

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO PRÉ-INÓCULO NO RENDIMENTO DE BIOMASSA DA BACTÉRIA *Ralstonia solanacearum* RS PRODUTORA DE P(3HB)

LEONARDO ZANETTI FONSECA¹; KARINE LASTE MACAGNAN²; MARIANE IGANSI ALVES³; PATRICIA DIAZ DE OLIVEIRA⁴; ANGELITA DA SILVEIRA MOREIRA⁵

¹Graduação em Biotecnologia, UFPEL – leozanetty@gmail.com

²PPGB - CDTec, UFPEL - karinemacagnan@hotmail.com

³PPGCTA - DCTA, UFPEL - marianeigansialves@hotmail.com

⁴PPGB – CDTec, PPGCTA – DCTA, UFPEL - bilicadiaz@yahoo.com.br

⁵PPGB – CDTec, PPGCTA – DCTA, UFPEL - angelitadasilveiramoreira@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Em função do baixo custo e versatilidade, plásticos petroquímicos ainda são amplamente utilizados em produtos descartáveis e de curta duração. Entretanto, quando o descarte é feito inadequadamente, constituem-se em sério problema ambiental, já que sua decomposição natural demora mais de cem anos (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006).

Novos materiais plásticos, sustentáveis e biodegradáveis vêm sendo desenvolvidos. O poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB)], polímero de reserva, é acumulado por inúmeras bactérias. Possui propriedades semelhantes ao polipropileno, mas a produção comercial ainda é bastante dispendiosa.

A síntese de PHAs ocorre quando há condições desfavoráveis de crescimento e excesso de carbono. A condição desfavorável ao crescimento caracteriza-se pela exaustão de nutrientes como nitrogênio, fósforo, enxofre, oxigênio. PHAs servem como materiais de reserva de energia e carbono para os microrganismos (LU; TAPPEL; NOMURA, 2009; STEINBUCHER; FUCHTENBUSCH, 1998). Acredita-se que cultivos celulares densos podem elevar a produção por conter uma maior quantidade de células.

Objetivou-se determinar o crescimento celular após 24, 48 e 72 h em meio de produção obtido a partir de pré-inóculos de *Ralstonia solanacearum* cepa RS com densidade óptica iniciais distintas, T1 (0,25), T2 (0,5), T3 (0,75) e T4 (1,0).

2. METODOLOGIA

2.1 Microrganismo

Para este experimento foi utilizado a bactéria *Ralstonia solanacearum* cepa RS, preservada na bacterioteca do Laboratório de Biopolímeros (CDTec-UFPEl).

2.2 Preparo do inóculo e produção de polímero

A bactéria foi crescida em meio *Nutritive Yeast Agar* (NYA) (SCHAAD et.al, 2001) sólido a 32 °C por 72 h. Preparou-se inóculos com densidade óptica (DO_{600nm}) inicial de 0,25 (T1); 0,5 (T2); 0,75 (T3) e 1,0 (T4). Nesta etapa foi utilizado o meio *Yeast Malt* (YM) modificado (MACAGNAN et al., 2017), as culturas foram incubadas em volume final de 100 mL em *Erlenmeyers* de 250 mL a 32° C e 200 rpm em agitador incubador orbital por 24 h. Posteriormente, para a fase de produção adicionou-se 20 % de inóculo em meio mineral (MM) (ATLIC et al., 2011) composto por 40 g/L de sacarose, incubados nas mesmas condições por até 72 h. Coletou-se amostras em 24, 48 e 72 h e avaliou-se o crescimento do microrganismo mensurado pelas análises de massa celular seca (MSC) e densidade óptica (DO_{600nm}), em triplicata.

2.3 Determinação de crescimento celular

O crescimento celular foi determinado pela DO_{600nm} , analisada por espectrofotometria a 600 nm, e pela concentração de MCS, determinada por gravimetria, após centrifugação do incóculo e caldo fermentado a 10.000 x g por 15 min. As médias foram comparadas e analisadas estatisticamente pelo teste ANOVA $p < 0,05$ no programa Statistica 7.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas amostras coletadas em 24 h na fase de produção não foi constatado diferença significativa entre os diferentes tratamentos. Após 48 h de produção houve um pequeno aumento de produção de biomassa, alcançando DO_{600nm} acima de 3 nos tratamentos mais densos. Já com 72 h de produção constatou-se uma diferença significativa, onde, os tratamentos mais densos obtiveram uma ligeira vantagem, alcançando uma DO_{600nm} de até 5, 7 para o mais denso. Os dados são representados na figura 1.

