

USO DA TÉCNICA DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL NA DETERMINAÇÃO DA DEGRADABILIDADE DO BIOPOLÍMERO PHB

USE OF THE MOST PROBABLE NUMBER TECHNIQUE FOR DETERMINING PHB BIOPOLYMER DEGRADABILITY

Wender Cardoso Silva^{1,2}; Paulo Henrique Graziotti^{1,3}; Vivian Machado Benassi^{1,2}; Juan Pedro Bretas Roa^{1,2}; Arlete Barbosa dos Reis*^{1,2,4}

¹ UFVJM-Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

² ICT-Instituto de Ciência e Tecnologia/BC&T

³ Curso de Engenharia Florestal

⁴ Curso de Engenharia Química

*Autor correspondente: arlete.reis@ict.ufvjm.edu.br

RESUMO

A justificativa da constante busca pela substituição de plásticos convencionais por biodegradáveis está embasada na necessidade de assegurar a degradação de materiais poliméricos que atendam, sobretudo, às exigências na redução de impactos ambientais. Entre as formas de se antepor à possibilidade de uso de materiais plásticos está a avaliação destes quanto a à biodegradabilidade. Dentre os métodos de quantificação, é possível avaliar a existência de micro-organismos que venham a auxiliar a decomposição destes em diversos meios a que venham ser dispostos. No presente trabalho, foi utilizada a metodologia de determinação do número mais provável (NMP), possibilitando quantificar a população de micro-organismos do solo capaz de degradar o material polimérico. Para a realização do experimento foi feito o plaqueamento em três meios de cultura específico para bactérias, fungos e actinobactérias. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação da biodegradabilidade do polímero poli-3-hidroxibutirato (PHB) por micro-organismos do solo. A metodologia empregada mostrou-se eficaz para determinar a biodegradabilidade do polímero PHB observando o desenvolvimento de micro-organismos submetidos à redução de fonte energética. Os testes mostraram, posteriormente, a formação de regiões com clareamento em torno de colônias microbianas, indicando biodegradação, o que possibilita maiores estudos a respeito destes micro-organismos.

Palavras-chave: Polímeros. Biodegradação. NMP. Actinobactérias. Micro-organismo.

ABSTRACT

The justification for the constant search for replacing conventional plastics by biodegradables is based on the necessity of ensure the degradation of polymeric materials that satisfy mainly the requirements of environmental impacts reduction. One of the ways to overcome the possibility of use of plastic materials is its evaluation in terms of biodegradability. Among the quantification methods, it is possible to evaluate the existence of microorganisms that may assist the polymers decomposition in different media. In the present work, the most probable number determination methodology (NMP) was used, making possible to quantify the population of soil microorganisms qualified to degrade the polymeric material. The experiments were carried out plating the polymer in three culture media specific for bacteria, fungi and actinobacteria. In this context, the present work aimed to evaluate the biodegradability of the poly-3-hydroxybutyrate (PHB) by soil microorganisms. The employed methodology proved to be effective in determination of the PHB biodegradability by observing the development of microorganisms while the energy sources were reduced. The tests showed posteriorly the formation of regions with clearing around microbial colonies, being indicative of biodegradation, which allows further studies on these microorganisms.

Keywords: Polymers. Biodegradation. NMP. Actinobacteria. Microorganism.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente muitos estudos voltam-se para a análise de biodegradação de polímeros, ou seja, análise da degradação dos materiais poliméricos através da ação de organismos vivos [1]. Diferentemente dos processos de degradação biotecnológica de macromoléculas de origem renovável como a celulose e o amido, cujos mecanismos são bem conhecidos [2]; [3], há ainda muito a se elucidar sobre a degradação de polímeros de origem sintética. Uma vez que, há uma preocupação em substituir os atuais polímeros, nocivos ao meio ambiente, por polímeros biodegradáveis. Dessa forma, a utilização de métodos que permitam avaliar a biodegradabilidade de um polímero e a classe de micro-organismos capazes de degradá-lo pode contribuir com os estudos e orientação de descarte de materiais plásticos.

Segundo estabelecido pela *American Standard for Testing and Methods* [4], polímeros biodegradáveis são polímeros degradáveis primariamente pela ação de micro-organismos. Esses organismos, naturalmente encontrados no solo, são comumente denominados de comunidade microbiana, sendo constituídos por populações variadas, cujas relações ecológicas não são fáceis de serem caracterizadas, uma vez que o solo e a comunidade microbiana são heterogêneos e difíceis de serem amostrados uniformemente [5].

