



XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

# ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS CONSUMIDORAS DE C1 PARA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS

L. O. B. CARDOSO<sup>1</sup>, C. A. O. NASCIMENTO<sup>1</sup>, E. A. PERPETUO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade de São Paulo, Departamento de Engenharia Química

<sup>2</sup> Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Ciências do Mar  
E-mail para contato: leticiacardoso@usp.br

**RESUMO** – *Os polihidroxicanoatos (PHAs) são biopolímeros produzidos por bactérias, que possuem características similares às dos petroderivados, tornando-se potenciais substitutos destes. A atual problemática refere-se ao seu alto custo de produção, portanto este trabalho visa utilizar um substrato de menor custo, o metanol. As bactérias utilizadas foram isoladas de área contaminada por atividade antrópica da orla da cidade de Santos, no estado de São Paulo, e identificadas por espectrometria de massas MALDI-TOF-Biotyper. Os resultados foram comparados à *Methylobacterium extorquens*, conhecidamente produtora de PHAs a partir de metanol. Ao fim de 15 dias de cultivo, amostras foram coletadas a fim de quantificar o PHB por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), e a que se mostrou melhor produtora foi a *Acinetobacter pittii*, capaz de sintetizar 98,2 mg/L de biopolímero.*

## 1. INTRODUÇÃO

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são biopolímeros produzidos por bactérias na forma de grânulos intracelulares. Esses biopolímeros são produzidos quando o microrganismo é exposto à limitação de nutrientes e excesso de carbono, formando assim grânulos de reserva de energia. Hoje existem mais de 150 monômeros conhecidos, e sua produção está diretamente ligada ao substrato oferecido como fonte de carbono. Os PHAs são biocompatíveis com os polímeros convencionais, tendo a vantagem de serem biodegradáveis e poder ser produzidos através de fontes renováveis como açúcares e óleos vegetais. Por este motivo, apresentam um alto potencial para substituí-los no mercado (CHEN *et al.*, 2013; MIZUNO *et al.*, 2010).

O PHA mais conhecido atualmente é o polihidroxibutirato (PHB). Ele foi descoberto no final de 1950 por Lemoigne, que fazia estudos com a bactéria *Bacillus megaterium* (SUDESH *et al.*, 2000). O PHB possui características termoplásticas de muita qualidade, enquanto que suas características elastoméricas nem tanto. Ele é um polímero rígido e quebradiço, mas ainda assim

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

possui muitas aplicabilidades em várias áreas, como na de embalagens, fabricação utensílios de plástico e compartimentos de plástico, como frascos de shampoo (KHANNA & SRIVASTAVA, 2005).

A maior desvantagem dos PHAs no cenário econômico atual se refere ao seu preço de produção, que é muito alto quando comparado aos polímeros derivados do petróleo. Além de buscar a utilização de um substrato de menor custo, buscamos também procurar novos gêneros de bactérias que possam vir a produzir os biopolímeros utilizando o metanol para então fazer um estudo de comparação entre *M. extorquens*, já conhecida por consumir até 1% (v/v) de metanol (YEZZA *et al.*, 2006).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Coleta de amostras

A coleta de amostras para o isolamento bacteriano foi realizada em diferentes pontos da orla da cidade de Santos – SP.

### 2.2. Isolamento

O isolamento foi realizado a fim de selecionar bactérias consumidoras de C1, portanto as amostras foram cultivadas em meio mínimo mineral (10 mL de  $\text{FeSO}_4$  [1mM], 1 mL de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  [1M], 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  [1M] e 10 mL de M2), sendo a composição do M2: 5 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 20,88 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e 10,6 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) acrescido de 0,5% de metanol (v/v). As amostras foram mantidas em estufa à 37°C por 72h e então plaqueadas em meio de cultura sólido nas mesmas condições do cultivo líquido. Após uma série de diluições, as colônias isoladas foram submetidas à identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF-Biotyper.

*Methylobacterium extorquens*: A bactéria do gênero *Methylobacterium extorquens* foi adquirida da Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria – CBMAI. Ela serviu como controle positivo à produção de polihidroxialcanoatos, uma vez que já está datada na literatura sua capacidade de produzi-los a partir do metanol (HÖFER *et al.*, 2010; MOKHTARI-HOSSEINI *et al.*, 2009; YEZZA *et al.*, 2006).

