

2.12.02 - Microbiologia Aplicada

**ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DE AMOSTRAS DE ÁGUA DE BONITO, MS.**

Sthephanye K. F. Gomes<sup>1\*</sup>, Mariana B. dos Santos<sup>2</sup>, Thaís S. M. Ferreira<sup>1</sup>, Flávia G. Ferreira<sup>1</sup>, Maricy R. L. Bonfá<sup>3</sup>

1. Estudante de graduação em Biotecnologia pela Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Federal da Grande Dourados (FCBA-UFGD)
2. Mestranda do programa de pós-graduação em Ciências Bioquímica pela Universidade Federal do Paraná. Colaboradora do laboratório de biologia estrutural e engenharia de proteínas (LPEP) na Fiocruz PR - Instituto Carlos Chagas
3. Professora Associada Doutora da Faculdade de Ciências Biológicas e ambientais FCBA-UFGD/Orientadora

**Resumo**

Os microplásticos são encontrados em todos os ambientes e também nos organismos vivos, devido ao descarte incorreto de plásticos e o uso exacerbado do mesmo. Visando a redução do consumo dos plásticos de fonte fóssil, o objetivo deste estudo foi bioprospectar bactérias no Rio Formoso (Bonito, MS) potencialmente produtoras de polihidroxialcanoatos (PHA). Para tanto, utilizou-se o meio ISP9 com glicerol (2%) (resíduo da produção do biodiesel). As 10 bactérias isoladas foram testadas quanto à produção de PHAs, utilizando-se a coloração células com Sudan Black B 0,02%. Posteriormente as que apresentaram acúmulo de lipídios foram cultivadas em meio com corante Red Nile ( $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) e as placas de Petri foram avaliadas sob luz UV para verificar a fluorescência adquirida pelas bactérias quando produzem PHAs. Oito bactérias estudadas apresentaram potencial de produção de PHAs, utilizando como fonte de carbono o glicerol, o que reduzirá o custo de produção dos biopolímeros produzidos.

**Autorização legal:** Cadastro SISGEN ACCBC41 (bioprospecção)

**Palavras-chave:** PHA; biopolímeros; reaproveitamento de glicerol.

**Apoio financeiro:** UFGD

**Trabalho selecionado para a JNIC:** DINIC/COPQ/PROPP/UFGD

**Introdução**

No Brasil, o bioma do cerrado é reconhecido como um local de ampla biodiversidade, sendo classificado como uma das regiões de maior diversidade do mundo (SILVA E BATES, 2002). Portanto, é de extrema importância um maior levantamento a respeito dos microrganismos existentes na região e suas possíveis aplicações. Nesse sentido, a bioprospecção é uma ferramenta que permite a obtenção de organismos do ambiente que tenham potencial biotecnológico e econômico e, eventualmente, levem ao desenvolvimento de um produto.

Durante a revisão de literatura, notou-se que há pouco estudo sobre microrganismos de água doce de interesse biotecnológico, principalmente produtores de biopolímeros. Bioprodutos de grande interesse do ponto de vista ambiental e industrial, os biopolímeros são inclusões celulares orgânicas ou inorgânicas chamadas PHAs (polihidroxialcanoatos), obtidas quando as bactérias armazenam carbono em um meio com falta de nutrientes. Esses compostos, quando em grande quantidade, podem substituir os polímeros fósseis, sendo uma alternativa mais sustentável, pois também possuem alta biodegradabilidade em diferentes tipos de ambientes (POLI, 2011).

A produção industrial de PHAs exige linhagens de microrganismos com o máximo de características associadas à otimização da produção, tais como rápido crescimento em fontes de carbono de baixo custo, alta porcentagem de acúmulo de PHA, eficiência na transformação do substrato em produto, produção de um polímero facilmente extraído das células bacterianas e bem adaptado às técnicas de separação, além de apresentar-se inofensivo a seres humanos, animais e ao ambiente (CHEN, 2003).