Torna-se evidente que a participação dos micro-organismos no processo de degradação venha a ser de grande importância, o que instiga avaliar a biodegradabilidade de sistemas poliméricos formados a partir de polímeros de origem sintética, como o polietileno (PE) e o poli(tereftalato de etileno) (PET). Logo, faz-se necessário a realização de estudos mais aprofundados, até mesmo a biodegradação de polímeros de origem renovável, como os da classe dos polihidroxicanoatos.

Os polímeros a base de PHAs têm recebido interesse industrial devido à sua utilização como plásticos biodegradáveis e biocompatíveis [6], [7], [8]. Dentre os PHAs, o poli(3-hidroxiбутирато) (PHB) é o mais estudado, sendo sintetizado por micro-organismos fermentadores, que metabolizam o açúcar presente no meio e acumulam o PHB na célula como reserva energética [9].

Vale citar que, a biodegradação do PHB leva à formação de CO₂ e biomassa por bactérias, fungos e leveduras em diversificados meios como: solo, lodos anaeróbios, lodo ativado, entre outros [10], [11].

As pequenas dimensões dos micro-organismos e a distribuição descontínua dos mesmos no solo exigem que sejam utilizados métodos específicos nas avaliações quantitativas da comunidade microbiana. Para tanto, existem variados métodos já conceituados de avaliação

da degradação de polímeros, como, por exemplo, o método respirométrico, onde a biodegradabilidade de polímeros é analisada e quantificada a partir da emissão de CO₂ de um sistema [12], [13]. Entretanto esses métodos exigem maior tempo e quantidade de materiais que geram mais custos na avaliação. Dada a ampla gama de polímeros passíveis de degradação e a diversidade dos mecanismos de hidrólise dessas macromoléculas são, em parte, responsáveis pelos diferentes métodos empregados para o acompanhamento dos processos de biodegradação [14]. Considerando que, de modo geral, os principais produtos da degradação biológica de polímeros são, na maioria das vezes, biomassa microbiana, água e dióxido de carbono [15]. O PHB, por sua vez, sendo biodegradável em ambas as condições, aeróbicas e anaeróbicas [16], no presente trabalho, nos possibilitou a utilização do método de quantificação nativa de micro-organismos do solo que sejam capazes de degradar o material polimérico, a técnica do Número Mais Provável (NMP).

Na técnica do NMP, a biodegradabilidade do material é observada em função do desenvolvimento de micro-organismos submetidos à redução de fonte energética, sendo esse método uma variação do plaqueamento por gotas [17], metodologia também utilizada por outros autores e adaptada para fins distintos. A exemplo de [18], na quantificação de espécies. [19], por exemplo, realizaram trabalho utilizando o método NMP onde, após isolamento e identificação das cepas positivas levando em conta o número de alíquotas positivas referentes às diversas diluições utilizadas. [20], utilizaram a mesma metodologia de coliformes totais e coliformes termotolerantes, mais precisamente na quantificação de Unidades Formadoras de Colônias.

Neste contexto, o presente trabalho objetivou apresentar um método alternativo de avaliação da biodegradabilidade de polímeros baseado na determinação do NMP de micro-organismos do solo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Para o desenvolvimento do presente trabalho, foram utilizados os seguintes materiais: amostras de biopolímero PHB, gentilmente cedido pela empresa PHB Industrial/SP; meios de cultura para actinobactérias, bactérias e fungos; amostras de solo e vidrarias em geral.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparo dos meios de cultura

Os meios de cultura Ágar nutriente, Meio de Martin (1950) [21], e Amido caseína foram usados para crescimento de bactérias, fungos e actinobactérias, respectivamente. Avaliou-se três grupos de micro-organismos com as seguintes modificações dos meios: (i) fonte de carbono do grupo controle de acordo com a descrição do meio; (ii) substituição da fonte de carbono por PHB (PHB Industrial, SP; Mw = 600 kDa (Quilodalton)) na quantidade de 2 % em massa; e (iii) sem adição de fonte de carbono.

Para a determinação da quantidade de bactérias utilizou-se o meio de cultura Ágar nutriente, composto por 500 mL água, 5,0 g ágar, 1,5 g extrato de carne, 5,0 g NaCl e 2,5 g peptona, a partir do qual reduziu-se 1/3 do extrato de carne e peptona e preparou-se mais dois meios com as seguintes composições: (i) 500 mL água, 5,0 g ágar, 0,5 g extrato de carne, 5,0 g NaCl, 0,83 g peptona, e 10 g PHB; e (ii) 500 mL água, 5,0 g ágar, 0,5 g extrato de carne, 5,0 g NaCl e 0,83 g peptona.

