

SELEÇÃO POLIFÁSICA DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE POLIHIDROXIALCANOATOS

Amanda L. S. Silva^a, Elane C. L. dos Santos^a, Ítalo A. P. dos Santos^a e Ana M. Q. López^{a,*}^aDepartamento de Química, Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 57072-900 Maceió – AL, Brasil

Recebido em 11/11/2015; aceito em 10/03/2016; publicado na web em 10/05/2016

POLIPHASIC SCREENING OF POLYHYDROXYALKANOATE-PRODUCING MICROORGANISMS. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are fully biodegradable biopolyesters produced by many prokaryotes and accumulated as insoluble cytoplasmic inclusions. The detection of these intracellular granule is usually provided using lipophilic azodyes, which are not specific. Another way to screen PHA-producing bacteria is through culture-independent molecular techniques such Polymerase Chain Reaction (PCR), and the search for new PHA-producer strains is essential to reduce the cost at industrial level. The application of these both methods is desirable. In the present study, 24 bacteria isolated from soil of the Atlantic forest in Maceió (AL, Brazil) and from agri-industrial sludge (Coruripe-AL, Brazil) were studied regarding to their capacity of growing in mineral salt medium, as indicative of PHA synthesis. All strains were submitted to biochemical characterization, whilst PCR has proved that isolates BMA-05, BMA-10, BMA-13 and BDL-07 has the gene *phaC*, which encodes a PHA synthase, the key for PHA synthesis. The amplification and sequencing of their 16S r-DNA region was able to identify these bacteria respectively as *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca* and *Bacillus pumilus*. The same minimal medium supplement with peptone demonstrated to induce growing of those strains.

Keywords: polyhydroxyalkanoate; molecular identification; PhaC synthase.

INTRODUÇÃO

Para ser considerado um plástico degradável, a molécula deve apresentar cadeia com ou sem ramificação ou com grupos funcionais éster, amida ou acetal.¹ Comumente, tais características não são atendidas pelos polímeros sintéticos, e sua degradação no ambiente dá-se muito lentamente. Por outro lado, os plásticos denominados biodegradáveis possuem os requisitos apresentados para tal e por isso são rapidamente decompostos por muitas espécies bacterianas e microalgas. Conforme descrito por Khanna e Srivastava,² distribuem-se em três categorias: a) a dos polímeros sintéticos suscetíveis a degradação e/ou ataque enzimático de microrganismos, mas que não atendem a todas as características necessárias para exploração comercial; b) a dos bioplásticos baseados no polissacarídeo amido, que são parcialmente degradáveis, pois os microrganismos degradam o amido mas não o polímero sintético que faz parte da composição desses produtos; c) a dos polihidroxialcanoatos (PHAs) produzidos por diversos microrganismos e armazenados intracelularmente como inclusões amorfas, mas que são totalmente degradáveis por organismos vivos.

Nesse sentido, desde a década de 90 do século passado, o Brasil vem dedicando um considerável esforço para o desenvolvimento de processos visando a geração em larga escala e utilização de polihidroxialcanoatos (PHAs) em produtos.³ Cerca de 150 monômeros diferentes já foram identificados como constituintes de PHAs produzidos por bactérias a partir de diversas fontes de carbono.⁴ Vale ressaltar que, na maioria das vezes, esse polímero biodegradável é produzido em condições não balanceadas pela limitação de algum nutriente (como fósforo e nitrogênio) e rico na fonte de carbono.⁵ *Cupriavidus necator* (também conhecida como *Wautersia eutropha*, *Ralstonia eutropha* e *Alcaligenes eutrophus*) é a espécie bacteriana mais estudada na produção desses biopolímeros,⁶ mas a busca por outros isolados em amostras ambientais diversas que favoreçam o mesmo tem se intensificado. Do ponto de vista econômico, embora os PHAs apresentem vantagens ambientais sobre os plásticos de

origem petroquímica, seu alto custo de produção, em especial com utilização de fontes de carbono puras, e também de metodologias de extração, ainda limita a aplicação comercial.⁴ Por isso, a busca de substratos ricos em carbono, de baixo custo, e que agreguem a remoção de resíduos poluentes do ambiente, tem aumentado. Diversas pesquisas destacam o uso de melão e caldo-de-cana. Outra opção é o soro de leite, um substrato abundante em laticínios de produção de queijo e caseína,⁵ geralmente descartado de modo a poluir o ambiente ou utilizado como suplemento alimentar ou bebida láctea de baixo valor no mercado.

Este trabalho visou a seleção de bactérias com o gene habilitador da produção de polihidroxialcanoatos entre isolados obtidos em amostras de solo (horizonte A de região selvagem de Mata Atlântica) e de lodo de esgoto da Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) de indústria sucroalcooleira, coletados em Coruripe, litoral Sul de Alagoas (Brasil).

PARTE EXPERIMENTAL

Coleta de amostras de solo e lodo e isolamento de bactérias

A coleta de solo de Mata Atlântica (Coruripe-AL) foi realizada num local onde não há interferência antrópica (10°17'07"S, 36°21'07"W). A camada superior do horizonte "O" foi removida com auxílio de ferramentas de jardinagem e amostras do solo do horizonte "A" foram coletadas, depositadas no interior de tubos tipo Falcon previamente esterilizados e transferidas para caixa de isopor com gelo ($\cong 4^\circ\text{C}$) para o transporte ao laboratório de Bioquímica do Parasitismo e Microbiologia Ambiental (LBPMA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), onde foram mantidas sob refrigeração ($\cong 6^\circ\text{C}$) até seu processamento. As amostras de lodo de lagoa de sedimentação da Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) da "Usina Coruripe Açúcar e Álcool S. A.", localizada no mesmo município, também foram coletadas, acondicionadas em tubos tipo Falcon, preservadas e transportadas para o LBPMA conforme o descrito para amostras do solo. A partir daí, inoculou-se individualmente 4 g de cada amostra em meio mínimo mineral (40 mL) com a seguinte composição e

*e-mail: amql@qui.ufal.br

posterior ajuste do pH para 7,0 (g L⁻¹): (NH₄)₂SO₄, 0,2; KH₂PO₄.7H₂O, 13,3; MgSO₄, 1,3; ácido cítrico, 1,7; solução de elementos traço esterilizada por filtração, 10 mL [FeSO₄.7H₂O, 10; ZnSO₄.7H₂O 2,25; CuSO₄.5H₂O, 1; MnSO₄.5H₂O, 0,5; CaCl₂.2H₂O, 2; Na₂B₄O₇.10H₂O, 0,23; (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 0,1; 35 % HCl, 10 mL] e glicose, 20.⁷ Quando foi necessário utilizar esse meio sólido, acrescentaram-se 20 g L⁻¹ de ágar. Após 72 h de incubação sob agitação orbital (120 rpm, 30 ± 1 °C), as culturas foram submetidas a diluições seriadas e alíquotas dessas diluições reinoculadas em meio sólido Ágar Nutriente com 0,03 g L⁻¹ do antifúngico fluconazol (Medley®).⁸

