

## Estudo das condições de crescimento do *Rhodococcus erythropolis* ATCC 1277

DANIELA GIER DELLA ROCCA<sup>1</sup>, DIEGO TODESCATO<sup>1</sup>, DANIELLE MAASS<sup>1</sup>,  
DÉBORA OLIVEIRA, SELENE M. A. GUELLI U. DE SOUZA<sup>1,\*</sup>, ANTÔNIO AUGUSTO  
U. DE SOUZA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Transferência de Massa, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, PO Box 476, CEP 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil

Telefone para contato: (+55) (48) 3721-9448; Fax: (+55) (48) 3721-9687

E-mail para contato: [augusto@enq.ufsc.br](mailto:augusto@enq.ufsc.br)

**RESUMO** – A capacidade da bactéria *Rhodococcus erythropolis* de degradar compostos sulfurados tem feito com que ela seja amplamente utilizada em diversos processos, tanto na área biotecnológica industrial, quanto na área ambiental – principalmente no que diz respeito aos problemas relacionados à chuva ácida. O interesse em se direcionar um estudo preliminar sobre o meio de crescimento e sobre as condições de cultivo desta bactéria tem por objetivo obter um meio nutritivo eficiente; mas que, ao mesmo tempo, seja economicamente viável aos processos industriais, tendo-se como possibilidade substituir os substratos usados neste estudo por compostos naturais e que visem à sustentabilidade, tais como o bagaço da cana-de-açúcar. Para tanto, buscou-se aprimorar o meio de cultivo do micro-organismo *R. erythropolis* ATCC 4277, através de um planejamento experimental 2<sup>(6-1)</sup>. Optou-se por variar as concentrações dos constituintes do seu caldo nutritivo (glicose, extrato de malte, extrato de levedura, CaCO<sub>3</sub>), além da temperatura e da agitação. A partir dos resultados, foi possível concluir que as concentrações de glicose e malte não são consideradas estatisticamente relevantes, enquanto que as demais variáveis são significativas. Desses fatores, a agitação e o extrato de levedura possuem efeito positivo, inverso ao do resultado obtido para o CaCO<sub>3</sub> e para a temperatura, que têm efeito negativo sobre o crescimento do *R. erythropolis*. É relevante, ainda, destacar o efeito positivo sobre o crescimento das bactérias da interação entre o extrato de levedura e a agitação.

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, um dos maiores problemas associados ao petróleo é a emissão de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), durante a sua combustão. Esse gás, ao reagir com o vapor d'água atmosférico, gera como produto o ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) - fenômeno conhecido como chuva ácida, que representa uma questão ambiental de considerável gravidade. Por se tratar de um ácido forte, ele tem alto poder degradante, o que pode vir a afetar o meio ambiente; ocasionando, por exemplo, o surgimento de clareiras e desequilíbrio de sistemas aquáticos

que não conseguem adaptar-se a maiores níveis do íon hidrônio ( $H^+$ ). Além disso, a chuva ácida tem a capacidade de retirar metais pesados do solo, levando-os para sistemas hídricos, fato que pode ocasionar problemas de saúde à população local.

Alternativamente, tem-se estudado a possibilidade de se utilizarem bactérias para a retirada de enxofre dos derivados de petróleo, método conhecido como biodessulfurização. Essa nova maneira tem sido amplamente aceita, por se tratar de um processo de custo reduzido e capaz de romper certos anéis sulfônicos de modo mais efetivo que a hidrodessulfurização – injeção de gás hidrogênio ( $H_2$ ) nos derivados de combustíveis fósseis. A degradação pela biodessulfurização é realizada por enzimas produzidas por esses micro-organismos, que, devido à alta especificidade associada a esses polipeptídeos, degradam apenas os compostos sulfurados, sem afetar as estruturas dos hidrocarbonetos, como na rota dessulfurante do DBT, por exemplo. Ademais, o meio de crescimento utilizado pelas bactérias dessulfurantes não apresenta problemas ambientais vinculados ao seu descarte.

