da inoculação em meio de cultura Soro de Laranja e incubada a 37 °C. Após esse período, as colônias com crescimento característico foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura Agar Rogosa e incubadas a 37 °C com restrição de oxigênio para isolamento em seguida. As colônias selecionadas foram submetidas a análises morfo-tintoriais pelo método de coloração de Gram e catalase, que são testes que caracterizam de forma sugestiva o gênero *Lactobacillus*. Todos os isolados purificados foram repicados e armazenados. Foi possível o isolamento de bactérias lacto fermentativas do gênero *Lactobacillus* provenientes de plantas de mandioca.

**Palavras-chave:** bactérias epifitas, fermentação, catalase.

### **Isolation, selection and purification of *Lactobacillus* from different phenologic stadium of cassava plant (*Manihot esculenta* Crantz)**

**Abstract:** Cassava is a plant of high economic and nutritional value, being used in the human diet and also for the animal feed through the silage processes. Among the bacteria responsible for the processes of silage fermentation, the genus *Lactobacillus* can be used as an additive for this process through inoculants. The objective of this study was the isolation, selection and purification of *Lactobacillus* from cassava leaves at different phenological stages. For that, leaves were collected in three phenological stages. Samples were sent to the laboratory where serial decimal dilution was carried out, followed by inoculation in Orange Agar culture medium and incubated at 37 °C. After this period, colonies with characteristic growth were inoculated into Petri dishes containing Rogosa Agar culture medium and incubated at 37 °C with oxygen restriction for isolation. The selected colonies were submitted to morpho-staining analyzes by the Gram staining method and catalase, which are tests that characterize the genus *Lactobacillus* in a suggestive manner. All purified isolates were picked and stored. It was possible to isolate lactic fermentative bacteria of the genus *Lactobacillus* from cassava plants.

**Keywords:** epiphytic bacteria, fermentation, catalase.



## I Encontro Regional de Estudos Agroambientais

Responsabilidade Socioambiental da Pesquisa Científica

03 a 05 de dezembro de 2018, Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Alagoas

### INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma cultura anual (FASINMIRIN; REICHERT, 2011; NAPASIRTH et al., 2015), amplamente cultivada nas regiões tropicais e subtropicais, com capacidade de prosperar em solos fracos e arenosos (FASINMIRIN; REICHERT, 2011), com baixo teor de matéria orgânica, temperaturas elevadas e sob baixa precipitação (NAPASIRTH et al., 2015), além de possuir relativa tolerância à infestação de ervas daninhas e ao ataque de insetos (SENA et al., 2014). Assim, a cultura da mandioca destaca-se pela alta tolerância a adversidades (SENA et al., 2014).

As raízes de mandioca, fatiadas, moídas ou trituradas, tanto nas formas fresca como seca, são consumidas pelos ruminantes, sendo utilizadas largamente como substituição aos grãos de cereais na alimentação animal.

A utilização de subprodutos da agroindústria na alimentação animal é uma estratégia promissora para a redução dos custos de produção (SOUZA et al., 2012).

As raízes de mandioca, fatiadas, moídas ou trituradas, tanto nas formas fresca como seca, são consumidas pelos ruminantes, sendo utilizadas largamente como substituto para os grãos de cereais na alimentação animal.

As bactérias ácido láctico como *Lactobacillus* da microbiota epifítica são essenciais para fermentação das silagens. Os inoculantes bacterianos abrangem a classe de aditivos com mais rápido desenvolvimento e adoção em todo o mundo, devido principalmente à facilidade de manipulação, ausência de toxicidade para os mamíferos e grande disponibilidade no mercado.

Os inoculantes microbianos desenvolvidos a partir da própria planta que se deseja ensilar têm revelado melhor padrão fermentativo e maior

recuperação da matéria seca ensilada do que inoculantes confeccionados utilizando-se microrganismos de isolados de outras plantas.

