

SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS BACTERIANAS PRODUTORAS DO BIOPLÁSTICO POLI(3-HIDROXIBUTIRATO)

SELECTION AND IDENTIFICATION OF BACTERIAL STRAINS PRODUCING OF THE BIOPLASTIC POLY(3-HYDROXYBUTYRATE)

Amanda Avila Rodrigues¹; Karine Laste Macagnan¹; Bruna Coi dos Santos¹; Mariane Igansi Alves¹; Andrea Bittencourt Moura¹; Maria do Carmo Ruaro Peralba²; Patrícia Diaz de Oliveira¹; Luciano da Silva Pinto¹; Odir Antonio Dellagostin¹; Angelita da Silveira Moreira¹; Claire Tondo Vendruscolo¹

¹Universidade Federal de Pelotas – UFPel – Pelotas – Brasil clairevendruscolo@gmail.com,
angelitadasilveiramoreira@gmail.com, amanda.bio2005@gmail.com

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS – Porto Alegre – Brasil

Resumo

*Poli(3hidroxibutirato) ou P(3HB) é um bioplástico biodegradável e biocompatível da família dos polihidroxicanoatos com propriedades térmicas e mecânicas semelhantes ao polipropileno. Isso os torna possíveis substitutos dos plásticos convencionais e lhes confere ampla possibilidade de aplicação em itens de descarte rápido, como embalagens, e em produtos para saúde. P(3HB) e outros polihidroxicanoatos são sintetizados por bioprocessos onde bactérias convertem a fonte de carbono em corpos lipofílicos armazenado intracelularmente como reserva de energia. Fatores como velocidade de crescimento do microrganismo e conversão de substrato, capacidade de cultivo em alta densidade e em substratos econômicos são fundamentais para a viabilidade econômica da produção de polihidroxicanoatos. Objetivou-se selecionar, dentre cinco linhagens isoladas na Região Sul do Rio Grande do Sul, as possivelmente acumuladoras de P(3HB) em maiores concentrações, para produção em frascos agitados. Realizou-se a seleção do meio de manutenção celular, triagem microscópica do acúmulo de corpos lipofílicos por coloração com sudan black, quantificação de acúmulo de P(3HB) por cromatografia gasosa e identificação molecular das linhagens selecionadas. O meio de cultivo Nutritive Yeast Agar foi selecionado para repiques conservativos e multiplicativos. As cinco linhagens em estudo foram classificadas como potencialmente acumuladoras na triagem microscópica. A análise cromatográfica comprovou acúmulo, de 2,6 a 19,8 %, por apenas três cepas. As duas cepas com maior acúmulo foram selecionadas para identificação molecular e tiveram 100 e 99 % de identidade da região 16S com *Bacillus megaterium* e *Ralstonia solanacearum*, respectivamente.*

Palavras-chave: polihidroxicanoatos; plástico biodegradável; identificação 16S.

1. Introdução

Por apresentarem grande versatilidade e durabilidade aliadas ao baixo custo, os plásticos convencionais, obtidos principalmente a partir do petróleo, são amplamente utilizados na indústria de embalagens e outros descartáveis. Considerados extremamente resistentes, os plásticos

petroquímicos necessitam de mais de cem anos para serem degradados, contribuindo de maneira significativa para a poluição ambiental (FRANCHETTI e MARCONATO, 2006). Analisando dados do *Population Reference Bureau* (2014) sobre índices de expansão demográfica do planeta, vê-se que passou, no último século, de 1,5 bi para mais de 6,8 bi. Considerando que a produção e consumo dos plásticos convencionais alcançaram 288 mi de toneladas em 2012 (PLASTICS EUROPE, 2012), essas propriedades consideradas desejáveis dos plásticos convencionais tornam-se preocupantes e o acúmulo desses no meio ambiente gera um grave problema mundial devido à elevada resistência à degradação (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005). Visando minimizar o desequilíbrio ambiental, pesquisas têm sido desenvolvidas com objetivo de encontrar polímeros substitutos para os plásticos convencionais não biodegradáveis, porém, biodegradáveis e produzidos a partir de fontes de carbono renováveis (CHANPRATEEP, 2010; CROCHEMORE et al., 2012; LU et al., 2009; PIEMOLINI, 2004).

O emprego de microrganismos em técnicas de fermentações é considerado uma ferramenta básica para obtenção de bioplásticos da grande família dos polihidroxialcanoatos (PHAs) (CHANPRATEEP, 2010). PHAs servem como materiais de reserva de energia e carbono para os microrganismos (LEE, 1996; STEINBUCHER e FUCHTENBUSCH, 1998). São acumulados no citoplasma bacteriano na forma de inclusões de poliésteres insolúveis, podendo corresponder a até 90 % da massa celular (KUNASUNDARI e SUDESH, 2011). A síntese de PHAs ocorre, geralmente, quando há condições desfavoráveis de crescimento e excesso de carbono (ANDERSON e DAWES, 1990; LEE, 1996), embora alguns microrganismos tenham a síntese de poliésteres associada ao crescimento, sem a necessidade de limitação de nutrientes (LEE, 1996). A condição desfavorável ao crescimento caracteriza-se pela exaustão de nutrientes como nitrogênio, fósforo, enxofre e oxigênio (LEE, 1996; LU et al., 2009).