O meio de cultura típico para fungos foi preparado com base na metodologia de Martin (1950) [21], composto por 500 mL água, 5,0 g ágar, 0,50 g KH_2PO_4 , 0,50 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,5 g peptona, 5,0 g dextrose, e 0,015 g estreptomicina, a partir do meio foram preparados mais dois meios, um deles retirou-se a dextrose e acrescentou 2% de PHB, e em outro meio sem nenhuma fonte de carbono, em ambos houve a redução em 1/3 da concentração de peptona.

Enquanto que, o meio de cultura típico para actinobactérias foi preparado a partir do meio de cultura Amido caseína, constituído por 500 mL água, 5,0 g amido, 0,15 g caseína, 1,0 g KNO_3 , 1,0 g NaCl, 1,0 g KH_2PO_4 , 0,025 g MgSO_4 , 0,005 g FeSO_4 , e 9,0 g ágar, a partir do meio foram preparados dois meios, em um deles retirou-se o amido e acrescentou-se 2% de PHB, e em outro retirou-se o amido, sendo que em ambos foi extraída a caseína.

2.2.2. Preparo das amostras de solo

As amostras do solo foram coletadas de acordo com [22], na horta da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri-UFVJM *campus* JK, Diamantina, Minas Gerais. Diluídas na proporção de 10 g de solo em 90 mL de solução NaCl a 0,85%, posteriormente, realizaram-se diluições sucessivas com alíquotas de 1,0 mL da suspensão e 9,0 mL de NaCl

0,85% até o fator de 10^{-3} para fungos, e 10^{-6} para bactérias e actinobactérias. Verteu-se 15 mL de meio de cultura em placa de Petri, sendo o total de 8 repetições para cada diluição estudada.

2.2.3. Análise do teor de umidade do solo

As amostras foram peneiradas (2 mm) e mantidas sob refrigeração ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) até o momento de suas análises. Utilizaram-se cinco amostras de 20g do solo úmido, sendo colocadas na estufa da marca Hafoseries 1600, à 180°C . Após 24 horas, o solo seco foi novamente pesado, considerando estes valores a umidade de cada amostra obtida a partir da equação 1 :

$$U = PU - PS \quad (1)$$

Onde:

U = umidade do solo; PU = peso úmido do solo e PS = peso seco do solo

2.2.4. Inoculação

O inóculo foi realizado utilizando-se 15 gotas de 0,04 mL das diferentes diluições da solução salina de NaCl 0,85% acrescido do solo. As concentrações de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} foram adicionadas ao meio de cultura para fungos e as concentrações de 10^{-5} e 10^{-6} foram adicionadas ao meio de cultura para bactérias. Após a inoculação, as placas foram incubadas à 28°C , durante 7 dias, para a determinação de crescimento de fungos e actinobactérias, e 48 h para as bactérias, em seguida procederam-se as leituras de desenvolvimento (positivo), ou não desenvolvimento (negativo).

2.2.5. Quantificação de micro-organismos

A quantificação dos micro-organismos foi realizada através da determinação do NMP pelo método de plaqueamento por gotas, usado por [17]. Os cálculos para obtenção dos valores finais da leitura do NMP, seguiu orientações citadas por [23], conforme os cálculos a seguir:

A percentagem da umidade foi obtida através da equação 2:

$$\%U = U * 100 \quad (2)$$

Onde;

$\%U$ = percentagem da umidade do solo; U = umidade do solo e FC = fator de correção foi calculado a partir da equação 3:

$$FC = 100 / (100 - \%U) \quad (3)$$

Onde;

FC = fator de correção e $\%U$ = percentagem da umidade do solo.

O valor da leitura final dos fungos foi obtido através da utilização da equação 4:

$$LF = 10 * NMP * FC * 10^4 \quad (4)$$

Onde;

LF = valor da leitura final para os fungos; NMP = média do número mais provável das duas repetições da amostra e FC = fator de correção

O valor da leitura final das bactérias foi obtido através da utilização da equação 5:

$$LB = 10 * NMP * FC * 10^7 \quad (5)$$

Onde;

LB = valor da leitura final para as bactérias; NMP = média do número mais provável das duas repetições da amostra e FC = fator de correção

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

No intuito de comprovar a biodegradabilidade do PHB, foram realizados ensaios de biodegradabilidade em solo utilizando-se a técnica comparativa do NMP. Para tanto, foi observado o crescimento de cada grupo de micro-organismos nos diferentes meios de cultura preparados. De acordo com os demonstrativos gráficos foi possível comparar a quantidade de micro-organismos que cresceram com a presença de PHB.

