

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS POTENCIALMENTE PRODUTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS

MACAGNAN, Karine Laste¹; RODRIGUES, Amanda Ávila²; MOREIRA, Angelita da Silveira³; MOURA, Andrea Bittencourt⁴; VENDRUSCOLO, Claire Tondo⁵

¹Universidade Federal de Pelotas - UFPel, Centro de Desenvolvimento Tecnológico - CDTec, Bacharelado em Biotecnologia; ²UFPel, CDTec, Doutoranda do PPG em Biotecnologia; ³UFPel, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e dos Alimentos - CCQFA e PPG em Ciência e Tecnologia Agroindustrial; ⁴UFPel, FAEM, PPG em Fitossanidade; ⁵UFPel, CCQFA, PPGCTA e CDTec/PPGB. karinemacagnan@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

Os plásticos convencionais, obtidos a partir do petróleo, substituem cada vez mais o vidro e o papel na indústria de embalagens, por serem de baixo custo, versáteis e duráveis. No entanto, a expansão demográfica do planeta, que passou, no último século, de 1,5 para 6,8 bilhões de habitantes (POPULACION REFERENCE BUREAU, 2011), gera preocupação devido ao acúmulo de plásticos no ambiente, ocasionando um problema mundial (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005). Embora tenha havido evoluções em praticamente todas as áreas, estas não foram suficientes para proporcionar equilíbrio entre o número expressivo de habitantes e seu consumo. A necessidade de produção para suprir as exigências destes habitantes tem gerado todo tipo de “lixo”, os quais contribuem para o desequilíbrio ambiental. Preocupados em minimizar este desequilíbrio, pesquisadores têm buscado substitutos para os plásticos petroquímicos. Estes materiais devem ser semelhantes aos plásticos convencionais, além de serem degradáveis mais rapidamente quando descartados no meio ambiente (PIEMOLINI, 2004).

Bioprocessos podem ser empregados como ferramenta para obtenção de polímeros biodegradáveis da família dos polihidroxialcanoatos (PHAs). PHAs são acumulados no citoplasma bacteriano como inclusões de poliésteres insolúveis, correspondendo até 90% da massa celular (KUNASUNDARI; SUDESH, 2011). A síntese de PHAs, materiais de reserva intracelular de energia e carbono para os microrganismos, ocorre quando há condições desfavoráveis de crescimento e excesso de carbono. A rápida degradação pela ação enzimática de microrganismos sob condições apropriadas no meio ambiente é a principal característica destes bioplásticos; além de serem termoplásticos e biocompatíveis. O polihidroxibutirato P[3HB] é o biopolímero mais estudado dentre os PHAs e o mais utilizado em plásticos biodegradáveis (CHANPRATEEP, 2010).

São conhecidos mais de 300 microrganismos sintetizadores de PHAs, mas são poucos os efetivamente empregados na sua produção, incluindo *Cupriavidus necator* e *Pseudomonas* sp., e *Escherichia coli* recombinantes (CHANPRATEEP, 2010). Os microrganismos empregados na produção de PHAs devem ser eficientes em cultivos com alta densidade celular, acumular alta concentração de polímero em um período relativamente curto, resultando em alta produtividade, um fator indispensável para diminuir os custos de produção deste biopolímero (LEE, 1996). A bioprospecção de bactérias produtoras de PHAs pode ser realizada pela avaliação da presença de corpos lipofílicos nas células, através do teste colorimétrico de *Sudan Black*. O corante *Sudan Black* é ligeiramente solúvel em solvente orgânico e insolúvel em água; ao ligar-se a estruturas hidrofóbicas confere coloração negra azulada, visível em microscópio óptico (LELLIOT; STEAD, 1987).

O objetivo deste trabalho foi bioprospectar bactérias potencialmente produtoras de PHAs para, a partir desta seleção, otimizar processos de produção e extração deste bioplástico, visando minimizar custos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas na bioprospecção cinco amostras bacterianas denominadas: *Ralstonia*, Contaminação Seca e *Pseudomonas B*, cedidas pelo Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, e *Beijerinckia B52* e *C31* cedidas pelo Laboratório de Biopolímeros do Núcleo de Biotecnologia do CDTec.

Foi realizada a comparação de três protocolos de coloração com *Sudan Black*, com diferenças no tempo de repouso do corante e na lavagem das lâminas, utilizados por Crochemore (2010), Oliveira (2010) e pelo *National Center for Biotechnology Education* (2012), para padronização da técnica. A bactéria utilizada como padrão foi a *C31*, já estudada por Oliveira (2010) como PHA positiva. Foram realizados esfregaços a partir de culturas de 48h a 28°C em placas contendo meio *Yeast Malt* (YM) e estes foram corados conforme as três metodologias (Tab. 1). Os esfregaços corados foram observados em microscópio óptico em lente de imersão.