Os primeiros PHAs foram descobertos há quase 90 anos. Lemoigne, em 1925, em um estudo com *Bacillus megaterium*, realizou as primeiras determinações de PHAs, porém, suas características de termoplasticidade não foram descobertas. Em 1958, Macre e Wilkinson, também utilizando *B. megaterium*, estudaram condições operacionais para obtenção de poli-3-hidroxi-butarato [P(3HB)] e concluíram que este é uma fonte de reserva de carbono e energia do microrganismo. Ainda, a taxa de formação de produto é proporcional ao aumento da biomassa; quando o aumento cessa, a formação de produto também cessa (LU et al., 2009).

São conhecidos mais de 300 microrganismos capazes de sintetizar PHAs, mas são poucas as bactérias efetivamente empregadas na sua produção, incluindo *Alcaligenes* spp., *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas* spp. e recombinantes (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005; LU et al., 2009). Um fator indispensável para diminuir os custos de produção dos biopolímeros é a alta produtividade, e, para tanto, é interessante que os microrganismos empregados na produção de

PHAs sejam eficientes em cultivos com alta densidade celular e acumulem alta concentração de polímero em um período relativamente curto de tempo, fatores que tornam a seleção e identificação de novas linhagens bacterianas continuamente necessárias para que a produção de PHAs seja mais rentável e econômica. (LU et al., 2009).

Os PHAs são poliésteres estruturalmente simples, constituídos por monômeros de cadeias curtas, médias ou longas (RAMSAY, 1994). Inúmeros monômeros podem constituir os PHAs, conferindo aos mesmos características físicas e mecânicas diversas (IZUMI e TEMPERINI, 2010). Os PHAs mais estudados e produzidos são o homopolímero poli-3-hidroxitirato P(3HB) e o seu copolímero poli-3-hidroxitirato-co-3-hidroxi valerato P(3HB-co-3HV) (CHANPRATEEP, 2010). A principal característica desses bioplásticos é sua degradação rápida e completa, no ambiente, pela ação enzimática de microrganismos, sob condições apropriadas; além de serem termoplásticos e biocompatíveis (CHANPRATEEP, 2010; FRANCHETTI e MARCONATO, 2006). O P(3HB) e seus copolímeros são os biopolímeros bacterianos mais utilizados na produção de plásticos biodegradáveis (CHANPRATEEP, 2010; IZUMI e TEMPERINI, 2010). Tais polímeros são aplicados na produção de embalagens para alimentos e frascos para o transporte de líquidos, gases e vapores (KULKARNI et al., 2011; MODI et al., 2011). A utilização do P(3HB) como bioplástico para embalagens de alimentos, segundo Bucci et al. (2007), tem grande potencial devido a eficiência de proteção como barreira à incidência de luz e pela posterior facilidade de degradação quando devidamente descartado. Devido a sua biocompatibilidade, PHAs são utilizados também na área médica, para a administração de fármacos através de cápsulas de liberação lenta do princípio ativo e para a fabricação de próteses e outros componentes médicos (HAYATI et al., 2012; RAI et al., 2011).

Entre a descoberta do P(3HB), em 1925, e sua produção industrial foram necessários investimentos para o avanço tecnológico na área de engenharia de biorreatores e otimização de bioprocessos (CHANPRATEEP, 2010; LU et al., 2009). Para uma produção economicamente viável, além de a bactéria ser capaz de produzir e armazenar o biopolímero, é fundamental que se encontrem condições operacionais satisfatórias para que se possa produzir, recuperar e purificar PHAs com características para aplicação como bioplásticos (CHANPRATEEP, 2010; LU et al., 2009). Mundialmente, poucas são as indústrias que se lançaram nessa produção porque o custo ainda é muito superior ao dos plásticos petroquímicos. A empresa W. R. Grace Co foi a primeira a produzir comercialmente o P(3HB), em 1960, porém, devido ao alto custo gerado pela ineficácia dos processos, a empresa não obteve sucesso. Em 1976 a empresa inglesa *Imperial Chemical Industries* (ICI) deu início às pesquisas de produção e aplicação de PHAs e na década de 80 iniciou a comercialização do Biopol®. No entanto, somente em 1990 foi lançada na Alemanha a embalagem produzida exclusivamente com plástico biodegradável. Em 1996 a Monsanto adquiriu a

patente do processo de produção do Biopol®, que pertence, desde 2001, à empresa norte-americana Metabolix. No Brasil a P(3HB) Industrial detêm a produção do Biocycle®, num sistema de consórcio com uma indústria açucareira, o que caracteriza um sistema de manufatura ecologicamente viável (LU et al., 2009; PIEMOLINI, 2004). Entretanto, o bioplástico ainda não é economicamente viável para substituir os plásticos derivados do petróleo. O que demonstra a necessidade de pesquisas para tornar os processos de produção, extração e purificação de PHAs mais eficientes e econômicos (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005; LU et al., 2009; REDDY et al., 2003; TIAN et al., 2009).

Portanto, objetivou-se selecionar, dentre cinco linhagens isoladas na Região Sul do Rio Grande do Sul, as que sejam possivelmente acumuladoras de P(3HB), em maiores concentrações, para produção em frascos agitados.