Características morfobioquímicas das bactérias isoladas

Nos testes para a identificação presuntiva dos isolados bacterianos, foram realizadas investigação da motilidade, colorações (Gram e verde malaquita) e testes para expressões da catalase e oxidase.⁹ O sistema de galerias API® 20E foi utilizado de acordo as recomendações do fabricante para avaliar a presença das seguintes enzimas/reações: β-galactosidase, arginina dihidrolase, lisina descarboxilase, ornitina descarboxilase, utilização de citrato, produção de H₂S, urease, expressão da triptofanase, produção de indol, produção de acetoina, gelatinase, fermentação/oxidação de glicose, manitol, inositol, sorbitol, ramnose, sacarose, melibiose, amígdalina, arabinose, e produção de citocromo-oxidase. Os microrganismos fermentadores da glicose foram cultivados em meio Vermelho de Metila-Voges Proskauer para determinar a via pela qual esse processo ocorre.⁸

Seleção de bactérias produtoras de PHAs

Turbidez das culturas

Cada bactéria isolada foi reinoculada em meios líquidos contendo a mesma composição daquele descrito para isolamento, diversificando-se, entretanto, a fonte de carbono original (glicose), a qual foi substituída por óleo de soja, glicerol e soro de leite (2%, em todos os casos). Em seguida, as culturas foram incubadas nas mesmas condições anteriormente descritas e a turbidez, usada como um reflexo da produção de PHAs, foi registrada atribuindo-se a legenda: + (pouco turvo); ++ (turbidez mediana); +++ (muito turvo), por inspeção visual após 72 h de cultivo (30 ± 1 °C).⁷

Coloração das colônias

Dois metodologias de coloração das colônias microbianas produtoras de polihidroxialcanoatos foram utilizadas com o meio mineral sólido descrito para o isolamento das bactérias. Na primeira, uma solução do corante preto de Sudão (0,3 g em 100 mL de etanol 70%) foi aplicada diretamente a colônias obtidas após 72 h de cultivo (30 ± 1 °C). Após 20 min, efetuou-se a lavagem das colônias com etanol 100% e as colônias que retiveram o corante e permaneceram escurecidas representaram resultado positivo. Na segunda estratégia de seleção, um volume de 0,5 µL de solução do corante azul do Nilo (1% em DMSO) foi adicionado a um litro de meio mínimo antes da esterilização. Após utilização desse meio para inoculação e a incubação conforme condições descritas na primeira metodologia, as colônias com brilho alaranjado após excitação luminosa de luz ultravioleta (UV-longo, 360 nm) foram considerados positivas para a produção de bioplástico.

Detecção do gene codante da *phaC* sintase

Após 24 h de incubação dos isolados bacterianos, sob agitação orbital (120 rpm, 30 ± 1 °C), em caldo nutriente, efetuou-se a extração de seu material genético por meio de *kit* comercial (Norgen Biotek).⁸ O par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) G-D (GTGCCGCCSYRSATCAACAAGT) e G-2R

(GTAGTTCCASAYCAGGTCGTT), desenhado por Romo *et al.*,¹⁰ foi sintetizado pela empresa GenOne. A amplificação por PCR seguiu o seguinte protocolo de reação (volume final de 25 µL): 100 µg de DNA, 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,8 mmol L⁻¹ de dNTPs, 2,5 mmol L⁻¹ de MgCl₂, 2,5 ml de tampão 10X (Biosystems), 5 µg de BSA, DMSO e 1 U de Taq DNA Polimerase (Biosystems).¹¹ O DNA amplificado foi visualizado com auxílio de transiluminador (UV emitido diretamente no gel de agarose corado com brometo de etídio).

Identificação molecular (16S rDNA) das bactérias produtoras de PHA

O material genético das bactérias previamente selecionadas como produtoras de PHAs foi novamente extraído, amplificado e visualizado conforme descrito no item anterior, exceto pelo fato de que nas reações de PCR utilizou-se o par 356F/1064R como oligonucleotídeos iniciadores da amplificação do gene 16S r-DNA e não houve acréscimo de DMSO.¹² O *amplicon* de cada um dos isolados foi purificado por meio de *kit* comercial (Norgen Biotek) e, depois, sequenciado em ambas as direções pela Plataforma de Sequenciamento de DNA da Universidade Federal de Pernambuco. As seqüências foram editadas, convertidas para o formato FASTA e comparadas com aquelas registradas para tal gene identificador nos bancos do NCBI (*National Center for Biotechnological Information*) e do RDP (*Ribosomal Database Project*). Tais seqüências também foram depositadas no GenBank (NCBI). O dendograma foi criado no programa CLUSTALW.¹³

Cinética de crescimento das bactérias produtoras de PHA

A fim de determinar qual a composição do meio de cultura mais favorável ao crescimento dos microrganismos produtores de PHAs obtidos neste trabalho, a composição do meio descrito anteriormente foi modificado quanto à variação da concentração de glicose e quanto à presença de peptona. As culturas receberam as seguintes codificações: Meio 01 (meio mínimo convencional, com 20 g L⁻¹ de glicose), Meio 02 (5 g L⁻¹ de peptona), Meio 03 (2 g L⁻¹ de glicose e 5 g L⁻¹ de peptona), Meio 04 (controle; ausente de glicose e peptona), Meio 05 (20 g L⁻¹ de glicose e 5 g L⁻¹ de peptona). Culturas submersas de cada isolado em meio caldo nutriente com 24 h de incubação foram utilizadas para inocular os diferentes meios de cultura líquidos, distribuídos em volume de 10 mL em tubos tipo *Falcon* (50 mL), com alíquotas que no final rendessem 10⁶ céls mL⁻¹. Triplicatas das culturas foram incubadas (65 rpm, 30 ± 1 °C) por um período de 96 h e a cada intervalo de 24 h foram colhidas amostras para determinação de pH, biomassa seca, concentração de proteínas e glicídeos redutores totais.¹⁴ Todas as análises foram realizadas em triplicatas. Os resultados de cada parâmetro nos diferentes tempos foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) e suas médias, através do teste de Tukey, sempre ao nível de 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Perfil bioquímico dos microrganismos isolados

Foram isoladas 24 bactérias, sendo 17 nas amostras de solo (horizonte A) da Mata Atlântica e sete nas de lodo de ETE de agroindústria de Coruripe-AL. O pequeno número de isolados pode ser explicado pela composição do meio de cultura que foi utilizado para o isolamento, isto é, limitado em nitrogênio [0,2 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄]. As linhagens produtoras de PHAs são classificadas em dois grupos principais, baseado nas condições de cultivo que estimulam a produção do polímero: há aquelas que necessitam da

limitação de um elemento essencial como N, P, Mg, K, O ou S, e aquelas que produzem o polímero mesmo quando há abundância de todos os nutrientes. Porém, mesmo nesse último caso, as bactérias sintetizam maior quantidade de PHA quando o meio é limitante e, por isso, o meio mínimo limitado em nitrogênio é escolhido pelos pesquisadores quando buscam selecionar microrganismos autóctones produtores do polímero.¹⁵

A quase totalidade das bactérias utiliza compostos inorgânicos de nitrogênio, em especial sais de amônio e ocasionalmente nitratos (raramente nitritos), mas alguns isolados exigem fontes orgânicas, representadas por um número variável de aminoácidos. Assim, a ausência de fontes orgânicas impediu o crescimento de colônias representativas dos microbiomas presentes nas amostras, restringindo-se ao aparecimento somente daquelas de interesse, isto é, potencialmente produtoras de PHAs. Apesar de gêneros formadores de endósporos serem comumente encontrados no solo (como *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporosarcina* e *Streptomyces*), nenhum dos 17 microrganismos isolados do solo de Mata Atlântica apresentou tal estrutura no interior celular após serem corados com verde malaquita. Por outro lado, das sete bactérias isoladas do lodo da ETE, duas (BLD05 e BLD07) são Gram positivas formadora de endósporos. A catalase, enzima importante para as bactérias no combate ao excesso de radicais livres na célula, foi detectada em todos os microrganismos isolados. As características morfológicas e bioquímicas dos isolados obtidos neste trabalho estão expostas na Tabela 1.