### 2.3. Identificação

As colônias isoladas do meio líquido foram ressuspendidas em eppendorfs durante 24h em 1 ml de meio Luria-Bertani (LB). Após este período, as amostras foram centrifugadas (13.000 rpm por 2 minutos) (CIENITEC, CT 15000R), e foi seguido protocolo para extração de proteínas. Ao *pellet* celular foram adicionados 300  $\mu\text{l}$  de água deionizada e 900  $\mu\text{l}$  de etanol para inativação das bactérias.

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

A solução foi homogeneizada, centrifugada novamente e o sobrenadante descartado. Então foram adicionados 30 µl de ácido fórmico 70% e 50 µl de acetonitrila para lisar as células bacterianas. Novamente a solução foi homogeneizada e centrifugada, mas desta vez com objetivo de separar os sedimentos celulares das proteínas. Então 1 µl do sobrenadante foi depositado em placa (96 MSP, Bruker Daltonics, EUA), seguido de secagem a temperatura ambiente. Ao sobrenadante seco foi adicionado 1 µl de solução matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico [CHCA] diluído em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 2,5%), seguido de secagem a temperatura ambiente. Para análise dos espectros de massa foi utilizado um espectrômetro MALDI-TOF LT Microflex Bruker. Os espectros de massa foram coletados na faixa de massas de 2.000 – 15.000 m/z e então analisados pelo programa MALDI Biotyper RTC, que leva em consideração as massas e intensidades relativas dos espectros desconhecidos e os compara com um banco de dados interno, resultando na identificação das bactérias.

## 2.4. Meio de cultura

Para produção de PHAs o meio de cultura precisa conter limitação de nutrientes e excesso de fonte de carbono, portanto foi utilizado um meio salino adaptado de Mokhtari-Hosseini (2009), contendo:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.75 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.68 g/L;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  6.14 g/L;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.2 g/L;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.6 mg/L;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.04 mg/L;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  20 mg/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  20 mg/L;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.04 mg/L;  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5 mg/L;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5 mg/L e 0,5% (v/v) de metanol como única fonte de carbono.

## 2.5. Experimentos

Os microrganismos foram cultivados em meio LB (Peptona 10 g/L, Extrato de levedura 5 g/L e NaCl 10 g/L) para enriquecimento à 37°C e 180 rpm durante 24 horas (INFORS HT Ecotron). Após este período, os inóculos foram preparados em erlenmeyers de 250 ml contendo 100 ml do meio de cultura adaptado de Mokhtari-Hosseini (2009) acrescido de 0,5% de metanol (v/v). Eles foram incubados à 28°C e 180 rpm durante 72h (INFORS HT Multitron PRO).

## 2.6. Extração e análise quantitativa de PHB

Adaptando o protocolo sugerido por Law & Slepecky (1961), amostras de 50 ml foram coletadas ao fim de 72h de ensaio e centrifugadas a 10.000 rpm e 4°C durante 5 minutos (HITACHI, CR22N). O sobrenadante foi descartado e 3 ml de NaClO foram adicionadas ao *pellet*, que foi mantido a 37°C durante 1 hora a fim de romper a membrana da célula. Após este período, foram realizadas lavagens com água, etanol e acetona para retirar impurezas e precipitar o PHB. Após as lavagens, o polímero foi dissolvido em três partes de clorofórmio, transferido para béqueres de 25 ml e deixado em bancada até que o solvente evaporasse. Então, foram adicionadas 10 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , o qual permaneceu em banho-maria a 80°C durante 20 minutos para que o PHB pudesse ser convertido à ácido crotônico. As soluções foram resfriadas e 1 ml foi analisado por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (SHIMADZU, UFLC) através de injeção de 50 µl em uma coluna HPX-87H,