2. Materiais e Métodos

Microrganismos e meios de cultura

As linhagens bacterianas empregadas neste estudo foram *Beijerinckia* B52 e *Bacillus* CN3, isoladas em solo de cultivo de arroz e de mata nativa, respectivamente (MACHADO, 2002), esta última identificada anteriormente por testes bioquímicos como *Beijerinckia* (BRITES, 2002), e; *Pseudomonas* C31, isolada a partir de contaminação de origem ambiental presente em cultivo de *Bacillus* CN3, que fazem parte da coleção do Laboratório de Biopolímeros do CDTEC/UFPel desde 1997. *Pseudomonas* PsB e *Ralstonia* RS, isoladas de cactus na Região de Pelotas, em 1999 (PEREIRA et al., 2001), identificadas e cedidas pelo Laboratório de Bacteriologia da FAEM/UFPel. Os meios empregados foram *Nutritive Yeast Agar* (NYA) (SCHAAD et al., 2001), *Nutritive Yeast Agar + Sacarose* (NYA+SAC) (SCHAAD et al., 2001, modificado), *Yeast Dextrose Carbonate* (YDC) (WILSON et al., 1967) e *Yeast Malt* (YM) (JEANES et al., 1974). Os microrganismos foram mantidos por repiques mensais em placas contendo NYA, mantidas sob refrigeração (5 ± 3 °C), e por liofilização com armazenamento das ampolas sob congelamento (-8 °C).

As linhagens bacterianas usadas neste estudo pertencem a diferentes gêneros. Portanto, foi necessário identificar um meio de cultura que possibilitasse crescimento e isolamento de colônias a partir de repiques conservativo e multiplicativo. Foram realizados cultivos em placas contendo os meios sólidos (Tabela 1) e as estrias foram analisadas em 24, 48 e 72 h, através da análise visual dos repiques, quanto à intensidade do crescimento e o isolamento de colônias. O experimento foi realizado em triplicata.

Tabela 1 – Composição dos meios de cultura testados para conservação e multiplicação celular.

Reagentes (g.L ⁻¹)	Meios de cultura			
	<i>Nutritive Yeast</i> Ágar (NYA) pH 6,5	<i>Nutritive Yeast</i> Ágar +Sacarose (NYA+SAC) pH 6,5	<i>Yeast Malt</i> (YM) pH 6,5	<i>Yeast Dextrose</i> Carbonate (YDC) pH 7,3
Carbonato de cálcio (Synth®)	-	-	-	20,0
Extrato de carne (Himedia®)	3,0	3,0	-	-
Extrato de levedura (Vetec®)	1,0	1,0	3,0	10,0
Extrato de malte (Kasvi®)	-	-	3,0	-
Peptona (Acumedia®)	5,0	5,0	5,0	-
Glicose (Synth®)	5,0	5,0	10,0	20,0
Sacarose (Synth®)	-	50,0	-	-
Ágar (Kasvi®)	15,0	15,0	15,0	15,0

Triagem com coloração de sudan black

Esfregaços das bactérias B52, C31, CN3, PsB e RS, cultivadas em meio NYA por 48 h a 28 °C, foram corados com *sudan black*, segundo metodologia descrita por Lelliot e Stead (1987), adaptada por Oliveira (2010) e modificada neste estudo. Os esfregaços foram cobertos com *sudan black* (Sigma-Aldrich®) 0,3 % m/v diluído em solução hidroalcoólica (água:etanol 30:70 v/v por 10 min), lavados com xilol (Vetec®), secos em papel, cobertos por safranina (Vetec®) 0,5 % por 15 s (solução aquosa), lavados com água e secos. A observação foi em microscópio óptico, com lente de imersão (aumento de 1000 vezes) e as imagens capturadas através de fotografias para posterior análise da presença de grânulos em monitor com tela de 46".

Seleção de bactérias produtoras de P(3HB) por Cromatografia Gasosa

Obteve-se amostras de massa celular seca (MCS) das bactérias B52, C31, CN3, PsB e RS a partir de cultivos em frascos *Erlenmeyers* de 250 mL, contendo 100 mL de YM, pH 6,5, durante 24 h, a 28 °C e 150 rpm em incubador agitador orbital, centrifugadas a 10.000 ×g por 25 min, lavadas com solução salina 0,89 % (m/v), novamente centrifugadas a 10.000 ×g por 15 min e secas em estufa a 56 °C até peso constante. As amostras foram metanolizadas segundo metodologia de Braunegg et al. (1978), modificada por Brandl et al. (1988), em tubos de ensaio com vedação. Em aproximadamente 30 mg de MCS adicionou-se 2 mL de metanol acidificado (H₂SO₄ 15 %) (Synth®), contendo ácido benzóico 0,4 g.L⁻¹ (padrão interno) (Vetec®), e 2 mL de clorofórmio

(Sigma-Aldrich®). Os tubos foram agitados e mantidos a 100 °C durante 60 min, agitados novamente e mantidos por mais 80 min no aquecimento. Após, foram transferidos para banho de gelo, adicionados de 1 mL de água destilada, agitados e mantidos por 24 h sem movimentação para decantação dos restos celulares e separação das fases; a fase orgânica foi transferida com pipetas *Pasteur* para *vials* e as amostras armazenadas sob refrigeração até análise.

