

Influência dos microrganismos *Ralstonia solanacearum* e *Bacillus megaterium* na taxa de degradação de poli(3-hidroxibutirato) comercial e sintetizado por *Ralstonia solanacearum*

MATHEUS MARQUES TORRES¹; MARIANE IGANSI ALVES²; KARINE LASTE MACAGNAN³; PATRÍCIA DIAZ DE OLIVEIRA⁴; ANGELITA DA SILVEIRA MOREIRA⁵; CLAIRE TONDO VENDRUSCOLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – matheus_mmt@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – marianeigansialves@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – karinemacagnan@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – bilicadiaz@yahoo.com.br

⁵Universidade Federal de Pelotas – angelitadasilveiramoreira@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – clairevendruscolo@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os materiais plásticos não biodegradáveis, derivados principalmente do petróleo, são largamente utilizados nos dias atuais. Pelo seu baixo custo de produção e propriedades físicas desejáveis, são empregados em diversos setores industriais, estando presentes no cotidiano de modo geral. Alguns possuem grande resistência e uma vida útil extensa, justificando seu amplo uso, mas aqueles empregados em materiais descartáveis estão se tornando um sério problema ambiental uma vez que a sua degradação é lenta (CASARIN et. al, 2013). Aliado a métodos de descarte ineficazes e um alto contingente de produção, tais materiais podem ser encontrados em aterros sanitários, acumulando-se sem serem decompostos. Quando não têm o devido destino, os plásticos não biodegradáveis podem contaminar solos e poluir corpos d'água, interferindo nas unidades biológicas presentes nos ecossistemas e modificando seu habitat. De acordo com a PLASTICS EUROPE (2011), a produção mundial de plásticos, em 2010, já ultrapassava 265 milhões de toneladas, tendendo ao crescimento nos dias atuais.

Biopolímeros são uma forma menos intrusiva ao meio ambiente de se obter os materiais plásticos necessários à indústria, sem, contudo, comprometer a biosfera. Além de serem produzidos a partir de fontes renováveis, sua degradação é mais eficaz e ocorre em um menor tempo em comparação aos plásticos petroquímicos.(CORDOVA et al, 2013).

O poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB)] é um biopolímero microbiano intracelular e possui muitas características semelhantes ao polipropileno, evidenciando seu potencial físico. É o polihidroxialcanoato mais estudados e difundido mundialmente, além de ter aplicação em diversas áreas tecnológicas (MACAGNAM, 2014).

O objetivo do trabalho foi verificar o potencial degradativo das bactérias *Ralstonia solanacearum* e *Bacillus megaterium*, isoladas da biosfera local, em solo simulado, sobre o P(3HB) produzido por *Ralstonia solanacearum* em comparação ao P(3HB) comercial (Biocycle®).

2. METODOLOGIA

O P(3HB) utilizado como controle foi o comercial, disponibilizado pela PHB Industrial SA (Biocycle®) e foram produzidas amostras tipo filme com a solubilização do P(3HB) em pó em clorofórmio [1:40 (m/v)] mediante aquecimento a 58 °C sob agitação magnética por 30min. A solução foi então colocada em placa

de Petri semiaberta, com diâmetro de 9 cm, em capela de exaustão de gases para lenta evaporação do solvente e formação do filme.

O P(3HB)-RS foi produzido no Laboratório de Biopolímeros por fermentação submersa com a bactéria *Ralstonia solanacearum* RS (MACAGNAN, 2014). A cepa selecionada, pertencente ao acervo de culturas do laboratório de biopolímeros da Universidade Federal de Pelotas, foi primeiramente multiplicada por repiques constantes em placas com meio sólido NYA (SCHAAD et al. 2001).

Para a fase de crescimento celular, os repiques foram transferidos para *Erlenmeyers* de 500 mL contendo 200 mL de meio YM líquido, (JEANES, 1974), permanecendo em agitador orbital a 32°C e 150 rpm por 24 horas.

Para a fase de produção de polímero, o inóculo (DO_{600} 10 a 11) foi transferido para o meio mineral F4, onde permaneceu em *Erlenmeyers*, no agitador orbital a 32°C e 150 rpm por 72 horas. Em seguida, o caldo fermentado foi centrifugado a 7000 rpm e o pellet foi então resuspenso em solução salina e centrifugado na mesma condição anterior, sendo posteriormente seco em estufa a 56°C até peso constante.

Para a extração, a massa celular seca foi ressuspensa em clorofórmio em uma proporção de 1:40 (m/v), e aquecida por 30min a 58 °C sob agitação. A solução foi colocada em funis de separação, onde o mesmo volume de água destilada, em relação ao clorofórmio, foi adicionado. A fase inferior orgânica foi então vertida em placas de Petri semiabertas, para lenta evaporação do solvente e formação do filme. Os corpos de prova de P(3HB), de aproximadamente 3,5 cm², foram pesados e individualizados em envelopes de tecido de poliéster medindo 5x6 cm, enterrados em triplicata e retirados nos períodos de tempo de 20, 40, 60, 80 e 100 dias.

