

## V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

### **Caracterização da Superfície de *Clostridium carboxidivorans* através de Teste de Adesão Microbiana a Solventes**

**Fabiana M. B. Coelho<sup>1</sup>, Roberta R. R. Ribeiro<sup>1</sup>, Priscilla F. F. Amaral<sup>1</sup> e Tatiana F. Ferreira<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro – Escola de Química - Departamento de Engenharia Bioquímica  
Av. Athos da Silveira Ramos, 149, Lab E-123 - CEP 21941-909 Rio de Janeiro - RJ - E-mail:  
(robertadosreisribeiro@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro – Escola de Química - Departamento de Processos Orgânicos  
Av. Athos da Silveira Ramos, 149, E-208 - CEP 21941-909 Rio de Janeiro - RJ

#### **RESUMO**

*Apesar dos estudos relacionados ao uso da bactéria *Clostridium carboxidivorans* para a fermentação de gás de síntese, pouco se sabe sobre as características de sua superfície celular, bem como sobre sua interação com demais solventes e superfícies. Assim, o presente trabalho se propôs a realizar uma caracterização da superfície dessa bactéria através de um Teste de Adesão Microbiana a Solventes (MATS) revelando seu caráter hidrofóbico, seu Caráter Doador de Elétrons (EDC) e seu Caráter Aceptor de Elétrons (EAC). A bactéria *C. carboxidivorans* apresentou uma hidrofobicidade de 20,2% e um EDC de 21,4%, porém não apresentou um Caráter Aceptor de Elétrons (EAC), comportamento indicado pelo valor negativo.*

**Palavras-chave:** Fermentação, Bactéria, *Clostridium carboxidivorans*, MATS, membranas, hidrofobicidade

#### **INTRODUÇÃO**

Biofilmes microbianos têm sido cada vez mais estudados devido aos benefícios adquiridos pelas células quando imobilizadas, como resistência a danos por UV, por gradientes de pH e tensão de cisalhamento, o que aumenta a variedade de condições operacionais em biorreatores (GROSS; SCHMID; BUEHIER, 2012). A formação do biofilme se dá em oito passos sugeridos por Characklis e Marshall (1990). Em uma das etapas iniciais, as células livres aderem reversivelmente a uma camada "condicionada", base da formação do biofilme e formada através de forças gravitacionais ou do fluido por várias moléculas orgânicas e inorgânicas. Acredita-se que essa adesão inicial ocorra através de forças de van der Waals e interações eletrostáticas explicadas pela teoria Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) (GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008).

*Clostridium carboxidivorans* é uma bactéria estritamente anaeróbia e gram-positiva (PANTALÉON et al., 2014) que é capaz de fermentar gás de síntese produzindo etanol, acetato, butirato e outros subprodutos (HICKEY et al., 2008). Estudos tem mostrado que essa fermentação apresenta fatores limitantes de transferência de massa e que o uso de células imobilizadas em membranas possibilitou contornar essa limitação (SHEN; BROWN; WEN, 2014; GROSS; SCHMID; BUEHIER, 2012; HICKEY et al., 2008). Entretanto, pouco se sabe sobre as

características da superfície celular da bactéria *C. carboxidivorans* e como isso pode afetar a adesão a membranas. De forma a contornar essa dúvida testes como MATS (Adesão Microbiana a Solventes), Adesão à Poliestireno, HIC (Cromatografia de Interação Hidrofóbica), Potencial Zeta, CAM (Medição do Ângulo de Contato) e outros podem ser feitos (AMARAL et al., 2006).

Dessa forma, o presente trabalho visa estudar a afinidade da superfície celular da bactéria *Clostridium carboxidivorans* a diferentes solventes através do teste MATS.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

Células de *Clostridium carboxidivorans* DSMZ 15243 foram cultivadas em shaker a 150 rpm, 37 °C por 24 horas em meio ATCC 2713 com pH 7,1. Este é composto por triptona (10,00 g/L), peptona de digestão pancreática de gelatina (10,00 g/L), extrato de lêvedo (5,00 g/L), glicose (1,00 g/L), cloreto de sódio (5,00 g/L), L-arginina (1,00 g/L), piruvato de sódio (1,00 g/L), menadiona (0,0005 g/L) e hemina (0,005 g/L). Ao meio foi purgado gás de síntese, substrato gasoso composto de H<sub>2</sub> (40%), CO (25%), CO<sub>2</sub> (10%), N<sub>2</sub> (10%) e CH<sub>4</sub> (11%).