Analizou-se a fase orgânica em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 17A, equipado com coluna DB Waxetr (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e detector de ionização de chama (FID). O gás de arraste foi o hidrogênio (1 mL.min⁻¹). Temperatura inicial de 80 °C foi mantida durante 1 min e, após, elevada a 11 °C.min⁻¹ até 200 °C e mantida durante 4 min. Injetou-se manualmente 1 µL de amostra. A temperatura do injetor foi de 260 °C e a do detector foi de 280 °C. A análise quantitativa foi realizada pelo método de padronização interna pelo ácido benzóico e a curva de calibração foi preparada a partir de P(3HB) (Sigma-Aldrich®) e do padrão interno ácido benzóico.

Análise estatística dos resultados de acúmulo de P(3HB)

Os dados, obtidos em triplicata, foram analisados por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância.

Identificação molecular das linhagens com maior acúmulo de P(3HB)

As bactérias CN3 e RS foram cultivadas em frascos *Erlenmeyers* de 250 mL, contendo 100 mL de cultivo em YM líquido, pH 6,5, por 24 h, a 28 °C e 150 rpm em incubador agitador orbital. Amostras de 1,5 mL foram coletadas em microtubos *Eppendorfs* e centrifugadas a 16000 ×g em centrífuga *Mini Spin Plus* (*Eppendorf*®) por 30 s e os *pellets* utilizados para extração de DNA. A extração do DNA foi realizada com Kit comercial de extração de DNA genômico *Illustra™ Bacteria Genomic Prep. Mini Spin Kit* (GE HEALTHCARE®), conforme as instruções do fabricante.

As reações para amplificação dos segmentos de DNA que codificam para o rRNA 16s foram realizadas com *primers* para *Leptospira*, denominados fD1 (*forward*) e rD1 (*reverse*) e descritos por Weisburg et al., (1991) (Tabela 2).

Tabela 2 – *Primers* utilizados para amplificação da região rDNA 16S.

Primer	Sequência
fD1	5' – ccgaattcgtcgacaaCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3'
rD1	5' – cccgggatccaagcttAAGGAGGTGATCCAGCC – 3'

Fonte: Weisburg et al., 1991.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Bio-Rad T100TM utilizando 1 µL de DNA molde, 0,5 µL de DNTP's (Invitrogen®), 0,5 µL de cada *primer*, 2,5 µL de tampão DSX, 0,75 µL de Cloreto de Magnésio (Synth®), 0,5 µL de TaqDNA Polimerase (Invitrogen®) e 18,75 µL de água. As condições normalizadas para a PCR foram 94 °C durante 5 min para desnaturação inicial, seguidos de 32 ciclos a 94 °C durante 1 min, 56 °C por 30 s para o anelamento dos *primers*, 72 °C durante 1 min e 30 s, e uma extensão final a 72 °C durante 10 min. Alíquotas de 5 µL de amostra foram coradas com 1 µL *Blue Green* (Invitrogen®) e analisadas por eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TBE 1× (Tris base, ácido bórico, EDTA, pH 8,0) (Invitrogen®). A eletroforese foi conduzida por 45 min a 90 volts.

As amostras foram sequenciadas em triplicata pela empresa ACTGene Análises Moleculares LDTA utilizando o equipamento ASI-PRISM 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

O alinhamento, a análise das sequências e a obtenção da sequência *Clustal* consenso foram feitas no programa BioEdit versão 5.09 (HALL, 1999). As sequências *Clustal* consenso foram comparadas com sequências depositadas no *GenBank* do NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) através da ferramenta BLAST, de modo a caracterizar a sua autenticidade e obter a identidade das bactérias em estudo.

3. Resultados e Discussão

Os resultados da análise visual dos repiques quanto à intensidade do crescimento e o isolamento de colônias podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 – Avaliação do crescimento nos meios sólidos NYA, NYA+SAC, YM e YDC.

Linhagem	Meios e tempo de cultivo											
	NYA			NYA+SAC			YM			YDC		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
B52	±	+	+	±	+	+	-	±	+	-	±	+
C31	-	+	+	-	+	+	-	±	+	-	±	+
CN3	±	+	+	-	±	+	-	-	+	-	-	±
PsB	-	±	+	-	±	+	-	±	+	-	±	±
RS	-	+	+	-	±	±	-	-	-	-	-	±

+ = estrias largas e colônias isoladas;

± = estrias estreitas e colônias isoladas pequenas;

