



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS **SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2021**

SELEÇÃO MICROBIANA PRODUTORA DE BIOSSURFACTANTE

Ericca Maria Teles Lobo Evangelista¹ e Eddy José Francisco de Oliveira²;

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Nome do Curso, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: ericcalobo@gmail.com
2. Orientador, Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: eddyfo@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: Genes funcionais; Bioprospecção; Ramnolipídeos.

INTRODUÇÃO

A biorremediação é um processo que consiste na utilização de seres vivos ou seus componentes na recuperação de áreas contaminadas. É um dos campos mais promissores da biotecnologia e geralmente empregam os microrganismos (fungos e bactérias) e/ou suas enzimas para degradar compostos poluentes, e contaminantes específicos do solo e águas, tais como a degradação de hidrocarbonetos do petróleo e compostos orgânicos diversos. Contaminações por hidrocarbonetos em derramamentos de petróleo e seus derivados têm causado sérios problemas ambientais e atenção extra está sendo dispensada ao desenvolvimento e implementação de novas tecnologias. Diversos métodos de remediação de solos e ambientes impactados com petróleo e seus derivados estão sendo desenvolvidos como alternativas ambientalmente corretas.

Os biossurfactantes são surfactantes de origem biológica. Sabe-se que microrganismos como bactérias, leveduras e fungos produzem vários tipos de biossurfactantes. São geralmente classificados de acordo com a carga transportada por seus grupos polares (cabeça) em catiônicos, aniônicos, anfotéricos e não iônicos. Os biossurfactantes estão atraindo muita atenção porque representam alternativas ecológicas aos seus homólogos sintéticos: exibem menor toxicidade, atividades potencialmente altas e estabilidade em extremos de temperatura, pH e salinidade. Eles têm uma grande variedade de estruturas e podem ser produzidos a partir de matérias-primas renováveis por uma grande variedade de microrganismos. Mais importante, eles são biodegradáveis, tornando-os ambientalmente amigáveis, produtos químicos “verdes”.

Os Ramnolipídeos são biossurfactantes glicolipídicos produzidos por várias espécies bacterianas. Em *P. aeruginosa*, três genes, transportados em dois operons distintos, codificam as enzimas responsáveis pelas etapas finais da síntese de ramnolipídeos: um operon carrega os genes *rhlAB* e o outro *rhlC*. Genes altamente semelhantes a *rhlA*, *rhlB* e *rhlC* também foram encontrados em várias espécies de *Burkholderia* sp.

O Plano de Trabalho "SELEÇÃO MICROBIANA PRODUTORA DE BIOSSURFACTANTE" faz parte do Projeto "Caracterização Molecular Avançada" (Consepe 026/2018). Este projeto propõe por revisão bibliográfica determinar um

possível isolamento microbiano capaz de produzir biossurfactante. Para isso, foram selecionados microrganismos do Banco de Sequencias LAMASP/UEFS. Foi avaliada a presença dos genes Glicose-1-fosfato timidiltransferase (rm1A, rm1B e rm1C) em dois momentos, i) Através do banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) para nucleotídeos e ii) Banco de dados Universal de Proteínas (UNIPROT) para prováveis genes, artigos revisados e não revisados.

METODOLOGIA

1. Revisão e seleção de organismos no banco de amostras

O projeto de pesquisa conta com um banco de dados de sequencias do gene 16S rRNA de trabalhos desenvolvidos na UEFS a partir de amostras coletadas no litoral da Bahia, e selecionados seis microrganismos associados à produção de biossurfactantes.

2. Levantamento de dados do NCBI e UNIPROT

Levantamento de dados no NCBI, encarregado de criar sistemas automatizados para armazenar e analisar conhecimentos sobre biologia molecular, bioquímica e genética, através de seu acervo de artigos foi correlacionado na área de nucleotídeo a *Glucose-1-phosphate thymidyltransferase* e os microrganismos selecionados

Levantamento de dados do UNIPROT, através da ferramenta do UniProt Knowledgebase (UniProtKB) que é o hub central para a coleta de informações funcionais sobre proteínas, com anotações precisas, consistentes e ricas. Utilizando o acervo de artigos revisados e não revisados foi realizada uma pesquisa ampla de estudos com a *Glucose-1-phosphate thymidyltransferase*, correlacionando aos microrganismos selecionados, localizando posteriormente se foram encontrados genes específicos para essa relação.