Um microrganismo que vem se destacando pela capacidade de degradar o DBT pela via “4S” é o *Rhodococcus* sp. pois possui uma característica hidrofóbica, o que faz com que, em um sistema bifásico óleo/água, essa bactéria fique na interface. Outra característica interessante das linhagens de *Rhodococcus* é a sua capacidade de sobreviver aos efeitos tóxicos de muitos solventes, adaptando sua membrana celular a fim de manter funções biológicas essenciais. Mudanças na composição dos ácidos graxos da membrana, com vistas a manter a mesma fluidez da membrana, parece ser a maior resposta dessa bactéria a compostos altamente tóxicos (HEIPIEPER *et al.*, 1994; CARVALHO *et al.*, 2005a).

Há que se ter em conta, por um lado, o problema da acessibilidade dos micro-organismos aos compostos que contêm enxofre e, por outro, mesmo que essa acessibilidade exista à existência de impedimentos estéricos associados à estrutura desses mesmos compostos, que dificultam a atuação dos sistemas enzimáticos microbianos. Alternativamente ao uso de células intactas, a utilização de enzimas livres ou imobilizadas tem sido objeto de patentes para aplicação em processos de biodessulfurização (Kilbane *et al.*, 1994, Kern *et al.*, 1989).

Optou-se por usar a bactéria *Rhodococcus erythropolis* pelo fato de esses micro-organismos serem um dos principais utilizados nos processos de biodessulfurização. Assim, os estudos foram direcionados para a etapa do seu crescimento no meio de cultura. A proposta é de se alcançar a maior quantidade de células com a menor quantidade possível de substratos.

O crescimento dos micro-organismos é um processo dinâmico que requer energia química e nutriente para a síntese dos componentes celulares e a manutenção das células. Para tanto, buscou-se aprimorar a composição do meio de cultura em função das concentrações de extrato de levedura, extrato de malte, glicose,  $CaCO_3$ , temperatura e agitação.

Os reagentes escolhidos fazem parte do meio *Yeast Malt Extract Agar* (YMA), optou-se por ele, uma vez que foi sugerido como o melhor meio de manutenção pela própria Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”. As outras duas variáveis foram escolhidas por serem comprovadamente influentes no crescimento microbiano. A temperatura deve se encontrar em uma faixa ótima, uma vez que, quando inadequada, pode não retirar as bactérias do estado de latência. Já a agitação influencia na quantidade de oxigênio dissolvido no meio de cultivo, por se tratar de um micro-organismo aeróbico seu crescimento é proporcional a esse nível de oxigenação.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Inóculo

O inóculo de 50 mL foi preparado a partir de extrato de levedura, glicose ( $C_6H_{12}O_6$ ), carbonato de Cálcio ( $CaCO_3$ ) e malte ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ). A ele foi adicionada uma pequena quantidade de bactérias que permaneceram, por vinte e quatro horas, a uma velocidade de 150 rotações por minuto (rpm) e a uma temperatura de 27 °C – em fase de adaptação.

### 2.2 Meio de crescimento

Com o intuito de otimizar o meio de crescimento, utilizaram-se os mesmos reagentes do inóculo, mas variaram-se suas concentrações. Primeiramente, transferiu-se 10% (v/v) do inóculo para outro frasco Erlenmeyer contendo meio de crescimento esterilizado. Neste instante, retirou-se a primeira alíquota do meio de crescimento e leu-se sua absorbância no espectrofotômetro ( $\lambda = 600$  nm). O processo foi repetido até que o crescimento do micro-organismo atingisse a fase estacionária. Desta vez, o volume foi de 100 mL e o período de análise foi fixado em 18 h (período em que todos os micro-organismos se estabilizaram). Porém, suas velocidades e suas temperaturas foram alteradas dependendo do experimento.