- = estrias estreitas e ausência de colônias isoladas

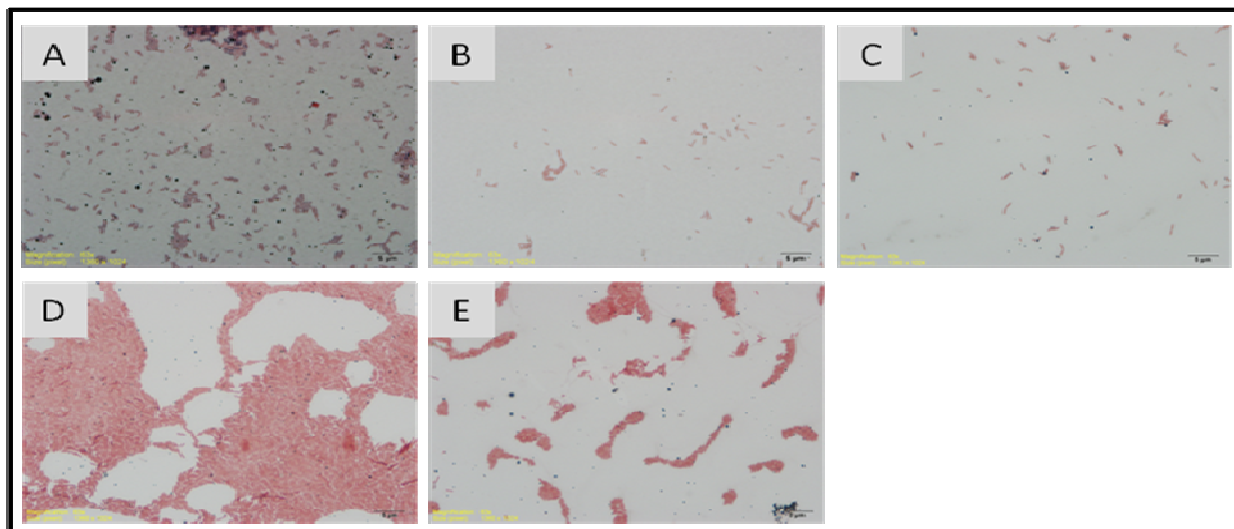
Para as linhagens *Beijerinckia* B52 e *Pseudomonas* C31 foi observado crescimento com estrias largas e colônias isoladas em todos os meios de cultivo no tempo de 72 h, sendo que para os meios NYA e NYA+SAC a condição de crescimento relatada foi observada também com 48 h de cultivo. Para as linhagens *Bacillus* CN3 e *Pseudomonas* PsB estrias largas e colônias isoladas foram observadas nos cultivos de 72 h nos meios NYA, NYA+SAC e YM, sendo que para a CN3 no meio

NYA houve crescimento de estrias largas e colônias isoladas já em 48 h. *Ralstonia* RS teve crescimento de estrias largas e colônias isoladas apenas no meio NYA em 48 e 72 h de cultivo. O isolamento de colônias se deu mais facilmente nos meio NYA, que contém glicose como fonte principal de carbono, menores concentrações de açúcar e de extrato de levedura, e extrato de carne ao invés de extrato de malte. Ainda, o meio rico em cálcio, YDC, foi o menos propício ao crescimento e isolamento das linhagens nas condições estudadas. Com exceção das linhagens *Beijerinckia* B52, nos meios NYA e NYA+SAC, e *Bacillus* CN3, no meio NYA, nãoobservou-se colônias isoladas visíveis em 24 h de cultivo e as estrias, quando observáveis, eram estreitas. Assim, selecionou-se o meio *Nutritive Yeast Ágar* (NYA) para os repiques conservativos e multiplicativos das linhagens do acervo, por proporcionar crescimento com estrias largas e presença de colônias isoladas em todas as linhagens estudadas e ser mais viável economicamente que os demais meios testados.

Para a utilização dos microrganismos no desenvolvimento de processos e produtos comerciais, além de serem avaliados quanto à presença de atributos desejáveis, como capacidade de síntese e acúmulo de PHAs, a identificação das linhagens é importante para uso dos meios de cultivo e condições de processos específicos para cada linhagem (BULL et al., 2000). Ademais, a formação e manutenção de coleções bacterianas para preservação adequada de tais linhagens é primordial de modo que a pesquisa de novas linhagens potencialmente produtoras de PHAs e o desenvolvimento de biotécnicas para a produção de tais bioplásticos sejam garantidos.

A triagem das linhagens bacterianas potencialmente produtoras de PHAs, realizada através da técnica de coloração com *sudan black*, visou a observação de grânulos negro azulados nas células das bactérias B52, C31, CN3, PsB e RS. A coloração negro azulada é gerada pela difusão simples do corante *sudan black*, que cora os corpos lipofílicos como os grânulos de P(3HB), presentes nas células dos esfregaços, possibilitando, assim, a visualização em microscópio óptico, em lente de imersão, o que possibilita inferir que as bactérias analisadas têm capacidade de acúmulo de corpos lipofílicos (ANDERSON e DAWES, 1990; LELLIOT e STEAD, 1987). Pelas observações realizadas (Figura 1), pode-se inferir que todas as bactérias analisadas são acumuladoras de grânulos lipofílicos, possuindo pontos negros azulados com distribuição, dimensão e intensidade significativamente diferentes. Nos esfregaços das bactérias CN3 e RS foram observados os pontos mais intensos e de maior dimensão; nos demais esfregaços, PsB, C31 e B52, foi possível observar os grânulos apenas quando as imagens foram analisadas em monitor de 42".

Figura 1 – Esfregaços corados com *sudan black* A – CN3, B – PsB, C – RS, D – C31 e E – B52.



Através da coloração e da microscopia óptica é possível realizar a análise de grandes áreas e números de amostras em curto espaço de tempo, além de ser de fácil manipulação e pouco dispendiosa (RAVEN, 1996). No entanto, a coloração com *sudan black* não permite a diferenciação dos grânulos de PHA quanto aos tipos de monômeros, por meio de simples observação, sendo, portanto, uma metodologia a ser empregada em fases de triagem. Para que seja realizada a identificação monomérica e a quantificação dos PHAs acumulados pelas diferentes linhagens faz-se necessário o emprego de técnicas como Cromatografia Gasosa (CG), Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas (CG-Massas), Espectrometria de Infravermelho (IR), entre outras. A técnica de CG é largamente empregada com o propósito de análise quantitativa e identificação da composição monomérica dos biopolímeros a partir de amostras de massa celular seca de cultivos (LAGEVEEN et al., 1988; SUDESH et al., 2000).