Seleção dos produtores de polihidroxialcanoatos

Fontes de carbono e turbidez em meio mínimo

A procura por bactérias produtoras de PHAs deve levar em

consideração o substrato disponibilizado a elas, visto que o mesmo determinará o tipo de biopolímero sintetizado e os custos do processo. Fontes mais puras podem aumentar em até 80% os gastos de produção, mas em geral aumentam a produtividade do PHA.^{16,17} Por outro lado, pesquisas com *C. necator* cultivada em óleo de canola revelam alto rendimento de síntese de PHA (92%).¹⁶ Essa bactéria também é capaz de acumular maior quantidade de PHA em meio contendo metanol – uma das fontes de carbono mais baratas que existem – do que glicose.¹⁸ O butirato é outro substrato bastante promissor para ser utilizado na produção de PHAs, já que a partir dele o isolado bacteriano pode conseguir elevado rendimento do biopolímero.¹⁹

A verificação de quais fontes de carbono são utilizadas por cada microrganismo serve para direcionar a escolha do substrato para a produção de PHAs em grandes volumes, isto é, cultura submersa em biorreatores.²⁰ Todos os microrganismos obtidos no presente trabalho utilizam a glicose como fonte de carbono e a maioria utiliza também sacarose e manitol (Tabela 2). Para verificar a utilização de outras fontes de carbono como óleo e soro de leite, os microrganismos foram cultivados em meio mínimo e a turbidez averiguada após 72 h. A turbidez do meio de cultura geralmente está relacionada com a concentração de células do microrganismo, mas no caso de cultivo em meio para síntese de PHAs, esta é relacionada com a quantidade intracelular do polímero, isto é, quanto mais turvo o meio, devido a opacidade da cultura presente, provavelmente houve mais síntese do bioplástico. Verificou-se, dessa forma, que a maioria dos isolados utilizam outros substratos além da glicose para crescer e provavelmente produzir PHAs. As bactérias BMA-05, 10 e 13 e BLD-07 apresentaram maior turbidez em todos os meios testados e foram selecionadas para os testes de coloração de suas colônias com os corantes preto de Sudão e azul do Nilo, e para o rastreamento do gene *phaC*.

Tabela 1. Algumas características morfológicas e bioquímicas dos isolados bacterianos estudados. Bactérias com codificação BMA foram isoladas de solo de Mata Atlântica, enquanto aquelas codificadas como BLD são oriundas do lodo da Estação e Tratamento de Efluentes da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (Coruripe-AL, Brasil)

Teste	Forma	Gram	En	Cat	Ox	Gal	Ar	Lis	Or	Cit	H ₂ S	Ure	Trip	Ac	Gel	Nit
BMA-01	Bastonetes	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BMA-02	Cocobacilos	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
BMA-03	Bastonetes	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
BMA-04	Bastonetes	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+
BMA-05	Bastonetes	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+
BMA-06	Cocobacilos	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+
BMA-07	Bastonetes	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+
BMA-08	Cocobacilos	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
BMA-09	Cocobacilos	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+
BMA-10	Cocobacilos	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
BMA-11	Cocobacilos	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BMA-12	Cocobacilos	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
BMA-13	Cocobacilos	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
BMA-14	Cocobacilos	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
BMA-15	Bastonetes	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
BMA-16	Cocobacilos	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
BMA-17	Cocos	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
BLD-01	Cocobacilos	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
BLD-02	Cocobacilos	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+
BLD-03	Cocobacilos	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
BLD-04	Cocobacilos	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
BLD-05	Bastonetes	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+
BLD-06	Cocobacilos	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
BLD-07	Cocobacilos	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-

Legenda: End = endósporos, Cat = catalase, Ox = oxidase, Gal = β galactosidase, Ar = arginina dihidrolase, Lis = lisina descarboxilase, Cit = utilização de citrato, H₂S = produção de H₂S, Ure = urease, Trip = expressão da triptofanase, Ac = produção de acetoína, Gel = gelatinase, Nit = redução de nitratos em nitrito.

Tabela 2. Fontes de carbono utilizadas pelos microrganismos isolados e turbidez apresentada em meio mínimo. Bactérias com codificação BMA foram isoladas de solo de Mata Altântica, enquanto aquelas codificadas como BLD são oriundas do lodo da Estação e Tratamento de Efluentes da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (Coruripe-AL, Brasil)

Teste	Gli	Man	Ino	Sor	Ram	Sac	Mel	Ami	Ara	Turbidez do meio mínimo			
										Glicose	Óleo de soja	Glicerol	Soro de leite
BMA-01	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+++	+	++	++
BMA-02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++
BMA-03	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	++
BMA-04	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	++
BMA-05	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+++	++	+++	+++
BMA-06	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BMA-07	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+
BMA-08	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
BMA-09	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+++
BMA-10	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++
BMA-11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	++
BMA-12	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
BMA-13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++	+++	++	+++
BMA-14	+	+	-	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+++
BMA-15	+	+	-	-	-	+	-	-	-	++	+	+	+
BMA-16	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+++	+++
BMA-17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+
BLD-01	+	+	-	-	-	-	-	-	-	++	+	+	+++
BLD-02	+	+	-	-	+	+	-	+	+	++	+	+	+++
BLD-03	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+++	++	+++
BLD-04	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+++
BLD-05	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	++
BLD-06	+	+	-	+	+	+	-	+	+	++	+	+++	++
BLD-07	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+++	+++	++	+++

Legenda: Gli = glicose, Man = manitol, Ino = inositol, Sor = sorbitol, Ram = ramnose, Sac = sacarose, Mel = melibiose, Ami = amigdalina, Ara = arabinose, + (pouco turvo); ++ (turbidez mediana); +++ (muito turvo).