No contexto apresentado, objetivou-se isolar quantificar e caracterizar *Lactobacillus* colhidos em diferentes estádios fenológicos da folha de mandioca afim de avalia-los como aditivos.

### MATERIAL E MÉTODOS

Para o isolamento das bactérias epifitas, foram amostradas aleatoriamente dos diversos estádios fenológicos, folhas da mandioca (20 dias após o plantio; início do processo de tuberização (60 dias); e definição das raízes de reserva (60 a 90) dias após o plantio).

O isolamento foi realizado por meio da técnica das diluições sucessivas com posterior cultivo em meio de cultivo Soro de Laranja, e incubado a 37 °C por 48h. Após 48 horas de incubação a 37°C, as culturas com crescimento evidenciado foram plaqueadas por estrias em meio de cultivo agar Rogosa e incubadas novamente sob baixo teor de oxigênio, a 37 °C durante 48 horas, para posterior isolamento. As colônias selecionadas isolados foram submetidos a análises morfo-tintoriais pelo método de coloração de Gram e catalase, que são testes que caracterizam de forma sugestiva o gênero *Lactobacillus*.

As colônias foram então repicadas para novo meio de cultura visando à purificação. A identificação dos isolados foi realizada com base no perfil de fermentação de carboidratos em meio de cultivo.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionadas do ágar soro de laranja onze colônias características, desse total, nove



## I Encontro Regional de Estudos Agroambientais

Responsabilidade Socioambiental da Pesquisa Científica

03 a 05 de dezembro de 2018, Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Alagoas  
provêm do meio de cultivo incubado por cinco e sete dias, respectivamente.

Das colônias selecionadas, três apresentaram reação Gram+, e foram negativos nos testes da redução do nitrato, hidrólise de gelatina, produção de gás sufrídico, indol, catalase e crescimento a 15°C, característicos de *Lactobacillus*.

O perfil de fermentação de carboidratos confirmou que os isolados pertencem ao gênero *Lactobacillus*, no entanto não foi possível identificação ao nível de espécie.

A caracterização do gênero *Lactobacillus* pôde ser realizada com base nos testes de coloração pelo método de Gram, catalase, produção de gás em glicose (BARROS et al., 2009).

Considera-se importante identificar as espécies de *Lactobacillus* spp. presentes nos ecossistemas microbianos (SONG et al., 2000), tendo em vista sua funcionalidade como agentes fermentativo e ótimos inoculantes para os processos de ensilagem na alimentação animal.

### CONCLUSÕES

Foi possível o isolamento de bactérias lacto fermentativas do gênero *Lactobacillus* provenientes de plantas de mandioca.

### AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo financiamento da pesquisa.

### REFERÊNCIAS

FASINMIRIN, J.T.; REICHERT, J.M. Conservation tillage for cassava (*Manihot esculenta crantz*) production in the tropics. **Soil and Tillage Research**, v. 113, N. 1, p. 1-10, 2011.

NAPASIRTH, V.; NAPASIRTH, P., SULINTHONE, T.; PHOMMACHANH, K.; CAI, Y. Microbial population, chemical composition and silage

fermentation of cassava residues. **Animal Science Journal**, v. 86, N. 9, p. 842-848, 2015.

SENA, L. S.; ROCHA JÚNIOR, V. R.; DOS REIS, S. T.; OLIVEIRA, L. M.; MARQUES, K. M. S.; TOMICH, T. R. Degradabilidade das silagens de diferentes frações da parte aérea de quatro cultivares de mandioca. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, N. 3, p. 249-258, 2014.

SONG, Y. L.; KATO, N.; LIU, C. X.; KATO, H.; WATANABE, K. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. **FEMS. Microbiology Letters.**, v. 187, p. 167-173, 2000.

BARROS, M. R.; ANDREATTI FILHO, R. L.; OLIVEIRA, D. E.; LIMA, E. T.; CROCCI, A. J. Comparação entre método bioquímico e reação em cadeia de polimerase para identificação de *Lactobacillus* spp., isolados de aves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 2, p. 319-325, 2009.