Após terem sido observados grânulos negro azulados em todas as amostras na triagem das linhagens bacterianas potencialmente produtoras, a confirmação do acúmulo de P(3HB), nas condições testadas, foi feita através da técnica de identificação e quantificação química por cromatografia gasosa. O conteúdo de P(3HB) encontrado nas amostras de MCS de B52, C31, CN3, PsB e RS pode ser analisado na Tabela 4.

Tabela 4 – Conteúdo de P(3HB) (%) em amostras de MCS de cultivos de 24 h em frascos agitados das linhagens B52, C31, CN3, PsB e RS.

Amostra	P(3HB) %
B52	2,6±0,12 ^c
C31	0±0 ^d
CN3	19,8±0,08 ^a
PsB	0±0 ^d
RS	12,5±0,09 ^b

Letras sobrescritas iguais na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

Através da identificação por cromatografia gasosa foi possível confirmar as linhagens B52, CN3 e RS como acumuladoras de P(3HB), com conteúdos que diferiram estatisticamente. Ainda, os valores de 19 e 12,5 % são resultados elevados para a fase de multiplicação celular (inóculo); assim, selecionou-se CN3 e RS para a posterior identificação molecular.

A determinação do acúmulo de P(3HB) ainda na fase de crescimento de inóculo não é uma análise comumente realizada, em função de o acúmulo ocorrer, normalmente, na fase de crescimento, quando se usam condições específicas para o acúmulo. Entretanto, Crochemore (2014) observou que *Pseudomonas* sp. CMM43, quando cultivada em meio YM por 24 h, na fase de crescimento do inóculo, acumulou 35,5 % do peso de MCS em grânulos lipofílicos [P(3HB)], valor este considerado expressivo para a fase em questão.

A identificação e a análise filogenética de bactérias realizada através da ferramenta molecular de análise de genes rRNA é uma técnica confiável, rápida e bastante difundida. O compartilhamento e a conservação das sequências de síntese proteica fazem com que seja possível o alinhamento e a comparação de sequências que, quando confrontadas com bancos de dados, leva à identificação de gênero e/ou espécies das linhagens em estudo (FLORESTA, 2003). A partir da análise das sequências *Clustal* consenso (Tabela 5), foi possível identificar a bactéria CN3 como *Bacillus megaterium*, com 100 % de identidade, não sendo, portanto, a CN3 uma linhagem de *Beijerinckia* como sugeriram os testes bioquímicos realizados nos estudos de Machado (2002) e Brites (2002). Já a linhagem RS foi identificada como *Ralstonia solanacearum*, com 99 % de identidade. Floresta (2003) e Neves (1998) comprovaram em seus estudos que a caracterização molecular é o método mais confiável para identificação de espécies e análise filogenética dos organismos, quando comparado às provas bioquímicas.

Bacillus megaterium é capaz de acumular P(3HB) quando cultivado em diferentes fontes de carbono, como frutose, glicose, maltose e sacarose, e a síntese do poliéster para esta espécie é associada ao crescimento (OMAR et al., 2001). Além de ser empregado em pesquisas de seleção de linhagens e otimização de condições operacionais para bioprocessos de síntese do biopolímero *Bacillus megaterium* é utilizado também como controle positivo para detecção de acúmulo grânulos quando outros microrganismos estão em estudo (ASLIM et al., 2002; CROCHEMORE et al., 2012; FULL et al., 2006; GOUDA et al., 2001; OMAR et al., 2001).

Para a espécie *Ralstonia solanacearum* não há na literatura registros acerca de estudos sobre acúmulo e produção de P(3HB) ou outros PHAs. No entanto, quando realizada pesquisa sobre a potencialidade do gênero *Ralstonia* em acumular poliésteres da família PHAs, esse gênero consta como um dos que apresentam as condições mais favoráveis para a produção industrial de bioplástico por possibilitar cultivos com elevada velocidade de produção, em diferentes tipos de

substratos e com rendimentos que podem alcançar aproximadamente 80 % da massa celular seca em biopolímero de elevada massa molar (BYROM, 1987; RAMSAY et al., 1990).

Tabela 5 – Sequências *Clustal* consenso das linhagens CN3 e RS utilizadas para confronto com as depositadas no *GenBank*.

Amostra	Sequência	Microrganismo mais similar (NCBI) e Identidade (%)
CN3	5' – GGGAAAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG - 3'	<i>Bacillus megaterium</i> KJ700302.1 100
RS	5' - TAAGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAGTCGAACGGCAGCGGGGTAGCTTGCTACCTGCCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTAGTGGGGGATAACTAGTCGAAAGACTAGCTAATACCGCATACGACCTGAGGGTGAAAGTGGGGGACCGCAAGGCCTCATGCTATAGGAGCGCCGATGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGAAAGAAATCGCTTCGGTTAATACCTGGAGTGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGGACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTCCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTGTGCAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAATTGCATTGGTGACTGCACAGCTAGAGTGTGTCAGAGGGAGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAG - 3'	<i>Ralstonia solanacearum</i> FP885897.1 99