Coloração das colônias

Os quatro microrganismos selecionados retiveram o preto de Sudão em suas colônias, mesmo após lavagem com álcool. Entretanto, apenas o isolado codificado como BMA-10 produziu fluorescência sob luz UV, embora com intensidade inferior à da bactéria de referência, *Cupriavidus necator* ATCC 17699. Alguns corantes são muito utilizados para seleção de microrganismos produtores de PHAs devido a sua capacidade de penetrar na membrana e corar grânulos desses polímeros.²¹ O preto de Sudão é um corante ligeiramente solúvel em solvente orgânico e insolúvel em água, capaz de conferir coloração negra azulada às estruturas hidrofóbicas visíveis em microscópio óptico. Quando em contato com as colônias, o corante é retido pelos microrganismos produtores de PHA, tornando-as azuladas.²² O uso do preto de Sudão antes da descoberta de outros corantes foi consideravelmente grande, porém, ele não é específico para PHA, uma vez que é capaz de agir em todos materiais lipídicos presente na célula. Contudo, seu uso na identificação de microrganismos produtores é a etapa inicial de muitas pesquisas.²³

O azul do Nilo, por sua vez, é um corante básico de oxazina, solúvel em água e álcool etílico. Em virtude da oxidação espontânea do azul do Nilo em solução aquosa, resultando na produção de vermelho do Nilo, suspeita-se que este seja o responsável pela coloração e fluorescência dos grânulos de PHA nas células bacterianas. Esse corante possui propriedades de maior sensibilidade e seletividade para a identificação de grânulos intracelulares de PHA, pois as membranas celulares e outros componentes celulares lipídicos não absorvem quantidades suficientes de corante para emitir fluorescência.²⁴ Apesar da maior especificidade do azul do Nilo aos PHAs, Mesquita *et al.*²⁵ compararam as imagens

de células bacterianas coradas com preto de Sudão (obtidas em microscópio de campo pulsado) com as imagens obtidas de esfregaços corados com azul do Nilo (obtidas em microscópio de fluorescência) e constataram que não somente a detecção de microrganismos com a habilidade de acumular o polímero por meio de qualquer um desses corantes é igualmente eficiente, como também é confiável para estimar a concentração dos polihidroxialcanoatos presentes nas células.

Detecção do gene codante da *phaC* sintase

As pesquisas mais recentes sobre PHAs abordam o estudo das enzimas que estão diretamente envolvidas na síntese de polihidroxialcanoatos. Existem quatro classes de PHA sintases, das quais destacam-se as PHA sintases da classe I, capazes de polimerizar unidades de hidroxiacil-CoA com cadeia curta (3-5 átomos de carbono) e as de classe II, específicas para monômeros de cadeia média (6-14 átomos de carbono).²⁶ Independentemente de qual classe a PHA sintase de um determinado microrganismo pertença, todas elas possuem a subunidade PhaC, e, por isso, essa é a região do DNA escolhida para ser detectada pela técnica de PCR, quando se espera detectar molecularmente possíveis produtores do polímero em questão.

Os quatro microrganismos avaliados apresentaram o *amplicon* esperado de 492 pb, sendo que os *primers* utilizados na reação de PCR hibridizam internamente o gene codante da PhaC sintase (classes I e II) de maneira universal.¹⁰ López *et al.*²⁷ foram os primeiros pesquisadores a utilizar a técnica de PCR para identificar organismos que apresentassem o gene em questão, mas na ocasião os *primers* foram baseados apenas no genoma de *Cupriavidus necator*. Com a popularização dessa técnica molecular aliada à crescente disponibilidade

de microrganismos sequenciados, diversos autores começaram a desenhar iniciadores com degeneração das suas bases em diferentes proporções. Sheu *et al.*⁸ foram alguns desses pesquisadores: eles elaboraram, com sucesso, um protocolo para detectar isolados bacterianos produtores de PHAs obtidos de amostras ambientais, por meio de *colony* PCR. As sequências altamente degeneradas propostas pelo grupo são utilizadas para detectar genes *phaC* das classes I e II. Até o presente momento, não há *primers* universais para detectar genes *phaC* das classes III e/ou IV,²⁸ embora existam aqueles que são específicos para bactérias redutoras de sulfato e haloarchaea que codificam para a PhaC sintase de classe III.²⁹ Shamala *et al.*³⁰ publicaram um trabalho divulgando *primers* não degenerados que delimitam o gene *phaC* específico da PhaC sintase IV, presente em *Bacillus* spp., porém os autores não conseguiram amplificação desse gene em *B. anthracis* e *B. thuringensis*. O referido trabalho levou Solaiman e Ashby³¹ a sugerirem que a sintases de classe IV são divididas em dois subgrupos: subgrupo *B. megaterium* (incluindo *B. sphaerica*, *B. circulans* e *B. brevis*) e o subgrupo *B. cereus* (incluindo *B. anthracis* e *B. thuringensis*). Sendo assim, isso significa que apesar da detecção do gene nos isolados BMA-05, 19, 13 e BLD-07, não é possível afirmar qual classe de *phaC* está presente em cada uma dessas bactérias.

Identificação molecular (16S rDNA) das bactérias produtores de PHA

Os *primers* utilizados nas reações de PCR deste trabalho para amplificar a região 16S rDNA resultaram em fragmentos gênicos com cerca de 700 pb em todos os quatro isolados testados. A comparação entre as bases nucleotídicas obtidas e os bancos de dados permitiram identificar que os microrganismos produtores de PHAs pertencem ao domínio *Bacteria*, sendo um representante do filo *Firmicutes* (BLD-07) e os outros do filo *Gammaproteobacteria*. A análise do alinhamento múltiplo das sequências nucleotídicas mostraram que a região 16S rDNA sequenciadas dos isolados BMA-05, 10, 13 e BLD-07 possuem 99% de identidade com *Pseudomonas fluorescens* P10-1, *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190, *Klebsiella oxytoca* KCTC 1686 e *Bacillus pumilus* SAFR-032, respectivamente (Figura 1). Os números de acesso no GenBank (NCBI) das sequências depositadas são: KU555925 (*Pseudomonas fluorescens* BMA05), KU555926 (*Enterobacter aerogenes* BMA10), KU555927 (*Klebsiella oxytoca* BMA13) e KU555928 (*Bacillus pumilus* BLD-07).

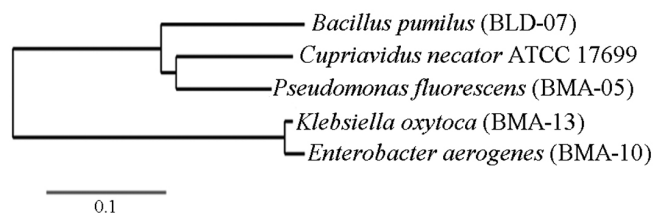


Figura 1. Dendrograma obtido em decorrência do alinhamento múltiplo das sequências 16S rDNA dos isolados BMA-05, 10, 13 e BLD-07, os quais tiveram 99 % de identidade com as bactérias *Pseudomonas fluorescens* P10-1, *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190, *Klebsiella oxytoca* KCTC 1686 e *Bacillus pumilus* SAFR-032, respectivamente

Conhecer a espécie precisa dos microrganismos isolados é essencial para direcionar futuros estudos para uma determinada finalidade. Dos quatro gêneros identificados no presente trabalho, *Pseudomonas* e *Bacillus* são os mais largamente utilizados na produção de PHAs.