Para o grupo de bactérias (Figura 1), percebeu-se maior tendência de degradação do PHB em relação aos outros grupos (Figura 2 e 3). As médias do NMP com o meio contendo PHB para os grupos com fungos e actinobactérias foram menores que os respectivos meios típicos. Para o grupo de fungos, quanto ao NMP, os resultados comparativos não mostraram diferenças expressivas entre os meios com PHB e sem dextrose. O NMP para o grupo de actinobactérias foi menor que os meios de cultura: típico e sem amido.

No intuito de verificar a eficiência da técnica do NMP para as bactérias, foram utilizados os meios de cultura de ágar nutriente (AN), ágar com redução da fonte de carbono (AN - FC) e ágar com redução da FC e adição de PHB (AN - FC + PHB) (Figura 1). Para o grupo de bactérias, percebeu-se maior tendência de degradação do PHB em relação aos outros grupos, tal como pode ser visto na Figura 1.

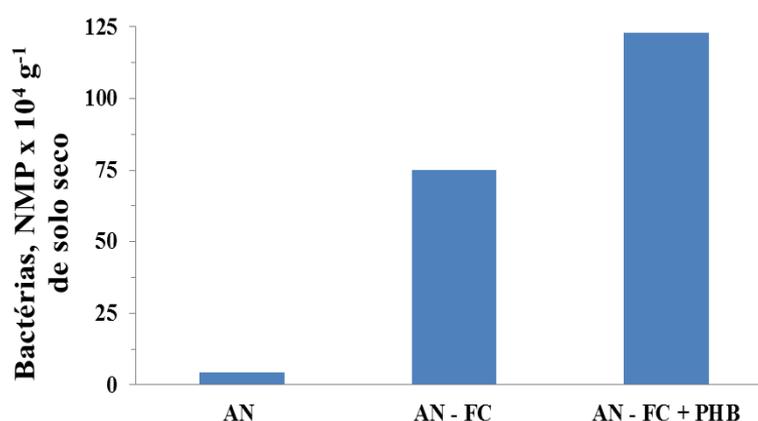


Figura 1 - Gráfico de NMP – Meio de cultura para bactérias. (Fonte: Autor, 2020).

Para a análise da eficiência da técnica do NMP para Fungos, foi utilizado o meio de Martin (Martin, 1950) [21], Martin com remoção da Dextrose (Martin - Dextrose) e Martin com remoção de Dextrose e adição de PHB (Martin - Dextrose + PHB) (Figura 2). Conforme ilustra a Figura 2, para o grupo de fungos, quanto ao NMP, os resultados comparativos não mostraram diferenças significativas entre os meios com PHB e sem dextrose.

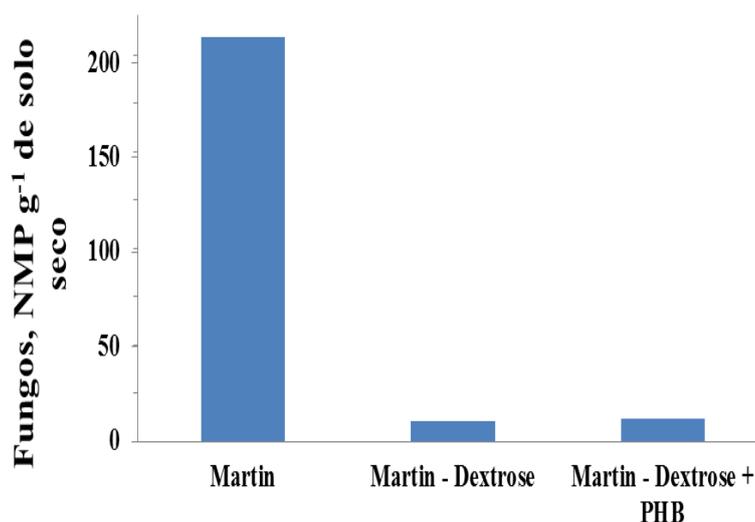


Figura 2 - Gráfico de NMP – Meio de cultura para fungos. (Fonte: Autor, 2020).

Para a análise do comportamento da técnica do NMP para actinobactérias, foi realizado o ensaio utilizando-se o meio de cultura de amido caseína (AC), amido caseína com remoção do Amido (AC - amido) e amido caseína com remoção do Amido e adição de PHB (AC - Amido + PHB) (Figura 3). Conforme ilustra a Figura 3, o resultado do NMP no meio com PHB foi menor do que os valores obtidos para os meios típico e típico sem amido (Figura 3).

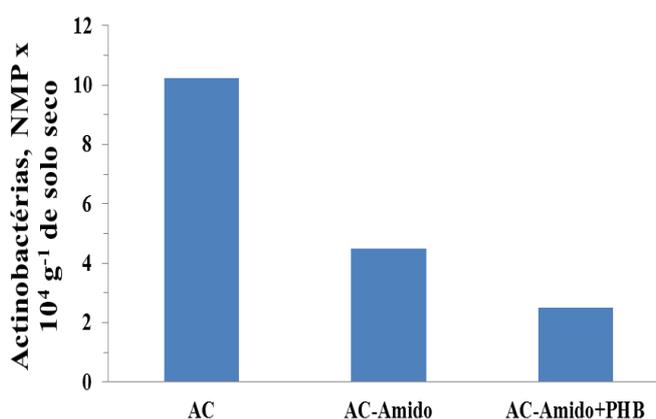


Figura 3 - Gráfico de NMP – Meio de cultura para actinobactérias. (Fonte: Autor, 2020).

O solo analisado possuía comunidade microbiana com habilidade natural de degradar o polímero usado. Assim, a técnica demonstrou-se eficiente para detectar micro-organismos com habilidade natural para biodegradar o polímero. Foi possível perceber a degradação do PHB

por meio da metodologia utilizada. Notou-se variação da quantidade de micro-organismos em relação às modificações do meio e na presença de PHB.

Para o grupo de bactérias, percebeu-se maior tendência de degradação do PHB em relação aos outros grupos. As médias do NMP com o meio de cultura contendo PHB para os grupos com fungos e actinobactérias foram menores que o meio de cultura típico. Para o grupo de fungos, quanto ao NMP, os resultados comparativos não mostraram diferenças expressivas entre os meios com PHB e sem dextrose. O NMP para o grupo de actinobactérias foi menor que nos meios típico e sem amido.

Os testes feitos com bactérias demonstraram que o PHB beneficiou o aumento de sua população. Os testes feitos com fungos e actinobactérias demonstraram que o polímero se mostrou seletivo para o crescimento desses micro-organismos.

4. CONCLUSÕES

Os resultados mostraram diferenças expressivas no NMP de bactérias em relação aos outros grupos. A metodologia empregada mostrou-se eficaz para determinar a biodegradabilidade do polímero PHB observando o desenvolvimento de micro-organismos submetidos à redução de fonte energética. Os testes mostraram, posteriormente, formação de regiões com clareamento em volta de colônias microbianas que é um forte indicativo de biodegradação o que possibilita maiores estudos a respeito destes micro-organismos.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao apoio do LABSOLO - Laboratório de Microbiologia do solo; e ao GEPAEQ-Grupo de Estudos e Pesquisas Aplicadas à Engenharia Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri-UFVJM.

6. REFERÊNCIAS

[1] FECHINE, G. J. M. **Polímeros biodegradáveis: tipos, mecanismos, normas e mercado mundial**. Scielo - Editora Mackenzie, 2013.

