

## Otimização do meio e condições de cultura do *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277

D. TODESCATO<sup>1</sup>, D. G. D. ROCCA<sup>1</sup>, D. MAASS<sup>1</sup>, D. OLIVEIRA<sup>1</sup>, S. M. A. GUELLI U. SOUZA<sup>1</sup>, A. A. ULSON DE SOUZA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos

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

RESUMO – A bactéria *Rhodococcus erythropolis* encontra-se em voga por suas inúmeras aplicações, principalmente na produção de biossurfactantes e em processos de remoção de enxofre e nitrogênio do petróleo e seus derivados. Portanto, a otimização do meio nutritivo e das condições de cultura do *Rhodococcus erythropolis* visa obter uma maior quantidade de células com o menor gasto energético, para posterior emprego dessa bactéria em outros processos biotecnológicos. Para isso foram avaliados o efeito das variáveis como concentração de substrato (extrato de levedura), concentração de nutriente (CaCO<sub>3</sub>), agitação e temperatura sobre o crescimento celular através de um planejamento experimental 2<sup>4</sup> com pontos axiais. Os ensaios foram conduzidos com concentração de glicose e extrato de malte fixa em 2,0 g L<sup>-1</sup> e 5,0 g L<sup>-1</sup>, respectivamente, e o tempo de crescimento foi de 18 horas. De acordo com os dados obtidos, os pontos críticos ou estacionários, onde se obteve o máximo de crescimento celular (5,10 g L<sup>-1</sup>), correspondem às concentrações de extrato de levedura de 6,15 g L<sup>-1</sup>, de CaCO<sub>3</sub> de 1,16 g L<sup>-1</sup>, temperatura de 23,7 °C e agitação de 180 rpm.

### 1. INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Rhodococcus* têm como características a forma de bastonete, são gram-positivas e aeróbicas. Normalmente crescem bem a temperaturas entre 30 e 37 °C e nos meios nutritivos sintéticos de laboratório (Sánchez *et al*, 2004).

Há relatos de um grande número de desalogações, desidrogenações, epoxidações, hidrólises, hidroxilações, oxidações, e, principalmente, desulfurizações, denitrogenações e produção de biossurfactante realizadas por células ou enzimas do *Rhodococcus erythropolis*. Essa grande variedade de bioconversões e degradações justificam plenamente a aplicação prospectiva desta bactéria em processos biotecnológicos (Carvalho & Fonseca, 2005; Dinamarca *et al*, 2014; Dinamarca *et al*, 2010; Torres *et al*, 2011).

A otimização do meio de cultivo e das condições de fermentação é considerado um dos passos mais importantes no desenvolvimento de processos biotecnológicos economicamente viáveis. Pois através desse método é possível selecionar os nutrientes

apropriados e as condições ótimas de cultivo que proporcionem um crescimento celular máximo. Esse ponto crítico melhora o rendimento do processo fermentativo, sem aumentar o custo de produção (Huang *et al.*, 2008; Vaidya *et al.*, 2009).

O presente estudo busca desenvolver uma condição ideal de crescimento das células do *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 utilizando o meio nutritivo sintético Yeast Malt (YM). Para isso foi avaliada a influência de fatores como concentração de substrato (extrato de levedura), concentração de nutriente ( $\text{CaCO}_3$ ), agitação e temperatura sobre o crescimento celular através de um planejamento experimental  $2^4$  com pontos axiais.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado neste estudo foi uma bactéria mesófila, *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 adquirida da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, Campinas, São Paulo.

### 2.2 Inoculo

O inoculo de 50 mL foi preparado a partir de extrato de levedura  $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ , glicose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ )  $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ , carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ )  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$  e extrato de malte ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ )  $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ . A ele foi adicionada uma alça de platina de bactérias, que permaneceram por 24 h, a uma velocidade de 150 rotações por minuto (rpm) e a uma temperatura de  $28^\circ\text{C}$  – em fase de adaptação.