3. Seleção de possíveis organismos ou consórcios

Posteriormente à análise dos dados obtidos, os mesmos foram culminados em tabelas comparativas para melhor compreensão e seleção de organismos e consórcios. Foram avaliados também potenciais genes a serem testados.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO (ou Análise e discussão dos resultados)

Os biossurfactantes atuam melhor que surfactantes petroquímicos em condições atípicas de temperatura, salinidade e pH (Banat, 1995; Mulligan, 2005). Porém, o seu alto custo de produção dessas moléculas ainda não permitiu que atingissem maior participação no mercado global, Silva (2017). Com o levantamento realizado por este trabalho é possível suprir parte dessa problemática evitando testes aleatórios de compatibilidade para encontrar a melhor seleção, através de um levantamento de estudos já realizados e anexados em bancos de dados como o NCBI e o UNIPROT foi possível confeccionar um grupo de informações (tabela 1 e 2) comparativos, que serviram de parâmetro para a seleção de possíveis microrganismos e genes

Tabela 1. Número de estudos com Glucose-1-phosphate thymidyltransferase

Nome / Táxon	Estudos no NCBI (Nucleotide)	Estudos no UNIPROT (Não revisados)	Estudos no UNIPROT (Revisados)
<i>Pseudomonas cedrina</i>	3	2	0
<i>Bacillus cereus</i>	486	414	0

<i>Brevibacillus brevis</i>	9	6	0
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	9	8	0
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	7	6	0
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	9	8	0

Legenda: 1. Estudos não revisados: não foram manualmente anotados e revisados por curadores UniProtKB (seção TrEMBL)., 2. Estudos revisados: foram manualmente anotados e revisados por curadores UniProtKB (seção Swiss-Prot)

É possível extrair desse primeiro levantamento que *Bacillus cereus* possui o maior volume de referência bibliográfica deste grupo em associação à Glucose-1-phosphate thymidyltransferase, seguido de *Stenotrophomonas rhizophila* e *Brevibacillus brevis*, sendo um provável conjunto de microorganismos produtor de RLs.

A síntese desses em *P. aeruginosa* se dá pela convergência de duas vias metabólicas, sendo a parte hidrofóbica proveniente da via de síntese de novo de ácidos graxos e a parte hidrofílica do operon RmlABCD (Reis et al., 2011). Em maiores detalhes, a primeira via para produção de RLs se dá pela conversão do metabólito central D-glicose-1-fosfato em dTDP-Rha, feita pelas enzimas RmlA (Glicose-1-fosfato timidiltransferase), RmlB (dTDP-glicose 4,6-desidratase), RmlC (dTDP-4-desidroramnose 3,5-epimerase) e RmlD (dTDP-4- 20 desidoramnose redutase). As subunidades RhlA e RhlB formam a enzima ramnosiltransferase 1, responsável por desviar o intermediário beta-hidroxiacil-ACP da via de biossíntese de ácidos graxos de novo para sintetizar HAAs e então ligá-los a uma molécula de dTDP-Rha, resultando em mono-RLs. A enzima RhlC (ramnosiltransferase 2) é responsável por ligar mais uma molécula de dTDP-Rha a mono-RLs previamente sintetizados, resultando em di-RLs. (Reis et al., 2013).

Tabela 2. Número de estudos com genes específicos para possível produção de biossurfactante

Nome / Táxon	Genes possíveis de produção (UNIPROT)		
	rfbA(rmlA)	rfbB(rmlB)	rfbC(rmlC)
<i>Pseudomonas cedrina</i>	1	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	73	0	0
<i>Brevibacillus brevis</i>	0	0	0
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	2	0	0
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	1	0	0
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	2	0	0

Legenda: 1. rfbA(rmlA) ligada à Glucose-1-phosphate thymidyltransferase., 2. rfbB(rmlB) ligada à dTDP-glicose 4,6-dehidratase 1., 3. rfbC(rmlC) ligada à dTDP-4-dehidroramnose 3,5-epimerase.

