

Bioprospecção de bactérias produtoras de polihidroxicanoatos a partir de óleo de andiroba

Bioprospecting of bacteria producing polyhydroxyalkanoates from andiroba oil

DOI:10.34117/bjdv7n11-060

Recebimento dos originais: 12/10/2021

Aceitação para publicação: 05/11/2021

Sabrina Sondre de oliveira reis

Doutoranda em Biodiversidade e Biotecnologia (Rede Bionorte)

Universidade Federal do Acre

Endereço: Rodovia BR 364, Km 04 - Distrito Industrial, Rio Branco - AC, 69920-900

E-mail: sabrinasondre@gmail.com

Francisca Silvana Silva do Nascimento

Mestranda do programa de pós-graduação Ciência e Inovação para a Amazônia (CITA)

Universidade Federal do Acre

Endereço: Rodovia BR 364, Km 04 - Distrito Industrial, Rio Branco - AC, 69920-900

E-mail: sylvana.fs@hotmail.com

Vanderley Borges Santos

Professor da Universidade Federal do Acre (UFAC)

Universidade Federal do Acre

Endereço: Rodovia BR 364, Km 04 - Distrito Industrial, Rio Branco - AC, 69920-900

E-mail: Vanderley.santos@ufac.br

Emmerson Corrêa Brasil da Costa

Professor da Universidade Federal do Acre (UFAC)

Universidade Federal do Acre

Endereço: Rodovia BR 364, Km 04 - Distrito Industrial, Rio Branco - AC, 69920-900

E-mail: costaemm.biomes@yahoo.com

Antônio Gilson Gomes Mesquita

Professor da Universidade Federal do Acre (UFAC)

Universidade Federal do Acre

Endereço: Rodovia BR 364, Km 04 - Distrito Industrial, Rio Branco - AC, 69920-900

E-mail: mesquitaagg@gmail.com

RESUMO

O objetivo desse estudo foi a bioprospecção de bactérias produtoras de polihidroxicanoatos. Amostras de óleo de andiroba foram cedidas pela COOPERAR. As amostras foram plaqueadas em meio TSB. As colônias foram analisadas quanto a presença de PHAs utilizando a coloração Sudan Black. O DNA das colônias bacterianas positivas para a produção de PHA foi extraído com a utilização de kits de extração. Após extração de DNA as amostras foram submetidas a PCR e algumas amostras foram enviadas para sequenciamento genético. Das 250 colônias obtidas em meio TSB, 110

mostrara-se positivas para a produção de PHA através da coloração Sudan Black. Das 110 colônias, foram realizadas extrações de DNA de 10 amostras. E as 3 melhores amostras foram sequenciadas. No sequenciamento genético os seguintes gêneros foram identificados: *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium* e *Proteus mirabilis*. Visto que o gênero *Proteus* relatado pela primeira vez como produtor de polihidroxicanoatos.

Palavras -chaves: bioprospecção, óleo de andiroba, Sudan Black.

ABSTRACT

The aim of this study was bioprospecting and polyhydroxyalkanoate producing bacteria. Oil samples were provided by COOPERAR. Samples were plated on TSB medium. Colonies were analyzed for the presence of PHAs using Sudan Black staining. DNA from bacterial colonies positive for PHA production was extracted using extraction kits. After DNA extraction, the samples were submitted to PCR and some samples were sent for genetic sequencing. Of the 250 colonies obtained in TSB medium, 110 were positive for the production of PHA through Sudan Black staining. From 110 colonies, DNA extractions were performed from 10 samples. And the 3 best samples were sequenced. In genetic sequencing, the following genera were identified: *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium* and *Proteus mirabilis*. Whereas the genus *Proteus* reported for the first time as a producer of polyhydroxyalkanoates.

Keywords: bioprospecting, andiroba oil, Sudan Black.

1 INTRODUÇÃO

Os polihidroxicanoatos (bioplásticos) são polímeros que podem ser produzidos de maneira sustentável e ecologicamente correta, utilizando matérias-primas renováveis ou resíduos industriais (DELGADO; CORDOBA,2015). São sintetizados por bactérias como reserva de carbono e energia (CARDOSO,2017; HERNÁNDEZ et al,2018).

A produção de polihidroxicanoatos (PHA) como material de reserva e energia é uma particularidade que muitas bactérias apresentam. Embora o Brasil seja conhecido como um país de grande diversidade biológica, poucos trabalhos foram realizados de forma a identificar bactérias na região amazônica responsáveis pela produção de polihidroxicanoatos (PHA) (MARGARIDO et al, 2021). Nesse sentido, faz-se necessário mais estudos sobre a diversidade genética da Amazônia, como por exemplo a diversidade das espécies vegetais.