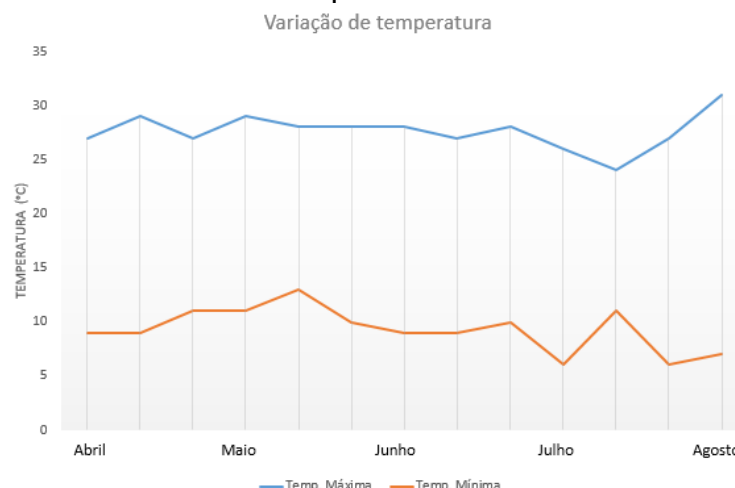
O experimento de degradação foi conduzido em casa de vegetação, cuja temperatura foi mensurada utilizando-se termômetro analógico para máxima e mínima.

Os recipientes utilizados foram sementeiras plásticas com células individualizadas, com dimensões de 6,5 x 6,5 x 6,0 cm, contendo aproximadamente 130 g de solo. O solo, adquirido no comércio local, possuía em sua constituição 25% de argila e 5,38% de massa orgânica, com pH 7,64, capacidade de retenção de água de 45%, mantido com essa proporção de umidade.

Quatro tratamentos foram utilizados: (1) solo natural, (2) terra esterilizada e acrescida de inóculo de *R. solanacearum*, (DO_{600} 10,8) (3) terra esterilizada e acrescida de inóculo de *B. Megaterium* (DO_{600} 5,8), e (4) solo esterilizado. Para obtenção dos inóculos utilizados nos tratamentos 2 e 3, foram realizados repiques multiplicativos em meio NYA a 32°C e 36 °C por 24h, respectivamente para *R. solanacearum* e *B. megaterium*; após, as células foram transferidas para frascos *Erlenmeyers* com 200 mL de meio YM e incubados nas temperaturas anteriores a 150 rpm, por 24 h.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As variações de temperatura anotadas na casa de vegetação estão demonstradas no gráfico 1, com valores entre 5 e 31 °C.

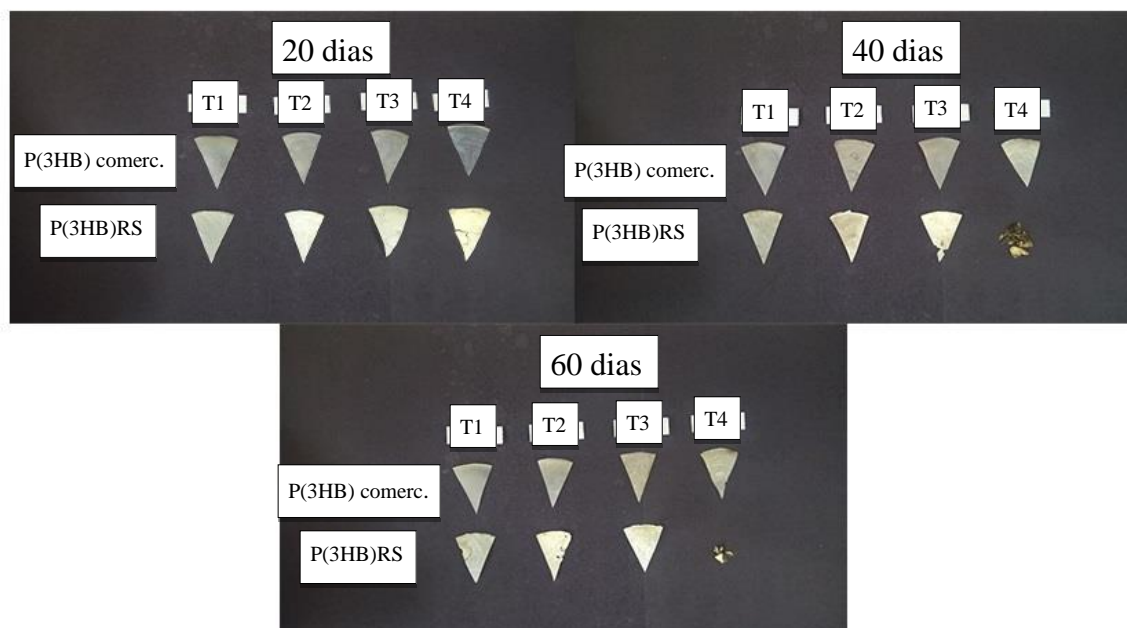
Gráfico 1. Variação de temperatura na casa de vegetação ao longo do experimento

A tabela 1 ilustra o grau de degradação dos bioplásticos submetidos aos diferentes tratamentos em solo simulado. A figura 1 representa, nos diferentes tempos do ensaio, a aparência física das amostras, discriminando tipo de P(3HB) e tratamentos respectivos.