Para realizar o acompanhamento do crescimento celular utilizou-se uma curva de calibração células de *Rhodococcus erythropolis*, onde o comprimento de onda que apresentou maior absorbância foi o de 600 nm.

### 2.3 Meio de crescimento

Foram transferidos 5,0 mL do inoculo para cada frasco Erlenmeyer contendo 100 mL de meio de crescimento esterilizado. Neste instante, retirou-se a primeira alíquota do meio de crescimento e leu-se sua absorbância no espectrofotômetro ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ).

Os ensaios foram conduzidos com concentração de glicose e extrato de malte fixa em  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$  e  $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. O período de análise foi fixado em 18 h (período em que todos os experimentos atingiram a fase estacionária).

Por serem quatro fatores variáveis, optou-se por um planejamento experimental  $2^4$ , com pontos axiais e com triplicatas no ponto central, totalizando 27 experimentos, como resposta a concentração celular.

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

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

Definiram-se os níveis de variação codificados como -2, -1, 0, +1 e +2 - para cada um dos fatores em estudo. As variáveis e seus respectivos níveis de variação são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Fatores e seus respectivos níveis estudados na otimização da concentração celular para o planejamento estrela.

Fatores	Nível	-2	-1	0	+1	+2
A	Extrato de Levedura (g L <sup>-1</sup> )	2,0	4,0	6,0	8,0	10
B	CaCO <sub>3</sub> (g L <sup>-1</sup> )	0,2	0,6	1,0	1,4	1,8
C	Temperatura (°C)	20	22	24	26	28
D	Agitação (rpm)	130	160	190	220	250

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados da avaliação quanto ao crescimento celular do *Rhodococcus erythropolis*, bem como cada condição empregada podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Planejamento experimental 2<sup>4</sup> com pontos axiais para otimização das condições experimentais para o crescimento de *Rhodococcus erythropolis*.

Experimento	A (g/L)	B (g/L)	C (°C)	D (rpm)	Concentração celular (g/L)
1	(-1) 4,0	(-1) 0,6	(-1) 22	(-1) 160	3,61
2	(1) 8,0	(-1) 0,6	(-1) 22	(-1) 160	2,29
3	(-1) 4,0	(1) 1,4	(-1) 22	(-1) 160	4,17
4	(1) 8,0	(1) 1,4	(-1) 22	(-1) 160	4,27
5	(-1) 4,0	(-1) 0,6	(1) 26	(-1) 160	3,51
6	(1) 8,0	(-1) 0,6	(1) 26	(-1) 160	3,06
7	(-1) 4,0	(1) 1,4	(1) 26	(-1) 160	3,37
8	(1) 8,0	(1) 1,4	(1) 26	(-1) 160	2,32
9	(-1) 4,0	(-1) 0,6	(-1) 22	(1) 220	1,60
10	(1) 8,0	(-1) 0,6	(-1) 22	(1) 220	3,16
11	(-1) 4,0	(1) 1,4	(-1) 22	(1) 220	1,75
12	(1) 8,0	(1) 1,4	(-1) 22	(1) 220	3,66
13	(-1) 4,0	(-1) 0,6	(1) 26	(1) 220	3,29
14	(1) 8,0	(-1) 0,6	(1) 26	(1) 220	3,65
15	(-1) 4,0	(1) 1,4	(1) 26	(1) 220	2,89
16	(1) 8,0	(1) 1,4	(1) 26	(1) 220	2,13
17	(-2) 2,0	(0) 1,0	(0) 24	(0) 190	2,17
18	(2) 10	(0) 1,0	(0) 24	(0) 190	3,95
19	(0) 6,0	(-2) 0,2	(0) 24	(0) 190	3,07
20	(0) 6,0	(2) 1,8	(0) 24	(0) 190	4,82
21	(0) 6,0	(0) 1,0	(-2) 20	(0) 190	2,51
22	(0) 6,0	(0) 1,0	(2) 28	(0) 190	3,58
23	(0) 6,0	(0) 1,0	(0) 24	(-2) 130	3,66
24	(0) 6,0	(0) 1,0	(0) 24	(2) 250	3,83
25	(0) 6,0	(0) 1,0	(0) 24	(0) 190	5,27
26	(0) 6,0	(0) 1,0	(0) 24	(0) 190	5,08
27	(0) 6,0	(0) 1,0	(0) 24	(0) 190	4,77

Os valores da concentração celular de cada composição de meio foram muito variados, ficando entre  $1,60 \text{ g L}^{-1}$  e  $5,27 \text{ g L}^{-1}$ . A Tabela 3, mostra a análise de variância (ANOVA) do modelo obtido.