Tabela 1 – Metodologias para coloração de *Sudan Black*

	Oliveira (2010)	Crochemore (2010)	<i>National Center for Biotechnology Education</i>
1ª	Preparar o esfregaço	Preparar o esfregaço	Preparar o esfregaço
2ª	Cobrir o esfregaço com Sudan Black 0,3% m/v e deixar por 10min.	Cobrir o esfregaço com Sudan Black 0,3% m/v e deixar por 15min.	Cobrir o esfregaço com Sudan Black 0,3% m/v e deixar por 12min.
3ª	Lavar com xilol	Lavar com xilol	Lavar com xilol
4ª	Lavar com água	Secar com papel	Secar com papel
5ª	Secar com papel	Cobrir com safranina 0,5% e deixar por 10s	Cobrir com safranina 0,5% e deixar por 10s
6ª	Cobrir com safranina 0,5% e deixar por 15s	Lavar com água	Lavar com água
7ª	Lavar com água	Esperar secar e observar na lente de imersão	Secar a lâmina e observar na lente de imersão
8ª	Esperar secar e observar na lente de imersão		

Após a escolha da técnica padrão, foi realizada a bioprospecção por coloração de *Sudan Black*. Para produção do inóculo, foram repicadas placas cheias em meio YM (28°C, 48h) e o conteúdo das placas transferido para *Erlenmeyers*, contendo meio YM, que foram incubados em agitador orbital a 28°C por 24h a 150rpm. Amostras de 24h do inóculo foram utilizadas para os esfregaços, corados com a técnica citada por Oliveira (2010) e foram observados em microscópio óptico em lente de imersão. As imagens foram captadas através de fotografias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a padronização da técnica de coloração com *Sudan Black* as lâminas foram visualizadas em microscópio óptico sem câmera fotográfica acoplada; portanto, não foi possível registrar estas imagens. As observações permitiram concluir que não houve diferença entre as colorações dos três protocolos. Portanto, foi determinada como técnica padrão para futuros experimentos a utilizada por Oliveira (2010) e confirmada nesta padronização, por demandar menor tempo de imersão no corante, possibilitando maior rapidez na técnica.

Os esfregaços das cinco amostras corados com a técnica selecionada e visualizados em lente de imersão de microscópio óptico, com câmera fotográfica acoplada, puderam ser registrados em fotografias demonstradas na Fig. 1.

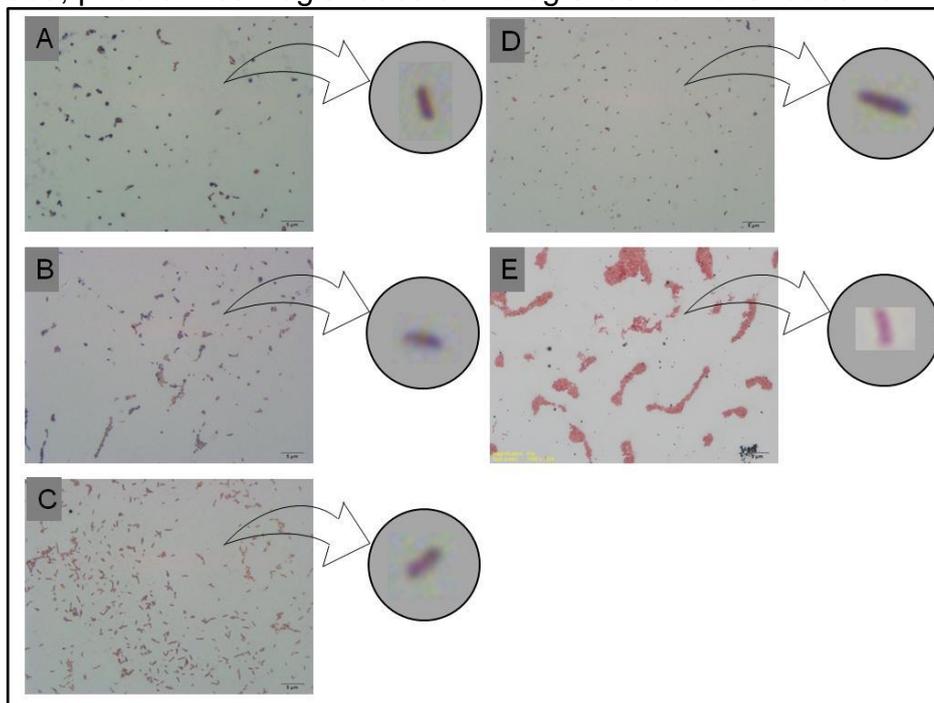


Figura 1 – Esfregaços corados com *Sudan Black* visualizados em lente de imersão em microscopia óptica. A (*Ralstonia*), B (Contaminação Seca), C (*Pseudomonas* B), D (C31 – *Beijerinckia*) e E (B52 – *Beijerinckia*).