Devido à grande dificuldade de isolamento de uma linhagem bacteriana adaptada às condições ideais, o custo de produção de PHA é muito alto, inviável para produção em larga escala de produtos como embalagens, por exemplo. Sendo assim, se fazem necessárias mais pesquisas nessa área para que o custo de produção seja reduzido e este produto se torne mais acessível. No estudo aqui relatado, foram coletadas amostras de água do Rio Mimoso, localizado na cidade de Bonito, MS, para serem bioprospectadas com o objetivo de encontrar bactérias com potencial de produção do biopolímero PHA, utilizando o glicerol como fonte de carbono de baixo custo.

## Metodologia

A coleta das amostras de água foi realizada no Rio Mimoso, a 25 km do município de Bonito, MS (20°58'23.1"S e 56°32'41.9"W). Para a realização da bioprospecção de bactérias, 10 mL da amostra de água foram adicionadas em frascos Erlenmeyer contendo 90 mL de solução salina (NaCl, 0,9%) esterilizada, os frascos foram agitados em agitador orbital shaker a 300 rpm durante 30 minutos. Realizou-se diluições seriadas da suspensão da amostra e 100 µL das diluições  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  foram inoculadas pelo método de espalhamento em superfície em placas de Petri com os meios ISP9 (MATIAS, 2009) com adição de glicerol (2%) como fonte de carbono. A cada 1 litro de meio seletivo foram adicionados 3 mL de solução fluconazol 0,01g.mL<sup>-1</sup> para evitar o crescimento de fungos. As placas foram incubadas pelo período de 48 horas em incubadora BOD à temperatura de 30°C. Após o crescimento, as colônias foram estriadas por esgotamento para a obtenção de colônias isoladas puras.

A partir da bioprospecção, foi realizado o isolamento e seleção das bactérias, sendo selecionadas colônias visualmente diferentes e cada uma delas estriada por esgotamento em múltiplas placas para passar pelos testes de *screening*, uma triagem para separar e diferenciar essas bactérias. Foram obtidos 10 isolados de sucesso das colônias puras, os quais também foram armazenadas em tubos criogênicos para preservação e armazenamento das linhagens.

O *screening* da produção de PHA foi realizado por dois testes iniciais: primeiro, a coloração com o Sudan Black B, um corante que apresenta cor azulada ao evidenciar acúmulo de lipídeos nas células, o que pode ser um sinal promissor quando se está buscando microrganismos produtores de PHA. Qualquer tom azulado (claro ou escuro) foi considerado positivo, por esse teste não ser totalmente definitivo (LÍCIO, 2011). Então, os 10 isolados também foram corados com o Nile Red, um corante que penetra no citoplasma da célula e tingem as inclusões de PHA. Tendo adicionado 1 µl de Nile Red a cada 1 mL de meio de cultura e aguardado o período apropriado de crescimento das colônias, a avaliação foi feita por um fotodocumentador Loccus, e, caso as bactérias apresentaram fluorescência sob a luz UV, foi constatado resultado positivo para produção e acúmulo do PHA.

Após esse teste, foi realizada uma caracterização morfológica e bioquímica, de quatro testes, para classificar essas bactérias. Foram realizados os testes de Gram e KOH, para diferenciação de bactérias Gram positivas e Gram negativas, e depois, o teste de catalase nas Gram positivas, para distinguir sua oxidação, e o teste de oxidase nas Gram negativas. Desta forma, caso seja necessário optar por algum dos grupos para uma futura produção de PHA, seria dada preferência ao grupo de bactérias Gram positivas, já que bactérias Gram negativas e oxidases negativa pertencem à família das Enterobacteriaceae e algumas são descritas como patogênicas (Octavia; Lan, 2014).