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

com fase móvel isocrática de ácido sulfúrico a 5 mM, detector PDA ajustado para 210 nm e fluxo de 1,2 ml/min a 60°C. A quantificação das amostras foi realizada correlacionando os resultados a uma curva de calibração realizada em concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/ml.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das amostras coletadas, cinco gêneros de bactérias foram isolados e analisados por espectrometria de massas MALDI-TOF-Biotyper, que resultou na identificação de *Acinetobacter pittii*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Rhodococcus ruber*. A técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF consiste na identificação das bactérias baseando-se no tempo de voo de suas proteínas quando estas são bombardeadas por um feixe de elétrons. O *score* resultante pode variar de 0 a 3,0, correspondendo respectivamente à identificação não confiável e identificação em nível de espécie. No entanto, um *score* de 2,0, no mínimo, confirma a identificação do gênero e dá uma provável identificação de espécie. Os *scores* dos isolados podem ser vistos na Tabela 1, bem como o da bactéria *M. extorquens*, que também foi analisada.

Com exceção da bactéria *Acinetobacter pittii*, todas as outras apresentam artigos na literatura que comprovam sua capacidade em produzir polihidroxialcanoatos. No entanto, elas utilizam de fontes de carbono como açúcares, ácidos graxos, óleos e gorduras, entre outros (ANDERSON *et al.*, 1992; GAO *et al.*, 2013; HORI *et al.*, 2011; MIZUNO *et al.*, 2010; SHEN *et al.*, 2009; VALAPPIL *et al.*, 2007; YEZZA *et al.*, 2006). Até o presente momento, não existem relatos de síntese destes biopolímeros através da utilização do metanol como única fonte de carbono. Logo, este trabalho visa a produção de biopolímeros utilizando metanol como substrato comparando os gêneros isolados com uma bactéria conhecida produtora de PHAs através do metanol, *Methylobacterium extorquens*.

Os inóculos foram mantidos em shaker à 28°C e 180 rpm durante 72h para análise do seu crescimento celular. Neste momento a temperatura foi ajustada de acordo com a temperatura ótima de cultivo para cada bactéria, conforme a literatura. Apenas a bactéria *P. aeruginosa* apresenta melhor crescimento a 37°C, porém como este é um trabalho comparativo, sua temperatura também foi ajustada para 28°C.

A análise quantitativa de síntese de PHB foi realizada em HPLC. Após 15 dias de cultivo, 50 ml foram coletados de cada bactéria e então foi seguido o protocolo para extração do polímero. O resultado da quantificação pode ser observado na Tabela 2 e os cromatogramas na Figura 1.

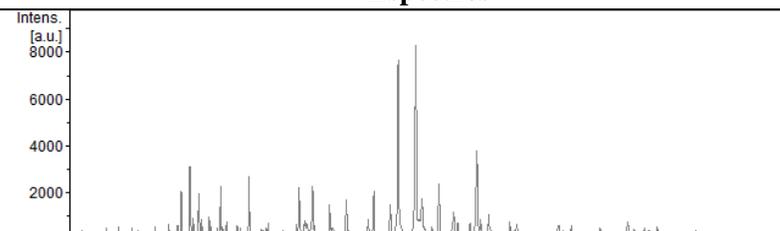
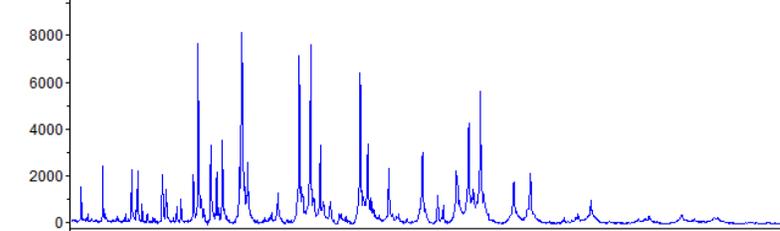
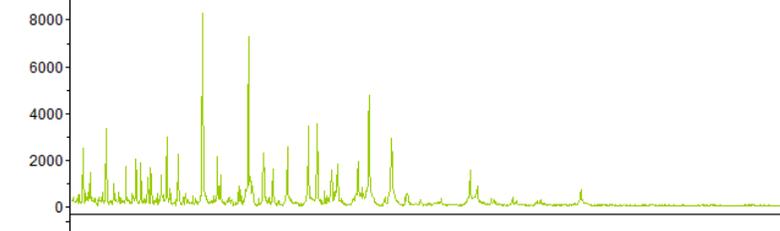
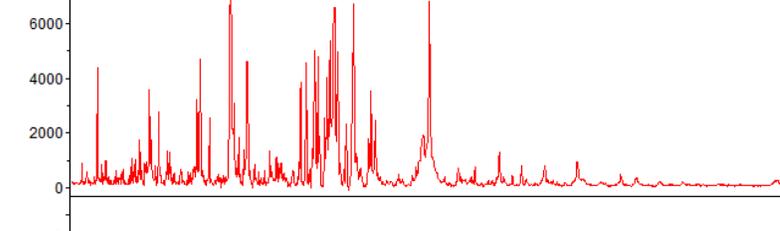
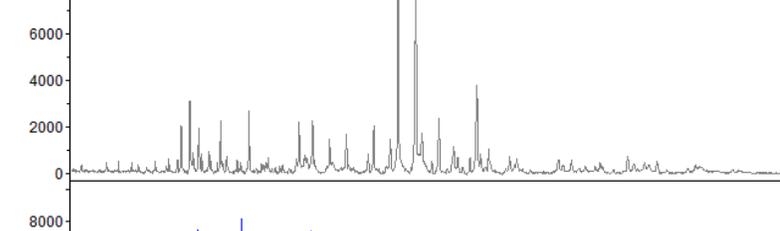
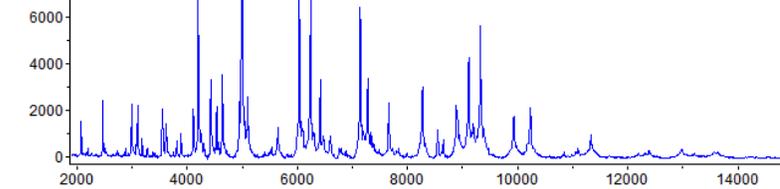
PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO



Tabela 1 – Identificação dos gêneros de bactérias por espectrometria de massas MALDI-TOF/MS e seus respectivos scores e espectros.

Bactérias	Scores	Espectros
<i>A. pittii</i>	2.127	
<i>A. hydrophila</i>	2.235	
<i>B. cereus</i>	2.095	
<i>M. extorquens</i>	2.362	
<i>P. aeruginosa</i>	2.311	
<i>R. ruber</i>	2.253	

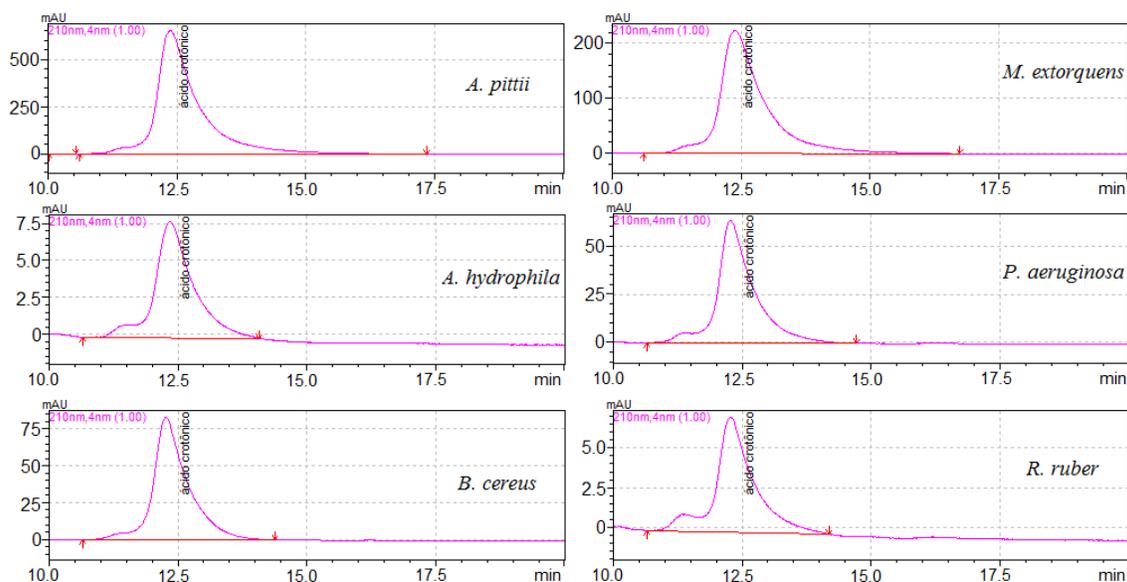


Figura 1 – Cromatogramas indicando a presença de ácido crotonico extraído das bactérias *A. pittii*, *A. hydrophila*, *B. cereus*, *M. extorquens*, *P. aeruginosa* e *R. ruber*, respectivamente. O tempo de retenção do ácido crotonico é 12,47 minutos.