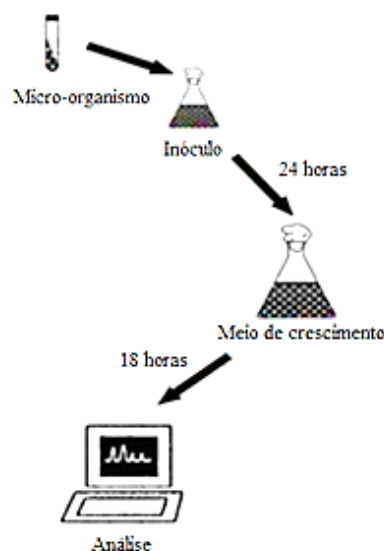


Figura 1 – Resumo da metodologia utilizada

### 2.3 Planejamento experimental

No estudo do processo, em batelada, foram modificadas seis variáveis:

- (A) Concentração de levedura ( $\text{g.L}^{-1}$ )
- (B) Concentração de glicose ( $\text{g.L}^{-1}$ )
- (C) Concentração de malte ( $\text{g.L}^{-1}$ )
- (D) Concentração de carbonato de cálcio ( $\text{g.L}^{-1}$ )
- (E) Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )
- (F) Agitação (rpm)

Por serem seis fatores variáveis, optou-se por se realizarem experimentos no formato  $2^{(6-1)}$  com mais quatro replicatas no ponto central, totalizando 36 experimentos. Definiram-se os níveis de variação codificados como -1, 0 e +1 - para cada um dos fatores em estudo. As variáveis e seus respectivos níveis de variação são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Fatores e níveis estudados no planejamento experimental  $2^{(6-1)}$ .

Fatores	Nível	-1	0	+1
A	Extrato de Levedura ( $\text{g L}^{-1}$ )	2,0	4,0	6,0
B	Glicose ( $\text{g L}^{-1}$ )	2,0	4,0	6,0
C	Extrato de Malte ( $\text{g L}^{-1}$ )	5,0	10	15
D	$\text{CaCO}_3$ ( $\text{g L}^{-1}$ )	1,0	2,0	3,0
E	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	24	28	32
F	Agitação (rpm)	100	150	200

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 2 - Planejamento experimental fatorial parcial  $2^{(6-1)}$  e as respostas em termos de crescimento celular.

Exp.	A	B	C	D	E	F	Crescimento (g/L)
01	(-1)	(-1)	(-1)	(-1)	(-1)	(-1)	2,42
02	(1)	(-1)	(-1)	(-1)	(-1)	(1)	5,60
03	(-1)	(1)	(-1)	(-1)	(-1)	(1)	1,56
04	(1)	(1)	(-1)	(-1)	(-1)	(-1)	4,03
05	(-1)	(-1)	(1)	(-1)	(-1)	(1)	1,51
06	(1)	(-1)	(1)	(-1)	(-1)	(-1)	3,55
07	(-1)	(1)	(1)	(-1)	(-1)	(-1)	1,83
08	(1)	(1)	(1)	(-1)	(-1)	(1)	5,28
09	(-1)	(-1)	(-1)	(1)	(-1)	(1)	1,21
10	(1)	(-1)	(-1)	(1)	(-1)	(-1)	0,08
11	(-1)	(1)	(-1)	(1)	(-1)	(-1)	0,0

12	(1)	(1)	(-1)	(1)	(-1)	(1)	3,94
13	(-1)	(-1)	(1)	(1)	(-1)	(-1)	0,0
14	(1)	(-1)	(1)	(1)	(-1)	(1)	4,06
15	(-1)	(1)	(1)	(1)	(-1)	(1)	0,77
16	(1)	(1)	(1)	(1)	(-1)	(-1)	0,91
17	(-1)	(-1)	(-1)	(-1)	(1)	(1)	1,14
18	(1)	(-1)	(-1)	(-1)	(1)	(-1)	0,0
19	(-1)	(1)	(-1)	(-1)	(1)	(-1)	0,96
20	(1)	(1)	(-1)	(-1)	(1)	(1)	6,91
21	(-1)	(-1)	(1)	(-1)	(1)	(-1)	0,82
22	(1)	(-1)	(1)	(-1)	(1)	(1)	5,77
23	(-1)	(1)	(1)	(-1)	(1)	(1)	2,28
24	(1)	(1)	(1)	(-1)	(1)	(-1)	1,97
25	(-1)	(-1)	(-1)	(1)	(1)	(-1)	0,0
26	(1)	(-1)	(-1)	(1)	(1)	(1)	0,71
27	(-1)	(1)	(-1)	(1)	(1)	(1)	0,0
28	(1)	(1)	(-1)	(1)	(1)	(-1)	0,0
29	(-1)	(-1)	(1)	(1)	(1)	(1)	0,0
30	(1)	(-1)	(1)	(1)	(1)	(-1)	0,0
31	(-1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(-1)	0,0
32	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	2,28
33	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	2,74
34	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	3,22
35	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	2,29
36	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	1,73