Tabela 31. Tabela análise da variância para o crescimento celular.

Fatores	SS	df	MS	F	p
(1) Concentração Ext. Levedura (L)	0,637	1	0,637	1,35	0,266
<b>Concentração Ext. Levedura (Q)</b>	<b>6,742</b>	<b>1</b>	<b>6,742</b>	<b>14,35</b>	<b>0,002</b>
(2) Concentração CaCO <sub>3</sub> (L)	0,630	1	0,630	1,34	0,269
<b>Concentração CaCO<sub>3</sub> (Q)</b>	<b>2,479</b>	<b>1</b>	<b>2,479</b>	<b>5,28</b>	<b>0,040</b>
(3) Temperatura (L)	0,142	1	0,142	0,30	0,591
<b>Temperatura (Q)</b>	<b>6,832</b>	<b>1</b>	<b>6,832</b>	<b>14,54</b>	<b>0,002</b>
(4) Agitação (L)	0,710	1	0,710	1,51	0,242
<b>Agitação (Q)</b>	<b>3,260</b>	<b>1</b>	<b>3,260</b>	<b>6,94</b>	<b>0,021</b>
Interação entre 1 e 2	0,000	1	0,000	0,00	0,985
Interação entre 1 e 3	1,076	1	1,076	2,29	0,155
Interação entre 1 e 4	2,095	1	2,095	4,46	0,056
<b>Interação entre 2 e 3</b>	<b>2,242</b>	<b>1</b>	<b>2,242</b>	<b>4,77</b>	<b>0,049</b>
Interação entre 2 e 4	0,536	1	0,536	1,14	0,306
Interação entre 3 e 4	0,936	1	0,936	1,99	0,183
Erros	5,635	12	0,469		
Total SS	25,165	26			

Pode-se observar que a soma quadrática dos erros acaba tendo um valor acima do esperado, isso faz com que o modelo não descreva em sua totalidade, o que resulta em uma variação explicada de 77,6%.

Analisando-se a Tabela 4, verifica-se que os termos quadráticos da concentração de extrato de levedura, CaCO<sub>3</sub>, temperatura e agitação e a interação entre os dois termos lineares (2) e (3) são significativos, como confirmado pelo *p*-valor (0,05) apresentado.

Tabela 42. Cálculo dos efeitos e respectivos índices estatísticos para otimização.

	Efeito	Erro Padrão	Teste <i>t</i> de Student	Nível <i>p</i>
<b>Média/Interações</b>	<b>5,040</b>	<b>0,395</b>	<b>12,738</b>	<b>0,0000</b>
(1) Ext. Levedura (L)	0,325	0,279	1,164	0,266
<b>Ext. Levedura (Q)</b>	<b>-1,124</b>	<b>0,296</b>	<b>-3,789</b>	<b>0,002</b>
(2) CaCO <sub>3</sub> (L)	0,324	0,279	1,158	0,269
<b>CaCO<sub>3</sub> (Q)</b>	<b>-0,681</b>	<b>0,296</b>	<b>-2,297</b>	<b>0,040</b>
(3) Temperatura (L)	0,154	0,279	0,551	0,591
<b>Temperatura (Q)</b>	<b>-1,131</b>	<b>0,296</b>	<b>-3,814</b>	<b>0,002</b>
(4) Agitação (L)	-0,344	0,279	-1,230	0,242
<b>Agitação (Q)</b>	<b>-0,781</b>	<b>0,296</b>	<b>-2,634</b>	<b>0,0217</b>
<b>Interação (2L) e (3L)</b>	<b>-0,748</b>	<b>0,342</b>	<b>-2,185</b>	<b>0,0494</b>

A Figura 3 apresenta os valores previstos *versus* observados, confirmando que o modelo proposto descreve parcialmente o fenômeno, visto que há uma dispersão dos pontos quando se busca um limite de confiança de 95%.