Dentre as espécies vegetais encontra-se a andiroba. A andiroba é uma espécie que pode alcançar até 30 metros e têm importância madeireira para a região amazônica, e suas sementes são usadas para extração de um óleo com propriedades medicinais (VINSON et al,2021). O óleo de Andiroba em sua composição apresenta os seguintes componentes: Ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido araquidônico (2,26)

e ácido benzênico (SILVA,2018). Embora o óleo de Andiroba apresenta uma vasta versatilidade e aplicabilidade em diversas situações, há ainda inúmeras formas de sua utilização que podem ser estudadas e aperfeiçoadas, tanto como tratamento médico, assim como cosmético, e outras formas que já são utilizadas popularmente assim como novas formas de aplicações (CARVALHO et al,2019).

Segundo Matsudo (2009) os óleos vegetais são uma fonte promissora para a produção de PHA, pois o seu metabolismo permite a síntese de diferentes tipos de PHA. Por isso este trabalho tem extrema importância, pois é pioneiro na bioprospecção de bactérias produtoras de polihidroxicanoatos em óleo de andiroba. A bioprospecção é um instrumento que permite a obtenção de organismos do ambiente que tenham potencial biotecnológico e econômico e levem ao desenvolvimento de um produto (GOMES et al,2021). Nesse sentido, este trabalho visa contribuir para o conhecimento sobre a bioprospecção de bactérias produtoras de polihidroxicanoatos, uma vez que existem poucos trabalhos na Amazônia referente a este tema.

2 MATERIAIS E METODOS

2.1 ISOLAMENTO E COLEÇÃO DAS BACTÉRIAS

As amostras de óleo de Andiroba (Carapa Guianensis) foram cedidas pela Cooperativa Agroextrativista do Mapiá e Médio Purus (COOPERAR), localizadas nos municípios de Boca do Acre. O município de Boca do Acre está situado na 3ª sub-região, da região do Purus, inserida na Mesorregião Sul Amazonense, conforme classificação do IBGE (2008), fazendo limites com Lábrea, Acre e Pauní. As amostras cedidas foram levadas para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Acre.

As amostras foram diluídas a 10^{-3} e 10^{-4} em solução estéril de salina (NaCl) a 85%. Alíquotas de 0,25 ml das diluições foram espalhadas placas de petri contendo meio TSB (Tryptic Soy Broth) e incubadas a 30°C por 7 dias. Após crescimento das culturas, as colônias bacterianas foram analisadas e, de acordo com suas características morfológicas e aparência, foram selecionadas para extração de DNA através do kit de extração da empresa Sinapse.

2.2 TRIAGEM DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE PHA

Para a análise qualitativa da presença de PHAs intracelular, utilizou-se a técnica de coloração Sudan Black (SCHLEGEL et al.,1970). A etapa de análise qualitativa da

produção de PHA por coloração de Sudan Black foi realizada após retirada das amostras do meio TSB, e montagem em lâmina.

Colônia de bactérias foram espalhadas em lâmina de vidro, fixadas por calor e coradas com sudan black, segundo metodologia descrita por Oliveira et al (2008) e adaptada por Paula (2008). Foram feitos 10 esfregaços bacteriano de cada local. Os esfregaços foram corados com uma solução de Sudan Black B 0,02% em etanol 96%, durante 20 minutos, sendo descorados com etanol por 1 minuto. As bactérias com coloração azul escura foram consideradas produtoras de PHA (PHA+), enquanto as colônias levemente azuladas ou não coradas foram consideradas não produtoras deste (PHA-). A observação foi em microscópio óptico 100X e as imagens capturadas através de fotografias para posterior análises.

2.3 EXTRAÇÃO DE DNA E PCR DE COLÔNIA

As colônias de bactérias com PHA+ foram incubadas em 10 mL de meio TSB. O DNA foi extraído utilizando o kit Quick-DNA Fungal/Bacterial Microprep Kit - Zymo Research - D6007 (Sinapse), seguindo manual do fabricante. As amostras foram submetidas a PCR, utilizando os iniciadores que amplificam o gene rDNA 16S, 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1401R (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG-3') em volume final de 25 µL. As condições da amplificação foram 30 ciclos de 94°C/45 segundos, 50°C/45 segundos e 72°C/ 90 s.