Como pode ser visto na Figura 1, os gêneros *Aeromonas* e *Rhodococcus* foram capazes de produzir o biopolímero, pois apresentam o pico de ácido crotonico, porém, como pode ser visto na Tabela 2, a concentração de PHB é muito baixa.

Tabela 2 – Concentrações de PHB em mg/L produzido pelas bactérias.

Bactérias	Concentração de PHB (mg/L)
<i>A. pittii</i>	98,2
<i>M. extorquens</i>	36,6
<i>B. cereus</i>	10,7
<i>P. aeruginosa</i>	8,5
<i>A. hydrophila</i>	1,1
<i>R. ruber</i>	1,0

O gênero *Rhodococcus* é conhecido por produzir o copolímero polihidroxibutirato-*co*-valerato, e o método utilizado para quantificação através do ácido crotonico realizado neste trabalho analisa somente o PHB. Haywood *et al.* (1990) conseguiram produzir até 30% (m/m) do copolímero utilizando glicose como substrato e apenas 25% era de hidroxibutirato. Essa pode ser uma das hipóteses para a baixa detecção de PHB pelo HPLC.



XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

Shen *et al.* (2009) conseguiram produzir 2,09 g/L de polihidroxibutirato pelo gênero *Aeromonas* utilizando ácido undecanóico como única fonte de carbono, enquanto que Chen *et al.* (2013) conseguiram produzir até 3,63 g/L de PHB utilizando óleo de coco. Isso demonstra que o metanol talvez não seja a melhor fonte de carbono para produção de biopolímero por *A. hydrophila*. Ela pode ser capaz de tolerar o metanol, mas pode não utilizá-lo em seu metabolismo na síntese de PHB na mesma proporção. Isso também explicaria a baixa detecção por cromatografia.

*M. extorquens*, *B. cereus* e *P. aeruginosa* são conhecidamente produtoras de PHB. No entanto, apenas *M. extorquens* foi capaz de produzir o biopolímero utilizando 1% (v/v) de metanol como substrato, chegando a atingir concentrações de 0,80 g/L (MOKHTARI-HOSSEINI *et al.*, 2009). *B. cereus* e *P. aeruginosa* conseguiram produzir 0,152 g/L e 64,4% (m/m) de massa seca utilizando açúcar e meio de cultura rico com adição de água residual sintética com limitação de nitrogênio, respectivamente (GHATE *et al.*, 2011; KOURMENTZA *et al.*, 2015).

Como citado anteriormente, a bactéria do gênero *Acinetobacter* não possui relatos na literatura sobre a produção de polihidroxialcanoatos. No entanto, no presente trabalho, ela foi a que se mostrou mais promissora, produzindo concentrações de até 98,2 mg/L utilizando 0,5% (v/v) de metanol.

## 4. CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu concluir que a bactéria *Acinetobacter pittii* foi a que se mostrou mais promissora para produção de PHB, mesmo quando comparada ao controle positivo, a bactéria *Methylobacterium extorquens*. *A. pittii* foi capaz de produzir 2,7 vezes mais biopolímero utilizando 0,5% (v/v) de metanol como única fonte de carbono. Os próximos passos do trabalho incluem caracterizar o biopolímero formado, assim como aumentar a escala de produção em um biorreator a fim de otimizar as condições físico-químicas do processo e testar também a tolerância do gênero *Acinetobacter* ao metanol a fim de otimizar a produção do PHB.