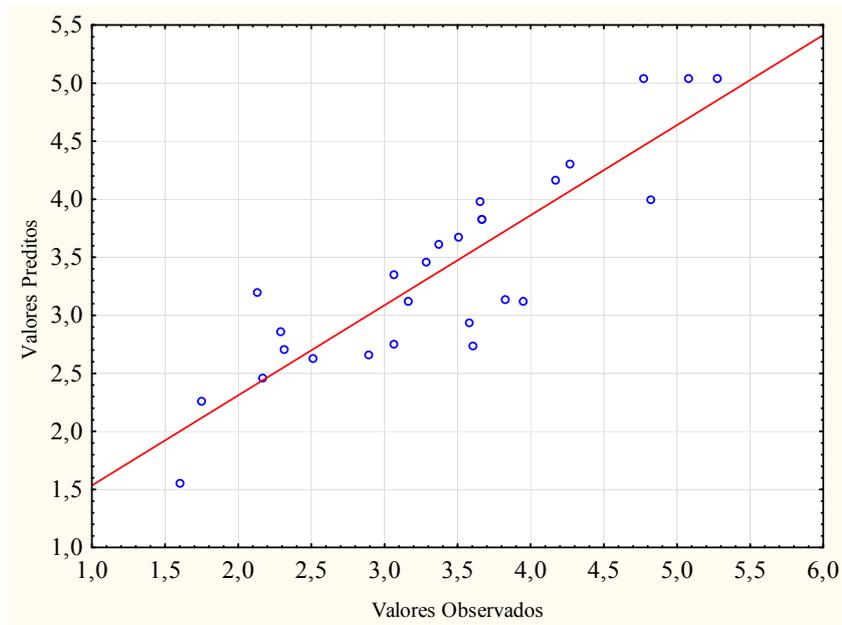


Figura 3. Valores preditos pelo modelo polinomial *versus* observados experimentalmente para a resposta do crescimento do *Rhodococcus erythropolis*.

A Figura 4 apresenta a região de máximo crescimento celular. Essa região ótima é definida no intervalo de concentração de  $\text{CaCO}_3$  de 0,8 a 1,2  $\text{g.L}^{-1}$  (níveis - 0,5 a 0,5) e concentração de extrato de levedura de 5 a 7  $\text{g L}^{-1}$  (níveis 0,5 a 0,5).