2.4 IDENTIFICAÇÃO E PRESERVAÇÃO BACTERIANA

Três colônias positivas para produção de polihidroxicanoatos na coloração por Sudan Black, foram enviadas para sequenciamento do DNA, na Plataforma de Sequenciamento na FIOCRUZ/RJ.

Para a identificação das espécies bacterianas com base nas sequências de nucleotídeos e aminoácidos relacionados, foi consultada a base de dados do NCBI (National Center of Biotechnology Information) usando a ferramenta de programa BLASTn e BLASTx (Basic Local Alignment Search Tool). O grupo foi definido com base no grau de similaridade existente entre a amostra e o banco de dados (e-value e identidade máxima).

Cada uma das linhagens bacterianas a ser preservada foram cultivadas em caldo LB por 24/48 horas, e, em seguida, 5 mL de cada uma das culturas foram diluídos em 5 mL de solução aquosa de glicerol a 40%, aliquotadas e armazenadas em freezer a -20°C.

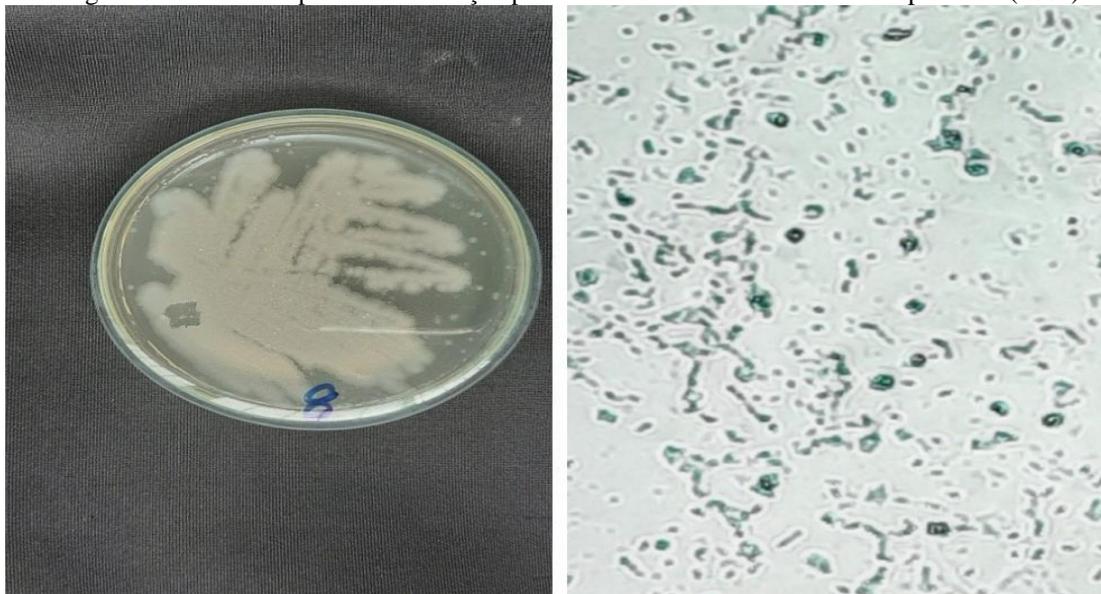
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 ANÁLISE QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE PHAS

Após processamento e isolamento de bactérias das amostras de óleo de Andiroba, observou-se que as colônias isoladas apareceram nas diluições de solo a partir de 10^{-5} , e a maior diversidade ocorreu a partir da diluição de 10^{-3} .

Com base nas diferenças de aspecto e coloração das colônias foram selecionadas 250 colônias bacteriana, no qual 110 mostraram-se positivas para a produção de PHA através da coloração Sudan Black.

Figura 01. Bactérias apresentando reação positiva ao Sudan Black ao microscópio óptico (100x).



3.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR (16S RDNA) DAS BACTÉRIAS PRODUTORES DE PHA

Das 110 colônias identificadas qualitativamente, foram realizadas extrações de DNA de 10 amostras, sendo que as 3 melhores produtoras de PHA foram sequenciadas. A técnica de identificação molecular utilizando a amplificação da região ribossomal 16S do DNA bacteriano permitiu identificar três gêneros (Tabela 1). As sequências obtidas foram alinhadas com as sequências do banco de dados público GenBank através do programa BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov), para a identificação com base na identidade da sequência parcial do gene 16S rDNA.

Tabela 1 - Identificação das bactérias isoladas em óleo de Andiroba com base na identidade da sequência parcial do gene 16S rDNA.