Enquanto o gênero *Pseudomonas* é conhecido por produzir PHAs contendo monômeros de cadeia média, algumas bactérias Gram-positivas, tais como espécies de *Bacillus*, *Clostridium*,

Corynebacterium, *Nocardia* e *Rhodococcus*, têm sido estudadas tanto na produção de PHB como também de copolímeros. O gênero *Bacillus* compreende mais de 50 espécies, cujo rendimento da produção de PHAs varia de 11 a 69% (p/p de massa seca celular) e esse polímero biodegradável pode ser produzido em condições de excesso ou limitantes de algum nutriente. Segundo Parvathi *et al.*,³² a espécie *B. pumilus* caracteriza-se por ser altamente resistente a condições ambientais extremas, como a disponibilidade de baixo ou nenhum nutriente, dessecação, irradiação, presença de H₂O₂ e desinfecção química. Seu papel ecológico é enfatizado pelo fato de que não produz compostos de microrganismos patogênicos, aumentando o interesse na mesma.

Representantes da família *Enterobacteriaceae*, por outro lado, apesar de não serem frequentemente documentados como produtores de PHAs, são capazes de hiperexpressar genes relacionados à síntese desse polímero e têm sido usados com sucesso para esse fim em experimentos de engenharia genética.^{7,33}

Cinética de crescimento dos isolados

Condições de fermentação como a relação C:N, a concentração de oxigênio dissolvido e quantidade de células no meio de cultura³⁴ aliada à otimização das vias metabólicas³⁵ são fatores de extrema importância quando se busca maximizar a biossíntese de PHA pelos microrganismos. A presença da fonte orgânica de nitrogênio nos meios 02, 03 e 05 permitiu que os microrganismos utilizassem o substrato disponível gerando maior biomassa em comparação ao meio 04 (Tabela 3).

Esse resultado está de acordo com Sreekanth *et al.*,³⁶ que estudaram como diferentes fontes de nitrogênio (0,2 g N L⁻¹) afetam o rendimento da produção de PHA e -amilase numa cepa de *Bacillus* sp. cultivada em meio contendo 20 g L⁻¹ de sacarose como fonte de carbono. Os autores observaram que fontes orgânicas de nitrogênio resultaram em maior biomassa e também maior quantidade de PHA dentro das células. Rendimentos de PHA diferenciados como reflexo da fonte nitrogenada presente no meio de cultura também foram documentados em outros experimentos semelhantes.³⁶⁻³⁹ Yüsekda *et al.*,³⁸ por exemplo, demonstraram que em meio contendo peptona, duas linhagens de *Bacillus* apresentaram os maiores rendimentos de PHB em comparação com os meios contendo sulfato de amônio, nitrato de potássio, e os aminoácidos L-cisteína e L-glicina (sempre na concentração de 20 g L⁻¹). Já Goma *et al.*³⁹ avaliaram o efeito de 19 fontes de nitrogênio na produção de PHA em *Bacillus subtilis* e verificaram que sulfato de amônio e nitrato de amônio na concentração de 1 g L⁻¹ foram as melhores fontes para o crescimento da cepa.

No presente trabalho, é possível afirmar que a adição de hidrolisado de proteínas favoreceu o crescimento de *Enterobacter aerogenes* BMA-10 *Klebsiella oxytoca* BMA-13. Todavia, os crescimentos observados no meio 01 foram equiparáveis aos do meio 04. Nesta última condição, as células bacterianas conseguiram se multiplicar em meio ausente de glicose provavelmente devido à presença de alguma fonte de carbono que ainda tenha restado no meio de cultura que foi introduzido juntamente com o inóculo, pois quando qualquer microrganismo se multiplica no meio de cultura, há um decréscimo proporcional na quantidade de nutrientes até o ponto em que a concentração de nutrientes por organismo atinja um nível crítico e a multiplicação cesse.

Pseudomonas fluorescens BMA-05 foi o único isolado que não acidificou nenhum dos meios de cultura, em nenhum dos tempos. Para os outros três isolados, os meios 02, 03 e 04 mantiveram-se próximos da neutralidade em todos os intervalos de tempo amostrados. Os meios 01 e 05, por sua vez, sofreram acidificação já após 24 h de cultivo, permanecendo na mesma faixa de pH até o final do experimento. Entretanto, como o meio 01 é limitado em nitrogênio [0,2 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄], os microrganismos consumiram somente até 50% da glicose após 96 h

Tabela 3. Concentrações de íons H⁺, glicídios redutores e de proteínas totais dos sobrenadantes livres de células e biomassa seca dos quatro microrganismos potencialmente produtores de PHAs cultivados durante 96 h (65 rpm, 30 ± 1 °C), em 50 mL de meio de cultura mínimo, modificado ou não

