

## ESTUDO COMPARATIVO DA PRODUÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) PELAS BACTÉRIAS *Cupriavidus necator* ATCC 17699 E *Ralstonia* *solanacearum* ISOLADA DE TABACO.

MARIA LUIZA DE OLIVEIRA ZANINI<sup>1</sup>; CAMILA RIOS PIECHA<sup>2</sup>; GABRIELA QUADROS DA LUZ<sup>2</sup>; CAROLINE DE PAULA LOPES CORRÊA<sup>2</sup>; PATRÍCIA SILVA DIAZ<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – luizaznn@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – camilapiecha@gmail.com; ql.gabi@gmail.com; carol.lopesd@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – bilicadiaz@yahoo.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

Os plásticos de origem petroquímica estão entre os maiores responsáveis pela contaminação ambiental (GROSS, 2013) por apresentarem baixa biodegradabilidade, acumulando-se em diversos ecossistemas, principalmente no oceano em que chegam a somar 97% de todo o lixo presente (TAVARES, 2017). Com isso, foram implementados programas de reciclagem de plástico por todo o mundo, visando a diminuição de seu acúmulo no meio ambiente, porém esses programas não se mostraram efetivos, visto que de todo plástico produzido mundialmente entre 1950 a 2015, apenas 9% foi reciclado (GREYER, 2017).

Portanto, cresce a necessidade de buscar alternativas que substituam o plástico petroquímico por materiais que apresentem as mesmas características do plástico petroquímico, mas que possuam, principalmente, maior biodegradabilidade, diminuindo a concentração desse material no ambiente.

Entre os materiais estudados, os bioplásticos têm se destacado como potenciais substitutos pois apresentam alta biodegradabilidade, sendo o poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB)] o mais estudado. Dos microrganismos que sintetizam P(3HB), existem várias espécies bacterianas que o produzem quando em estresse metabólico, dentre elas estão *Cupriavidus necator* (*Ralstonia eutrophus*), que se destaca por obter produtividade de até 90% (RABERG, 2018), sendo considerado padrão nos estudos de produção do P(3HB) e a espécie *Ralstonia solanacearum*, que se mostra como um potencial microrganismo a ser utilizado para a produção industrial, necessitando ainda de estudos de otimização de sua produção, elucidação de seu metabolismo e bioprospecção de novos isolados que possuam elevada síntese do P(3HB) e apresentem potencial de produção industrial.

Dessa forma, este trabalho teve o objetivo de estudar a produção do bioplástico P(3HB) sintetizado por um novo isolado de *Ralstonia solanacearum* comparando com a bactéria padrão *Cupriavidus necator*, em escala laboratorial, a fim de verificar se esta possui potencial de produção de P(3HB) a nível industrial.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1. FASE DE INÓCULO

A bactéria *Cupriavidus necator* ATCC 17699 foi adquirida do Banco de Células da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello, ao passo que a espécie *Ralstonia solanacearum* isolada de tabaco (TA) foi obtida por repiques multiplicativos do acervo de microrganismos do Laboratório de Biopolímeros do CDTEC/UFPel. Foram preparadas suspensões de ambas as bactérias utilizando meio de cultivo Yeast Malt (YM) e adicionadas a frascos *Erlenmeyers* aletados que foram mantidos em incubador agitador orbital por 24 h,

a 32 °C e 150 rpm para crescimento celular. A biomassa celular obtida foi quantificada por densidade óptica ( $DO_{600nm}$ ) utilizando-se espectrofotômetro de bancada.

## 2.2. FASE DE PRODUÇÃO DE P(3HB)

Alíquotas de 40 mL dos inóculos bacterianos foram transferidas para *Erlenmeyers* aletados contendo 144 mL de *Mineral Medium* (MM), somado a 1 mL de solução de elementos-traço (0,2 g/L de MgSO<sub>4</sub>, 0,01 g/L de CaCl<sub>2</sub>, 0,005 g/L de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0,05 g/L FeCl<sub>3</sub>) e 1 mL de óleo de arroz – com pH mensurado com Phmetro digital de bancada e ajustado para pH = 7 – e 16 mL de sacarose (40 g/L), totalizando um volume de 200 mL. Os frascos contendo a suspensão bacteriana foram colocados em incubador agitador orbital por 72 h, a 32 °C e 150 rpm para fermentação e consequente produção do biopolímero. A quantificação da densidade óptica foi obtida por  $DO_{600nm}$  em intervalos de 24 h. Ao final, o experimento possuiu uma duração total de 96 horas.

## 2.3. EXTRAÇÃO DE P(3HB)

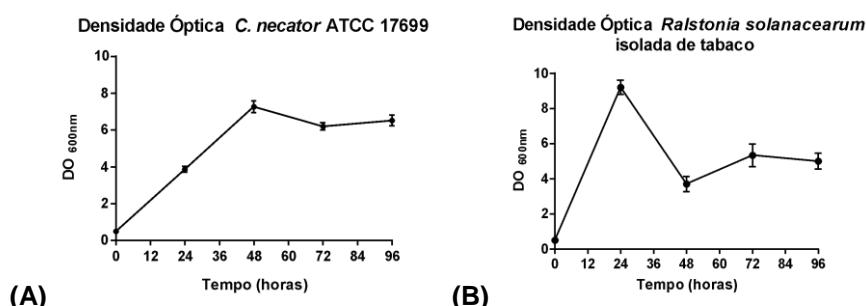
Os caldos fermentados foram centrifugados a 10.000 x g por 30 min e os pellets celulares obtidos foram secos em estufa a 56 °C até peso constante, posteriormente triturados com grau e pistilo. A extração do polímero se deu a partir da massa celular seca (MCS), utilizando clorofórmio como agente de rompimento celular na proporção 40:1 (v/m). As amostras foram mantidas em tubos de ensaio com tampa de rosca em banho-maria na temperatura de 58 °C por 30 min e submetidas à agitação em vórtex a cada 10 min. Após, foram transferidas para funil de decantação com adição de água destilada na mesma proporção do solvente e deixadas em repouso para a separação das fases. A fase orgânica foi transferida para placas de Petri e os filmes foram obtidos pelo método de *casting* (MACAGNAN, 2014). O rendimento de P(3HB) produzido foi mensurado por gravimetria.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. DENSIDADE ÓPTICA

Durante a fase de inóculo, *C. necator* ATCC 17699 apresentou aumento de 0,5 abs para 3,8 abs em 24h, enquanto *R. solanacearum* (TA) obteve um aumento mais expressivo, de 0,5 abs para 9,2 abs em 24 h.

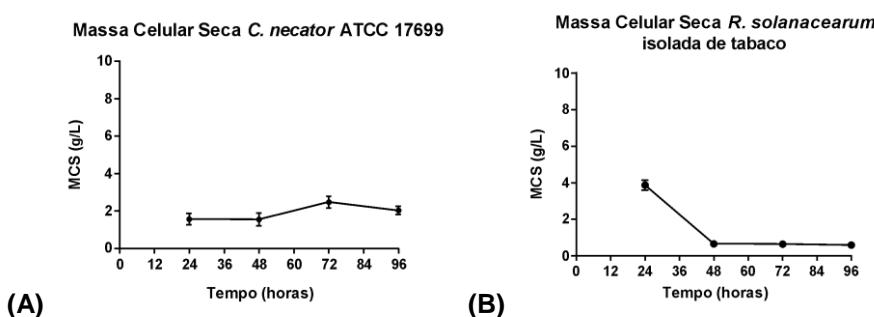
Para a fase de produção, *C. necator* ATCC 17699 apresentou resultados crescentes de  $DO_{600nm}$  nas primeiras 24 h, de 7,26, com redução em 48 h (6,2), finalizando em 6,72 (72 h) (Figura 1 A). Já *R. solanacearum* isolada de tabaco apresentou menor aumento, iniciando com 3,7 abs em 24 h, aumentando para 5,33 abs (48 h), encerrando em 5 em 72 h (Figura 1 B).



**Gráfico 1:** (A) Densidade óptica ( $DO_{600nm}$ ) da bactéria *Cupriavidus necator* ATCC 17699 ao final do experimento (96 h); (B) Densidade óptica ( $DO_{600nm}$ ) da bactéria *Ralstonia solanacearum* TA ao final do experimento (96 h);

### 3.2. MASSA CELULAR SECA

Durante a fase de inóculo, *C. necator* ATCC 17699 produziu 1,55 g/L nas primeiras 24 h e 1,57 g/L na fase de produção, seno 2,48 g/L em 48 h e 2,03 g/L em 72 h (Figura 3 A). Enquanto que, a *R. solanacearum* (TA) teve uma produção 2,5 vezes maior que no período de inóculo, com 3,88 g/L e, para a fase de produção, apresentou resultados expressivamente menores, iniciando com 0,72 g/L (0h), decrescendo pelo restante do período para 0,66 g/L (24 h) e 0,64 g/L (48 h), finalizando com 0,59 g/L (72 h) (Figura 3 B).