Como já mencionado, o corante *Sudan Black* atua por difusão simples, corando corpos lipofílicos como os grânulos de PHAs, gerando uma coloração negra azulada, a qual possibilita sua visualização em microscópio óptico e indica resultado positivo (LELLIOT; STEAD, 1987). Assim, pode-se inferir que todas as bactérias analisadas são potencialmente produtoras de PHAs, apresentando pontos negros azulados com diferente distribuição, dimensão e intensidade. A observação dos grânulos mais intensos ocorreu nas lâminas de *Beijerinckia* C31 e Contaminação Seca, e a *Beijerinckia* B52 foi a amostra que apresentou os grânulos mais claros. Quanto à disposição dos grânulos nas células, as amostras corresponderam ao relatado na literatura para os gêneros bacterianos analisados, ou seja, todas as bactérias apresentaram no mínimo dois grânulos distribuídos um em cada pólo da célula. Esta distribuição é encontrada em grande parte das células no estágio inicial de acúmulo de PHAs. Já a presença de um terceiro grânulo, também observado em nossas análises, normalmente ocorre na região central do bacilo (JENDROSSEK, 2007).

As bactérias do gênero *Beijerinckia* bioprospectadas neste trabalho foram também analisadas por Oliveira (2010) com esfregaços de culturas de 24 e 48h em meio *YM* sólido. A bactéria C31 mostrou-se positiva em ambos os resultados e foi classificada como a amostra de mais fácil visualização dos grânulos; já a B52, PHA negativa para Oliveira (2010), em nosso trabalho, apresentou pontos negros azulados, mesmo que não tão intensos quanto os das demais bactérias, indicando o potencial de produção de PHAs dessa bactéria. Tal resultado pode ser justificado pela diferença do método de multiplicação celular empregado. No presente trabalho, após a cultura em placas com meio sólido, as células foram crescidas em meio

líquido com agitação, o que pode ter facilitado a transformação do substrato em poliésteres, uma vez que a síntese dos grânulos de PHA pode ser diferentemente influenciada pelas condições operacionais empregadas (JENDROSSEK, 2007).

4 CONCLUSÃO

Esta triagem realizada através de coloração com *Sudan Black* forneceu indícios de que todas as linhagens são possíveis produtoras de PHAs, sendo as linhagens C31 e Contaminação Seca as que provavelmente produzam em maior quantidade tais polímeros. A bioprospecção por visualização de corpos lipofílicos em microscopia óptica foi considerada uma técnica rápida e de fácil implementação para uma triagem inicial; porém, sugerimos que amostras destes cultivos sejam analisadas por Cromatografia Gasosa para elucidar qualitativamente e quantitativamente os PHAs produzidos.

5 REFERÊNCIAS

- CHANPRATEEP, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 621-632, 2010.
- CROCHEMORE, A.G. **Bioprospecção de espécies de *Pseudomonas* isoladas de solo de várzea subtropical do RS para produção de Polihidroxibutirato**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. UFPel, Pelotas.
- JENDROSSEK, D. Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 1186-1196, 2007.
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A.K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 607-619, 2005.
- KUNASUNDARI, B.; SUDESH, K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. **Express Polymer Letters**, v. 5, n. 7, p. 620-634, 2011.
- LEE, S. Y. Plastic bacteria - Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Trends Biotechnology**, v. 14, p. 431-438, 1996.
- LELLIOT, R.A.; STEAD, D.E. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants, *Methods in plant pathology*, 2, British Society for Plant Pathology, 1987.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY EDUCATION. **Plastic from bacteria**. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbe.reading.ac.uk/ncbe/protocols/PRACBIOTECH/PDF/phbprod.pdf>>. Acesso em 10 de julho de 2012.
- OLIVEIRA, C.F. **Produção de Polihidroxibutirato: Bioprospecção de *Beijerinckia* sp., da coleção de bactérias do Laboratório de Biopolímeros do CD Tec - UFPel**. 2010. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. UFPel, Pelotas.
- PIEMOLINI, L. T. **Modelagem estrutural da PHA sintase de *C. violaceum* para estudos de mutação sítio-dirigida**. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, UFSC, Florianópolis.
- POPULATION REFERENCE BUREAU. **GUIDE DE DÉMOGRAPHIE DU POPULATION REFERENCE BUREAU**. Disponível em: <http://www.prb.org/pdf/Pop_Handbook_Fr.pdf>. Acesso em: 8 de maio de 2011.