## 5. REFERÊNCIAS

- ANDERSON, A. J.; WILLIAMS, D. R.; TAIDI, B.; DAWES, E. A.; EWING, D. F. Studies on copolyester synthesis by *Rhodococcus ruber* and factors influencing the molecular mass of polyhydroxybutyrate accumulated by *Methylobacterium extorquens* and *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 103, p. 93-102, 1992.
- CHEN, B.; HUNG, J.; SHIAU, T.; WEI, Y. Exploring two-stage fermentation strategy of polyhydroxyalkanoate production using *Aeromonas hydrophila*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 78, p. 80-84, 2013.
- GAO, X.; JIAN, J. LI, W.; YANG, Y.; SHEN, X.; SUN, Z.; WU, Q.; CHEN, G. Genomic study of

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

- polyhydroxyalkanoates producing *Aeromonas hydrophila* 4AK4. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 97, p. 9099-9109, 2013.
- GHATE, B.; PANDIT, P.; CHANDRASHEKHAR, K.; MUNGI, D. D.; PATEL, T. S. PHB production using novel agro-industrial sources from different *Bacillus* species. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, v. 2, n. 3, p. 242-249, 2011.
- HAYWOOD, G. W.; ANDERSON, A. J.; WILLIAMS, D. R.; DAWES, E. A.; EWING, D. F. Accumulation of a poly(hydroxyalkanoate) copolymer containing primarily 3-hydroxyvalerate from simple carbohydrate substrates by *Rhodococcus* sp. NCIMB 40126. *Int J Biol Macromol.*, v. 13, n. 2, p. 83-88, 1991.
- HÖFER, P.; CHOI, Y. J.; OSBORNE, M. J.; MIGUEZ, C. B.; VERMETTE, P.; GROLEAU, D. Production of functionalized polyhydroxyalkanoates by genetically modified *Methylobacterium extorquens* strains. *Microbial Cell Factories*, v. 9, p. 1-13, 2010.
- HORI, K.; ICHINOHE, R.; UNNO, H.; MARSUDI, S. Simultaneous syntheses of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* IFO3924 at various temperatures and from various fatty acids. *Biochemical Engineering Journal*, v. 53, p. 196-202, 2011.
- LAW, J. H.; SLEPECKY, R. A. Assay of poly- $\delta$ -hydroxybutyric acid. *Journal of Bacteriology*, v. 82, n. 1, p. 33-36, 1961.
- MIZUNO, K.; OHTA, A.; HYAKUTAKE, M.; ICHINOMIYA, Y.; TSUGE, T. Isolation of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria from a polluted soil and characterization of the isolated strain *Bacillus cereus* YB-4. *Polymer Degradation and Stability*, v. 95, p. 1335-1339, 2010.
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 607-619, 2005.
- KOURMENTZA, C.; NTAIKOU, I.; LYBERATOS, G.; KORAROS, M. Polyhydroxyalkanoates from *Pseudomonas* sp. Using synthetic and olive mill wastewater under limiting conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 74, p. 202-210, 2015.
- MOKHTARI-HOSSEINI, Z. B.; VASHEGANI-FARAHANI, E.; HEIDARZADEH-VAZIFEKHORAN, A.; SHOJAOSADATI, S. A.; KARIMZADEH, R.; DARANI, K. K. Statistical media optimization for growth and PHB production from methanol by a methylotrophic bacterium. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 2436-2443, 2009.
- SHEN, X.; YANG, Y.; JIAN, J.; WU, Q.; CHEN, G. Production and characterization of homopolymer poly(3-hydroxy-valerate) (PHV) accumulated by wild type and recombinant *Aeromonas hydrophila* strain 4AK4. *Bioresource Tecnology*, v. 100, p. 4296 – 4299, 2009.
- SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.*, v. 25, p. 1503-1555, 2000.
- VALAPPIL, S. P.; PEIRIS, D.; LANGLEY, G. J.; HERNIMAN, J. M.; BOCCACCINI, A. R., BUCKE, C.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from structurally unrelated carbon sources by a newly characterized *Bacillus* spp. *Journal of Biotechnology*, v. 127, p. 475-487, 2007.
- YEZZA, A.; FOURNIER, D.; HALASZ, A.; HAWARI, J. Production of polyhydroxyalkanoates from methanol by a new methylotrophic bacterium *Methylobacterium* sp. GW2. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 73, p. 211-218, 2006.

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO