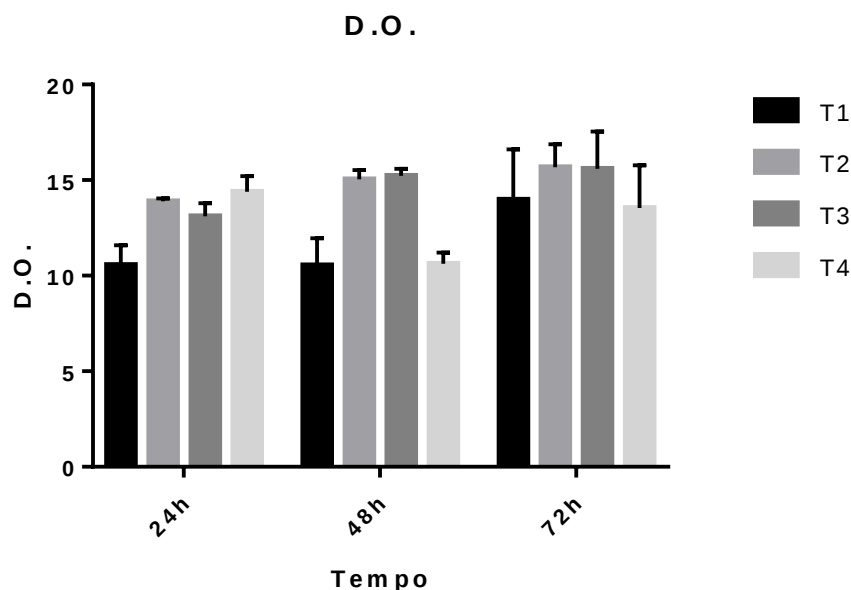
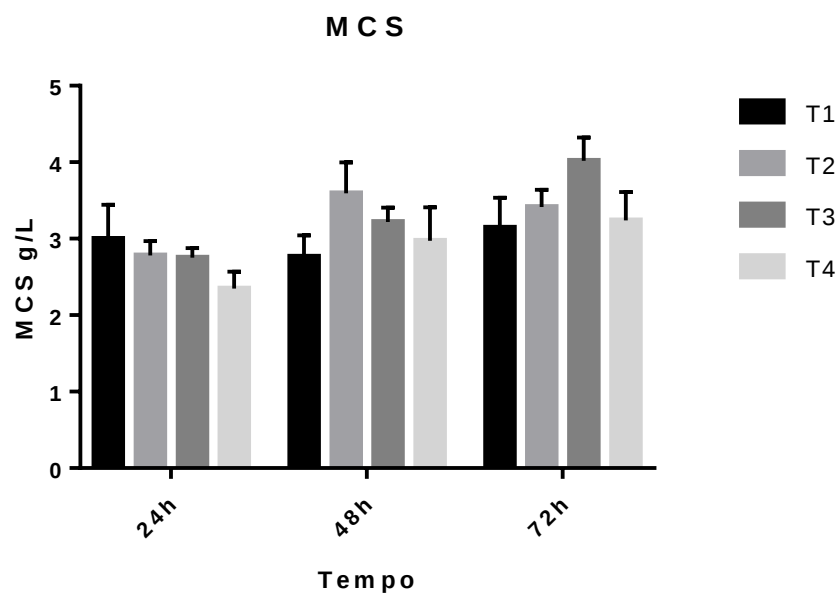


Figura 1. Densidade Óptica (DO_{600nm}) após 24, 48 e 72h de cultivo no meio de produção MM nos tratamentos com diferentes DO_{600nm} iniciais T1 (DO 0,25), T2 (0,5), T3 (0,75) e T4 (1,0).

Já a análise de MCS demonstrou uma ligeira vantagem nos tratamentos menos densos, sendo que o T1 atingiu uma média de 3g/L, T2 e T3 atingiram uma cerca 2,78g/L e T4 2,51g/L nas primeiras 24h. Já no tempo de 48h T1 ficou com produção de 2,76g/L, T2 foi o que mais produziu, atingindo 3,14g/L, T3 ficou com 3,6g/L e T4 com 2,96g/L. Com 72h de produção os resultados tiveram um leve aumento, T1 apresentou em média 3,29g/L, T2 ficou com 3,33g/L, T3 com 3,84g/L e T4 com 4,11g/L.



4. CONCLUSÕES

Ao contrário do esperado foi constatado que uma maior concentração na fase de inóculo não implica em um aumento significativo na produção de biomassa, portanto, produzir um inóculo tão denso implica em gastos desnecessários de material e tempo, assim se tornando economicamente inviável.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATLIĆ, A.; KOLLER, M.; SCHERZER, D.; KUTSCHERA, C.; GRILLO-FERNANDES, E.; HORVAT, P.; CHIELLINI, E.; BRAUNEGG, G. Continuous production of poly([R]-3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* in a multistage bioreactor cascade. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 91, p. 295–304, 2011.

FRANCHETTI; MARCONATO, 2006

SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. APS Press, 2001, 3ª Ed.

MACAGNAN, K.L.; ALVES, M.I.; RODRIGUES, A.A.; FURLAN, L.; RODRIGUES, R.S.; OLIVEIRA, P.D.; VENDRUSCOLO, C.T.; MOREIRA, A.S. Complete factorial design to adjust pH and sugar concentrations in the inoculum phase of *Ralstonia solanacearum* to optimize P(3HB) production. **PLoS One**, v. 12, p. e0180563, 2017
FUCHTENBUSCH, B.; STEINBUHEL, A. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates from low-rank coal liquefaction products by *Pseudomonas oleovorans* and *Rhodococcus ruber*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 1, p. 91-95, 1999.