Meio	Tempo	<i>Pseudomonas fluorescens</i> BMA-05				<i>Enterobacter aerogenes</i> BMA-10				<i>Klebsiella oxytoca</i> BMA-13				<i>Bacillus pumilus</i> BLD-07			
		pH	Massa total (mg)	Glicídios redutores (g L ⁻¹)	Proteínas totais (g L ⁻¹)	pH	Massa total (mg)	Glicídios redutores (g L ⁻¹)	Proteínas totais (g L ⁻¹)	pH	Massa total (mg)	Glicídios redutores (g L ⁻¹)	Proteínas totais (g L ⁻¹)	pH	Massa total (mg)	Glicídios redutores (g L ⁻¹)	Proteínas totais (g L ⁻¹)
Meio 01	0 h	6,99 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	19,49 ± 0,79 ^a	0,20 ± 0,01 ^b	6,99 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^d	20,36 ± 0,48 ^a	0,17 ± 0,00 ^b	6,99 ± 0,00 ^d	0,00 ± 0,00 ^b	20,01 ± 0,51 ^a	0,22 ± 0,01 ^b	6,99 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^c	19,43 ± 0,77 ^a	0,25 ± 0,02 ^c
	24 h	7,13 ± 0,00 ^{bc}	1,3 ± 0,85 ^b	15,31 ± 1,69 ^b	0,19 ± 0,01 ^b	5,92 ± 0,01 ^b	4,50 ± 0,10 ^{ab}	17,55 ± 0,44 ^b	1,08 ± 0,14 ^c	6,36 ± 0,01 ^d	2,90 ± 0,35 ^a	15,29 ± 1,23 ^b	0,47 ± 0,02 ^b	6,67 ± 0,00 ^b	1,90 ± 0,35 ^b	11,27 ± 1,52 ^b	0,56 ± 0,03 ^b
	48 h	7,20 ± 0,00 ^d	2,80 ± 0,00 ^d	18,47 ± 0,91 ^{ab}	0,29 ± 0,01 ^a	4,83 ± 0,01 ^a	4,73 ± 0,47 ^a	14,55 ± 0,40 ^b	2,20 ± 0,15 ^a	5,35 ± 0,02 ^c	3,53 ± 0,35 ^a	12,69 ± 0,97 ^{bc}	0,58 ± 0,07 ^b	6,59 ± 0,00 ^{ab}	6,97 ± 0,12 ^a	10,57 ± 0,05 ^{bc}	0,55 ± 0,10 ^b
	72 h	7,11 ± 0,00 ^b	3,50 ± 0,71 ^a	20,01 ± 0,78 ^a	0,29 ± 0,01 ^a	4,79 ± 0,00 ^a	3,07 ± 0,86 ^{bc}	13,94 ± 0,70 ^a	1,94 ± 0,08 ^{ab}	4,84 ± 0,00 ^b	3,4 ± 0,30 ^b	12,09 ± 0,63 ^c	0,68 ± 0,03 ^b	6,61 ± 0,01 ^{ab}	2,03 ± 0,06 ^b	8,05 ± 0,05 ^c	1,31 ± 0,1 ^a
	96 h	7,15 ± 0,00 ^c	2,6 ± 1,56 ^a	18,39 ± 2,04 ^{ab}	0,28 ± 0,02 ^a	4,80 ± 0,00 ^a	2,77 ± 0,93 ^c	14,58 ± 0,63 ^c	1,78 ± 0,10 ^b	4,69 ± 0,00 ^a	3,17 ± 0,35 ^a	10,71 ± 1,23 ^c	1,42 ± 0,32 ^a	6,54 ± 0,00 ^a	1,83 ± 0,31 ^b	9,27 ± 1,96 ^{bc}	1,34 ± 0,09 ^a
Meio 02	0 h	6,99 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,02 ± 0,01 ^a	1,97 ± 0,02 ^a	6,99 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	0,06 ± 0,01 ^{ab}	1,17 ± 0,08 ^c	6,99 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^b	2,72 ± 0,03 ^a	6,99 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^d	0,00 ± 0,00 ^b	1,75 ± 0,87 ^a
	24 h	7,02 ± 0,00 ^a	3,57 ± 0,15 ^a	0,01 ± 0,01 ^a	1,62 ± 0,10 ^b	7,17 ± 0,00 ^b	9,93 ± 0,32 ^a	0,05 ± 0,01 ^{ab}	1,59 ± 0,08 ^{ab}	7,11 ± 0,00 ^{ab}	8,31 ± 0,36 ^b	0,01 ± 0,01 ^b	1,95 ± 0,04 ^c	7,30 ± 0,00 ^b	0,60 ± 0,00 ^d	0,01 ± 0,01 ^b	2,91 ± 0,16 ^a
	48 h	7,25 ± 0,00 ^c	6,33 ± 1,45 ^a	0,01 ± 0,01 ^a	1,65 ± 0,13 ^b	7,28 ± 0,00 ^c	10,83 ± 1,22 ^a	0,07 ± 0,01 ^a	1,93 ± 0,05 ^a	7,24 ± 0,00 ^{bc}	8,53 ± 0,23 ^b	0,01 ± 0,00 ^b	1,73 ± 0,14 ^c	7,64 ± 0,02 ^b	7,00 ± 0,69 ^b	0,02 ± 0,01 ^{ab}	3,10 ± 0,11 ^a
	72 h	7,16 ± 0,00 ^b	6,10 ± 0,56 ^a	0,02 ± 0,01 ^a	1,67 ± 0,05 ^b	7,47 ± 0,01 ^d	10,40 ± 3,5 ^a	0,05 ± 0,01 ^{ab}	1,40 ± 0,17 ^{bc}	7,26 ± 0,01 ^{bc}	10,17 ± 0,40 ^a	0,02 ± 0,00 ^a	1,78 ± 0,09 ^c	7,34 ± 0,01 ^b	5,00 ± 0,62 ^b	0,02 ± 0,00 ^a	3,36 ± 0,02 ^a
	96 h	7,24 ± 0,00 ^c	5,90 ± 0,75 ^a	0,01 ± 0,00 ^a	1,71 ± 0,07 ^b	7,40 ± 0,00 ^b	8,43 ± 0,57 ^a	0,04 ± 0,01 ^b	1,32 ± 0,04 ^c	7,39 ± 0,01 ^c	10,50 ± 0,46 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	2,23 ± 0,10 ^b	7,37 ± 0,00 ^b	3,47 ± 0,99 ^c	0,03 ± 0,00 ^a	3,72 ± 0,14 ^a
Meio 03	0 h	6,99 ± 0,00 ^{ab}	0,00 ± 0,00 ^d	1,79 ± 0,01 ^a	2,17 ± 0,02 ^a	6,99 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^c	1,62 ± 0,03 ^a	1,78 ± 0,09 ^{ab}	6,99 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^c	1,66 ± 0,05 ^a	2,89 ± 0,18 ^a	6,99 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^c	1,68 ± 0,02 ^a	1,85 ± 0,09 ^{ab}
	24 h	6,95 ± 0,01 ^a	3,13 ± 1,19 ^a	1,48 ± 0,06 ^c	2,27 ± 0,56 ^a	6,80 ± 0,00 ^b	10,73 ± 0,32 ^b	0,05 ± 0,00 ^b	1,77 ± 0,08 ^{ab}	6,80 ± 0,00 ^a	13,17 ± 0,67 ^b	0,02 ± 0,01 ^b	1,26 ± 0,73 ^c	6,70 ± 0,00 ^a	3,83 ± 0,06 ^c	0,15 ± 0,01 ^b	2,81 ± 0,16 ^a
	48 h	7,28 ± 0,00 ^c	5,00 ± 0,99 ^{bc}	1,74 ± 0,07 ^{ab}	1,69 ± 0,14 ^a	6,86 ± 0,00 ^b	15,40 ± 1,06 ^a	0,05 ± 0,01 ^b	1,98 ± 0,21 ^a	6,90 ± 0,00 ^b	13,27 ± 0,42 ^b	0,01 ± 0,00 ^b	1,70 ± 0,03 ^{bc}	6,74 ± 0,00 ^{ab}	4,43 ± 0,06 ^b	0,09 ± 0,00 ^c	2,65 ± 0,44 ^a
	72 h	7,15 ± 0,00 ^b	7,53 ± 1,33 ^a	1,55 ± 0,05 ^{bc}	1,81 ± 0,08 ^a	6,87 ± 0,00 ^b	11,85 ± 0,92 ^b	0,06 ± 0,00 ^b	1,73 ± 0,03 ^{ab}	6,92 ± 0,00 ^{bc}	14,80 ± 0,36 ^a	0,03 ± 0,01 ^b	1,70 ± 0,03 ^{bc}	6,77 ± 0,00 ^{ab}	9,83 ± 0,29 ^b	0,02 ± 0,00 ^d	2,09 ± 1,81 ^a
	96 h	7,22 ± 0,00 ^c	6,33 ± 0,75 ^{ab}	1,78 ± 0,15 ^a	1,82 ± 0,11 ^a	6,84 ± 0,00 ^b	10,7 ± 0,42 ^b	0,06 ± 0,00 ^b	1,79 ± 0,06 ^b	6,90 ± 0,00 ^b	14,1 ± 0,66 ^{ab}	0,03 ± 0,01 ^b	2,23 ± 0,07 ^{ab}	6,80 ± 0,00 ^b	0,73 ± 0,12 ^d	0,12 ± 0,00 ^b	3,96 ± 0,14 ^a
Meio 04	0 h	6,99 ± 0,00 ^{ab}	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^a	0,06 ± 0,00 ^{bc}	6,99 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^c	0,04 ± 0,00 ^c	0,04 ± 0,01 ^c	6,99 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^c	0,06 ± 0,00 ^c	6,99 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^b	0,02 ± 0,01 ^{ab}	0,05 ± 0,00 ^c
	24 h	6,96 ± 0,00 ^a	0,20 ± 0,00 ^c	0,01 ± 0,00 ^a	0,06 ± 0,01 ^c	7,18 ± 0,00 ^c	5,2 ± 0,26 ^b	0,03 ± 0,00 ^b	0,14 ± 0,02 ^{ab}	7,17 ± 0,00 ^b	2,97 ± 0,32 ^a	0,01 ± 0,00 ^a	0,12 ± 0,01 ^a	7,10 ± 0,01 ^{ab}	1,67 ± 0,21 ^b	0,04 ± 0,01 ^a	0,09 ± 0,01 ^b
	48 h	7,20 ± 0,00 ^c	2,93 ± 0,21 ^b	0,01 ± 0,00 ^a	0,08 ± 0,01 ^a	7,25 ± 0,00 ^c	6,03 ± 0,76 ^a	0,03 ± 0,00 ^b	0,14 ± 0,01 ^a	7,21 ± 0,00 ^b	2,70 ± 0,70 ^b	0,01 ± 0,00 ^a	0,08 ± 0,01 ^{bc}	7,09 ± 0,00 ^{ab}	4,17 ± 1,88 ^a	0,00 ± 0,00 ^c	0,18 ± 0,03 ^a
	72 h	7,08 ± 0,00 ^b	3,60 ± 0,26 ^b	0,01 ± 0,00 ^a	0,08 ± 0,01 ^{ab}	7,25 ± 0,00 ^c	3,33 ± 0,49 ^b	0,03 ± 0,00 ^b	0,16 ± 0,00 ^a	7,19 ± 0,00 ^b	3,37 ± 0,42 ^a	0,01 ± 0,00 ^a	0,11 ± 0,02 ^{ab}	7,21 ± 0,00 ^b	4,93 ± 0,12 ^a	0,01 ± 0,01 ^{bc}	0,20 ± 0,01 ^a
	96 h	7,25 ± 0,01 ^c	3,13 ± 0,42 ^{ab}	0,00 ± 0,00 ^a	0,09 ± 0,00 ^a	7,31 ± 0,00 ^c	3,2 ± 0,26 ^b	0,02 ± 0,00 ^c	0,11 ± 0,02 ^b	7,27 ± 0,01 ^b	3,5 ± 0,32 ^a	0,01 ± 0,00 ^a	0,10 ± 0,01 ^{ab}	7,12 ± 0,00 ^{ab}	0,60 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^c	0,18 ± 0,02 ^c
Meio 05	0h	6,99 ± 0,00 ^{ab}	0,00 ± 0,00 ^c	19,81 ± 0,57 ^a	2,30 ± 0,02 ^a	6,99 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^b	19,55 ± 1,67 ^a	1,94 ± 0,26 ^b	6,99 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	20,37 ± 0,50 ^a	3,22 ± 0,05	6,99 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^c	20,04 ± 0,76 ^a	3,17 ± 0,00 ^a
	24h	6,96 ± 0,00 ^a	2,53 ± 0,8 ^a	16,52 ± 1,38 ^a	2,30 ± 0,05 ^a	5,81 ± 0,00 ^a	18,07 ± 0,85 ^a	0,20 ± 0,01 ^b	2,77 ± 0,10 ^a	5,86 ± 0,00 ^a	13,57 ± 2,22 ^b	3,35 ± 0,82 ^b	4,71 ± 0,68	5,95 ± 0,00 ^b	8,80 ± 1,85 ^b	8,57 ± 0,58 ^b	2,99 ± 0,00 ^a
	48h	7,22 ± 0,00 ^d	4,03 ± 1,91 ^{ab}	17,34 ± 3,25 ^a	2,15 ± 0,20 ^a	5,94 ± 0,00 ^b	18,70 ± 2,29 ^a	0,24 ± 0,12 ^b	2,94 ± 0,04 ^a	5,93 ± 0,01 ^a	16,3 ± 1,99 ^{ab}	0,23 ± 0,05 ^c	4,41 ± 0,04	5,16 ± 0,00 ^a	2,37 ± 0,15 ^c	6,62 ± 0,84 ^c	2,77 ± 0,28 ^a
	72h	7,02 ± 0,00 ^b	5,10 ± 0,20 ^a	17,64 ± 1,61 ^a	2,16 ± 0,00 ^a	5,98 ± 0,00 ^b	16,00 ± 0,89 ^a	0,16 ± 0,05 ^b	2,68 ± 0,11 ^a	5,94 ± 0,01 ^a	19,23 ± 3,17 ^{ab}	0,22 ± 0,03 ^c	5,86 ± 0,16	5,05 ± 0,00 ^a	11,67 ± 0,81 ^a	6,07 ± 0,70 ^c	3,25 ± 0,05 ^a
	96h	7,08 ± 0,00 ^c	5,73 ± 0,46 ^a	18,41 ± 0,10 ^a	1,19 ± 0,06 ^a	5,98 ± 0,00 ^b	16,80 ± 2,88 ^a	0,21 ± 0,01 ^b	2,19 ± 0,26 ^b	6,02 ± 0,00 ^a	21,77 ± 3,15 ^a	0,26 ± 0,04 ^c	5,59 ± 0,85	5,13 ± 0,01 ^a	6,20 ± 1,06 ^b	5,34 ± 0,70 ^c	3,32 ± 0,30 ^b