Código da Coleção	Gêneros cuja sequência apresentou maior similaridade através de BLASTn	Máximo de Identidade (%)	Score	Valor E	Acesso no Genbank com maior similaridade
BAC01OLEO	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	156-156	$2e^{-34}$	MH422129.1
BAC02OLEO	<i>Enterococcus faecium</i>	100%	156-156	$2e^{-34}$	AB685282.1
BAC03OLEO	<i>Proteus mirabilis</i>	100%	778-5364	0.0	CP053718.1

De acordo com Ferreira (2015) o valor do score dá uma indicação sobre o grau de homologia entre a sequência em questão e a sequência que introduzimos. Dos 3 gêneros identificados no presente trabalho, o gênero *Bacillus* é o mais significativo. O gênero *Bacillus* foi considerado o mais representativo em ambientes de água doce capazes de produzir polihidroxialcanoatos (FERREIRA,2015) e em ambiente de mata e solo (SILVA et al,2016). Esse gênero é relatado na literatura também por acumular elevadas concentrações de PHA em diferentes meios de cultivo (RODRIGUES et al,2015; SATHYA et al,2018) por ter um rápido crescimento em resíduos industriais (MORENO et al,2012) e ser um dos gêneros mais comuns representativos das endofíticas (MIGUEL et al,2020).

O gênero *Enterococcus* identificado neste trabalho é comum em relatos na literatura como produtoras de polihidroxialcanoatos. As bactérias do gênero *Enterococcus* são gram-positivas, não patogênicas, geralmente encontradas no trato gastrointestinal, no solo, na água e em alimentos fermentados (BYAPPANAHALLI et al,2012). *Enterococcus faecium* é uma das espécies mais estudadas presentes no trato gastrointestinal (FRANZ et al., 2003).

O gênero *Enterococcus* foi identificado como produtor de polihidroxialcanoatos por Echavaria et al (2013). Os autores fizeram a identificação molecular de bactérias isoladas de resíduos de laticínios e cana-de-açúcar. Conseguiram isolar 38 cepas bactéria com potencial para a produção de polihidroxialcanoatos e identificaram 27 cepas a nível de gênero. Além do gênero *Enterococcus* foi possível identificar também os gêneros *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Lactococcus* e *Bacillus*.

A bactéria *Proteus mirabilis* identificada neste trabalho pertence ao grupo das gram-negativas, bactéria patogênica e associada a infecções urinárias. Essas bactérias são encontradas em solo e águas contaminadas (GIBBS; GREENBERG,2011).

Proteus mirabilis também é identificada como causadora de infecções em animais domésticos. Esse grupo bacteriano foi o segundo agente infeccioso mais frequente

encontrado na urina de 26 cães e gatos com suspeita de infecção urinária atendidos de janeiro de 2016 a dezembro de 2018 em clínica veterinária do centro universitário Ingá no Paraná (SILVA et al,2018). O gênero *Proteus* é considerado oportunista e encontrado principalmente na microbiota entérica (KOENIG,2012).

4 CONCLUSÃO

Neste estudo, os métodos empregados permitiram isolar e purificar de 2500 isolados bacterianos de óleo de andiroba, 110 bactérias produtoras de biopolímeros, sendo selecionadas 03 por apresentarem maiores alterações morfológicas da célula quando visualizados em microscópio óptico, sugerindo maior capacidade de produção de biopolímeros.

Através da extração de DNA dos isolados bacterianos foi possível realizar o sequenciamento do DNA do gene rRNA 16S. Análise das sequências de nucleotídeos possibilitaram a identificação de três gêneros. Sendo o gênero *Bacillus* o mais significativo. Não há relatos na literatura da produção de biopolímeros pelo gênero *Proteus*. Nossos dados demonstram a importância da busca por novas linhagens com potencial para produção de biopolímero na região Amazônica.

REFERÊNCIAS

BYAPPANAHALLI, M.N.; NERVES, M.B.; KAROJKIC.; STALEY, Z.; HARWOOD, V.J. Enterococci in the environment. *Microbiol Mol Biol Ver*, V. 76, n.4, p. 685-706,2012.

CARDOSO, L.O.P. Produção de Polihidroxicanoatos (PHB) por bactérias metilotróficas.2017.79f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Universidade de São Paulo.2017.

CARVALHO,S.B.A.; CARVALHO,C.C.; SIRQUEIRA,B.P.C.; SILVA,R.A.; NYLANDER,B.V.R.;BARROS,C.A.V. Estudo em bases de patentes sobre a andiroba e suas propriedades anti-inflamatórias. *Para Research Medical Journal*, 2019.