O teste MATS segue o procedimento descrito por Amaral et al. (2006) com modificações para a bactéria. As células foram ressuspensas em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0) e a densidade ótica foi determinada em espectrofotômetro a 600nm. A suspensão foi diluída até uma densidade ótica (D.O.) de 0,750. Uma mistura de 0,6 ml de solvente e 3,6 ml de suspensão celular foi agitada em vórtex por 50 segundos. Após 10 minutos de repouso, a densidade ótica foi medida novamente e a porcentagem de adesão a cada um dos solventes foi calculada de acordo com  $\% \text{ adesão} = 1 - \frac{A}{A_0}$ , onde  $A_0$  e  $A$  são as densidades óticas (D.O.) antes e depois da mistura, respectivamente.

Os solventes utilizados foram hexadecano, clorofórmio, éter etílico e hexano, todos obtidos pela Vetec Química Fina Ltda.

Através do teste MATS é possível quantificar as interações ácido-base de Lewis (Amaral et al., 2006) bem como a hidrofobicidade, que é calculada em relação à adesão celular em hexadecano. O Caráter Doador de Elétrons (EDC) é calculado pela diferença da adesão celular em clorofórmio, que é o elétron aceptor (ácido de Lewis), e hexadecano. O Caráter Aceptor de Elétrons (EAC) é estabelecido pela diferença da adesão celular em éter, que é um elétron doador (base de Lewis), e o hexano.

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

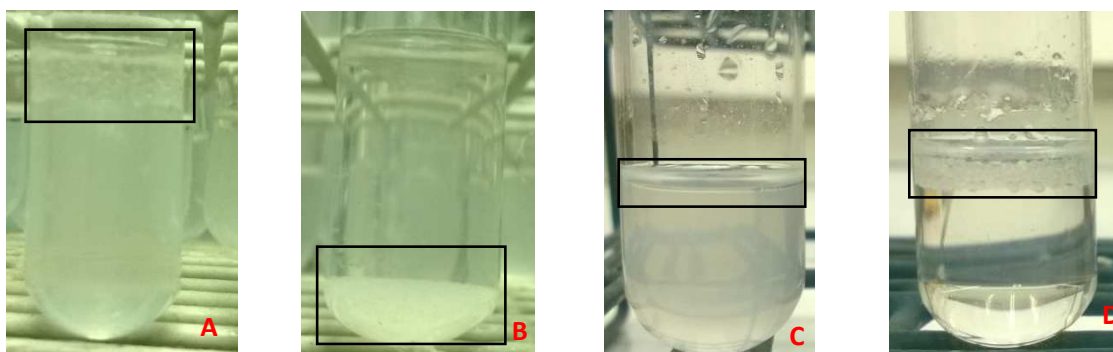
O teste MATS avalia a afinidade de um microrganismo a dois solventes diferentes, um monopolar e outro apolar (Amaral et al., 2006) através da porcentagem de adesão de células. Utilizando-se hexadecano foi possível determinar a hidrofobicidade da bactéria *Clostridium carboxidivorans*, enquanto clorofórmio, éter etílico e hexano foram utilizados para determinar o caráter doador e aceptor de elétrons do micro-organismo, como mostra a Tabela 1.

**Tabela 1-** Porcentagem de adesão das células de *Clostridium carboxidivorans* aos solventes hexadecano, clorofórmio, éter etílico e hexano.

	<b>Hexadecano</b>	<b>Clorofórmio</b>	<b>Éter etílico</b>	<b>Hexano</b>
<i>Clostridium carboxidivorans</i>	20,2%	41,6%	12,8%	89,2%

A Tabela 1 apresenta os valores de adesão celular aos quatro solventes testados, demonstrando a afinidade da bactéria nas respectivas misturas suspensão-solvente. Observa-se que *C. carboxidivorans* apresenta maior afinidade ao tampão quando em presença de hexadecano e éter etílico, enquanto apresenta uma grande afinidade ao solvente hexano, que é um hidrocarboneto com característica hidrofóbica.

Na Figura 1 é possível observar claramente a variação de afinidade entre solvente e tampão fosfato para as diferentes misturas. Na mistura suspensão-hexano, observa-se que a fase aquosa contendo tampão está quase límpida quando comparada às demais misturas. A turbidez na suspensão é muito forte na mistura suspensão-éter etílico e suspensão-hexadecano, o que corrobora com as porcentagens achadas na Tabela 1.