A Tabela 2 mostra a matriz de planejamento fracionário e as respostas obtidas para cada ensaio, avaliando a influência da concentração de extrato de levedura, glicose, extrato de malte,  $\text{CaCO}_3$ , temperatura e agitação sobre o crescimento do *Rhodococcus erythropolis*. A partir dos resultados apresentados na Tabela 2, foi realizada uma análise estatística utilizando-se ferramentas de planejamento experimental, sendo esta apresentada nos itens a seguir.

Tabela 3 - Cálculo dos efeitos e respectivos índices estatísticos.

	Efeito	Erro Padrão	Teste t de Student	Nível P
<b>Média/Interações</b>	<b>1,93314</b>	<b>0,161475</b>	<b>11,97178</b>	<b>0,000000</b>
<b>(1) Ext. Levedura</b>	<b>1,91216</b>	<b>0,342540</b>	<b>5,58228</b>	<b>0,000068</b>
(2) Glicose	0,36503	0,342540	1,06566	0,304612
(3) Malte	0,15532	0,342540	0,45343	0,657186
<b>(4) <math>\text{CaCO}_3</math></b>	<b>-1,98074</b>	<b>0,342540</b>	<b>-5,78251</b>	<b>0,000047</b>
<b>(5) Temperatura</b>	<b>-0,87004</b>	<b>0,342540</b>	<b>-2,53997</b>	<b>0,023571</b>
<b>(6) Agitação</b>	<b>1,65409</b>	<b>0,342540</b>	<b>4,82890</b>	<b>0,000268</b>
<b>Interação (1) e (6)</b>	<b>1,34818</b>	<b>0,342540</b>	<b>3,93583</b>	<b>0,001493</b>

Na Tabela 3, têm-se os valores obtidos para os efeitos referentes aos fatores concentração de extrato de levedura, concentração de  $\text{CaCO}_3$ , concentração de extrato de malte, concentração de glicose, agitação e temperatura, além de seus respectivos índices estatísticos. O crescimento foi avaliado calculando-se a diferença entre a concentração inicial e a concentração ao final de 18 h, tempo em que o *R. erythropolis* atinge a fase estacionária.

Tabela 4 - Cálculo dos coeficientes e respectivos índices estatísticos.

	Coeficiente	Erro Padrão	-95% Limite de Confiança	95% Limite de Confiança
<b>Média/Interações</b>	<b>1,933144</b>	<b>0,161475</b>	<b>1,58681</b>	<b>2,279474</b>
<b>(1) Ext. Levedura</b>	<b>0,956078</b>	<b>0,171270</b>	<b>0,58874</b>	<b>1,323416</b>
(2) Glicose	0,182516	0,171270	-0,18482	0,549854
(3) Malte	0,077659	0,171270	-0,28968	0,444997
<b>(4) <math>\text{CaCO}_3</math></b>	<b>-0,990372</b>	<b>0,171270</b>	<b>-1,35771</b>	<b>-0,623034</b>
<b>(5) Temperatura</b>	<b>-0,435022</b>	<b>0,171270</b>	<b>-0,80236</b>	<b>-0,067684</b>
<b>(6) Agitação</b>	<b>0,827047</b>	<b>0,171270</b>	<b>0,45971</b>	<b>1,194385</b>
<b>Interação (1) e (6)</b>	<b>0,674091</b>	<b>0,171270</b>	<b>0,30675</b>	<b>1,041429</b>