## Resultados e Discussão

Foram obtidos por meio do plaqueamento da amostra de água nos meios seletivos 10 isolados bacterianos no meio seletivo ISP9 + glicerol 2%, específico para crescimento de bactérias produtoras de PHA. A escolha das colônias seguiu os seguintes parâmetros: diferença morfológica a olho nu (quanto a cor, textura, brilho) e colônias isoladas (evitando a chance de que a colônia escolhida pudesse estar contaminada por colônias vizinhas). As bactérias escolhidas foram repicadas por esgotamento até a obtenção de colônias puras e então cultivadas em tubo inclinado para sua preservação e uso posterior.

O *screening* inicial para o potencial de produção de PHA ocorreu pela adição do corante Sudan Black B 0,02%. Como resultado, todas as 10 colônias foram coradas de azul, indicando o acúmulo de lipídios. No teste de coloração com o Nile Red, oito isolados exibiram forte ou considerável fluorescência. Os outros dois isolados não exibiram fluorescência. As fluorescências foram medidas em 24 e 48 horas de crescimento, mas não apresentaram diferenças na intensidade.

Zuriani *et al.* (2012) mostrou a correlação da concentração de PHA e fluorescência em cepa *Cupriavidus sp.*, onde quanto maior a concentração (g.L<sup>-1</sup>) de PHA maior a intensidade da fluorescência. Desse modo, é possível interpretar que uma das colônias positivas para o teste com Nile Red, a colônia PHA-03, teve uma menor produção de PHA que os outros isolados positivos para a produção, pois apresentou menor intensidade de fluorescência.

Após a obtenção dos isolados em meio ISP9, procedeu-se à sua identificação por ensaios morfológicos. A técnica de Gram serviu para a diferenciação dos isolados em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Dos dez isolados obtidos, oito foram classificados como bactérias bastonetes Gram-positivas e catalase positivo, e dois como bastonetes Gram-negativos positivos para o teste de KOH. Todos os isolados Gram negativos foram negativos para o teste de oxidase.

## Conclusões

A partir da amostra de água do Rio Mimoso (Bonito, MS) isolou-se bactérias com potencial biotecnológico, sendo oito delas positivas nos dois testes realizados, coloração com Sudan Black e Nile Red, ou seja, oito bactérias com potencial de produção de PHA, uma alternativa biodegradável aos polímeros de origem fóssil, e que também possui vários usos na medicina.

Poucos estudos exploram o potencial de bioprospecção da água doce para obtenção de microrganismos com potencial biotecnológico, desse modo, este trabalho explora um novo potencial da região do Cerrado. Se explorada de maneira responsável e sustentável, essa região pode crescer economicamente e ainda auxiliar na preservação do meio ambiente. Além disso, a fonte de carbono utilizada para o crescimento

dos microrganismos foi o glicerol, já que é barato e não pode ser descartado diretamente no meio ambiente.

### Referências bibliográficas

CHEN, G.Q. Production and Application of Microbial Polyhydroxyalkanoates. In: CHIELLINI, E.; SOLARO, R. Biodegradable Polymers and Plastics. London: **Springer**, 2003. p. 155-166.

LÍCIO, D. C. P. Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos e caracterização molecular de sua PHA sintase. 2011. 105f. Dissertação de Mestrado - **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2011.

MATIAS, F. et al. Polyhydroxyalkanoates production by actinobacteria isolated from soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 7, p. 790–800, 2009.

OCTAVIA S., LAN R. (2014) The Family Enterobacteriaceae. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) The Prokaryotes. **Springer**, Berlin, Heidelberg.

POLI, A.; DI-DONATO, P. ABBAMONDI, G. R. NICOLAUS, B. Synthesis, Production, and Biotechnological Applications of Exopolysaccharides and Polyhydroxyalkanoates by Archaea. Review Article **Hindawi Publishing Corporation Archaea** Volume 2011.

SILVA, J. M. C.; BATES, J. M. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical Savanna hotspot. **BioScience** 52, 225–233. 2002

ZURIANI R.; VIGNESWARI S.; AZIZAN M. N. M.; MAJID M. I. A.; AMIRUL A. A. A High Throughput Nile Red Fluorescence Method for Rapid Quantification of Intracellular Bacterial Polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. 2012.