Legenda: Meio 01 = meio mínimo convencional, com 20 g L⁻¹ de glicose, Meio 02 = 5 g L⁻¹ de glicose e 5 g L⁻¹ de peptona, Meio 03 = 2 g L⁻¹ de glicose e 5 g L⁻¹ de glicose e 5 g L⁻¹ de peptona. Os valores representam a média das triplicatas ± desvio padrão. Para cada microrganismo, as letras diferentes nas colunas do mesmo parâmetro indicam diferença estatística pelo teste Tukey ($p < 0,05$), enquanto letras iguais indicam que os valores obtidos nos diferentes tempos não diferem entre si significativamente.

de cultivo. Esse meio de cultura é comumente utilizado por pesquisadores que buscam selecionar possíveis bactérias produtoras de PHAs, entretanto, tais condições nutricionais não são válidas para todos os microrganismos. Shi *et al.*,⁴⁰ por exemplo, verificaram que para *Brachymonas* sp. P12 as condições de excesso de carbono tiveram efeito negativo no acúmulo de PHA quando comparado a condições limitantes de carbono. Nessa cultura, a aeração, limitação de C, excesso ou limitação de N e excesso ou limitação de P afetam a produção de PHA. No meio 05, grande parte da glicose foi rapidamente consumida tanto por *Enterobacter aerogenes* BMA-10 como *Klebsiella oxytoca* BMA-13 e resultaram em maior biomassa desses microrganismos. Por sua vez, tanto *Bacillus pumilus* BLD-07 como *Pseudomonas fluorescens* BMA-05 apresentaram comportamento semelhante nesses dois meios de cultura. Encontrar a condição ideal para a produção do biopolímero varia não somente de acordo com a espécie bacteriana, mas também entre as diferentes cepas da mesma espécie,⁴¹ e como o nitrogênio faz parte da composição de macromoléculas como proteínas e ácidos nucleicos, a adição dele faz-se necessária à multiplicação microbiana.