4. Conclusão

A triagem por coloração com *sudan black* é uma técnica indicativa de acúmulo de corpos lipofílicos, no entanto, a realização da técnica para quantificação e identificação, como a CG, é fundamental para a seleção das linhagens. Duas linhagens bacterianas isoladas na Região Sul do Rio Grande do Sul foram consideradas potencialmente acumuladoras de P(3HB) em concentrações elevadas, haja vista a capacidade de acúmulo observada em meio de cultivo propício à multiplicação celular e curto tempo de cultivo. A identificação molecular dessas linhagens, pela região 16S, foi eficiente e as identidades obtidas, de 100 e 99 %, para as linhagens CN3 e RS foram, respectivamente, para *Bacillus megaterium* e *Ralstonia solanacearum*. Tais resultados são promissores e condizentes com a porcentagem de acúmulo verificada por CG e com as potencialidades relatadas na literatura para tais gêneros quanto à síntese de PHAs.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Instituto de Química.

Abstract

*Poly(3hydroxybutyrate) or P(3HB) is a biodegradable and biocompatible bioplastic of the polyhydroxyalkanoates family with similar thermal and mechanical properties to the polypropylene. Thus, PHAs are possible replacements for conventional plastics and have large possibility of being used in rapid disposal items such as packaging and health care products. P(3HB) and other polyhydroxyalkanoates are synthesized by bioprocesses where bacteria convert the carbon source in lipophilic bodies stored intracellularly as energy reserve. Factors such as the microorganism growth rate, substrate conversion, growing capacity at high density culture and economic substrates are key to the economic viability of polyhydroxyalkanoates production. The aim was to select from among five strains isolated in southern Rio Grande do Sul those that are possibly accumulating poly-3hydroxybutyrate, in higher concentrations, for production in shake flasks. Was performed the selection of bacterial maintenance culture medium, microscopic screening of the accumulation of lipophilic bodies by sudan black staining, quantification of P(3HB) accumulation by gas chromatography and molecular identification of selected strains. The culture medium Nutritive Agar Yeast was selected for the preservation and propagation of bacteria. The five strains studied were classified as potentially accumulating by microscopic screening. Chromatographic analysis confirmed accumulation, from 2.6 to 19.8% for just three strains. The two strains with the highest accumulation were selected for molecular identification and they were 100 and 99% identity with the 16S region with *Bacillus megaterium* and *Ralstonia solanacearum*, respectively.*

Key-words: polyhydroxyalkanoates; biodegradable plastic; 16S identification.

Referências

- ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiology Reviews**, v. 54, n. 4, p. 450-472, 1990.
- ASLIM, B., YÜKSEKDAG, N. Z., BEYATLI, Y. Determination of PHB growth quantities of certain *Bacillus* species isolated from soil. **Turkish Electronic Journal of Biotechnology**, p. 24-30, 2002.
- BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER R. C. *Pseudomonas oleovorans* as a Source of Poly(β -Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1977-1982, 1988.
- BRAUNEGG, G.; SONNLEITNER, B.; LAFFERTY, R. M. A rapid gas chromatographic method for determination of Poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 29-37, 1978.
- BRITES, P. C. **Caracterização molecular de bactérias produtoras de biopolímero extracelular**. Pelotas, 2002. 39 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal de Pelotas.
- BUCCI, D. Z., TAVARES, L. B. B., SELL, I. Biodegradation and physical evaluation of PHB packaging. **Polymer Testing**, v. 26, n. 7, p. 908-915, 2007.
- BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and Discovery Strategies for Biotechnology: the Paradigm Shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 573-606, 2000.
- BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. **Tibtech**, v. 5, p. 246-250, 1987.
- CHANPRATEEP, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 621-632, 2010.
- CROCHEMORE, A. G. **Poli(3-hidroxibutirato) com propriedades térmicas diferenciadas produzido por *Pseudomonas* sp. CMM43 degradadora de agrotóxico**. Pelotas, 2014. 104f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - Universidade Federal de Pelotas.
- CROCHEMORE, A. G.; MATTOS, M. L. T.; VENDRUSCOLO, C. T.; CASTRO, L. A. S.; MOREIRA, A. S. Identification of pesticide-degrading *Pseudomonas* strains as poly- β -hydroxybutyrate producers. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 85, p. 15144-15149, 2012.
- FLORESTA, F. A. **Análise da Região codificadora de rRNA de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20: Filogenia e Presença de Sequências de Inserção Putativa**. Viçosa, 2003. 54f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola - Universidade Federal de Viçosa.
- FULL, T. D.; JUNG, D. O.; MADIGAN, M. T. Production of poly- β -hydroxyalkanoates from soy molasses oligosaccharides by new, rapidly growing *Bacillus* species. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 377-384, 2006.
- FRANCHETTI, S. M.; MARCONATO, J. C. Biodegradable polymers - A partial way for decreasing the amount of plastic waste. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006.
- GOUDA, M. K.; SWELLAM, E. A.; OMAR, H. S. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. **Microbiological Research**, v. 156, n. 3, p. 201-207, 2001.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95-98, 1999.
- HAYATI, A. N., HOSSEINALIPOUR, S. M., REZAIIE, H. R.; SHOKRGOZAR, M. A. Characterization of poly(3-hydroxybutyrate)/nano-hydroxyapatite composite scaffolds fabricated without the use of organic solvents for bone tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering**, v. 32, n. 3, p. 416-422, 2012.