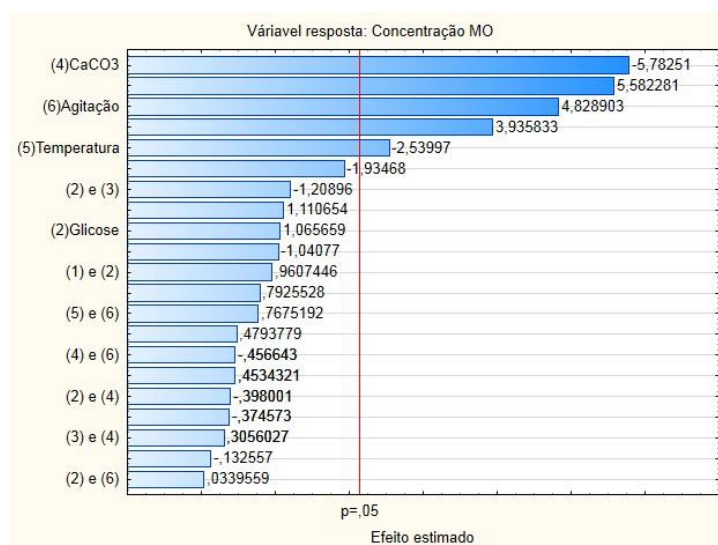


Figura 2 - Gráfico de Pareto em função dos valores estatísticos do teste t.

Verifica-se, pelas Tabelas 3 e 4 e pela Figura 2, que os termos lineares da concentração de extrato de levedura,  $\text{CaCO}_3$ , agitação, temperatura e a interação entre os dois termos lineares (1) e (6) são significativos, sendo perceptível que os mais influentes são o  $\text{CaCO}_3$  juntamente com o extrato de levedura.

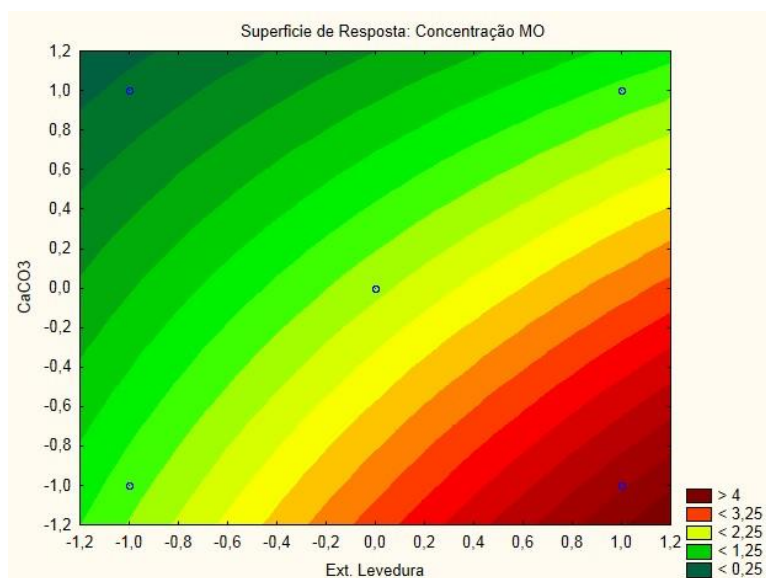


Figura 3 - Curvas de nível para os fatores de  $\text{CaCO}_3$  e extrato de levedura para o crescimento de *Rhodococcus erythropolis*.

A Figura 3 apresenta as curvas de nível correspondentes à superfície de resposta gerada pelo modelo linear e nota-se que, com a redução da concentração do  $\text{CaCO}_3$  e com o aumento da concentração de extrato de levedura, o crescimento celular é mais acentuado; sendo, assim, considerada a região de condição experimental ótima do processo. Essa região ótima é definida no intervalo de concentração de  $\text{CaCO}_3$  de 0,8 a 1,4 g L<sup>-1</sup> (níveis - 1,2 a -0,6) e concentração de extrato de levedura de 4,8 a 6,4 g L<sup>-1</sup> (níveis 0,4 a 1,2).