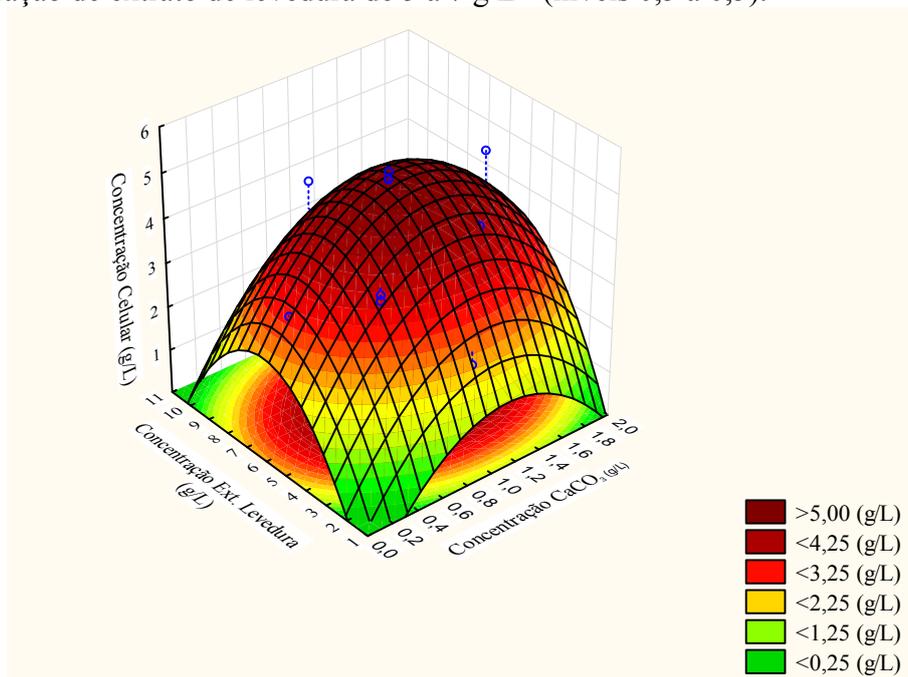


Figura 4. Superfície de resposta da concentração de  $\text{CaCO}_3$  *versus* extrato de levedura para o crescimento de *Rhodococcus erythropolis*.

Conforme mostra a Figura 5 verifica-se que a região ótima de crescimento encontra-se num nível máximo com agitação de 160 a 190 rpm (níveis -1,0 a 0) e temperatura de 23,0 a 25  $^{\circ}\text{C}$  (níveis -0,5 a 0,5).

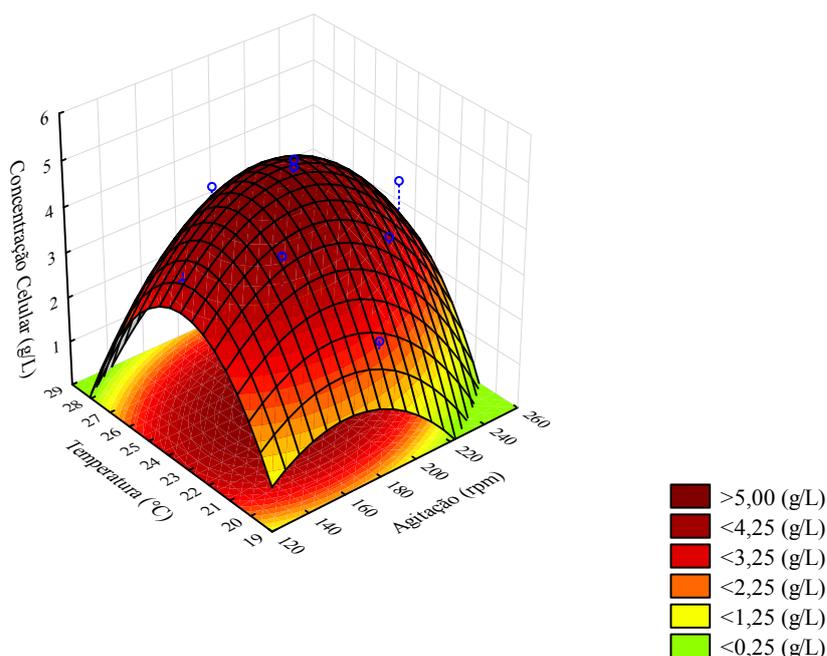


Figura 5. Superfície de resposta da agitação *versus* temperatura para o crescimento de *Rhodococcus erythropolis*.

Outro fato que pode ser observado nas curvas de nível das Figuras 4 e 5 é a maior sensibilidade para o crescimento do *Rhodococcus erythropolis* para a concentração de extrato de levedura e temperatura do que em relação à  $\text{CaCO}_3$  e agitação, fato que também pode ser visto pelo maior coeficiente dos mesmos.

O modelo para a o crescimento do *Rhodococcus erythropolis* é representado pela Equação 1:

$$C_{R.e.} = 5,04 - 0,562187 A^2 - 0,340937 B^2 - 0,565937 C^2 - 0,390937 D^2 - 0,374375 BC \quad (1)$$

onde:

$C_{R.e.}$  = Concentração final de *Rhodococcus erythropolis* ( $\text{g L}^{-1}$ );

$A$  = Concentração Extrato de levedura ( $\text{g L}^{-1}$ );

$B$  = Concentração de  $\text{CaCO}_3$  ( $\text{g L}^{-1}$ );

$C$  = Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ );

$D$  = Agitação (rpm).