- IZUMI, C. M. S.; TEMPERINI, M. L. A. FT-Raman investigation of biodegradable polymers: Poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). **Vibrational Spectroscopy**, v. 54, n. 2, p. 127-132, 2010.
- JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides – New hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, v. 28, p. 34-40, 1974.
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 607-619, 2005.
- KULKARNI, S. O.; KANEKAR, P. P.; JOG, J.; PATIL, P. A.; NILEGAONKAR, S. S.; SARNAIK, S. S.; KSHIRSAGAR, P. R. Characterization of copolymer, poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (P(3HB)-co-PHV) produced by *Halomonas campisalis* (MCM B-1027), its biodegradability and potential application. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 11, p. 6625-6628, 2011.
- KUNASUNDARI, B.; SUDESH, K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. **Express Polymer Letters**, v. 5, n. 7, p. 620-634, 2011.
- LAGEVEEN, R. G.; HUISMAN, G. W.; PREUSTING, H.; KETELAAR, P.; EGGINK, G.; WITHOLT, B. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly(R)-3-hydroxyalkanoates and poly(R)-3-hydroxyalkenoates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 12, p. 2924-2932, 1988.
- LEE, S. Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, n. 1, p. 1-14, 1996.
- LELLIOT, R. A.; STEAD, D. E. **Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants**. Palo Alto: Blackwell Scientific Publications, 1987.
- LU, J. N.; TAPPEL, R. C.; NOMURA, C. T. Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates). **Polymer Reviews**, v. 49, n. 3, p. 226-248, 2009.
- MACHADO, M. I. C. S. **Caracterização de bactérias isoladas do solo quanto à produção de biopolímeros e degradação de clomazone**. Pelotas, 2002. 84 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - Universidade Federal de Pelotas.
- MODI, S.; KOELLING, K.; VODOVOTZ, Y. Assessment of PHB with varying hydroxyvalerate content for potential packaging applications. **European Polymer Journal**, v. 47, n. 2, p. 179-186, 2011.
- NEVES, J. T. M. **Caracterização da região codificadora de RNA ribossomal 16S de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20**. Viçosa, 1998. 46f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola - Universidade Federal de Viçosa.
- OLIVEIRA, C. **Produção de polihidroxibutirato: bioprospecção de *Beijerinckia* sp. da coleção de bactérias do Laboratório de Biopolímeros do CDTec - UFPel**. Pelotas, 2010. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - Universidade Federal de Pelotas.
- OMAR, S.; RAYES, A.; EQAAB, A.; VOB, I.; STEINBÜCHEL, A. Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 14, p. 1119-1123, 2001.
- PEREIRA, D. D.; MOURA, A. B.; SILVA, E. G.; KUNZLER, D. P. Cacto (*Cereus peruvianus* monstrosus), um novo hospedeiro para *Ralstonia solanacearum*. **Revista Ciência Rural**, v. 6, n. 1, p. 22-26, 2001.
- PIEMOLINI, L. T. **Modelagem estrutural da PHA sintase de *Chromobacterium violaceum* para estudos de mutação sítio-dirigida**. Florianópolis, 2004. 79f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina.
- PLASTICS EUROPE. **Plastics Europe Information/2012**. Disponível em: <<http://www.plasticseurope.org/information-centre/press-releases/press-releases-2012>>. Acesso em: 6 Maio 2014.
- POPULATION REFERENCE BUREAU. **Guide de démographie du Population Reference Bureau**. Disponível em: <http://www.prb.org/pdf/PopHandbook_Fr.pdf>. Acesso em: 8 Maio 2014.

- RAI, R.; KESHAVARZ, T.; ROETHER, J. A.; BOCCACCINI, A. R.; ROY, I. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. **Materials Science & Engineering R-Reports**, v. 72, n. 3, p. 29-47, 2011.
- RAVEN, P. H. **Biology of plants**. New York: Worth Publisher, 1996.
- RAMSAY, B. A. Physiological factor affecting PHA production in Physiology, kinetics, production and use of biopolymers (Proceedings). **Proceedings**, p. 9-17, Austria, 1994.
- RAMSAY, B. A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; DUBE, B.; BATAILLE, P.; RAMSAY, J. A. Production of Poly-(Beta-Hydroxybutyric-Co-Beta-Hydroxyvaleric) Acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 7, p. 2093-2098, 1990.
- REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; RASHMI; KALIA, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 137-146, 2003.
- SCHAAD, N. W., JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. St. Paul: APS Press, 2001.
- STEINBUCHER, A.; FUCHTENBUSCH, B. Bacterial and other biological systems for polyester production. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 10, p. 419-427, 1998.
- SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Progress in Polymer Science**, v. 25, n. 10, p. 1503-1555, 2000.
- TIAN, P. Y.; SHANG, L. A.; REN, H.; MI, Y.; FAN, D. D.; JIANG, M. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: Current research and development. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 5, p. 709-714, 2009.
- WEISBURG, W. G., BARNS, S. M., PELLETIER, D. A., LANE, D. J.. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. **Journal of Bacteriology**, v. 173. n. 2, p. 697-703, 1991.
- WILSON, E. E.; ZEITON, F. N.; FREDRICKSON, D. L. Bacterial phloem canker, a new disease of persian walnut trees. **Phytopathology**, v. 57, p.618-621, 1967.
-