CONCLUSÃO

Quatro bactérias (*Enterobacter aerogenes* BMA-10, *Pseudomonas fluorescens* BMA-05, *Klebsiella oxytoca* BMA-13 e *Bacillus pumilus* BLD-07) entre um total de 24 isoladas de solo de Mata Atlântica e Lodo de ETE de agroindústria sucroalcooleira foram selecionadas por serem capazes de turvar acentuadamente o meio mínimo mineral indutor de produção de PHAs, mediante diferentes fontes de carbono, além de reterem o corante preto de Sudão e apresentarem em seu genoma o gene *phaC*, codante da PhaC sintase. Sob luz ultravioleta, culturas sólidas contendo o corante azul do Nilo só apresentaram fluorescência característica de acúmulo de PHA para um desses três isolados, isto é, *Enterobacter aerogenes* BMA-10. O meio mínimo acrescido de peptona demonstrou ser um meio de cultivo favorável ao crescimento dos isolados.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, pelo apoio financeiro. À Plataforma de Sequenciamento de DNA da Universidade Federal de Pernambuco pelo serviço prestado.

REFERÊNCIAS

- Tokiwa, Y.; Calabia, B. P.; Ugwu, C. U.; Aiba, S.; *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 3722; Mano, E. B.; Mendes, L. C.; *A natureza e os polímeros: meio ambiente, geopolímeros, fitopolímeros e zoopolímeros*, 1ª ed., Blücher: São Paulo, 2013.
- Khanna, S.; Srivastava, A. K.; *Process Biochem.* **2005**, *40*, 607.
- Silva, L. F.; Gomez, J. G. C.; Rocha, R. C. S.; Taciro, M. K.; Pradella, J. G. C.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1732; Brämer, C. O.; Vandamme, P.; Silva, L. F.; Gomez, G. C.; Steinbüchel, A.; *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2001**, *51*, 1709; Mantelatto, P. E.; Duzzi, A. M.; Sato, T.; Durão, N. A. S.; Nonato, R. V.; Rocchiccioli, C.; Kesslerlingh, S. M.; *Br PI 0405622-1 A*, **2006**.
- Laycock, B.; Halley, P.; Pratt, S.; Werker, A.; Lant, P.; *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38*, 536.
- Squiao, C. R.; Aragão, G. M. F.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 615.
- Jendrossek, D.; *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 3195.
- Naheed, N.; Jamil, N.; Hasnain, S.; *Afr. J. Microbiol. Res.* **2011**, *5*, 4097.
- Silva, N. Informes Técnicos Nº1. *Testes Bioquímicos Para Identificação de Bactérias em Alimentos*. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos. 1996.
- Neder, R. N.; *Microbiologia. Manual de Laboratório*, Livraria Nobel S. A.: São Paulo, 1992.
- Romo, D. M. R.; Grosso, M. V.; Solano, N. C. M.; Castañó, C. M.; *Electron. J. Biotechnol.* **2007**, *10*, 348.
- Sheu, D.; Wang, Y.; Lee, C.; *Microbiology* **2000**, *146*, 2019.
- Winsley, T.; van Dorst, J. M.; Brown, M. V.; Ferrari, B. C.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 5938.
- Larkin M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Higgins, D. G.; *Bioinformatics* **2007**, *23*, 2947.
- Lowry, O. H.; Rosebrough N. J.; Farr A. L.; Randall R. J.; *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265; Miller, G. L.; *Anal. Chem.* **1959**, *31*, 426.
- Amoli, R. I.; Baei, M. S.; Pirouz, F.; *Middle East J. Sci. Res.* **2013**, *14*, 1035.
- López-Cuellar, M. R.; Alba-Flores, J.; Rodríguez, J. N.; Pérez-Guevara, F.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2011**, *48*, 74.
- Choi, J.; Lee, S. Y.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51*, 13.
- Huang, Y.; Chen, P.; Semblante, G. U.; You, S.; *J. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *22*, 1141.
- Marang, L.; Jiang, Y.; van Loosdrecht, M.; Kleerebezem, R.; *Bioresour. Technol.* **2013**, *142*, 232.
- Koller, M.; Bona, R.; Chiellini, E.; Fernandes, E.; Horvat, P.; Kutschera, C.; Hesse, P.; Braunegg, G.; *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 4854.
- Tyo, K. E.; Zhou, H.; Stephanopoulos, G. N.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 3412.
- Legat, A.; Gruber, C.; Zangger, K.; Wanner, G.; Stan-Lotter, H.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *87*, 1119.
- Serafim, L. S.; Lemos, P. C.; Reis, M. A. M.; *Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia* **2003**, *76*, 16.
- Ostle, A. G.; Holt, J. G.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1982**, *44*, 238.
- Mesquita, D. P.; Amaral, A. L.; Leal, C.; Oehmen, A.; Reis, M. A. M.; Ferreira, E. C.; *Anal. Chim. Acta* **2015**, *865*, 8.
- Rehm, B. H.; *Biochem. J.* **2003**, *376*, 15.
- López, N. I.; Pettinari, M. J.; Méndez, B. S.; *FEMS Microbial Ecology* **1997**, *22*, 129.
- Inoue, D.; Suzuki, Y.; Uchida, T.; Morohoshi, J.; Sei, K.; *J. Biosci. Bioeng.* **2015**, *121*, 47.
- Hai, T.; Lange, D.; Rabus, R.; Steinbüchel, A.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 4440; Han, J.; Lu, Q.; Zhou, L.; Liu, H.; Xiang, H.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 6168.
- Shamala, T. R.; Chandrashekar, A.; Vijayendra, S. V. N.; Kshama, L.; *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *94*, 369.
- Solaiman, D. K. Y.; Ashby, R. D.; *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 532.
- Parvathi, A.; Krishna, K.; Jose, J.; Joseph, N.; Nair, S.; *Braz. J. Microbiol.* **2009**, *40*, 269.
- Zhang, H.; Obias, V.; Gonyer, K.; Dennis, D.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 1198.
- Manangan, T.; Shawaphun, S.; *ScienceAsia* **2010**, *36*, 199.
- Magdoui, S.; Brar, S. K.; Blais, J. F.; Tyagi, R. D.; *Biomass Bioenergy* **2015**, *74*, 268.
- Sreekanth, M. S.; Vujavendra, S. V.; Joshi, G. J.; Shamala T. R.; *J. Food Sci. Technol.* **2013**, *50*, 404.
- Lee, W-H.; Loo, C-Y.; Nomura, C. T.; Sudesh, K.; *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 6844.
- Yüksekdağ, N.; Aslim, B.; Beyatli, Y. Mercan, N.; *Afr. J. Biotechnol.* **2004**, *3*, 63.
- Gomaa, E. Z.; *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2014**, *57*, 145.
- Shi, H. P.; Lee, C. M.; Ma, W. H.; *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *23*, 625.
- Saharan, B. S.; Grewal, A.; Kumar, P.; *Chin. J. Biol.* **2014**, *2014*, 1.