O levantamento de possíveis genes através do UNIPROT demonstrou que o melhor gene para ser usado é o rfbA ou seu homólogo o gene rmlA, correspondente à Glucose-1-phosphate thymidyltransferase, com a exceção para o *Brevibacillus brevis*, que não conteve nenhuma correspondência para os genes rfbA (rmlA), rfbB(rmlB) e rfbC(rmlC) (SILVA, 2017). Assim como na Tabela 1, os indivíduos de *Bacillus cereus* e *Stenotrophomonas rhizophila* possuem grande potencial para produção de biosurfactante. As vantagens da levedura *Stenotrophomonas rhizophila* como hospedeira para produção heteróloga incluem: (i) possui status GRAS (do inglês Generally Regarded as Safe), o que facilita processos de descarte de resíduos e aprovação de produtos e processos; (ii) tolerância a baixo pH, o que garante baixo risco de contaminação bacteriana e elimina a necessidade de neutralizar produtos ácidos; e (iii) tolerância a inibidores fermentativos, como os presentes em hidrolisados de biomassa (Borodina & Nielsen, 2014).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo de levantamento será um guia para uma seleção dos melhores grupos de produção de rhamnolipídeos e bioprodutos, resultando em consórcios melhores, fato importante na etapa experimental de seleção molecular. Consórcios melhores resultam em um aumento de produção. Portanto podemos concluir que com o levantamento seleciona quais microrganismos e os principais gene envolvidos na síntese de bioprodutos. Além disso, fornece informações para etapas de clonagem e modificação genética devem elevar o potencial de produção de biosurfactantes e bioprodutos.

REFERÊNCIAS

- DESAI, J. D. and Banat, I. M., Microbial production of surfactants and their commercial potencial. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61, 47-64 (1997).
- LANG, S., Wullbrandt, D. Rhamnose lipids – biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 51, 22–32 (1999).
- REIS, R. S. et al. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*: a review. *Bioresource technology*, v. 102, n. 11, p. 6377-84, 2011.
- The UniProt Consortium, UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021, *Nucleic Acids Research*, Volume 49, Issue D1, 8 de janeiro de 2021, Pages D480 – D489, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>
- BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. *Bioresource Technology*, v. 51, n. 1, p. 1-12, 1995.
- MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, v. 133, n. 2, p. 183-198, 2005.
- SILVA, Frederico Mendonça Bahia. **Construção de cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de rhamnolipídeos a partir de sacarose**. Orientador: Prof.ª Dr.ª Nádia Skorupa Parachin. 2017. 70 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular.) - Universidade de Brasília, Brasília, 2017.
- REIS, R. S. et al. Biosurfactants: Production and Applications. In: CHAMY, R.; ROSENKRANZ, F. (Ed.) *Biodegradation: Life of Science*. InTech, 2013. p. 31- 61.
- SCHMIDBERGER, A. et al. Expression of genes involved in rhamnolipid synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in a bioreactor cultivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 97, n. 13, p. 5779-91, 2013.
- BORODINA, I.; NIELSEN, J. Advances in metabolic engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for production of chemicals. *Biotechnology Journal*, v. 9, n. 5, p. 609-629, 2014.
- Rossi, Gabriel Augusto Marques, et al. “*Bacillus cereus* group: genetic aspects related to food safety and dairy processing”. *Arquivos do Instituto Biológico*, vol. 85, nº 0, novembro de 2018. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1590/1808-1657000232017>.
- Wang, Yanchun, et al. “Highly Efficient Genome Engineering in *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* Using the CRISPR/Cas9 System”. *Frontiers in Microbiology*, vol. 10, agosto de 2019, p. 1932. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01932>.