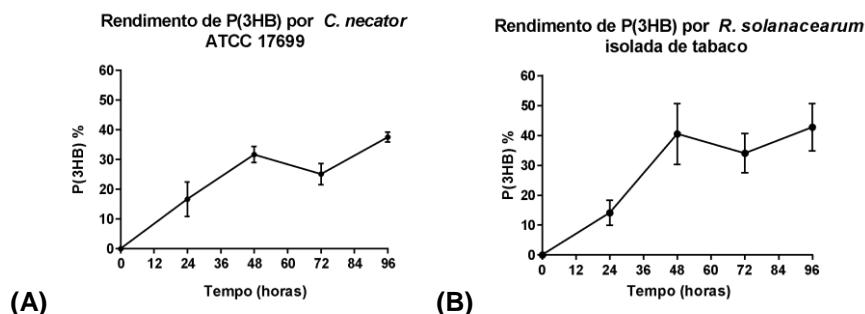


**Gráfico 2:** (A) Massa celular seca produzida, ao final das 96 h de experimento, pela bactéria *Cupriavidus necator*; (B) Massa celular seca produzida, ao final das 96 h de experimento, da bactéria *Ralstonia solanacearum* TA;

### 3.3. RENDIMENTO DE P(3HB)

No que diz respeito à obtenção do P(3HB), a *C. necator* ATCC 17699 obteve rendimento de 16,66% no inóculo (24 h) e no decorrer da fase de produção, aumentou para 31,72% nas primeiras 24 h, diminuindo em 48 h (25,11%), atingindo seu máximo de 37,58% em 72 h (Figura 4 A). Já a *R. solanacearum* (TA) obteve menor produção durante a fase de inóculo com 14,13% em 24 h e, no decorrer da fase de produção, mostrou maior síntese com 40,54% em 24 h, diminuição para 34,08% em 48 h, também apresentando seu rendimento máximo em 72 h com 42,76% (Figura 4 B).

Em estudos anteriores com a espécie *R. solanacearum* RS, MACAGNAN et al., (2017) obteve rendimento de 45%, MACAGNAN, (2018) de 46,8% enquanto PIECHA, (2018) alcançou uma produção significativamente maior com 70,99%. Essa diferença na produção pode ser devida ao meio de cultivo utilizado durante a fase de inóculo que, no caso das bactérias estudadas, pode não ter suprido suas necessidades nutricionais, o que, consequentemente, dificulta o crescimento celular, interferindo na produção do P(3HB).



**Gráfico 3:** (A) Rendimento de P(3HB) da bactéria *Cupriavidus necator* ao final das 96 h de experimento; (B) Rendimento de P(3HB) da bactéria *Ralstonia solanacearum* TA ao final das 96 h de experimento.

#### 4. CONCLUSÕES

Os dados obtidos demonstram que *C. necator* ATCC 17699 apresentou rendimento abaixo do relatado na literatura, sendo a produção máxima de P(3HB) de 37,58% durante a fase de produção. Em relação à *R. solanacearum* isolada de tabaco, foram obtidas produções máximas de 40,54% em 24 h e 42,76% em 72 h de produção, que, ainda assim, se mostram baixas. Assim, são necessários estudos quanto aos meios de cultivo utilizados no processo, com o intuito de otimizar a produção de *R. solanacearum* isolada de tabaco e o melhoramento dos meios de cultivo utilizados que possam favorecer o estresse metabólico necessário para elevar a síntese de P(3HB) em escala industrial.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GREYER, R et al. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, EUA, v. 3, n. 7, p. 1-5, 2017.
- GROSS, M. Plastic waste is all at sea. **Current Biology**, EUA, v. 23, n. 4, p. 135-137, 2013.
- MACAGNAN, K. L. **Otimização de metodologia de extração química clássica de Poli(3-hidroxibutirato)**. 2014. Dissertação (mestrado em biotecnologia). Programa de Pós-graduação em biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.
- MACAGNAN, K. L. et al. Complete factorial design to adjust pH and sugar concentrations in the inoculum phase of *Ralstonia solanacearum* to optimize P(3HB) production. **PLOS ONE**, EUA, v. 12, n. 7, p. e0180563, 2017.
- MACAGNAN, K. L. **Aumento do rendimento de P(3HB) produzido por bactéria brasileira (*Ralstonia solanacearum* RS), otimização da extração química por clorofórmio e desenvolvimento de metodologia de extração por adsorção em fase**. 2018. Tese (Doutorado em biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.
- PIECHA, C. R. **Estudo filogenético, molecular e síntese de poli-3-hidroxibutirato pela bactéria *Ralstonia solanacearum* cepa RS**. 2018. Trabalho de conclusão de curso – Graduação em Biotecnologia, Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.
- RABERG, M. et al. *Ralstonia eutropha* H16 in progress: Applications beside PHAs and establishment as production platform by advanced genetic tools. **Critical Reviews in Biotechnology**, Reino Unido, v. 38, n. 4, p. 494-510, 2018.
- TAVARES, D.C et al. Incidence of marine debris in seabirds feeding at different water depths. **Marine Pollution Bulletin**, Reino Unido, v. 119, n. 2, p. 68-73, 2017.