- [2] CASTRO, H. F.; CLASSEN, A. T.; AUSTIN, E. E.; NORBY, R. J.; SCHADT, C. W. **Soil Microbial Community Responses to Multiple Experimental Climate Change Drivers**. Applied and environmental microbiology. v. 76, p. 999-1007, 2010.
- [3] CINELLI, M.; COLES, S. R.; KIRWAN, K. **Analysis of the potential of multi criteria decision analysis methods to conduct sustainability assessment**. Ecological Indicators. n.46, p.138-148, 2014.
- [4] AMERICAN STANDARD FOR TESTING AND METHODS - ASTM D883-12 - **American Society for Testing and Materials** - Standard Terminology Relating to Plastics, 2012.
- [5] ROCHA, R. DE C. D. S. **Quitosana na indução de resistência ao tombamento de plântulas de espécies olerícolas e no controle de fitopatógenos in vitro**. 68 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2015.
- [6] COSTA, C. Z. **Degradação microbiológica e enzimática de polímeros: uma revisão**. Química Nova, v. 38, n. 2, p. 259, 2015.
- [7] POUTON, C. W.; AKHTAR, S. **Biosynthetic polyhydroxy alcanoates and their potential in drug delivery**. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 18, n. 2, p. 133-162, 1996.
- [8] JIANG, Y.; HEBLY, M.; KLEEREBEZEM, R.; MUYZER, G.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. **Metabolic modeling of mixed substrate up take for polyhydroxy alcanoate (PHA) production**. Water Research, v. 45, n. 3, p. 1309-1321, 2011.
- [9] KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. **Recent advances in microbial polyhydroxy alcanoates**. Process Biochemistry, v. 40, n. 2, p. 607-619, 2005.
- [10] ROSA, D. S. **Avaliação da Biodegradação de Poli- β -(Hidroxibutirato), Poli- β -(Hidroxibutirato-co-valerato) e Poli- ϵ -(caprolactona) em solo compostado**. Polímeros: Ciência e Tecnologia, v. 12, n. 4, p. 311-317, 2002.

- [11] FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. **Polímeros biodegradáveis-uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos**. Química Nova, v. 29, n. 4, p. 811, 2006.
- [12] FECHINE, G. J. M.; AMBRÓSIO, F. B.; ALVES, D. A. **Estudo da biodegradabilidade de polímeros por meio do Respirômetro de Bartha**. Revista Mackenzie de Engenharia e Computação, v. 11, n. 1, 2012.
- [13] COELHO, N. S.; ALMEIDA, Y. M. B; VINHAS, G. M. **A Biodegradabilidade da Blenda de Poli (β -Hidroxibutirato-co-valerato) Amido Anfótero na Presença de Microorganismos**. Polímeros: Ciência e Tecnologia, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 270-276, 2008.
- [14] COSTA, C.Z.; ALBUQUERQUE, M.C.C.; BRUM, M.C.; CASTRO, A.M. **Degradação microbiológica e enzimática de polímeros: Uma Revisão**. Química Nova, v.38, n.2, p.259-267, 2015. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140293>
- [15] MOSANENZADEH, S.G.; NAGUIB, H.E.; PARK, C.B.; ATALLA, N. **Effect of biopolymer blends on physical and Acoustical properties of biocomposite foams**. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 52(15), 1002–1013, 2014. doi:10.1002/polb.23522
- [16] BAHL, S.; DOLMA, J.; JYOT S. J.; SEHGAL, S. **Biodegradation of plastics: state of the review**. *Materials Today: Proceedings*, 2020. Doi: 10.1016/j.matpr.2020.06.096
- [17] JAHNEL, M. C.; CARDOSO, E. J. B. N.; DIAS, C. T. S. **Determinação do número mais provável de micro-organismos do solo pelo método de plaqueamento por gotas**. Revista brasileira de ciência do solo, v. 23, n. 3, p. 553-559, 1999.
- [18] BARROS, G.C.; VIANNI, M.C.E. **Vibrio parahaemolyticus: isolamento e identificação em águas da Baía de Guanabara**. Rev. Latinoam. Microbiol., México, v. 22, p. 163-169, 1980.
- [19] SERRA, C. L. M.; CAVALCANTE, P. R. S.; NASCIMENTO, L. M. A.; NASCIMENTO, A. R.; DINIZ, S. C. C. S. **Avaliação de parâmetros físicos e químicos e pesquisa de Vibrio**

parahaemolyticus em águas do estuário do rio Anil (São Luís, Estado do Maranhão). Acta Scientiarum. Biological Sciences Maringá, v. 25, no. 2, p. 261-266, 2003.

[20] VALIATTI, T.B.; SOBRAL, F. O. S.; DEGEN, A.N.; FERREIRA, V.; BARCELOS, I.B.; ROMÃO, N. F.; MARSON, R.F. **Microbiological analysis of açaí-based drinks marketed by street vendors in the city of Ji-Paraná-Rondônia, Brazil**. SAJEBTT, Rio Branco, UFAC v.6 n.2, p. 268-276, Edição ago/dez. 2019.

[21] MARTIN, J.P. Used of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungus. Soil Sci., n. 134, 1528-1529, 1950.

[22] HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Embrapa-Serviço de Produção e Informação, 1994.

[23] SCHINNER, F.; ÖHLINGER, R.; KANDELER, E.; MARCESIN, R. **Methods in Soil Biology** (Eds.), 1996.