Foram determinados os pontos críticos ou estacionários, onde se tem o máximo de crescimento,  $5,10 \text{ g.L}^{-1}$ , que correspondem à concentração de extrato de levedura de  $6,15 \text{ g.L}^{-1}$  (valor codificado 0,0759), concentração de  $\text{CaCO}_3$   $1,16 \text{ g.L}^{-1}$  (valor codificado 0,4123), temperatura de  $23,7 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (valor codificado -0,1561) e agitação de 180 rpm (valor codificado -0,3298). A diferença das cinéticas entre o meio inicial e otimizado são mostrados na figura 6.

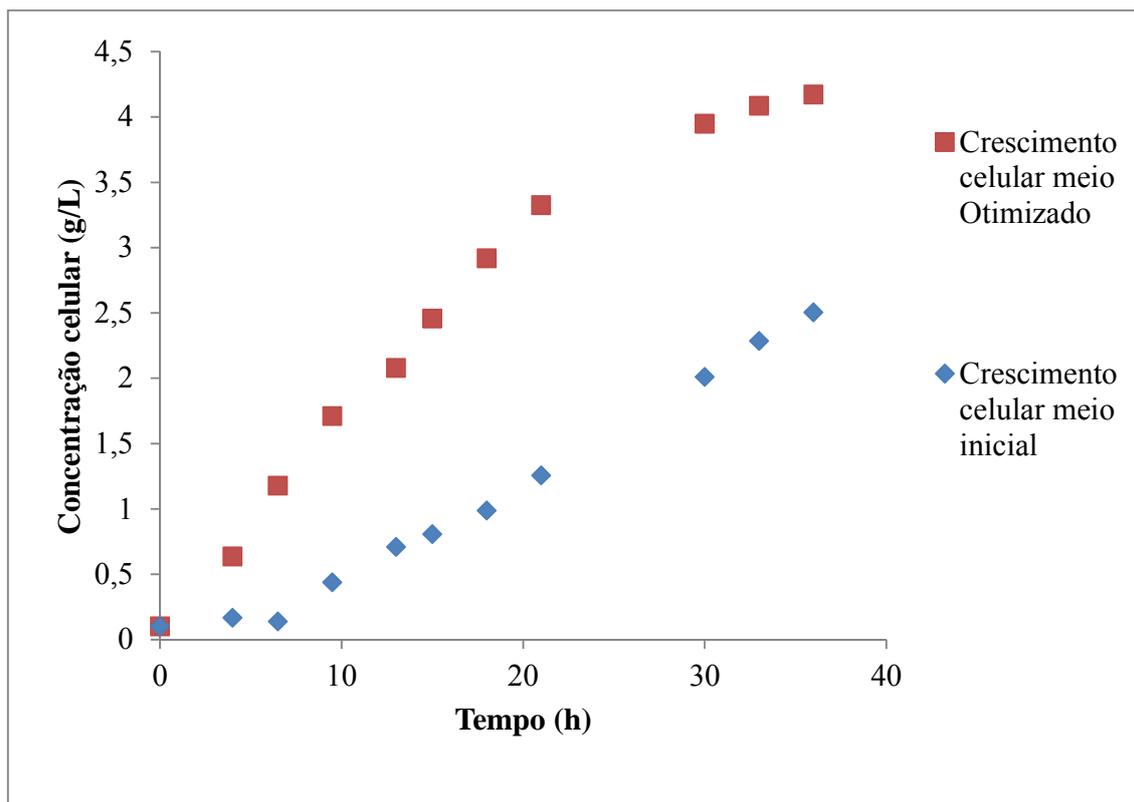


Figura 6. Cinéticas de crescimento do *Rhodococcus erythropolis*.