Tabela 1. Percentuais de degradação (%) dos P(3HB) nos diferentes tratamentos

Tempo (dias)	Tratamentos							
	T1		T2		T3		T4	
	P(3HB) RS	P(3HB) comerc	P(3HB) RS	P(3HB) comerc	P(3HB) RS	P(3HB) comerc	P(3HB) RS	P(3HB) comerc
20	3.49 ^{a,C}	2.54 ^{a,C}	7.24 ^{a,BC}	3.64 ^{a,C}	12.51 ^{a,B}	6.39 ^{a,C}	19.22 ^{a,A}	3.68 ^{a,C}
40	10.22 ^{a,C}	7.08 ^{a,C}	12.03 ^{a,C}	7.87 ^{a,C}	36.09 ^{a,AB}	12.26 ^{b,C}	49.25 ^{a,A}	18.58 ^{b,BC}
60	23.85 ^{a,D}	12.97 ^{b,D}	26.03 ^{a,CD}	19.24 ^{b,CD}	49.72 ^{a,B}	22.67 ^{b,CD}	77.32 ^{a,A}	27.63 ^{b,C}

(T1) solo estéril; (T2) solo estéril inoculado com *R. solanacearum*; (T3) solo estéril inoculado com *B. megaterium*; (T4) solo não estéril. Letras sobrescritas minúsculas diferentes, na mesma linha e no mesmo tratamento, representam diferenças significativas devidas ao P(3HB); letras sobrescritas maiúsculas diferentes para o mesmo polímero, na mesma linha e em tratamentos diferentes, representam diferenças significativas devidas ao tratamento.

Figura 1. Imagem das amostras após os respectivos tempos de degradação

O P(3HB) RS teve taxa de degradação estatisticamente maior no solo não estéril, com a microbiota natural (T4), nos tempos de 20 e 40 dias. Em 60 dias, a degradação foi maior em todos os tratamentos, mas com destaque para o T4, onde observou-se a perda quase total do peso original. É possível observar na figura 1 a perceptível diferença de massa no tratamento 4, entre as amostras.

A capacidade biodegradativa das bactérias *R. solanacearum* e *B. megaterium* foi comprovada pelas maiores degradações observada nos solos inoculados (T2 e T3, respectivamente) em relação ao T1, com solo estéril não inoculado. Observou-se a maior degradação no solo inoculado com *B. megaterium* (T30). As bactérias *R. solanacearum* e *B. megaterium* acumulam P(3HB) e possuem as enzimas necessárias para a sua degradação. No entanto, a perda de massa de P(3HB) no solo esterilizado (T1) e no esterilizado e inoculado com a bactéria *R. solanacearum* (T2) possuem grandezas próximas, além de não possuírem muitas diferenças visuais, como ilustra a figura 1, evidenciando que essa bactéria não possui um sistema de degradação tão efetivo.

4. CONCLUSÕES

Apesar do estudo ainda não ter sido concluído, apenas com os dados de degradação de até 60 dias é possível afirmar que o P(3HB) RS é um material atraente do ponto de vista ecológico, uma vez que possui taxa de degradação maior do que o P(3HB) comercial Biocycle®, único já produzido comercialmente no Brasil. Também podemos inferir que as bactérias *R. solanacearum* e *B. megaterium* são potenciais bactérias biodegradadoras de P(3HB), com destaque para *B. megaterium*. Os resultados obtidos ainda requerem mais estudos para verificar uma possível sinergia entre a microbiota nativa e as espécies estudadas nesta pesquisa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

PLASTICS EUROPE, 2011, **Plastics – the Facts 2011. An analysis of European plastics production, demand and recovery** for 2011. Disponível em: <<http://www.plasticseurope.com>>

Macagnan, K. L. **Otimização de metodologia de extração química clássica de Poli(3-hidroxibutirato)** (2014). Dissertação (mestrado em biotecnologia). Curso de Pós-graduação em biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Cordova, L; Meza, C; Gonzalez, G; Gonzalez R. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, 2013, 77-115.

Casarin, S. A; Agnelli, J. A. M; Malmonge, S. M; Rosário, F. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, vol.23, n.1, p.115-122, 2013.

Araújo, R. de J.; Conceição, I. D. da; Carvalho, L. H. de; Alves, T. S.; Barbosa, R. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, vol.25, n.5, p.483-491, 2015.

SCHAAD, N. W; JONES, J. B; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. St. Paul: APS Press, 2001.

JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides – **New hydrocolloids of interest to the food industry**. Food Technology, v. 28, p. 34-40, 1974.