DELGADO, A.C.L.; CORDOBA, A.M. Polihidroxicanoatos (PHA) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Informador Técnico, Centro Nacional de Asistencia Técnica a la Industria*,V.79,1, p. 93-101,2015.

FERREIRA, E.M. Potencial de bactérias do rio madeira na produção de biopolímeros. 2015. 75 p. Dissertação de mestrado. Universidade do estado do Amazonas. Manaus 2015.

FRANZ, C. M. A. P.; STILES, M.E.; SCHLEIFER, K, H.; HOLZAPFEL, W.H. Enterococci in foods - A conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, v. 88, n. 2–3, p. 105–122, 2003.

GIBBS, K.A.; GREENBERG, E.P. Territorially in *Proteus*: Advertisement and aggression. *Chemical Reviews*, v.111, p.188-194,2011.

MARGARIDO, S.S.O.R.; BORGES, V.; NASCIMENTO, F.S.; MESQUITA.A.G.G. Prospecção de bactérias produtoras de plásticos biodegradáveis na região sudoeste da Amazônia. *Biologia, ensino, pesquisa e extensão: Uma abordagem do conhecimento científico nas diferentes esferas do saber*, 2021.

MATSUDO, T.S. Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxicanoatos de cadeia curta e média a partir de óleos vegetais. 2009.84p. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. Programa de pós-graduação interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan,2009.

MIGUEL, P.S.B.; DELVAX, J.C.; OLIVEIRA, M.N.V.; CARMAGO, R.; FRANCO, M.H.; SOBREIRA, H.A.; SOARES, D.F.; JARDIM, V.H.P. Bactérias endofíticas: Colonização, benefícios e identificação. *Brazilian Journal of Development*, v.7, n.1, p. 8777-8791, 2021.

MORENO, S.A.S.; MONTOYA, M.A.M.; MERTINEZ, A.L.M.; PEREZ, M.D.S. identificación de bacterias productoras de polihidroxicanoatos (PHAs) en suelos contaminados con desechos de fique. *Revista colombiana biotecnologia*. v.XIV, n.2, p. 89-100,2012.

OLIVEIRA, I.S.S.; TELLIS, C.J.M.; CHARGAS, M.S.S.; BEHRENS, M.D.; CALABRESE, K.S.; ABREU-SILVA, A.L.; ALMEIDA-SOUZA, F. Carapa guianensis Aublet (Andiroba) Seed Oil: Chemical Composition and Antileishmanial Activity of Limonoid-Rich Fractions. *BioMed Research International*, v. 2018.

PAULA, F.C. Polihidroxialcanoatos (PHAs): Bioprospecção de microorganismos e produção a partir de glicerol. Tese de doutorado. 2012, 92 p. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia aplicada) – Universidade Estadual Júlio Mesquita. 2012.

RODRIGUES, A.A.; MACAGNAN, K.L.; SANTOS, B.C.; ALVES, M.I.; MOURA, A.B.; PERALBA, M.C.R.; OLIVEIRA, P.D.; PINTO, L.S.; DELLAGOSTIN, O.A.; MOREIRA, A.S.; VENDRUSCO, C.T. Seleção e identificação de linhagens bacterianas produtoras do bioplástico poli (3-hidroxibutirato). *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, V.9, n.1, p.1771-1785,2015.

SILVA, A.L.S.; SANTOS, E.C.L.; SANTOS, I.A.P.; LOPES, A.M. Seleção polifásica de microrganismos produtores de polihidroxialcanoatos. *Química nova*. V. 39, n. 7, 782-788, 2016.

SILVA, L. R. Propriedades físico-químicas e perfil dos ácidos graxos do óleo da andiroba. *Nativa, Sinop*, v. 6, n. 2, p. 147-152, mar./abr. 2018. 73ª Reunião Anual da SBPC.

VINSON, C. C.; AZEVEDO, V. C. R.; SAMPAIO, I.; CIAMPI, Y. Development of microsatellite markers for *Carapa guianensis* (Aublet), a tree species from the Amazon forest. *Molecular Ecology Notes*, V. 5, p. 33–34,2005.

SILVA, D.R.; VIEIRA, Y.G.; VENANCIO, J.R.; ORTIZ, M.A.L.; MOLINARI, B.L.D. Estudo retrospectivo da etiologia, sensibilidade antibiótica, avaliação hematológica e bioquímica de infecções do trato urinário de cães e gatos. *Revista Uningá Review, Maringá*, v. 33, n. 4, p. 13-26, 2018.

KOENIG, A. Gram-negative bacterial infections. In: GREENE, C.E. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders, p.349-359,201.