**Figura 1-** Aspecto da mistura suspensão-solvente entre *Clostridium carboxidivorans* e hexadecano (A), clorofórmio (B), éter etílico (C) e hexano (D)

A partir dos valores da porcentagem de adesão é possível calcular três parâmetros importantes para análise da superfície celular da bactéria *C. carboxidivorans* utilizando o teste MATS. Hidrofobicidade, EDC e EAC estão resumidos na Tabela 2. O Caráter Doador de Elétrons (EDC), calculado pela diferença de adesão celular entre clorofórmio e hexadecano, se mostrou significativo (21,4%), enquanto o Caráter Aceptor de Elétrons (EAC), estabelecido pela diferença da adesão microbiana entre éter e hexano, foi baixo (-76,4%).

A hidrofobicidade, medida em relação à adesão de células ao solvente hexadecano, apresentou um valor baixo em relação a estudos anteriores com outros microrganismos. Comparando o resultado com a hidrofobicidade de *Yarrowia lipolytica* (86,5%) quando cultivada em meio YPD por 48 horas em shaker a 160 rpm, a hidrofobicidade de *Clostridium carboxidivorans* (20,2%) foi relativamente baixa, porém próximo ao valor apresentado por *S. thermophilus* (30%) (Amaral et al., 2006). Ainda em comparação, o Caráter Doador de Elétrons de *C. carboxidivorans* foi maior que o apresentado pela levedura (11,1 %), conforme mostrado em Amaral et al., 2006. Contudo, ambas mostraram um pequeno EAC, sendo o caráter aceptor de elétrons da bactéria ainda menor que o da levedura.

**Tabela 2-** Porcentagem da hidrofobicidade, Caráter Doador de Elétrons (EDC) e Caráter Aceptor de Elétrons (EAC) para *C. carboxidivorans*.

	<b>Hidrofobicidade</b>	<b>EDC</b>	<b>EAC</b>
<i>Clostridium carboxidivorans</i>	20,2%	21,4%	-76,4%

É possível afirmar previamente que a superfície dessa bactéria apresenta um caráter pouco hidrofóbico. Contudo, como visto no artigo de Amaral et al. (2006), apenas o teste MATS não é conclusivo o suficiente para determinar com certeza as características dessa bactéria.

### CONCLUSÕES

Foi possível quantificar a hidrofobicidade da superfície da bactéria *Clostridium carboxidivorans* através do teste MATS obtendo-se um valor de 20,2%. Também verificou-se que o Caráter Doador de Elétrons (EDC) desse microrganismo é expressivo (21,4%) principalmente se comparado ao seu Caráter Aceptor de Elétrons (EAC), cujo valor foi negativo.

Contudo, apenas o teste MATS não é suficiente para se adquirir um conhecimento pleno da superfície bacteriana. Apesar de conclusivos, os resultados são apenas um começo para uma caracterização mais profunda.

**Agências de Fomento:** Capes, CNPq e Faperj.

### REFERÊNCIAS

- AMARAL, P. F. F.; LEHOCKY, M.; BARROS-TIMMONS, A. M. V.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; COELHO, M. A. Z.; COUTINHO, J. A. P. Cell surface characterization of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. **Willey InterScience**, v. 23, p. 867-877, 2006. DOI: 10.1002/yea.1405.
- CARDINAL LAW GROUP (Evanston, IL). Robert Hickey, Rathin Datta, Shih-Peng Tsai, Rahul Basu. **Membrane supported bioreactor for conversion of syngas components to liquid products**. US 2008/0305539 A1, 10 jan.2008, 11 dez. 2008.
- CHARACKLIS, W. G.; MARSHAL, K. C. **Biofilms**, John Wiley & Sons, Nova York, p. 341-394, 1990.
- GARRET, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, p. 1049-1056, 2008.
- GROSS, R.; SCHMID, A.; BUEHIER, K. Catalytic Biofilms: A Powerful Concept for Future Bioprocess. EM: LEAR, G., LEWIS, G.D. **Microbial Biofilms: Current Research and Applications**, Caister Academic Press, Norfolk, UK, p. 193-222, 2012.
- PANTALÉON, V.; BOUTTIER, S.; SOAVELOMANDROSO, A. P.; JANOIR, C., CANDELA, T. Biofilms of *Clostridium* species. **Anaerobe**, xxx, p. 1-6, 2014.
- SHEN, Y.; BROWN, R.; WEN, Z. Syngas fermentation of *Clostridium carboxidivorans* P7 in a hollow fiber membrane biofilm reactor: Evaluating the mass transfer coefficient and ethanol production performance. **Biochemical Engineering Journal**, v. 85, p. 21-29, 2014.