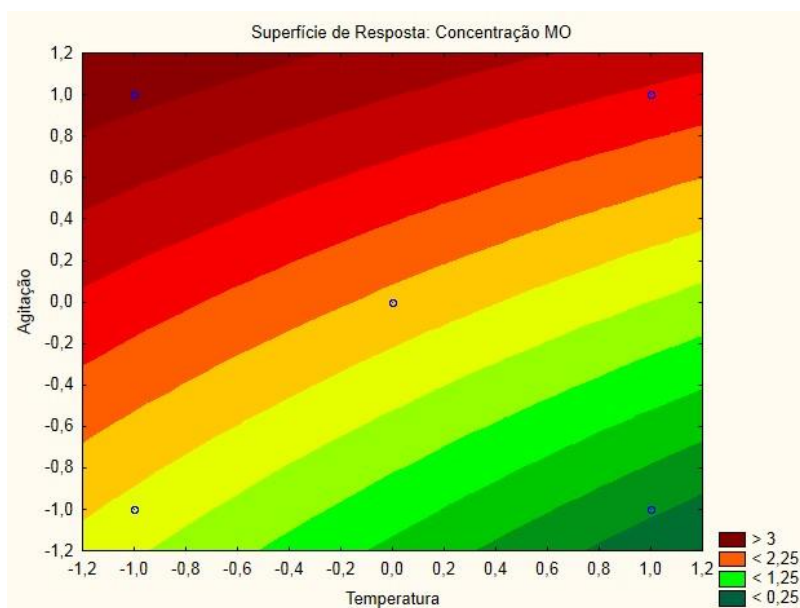


Figura 4 - Curvas de nível para os fatores de agitação e temperatura para o crescimento de *Rhodococcus erythropolis*.



A Figura 4 mostra que, com a redução da temperatura e o aumento da agitação, a concentração das células, após o crescimento, encontra-se num nível máximo na região ótima de processo com agitação de 160 a 210 rpm (níveis 0,2 a 1,2) e temperatura de 23,2 a 26,4 °C (níveis -1,2 a -0,4).

## 4. CONCLUSÃO

Pelo planejamento experimental realizado, pôde-se concluir que as concentrações de glicose e de malte não apresentaram efeito estatístico significativo. Por esse motivo, optou-se por reduzir suas concentrações, respectivamente, de 4,0 e 10 g L<sup>-1</sup> para 2,0 e 5 g L<sup>-1</sup>.

Foi observado que a maior influência no crescimento da bactéria estava vinculada às concentrações de levedura e CaCO<sub>3</sub>. As variáveis temperatura e agitação também foram consideradas significativas, embora em caráter menos relevante.

Este trabalho permite a minimização da realização de ensaios experimentais, priorizando o estudo de variáveis relevantes no processo.

## 5. REFERÊNCIAS

ALVES, L.; MESQUITA, E.; GÍRIO, F. M. Dessulfurização bacteriana de combustíveis fósseis. *Biotechnol. Amb.*, v. 62, p. 3-8, 1999.

DAVOODI-DEHAGHANI, F.; VOSOUGHI, M.; ZIAEE, A. A. Biodesulfurization of dibenzothiophene by a newly isolated *Rhodococcus erythropolis* strain, *Biores. Technol.*, v. 101, p. 1102–1105, 2001.

FARAH, M. A. Petróleo e seus derivados: definição, constituição, aplicação, especificações, características de qualidade. Rio de Janeiro. LTC, 2012.

GUPTA, N.; ROYCHOUDHURY, P. K.; DEB, J. K. Biotechnology of desulfurization of diesel: prospects and challenges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 66, p. 356–366, 2005.

MAGHSOUDI, S.; VOSSOUGH, S.; KHEIROLOMOOM, A.; TANAKA, E.; KATOH, S. Biodesulfurization of hydrocarbons and diesel fuels by *Rhodococcus* sp. strain P32C1, *Biochem. Eng. J.*, v. 8, p. 151–156, 2001.

McFARLAND, B. L. Biodesulfurization. *Ecol. Ind. Microbiol.*, v. 2, p. 257-264, 2000.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos, Campinas, SP, 2005.