Através da Figura 6 é possível observar a redução da fase de adaptação do micro-organismo que era de 8 a 10 h para 3 a 4 h. Fator que pode ser destacado visto que facilita a sua utilização industrial, além de se obter uma maior velocidade de crescimento.

Com os resultados obtidos na otimização foi possível aumentar a eficiência do micro-organismo em relação ao crescimento celular e a quantidade de substrato presente no meio, adicionalmente o excesso de  $\text{CaCO}_3$  faz com que o micro-organismo não se desenvolva, já que sua adição faz com que se tenha uma elevação no pH, conforme descrito por Maass (2011), o *R. erythropolis* se desenvolve em pH entre 6,5 e 7,5. Já a quantidade de oxigênio dissolvida tende a aumentar com a diminuição da temperatura e o aumento da agitação, segundo Pinotti (2003), devido à baixa solubilidade do oxigênio na água, é essencial à transferência contínua deste para o meio líquido de crescimento, visto que é um importante substrato em fermentações aeróbicas.

#### 4. CONCLUSÃO

Neste trabalho realizou-se o estudo da influência de fatores como temperatura, agitação e concentrações dos compostos: extrato de levedura,  $\text{CaCO}_3$  no crescimento do micro-organismo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277. Os valores encontrados para a concentração de extrato de levedura e temperatura apresentaram uma maior influência no crescimento do *Rhodococcus erythropolis* quando comparados com a  $\text{CaCO}_3$  e agitação. Com a otimização do meio de crescimento foi possível reduzir a fase lag que era de 8 a 10 h para 3 a 4 h.

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

informações sobre o efeito de cada variável junto ao crescimento do *Rhodococcus erythropolis*.

## 5. REFERÊNCIAS

- CARVALHO, C. C. C. R.; da FONSECA, M. M. R. The remarkable *Rhodococcus erythropolis*. *Appl. Microbiol. Biot.*, v. 67, p. 715-726, 2005.
- DINAMARCA, M. A.; IBACACHE-QUIROGA, C.; BAEZA, P.; GALVEZ, S.; VILLARROEL, M.; OLIVERO, P.; OJEDA, J. Biodesulfurization of gas oil using inorganic supports biomodified with metabolically active cells immobilized by adsorption. *Bioresour. Technol.* V. 101, p. 2375-2378, 2010.
- DINAMARCA, M. A.; ROJAS, A.; BAEZA, P.; ESPINOZA, G.; IBACACHE-QUIROGA, C.; OJEDA, J. Optimizing the biodesulfurization of gas oil by adding surfactants to immobilized cell systems. *Fuel.* V. 116, p. 237-241, 2014.
- HUANG, L.; MA, T.; LI, D.; LIANG, F. L.; LIU, R. L.; LI, G. Q. Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Rhodococcus erythropolis*. *Mar. Pollut. Bull.* V. 56, p. 1714-1718, 2008.
- MAASS, D.; Dessulfurização do DBT e do óleo diesel em sistema bifásico pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 em reator descontínuo. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2011.
- PINOTTI, L. Study of different media for production of penicillin G Acylase from *Bacillus magaterium* ATCC 14945. *Appl. Biochem. Biot.*, v. 84 (6), p. 655-663, 2000.
- SANCHEZ, N.; SANDOVAL, A. H.; DIAZ-CORRALES, F.; SERRANO, J. A. Revista de la sociedad venezolana de microbiologia. Caracas, 2004.
- TORRES, S.; PANDEY, A.; CASTRO, G. R. Organic solvent adaptation of gram positive bacteria: Applications and biotechnological potentials. *Biotechnol. Adv.*, v. 29, p. 442-452, 2011.
- VAIDYA, B. K.; MUTALIK, S. R.; JOSHI, R. M.; NEME, S. N.; KULKARNI, B. D. Enhanced production of amylase from *Rhodococcus erythropolis* MTCC 1526 by medium optimization using a statistical experimental design. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* V. 36, p. 671-678, 2009.