



UFAL

**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE POLIHIDROXIALCANOATOS E BIOSURFACTANTES EM SOLO FLORESTAL E EM LODO ATIVADO

AMANDA LYS DOS SANTOS SILVA

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Ana Maria Queijeiro López

Maceió, Estado de Alagoas

Abril, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A.C. Simões
Tabuleiro do Martins
57072-970 - Maceió-AL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

AMANDA LYS DOS SANTOS SILVA

**Prospecção de Microrganismos Produtores de Polihidroxialcanoatos e
Biosurfactantes em Solo Florestal e em Lodo Ativado**

Maceió-AL

2016

AMANDA LYS DOS SANTOS SILVA

**Prospecção de Microrganismos Produtores de Polihidroxialcanoatos e
Biosurfactantes em Solo Florestal e em Lodo Ativado**

Tese apresentada ao Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências (Área de concentração: Bioquímica e Biotecnologia).

Orientadora: Prof^a Dra. Ana Maria Queijeiro López

Maceió – AL
2016

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

S586p Silva, Amanda Lys dos Santos.
Prospecção de microrganismos produtores de polihidroxialcanoatos e biosurfactantes em solo florestal e em lodo ativado / Amanda Lys dos Santos Silva. – 2016.
116. : il. tabs., graf.

Orientadora: Ana Maria Queijeiro López.
Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2016.

Bibliografia: f. 94-106.
Apêndices: f. 107-111.
Anexos: f. 112-116.

1. Polihidroxibutirato - Produção. 2. Bactéria. 3. PhaC sintase.
4. Biotensoativos. I. Título.

CDU: 547:678.5



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda **Amanda Lys dos Santos Silva** intitulada: **“Prospecção de microrganismos produtores de polihidroxialcanoatos e biosurfactantes em solo florestal e em lodo ativado”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 13 de abril de 2016, às 08h30, na Sala de Reuniões do IQB, na Universidade Federal de Alagoas.

COMISSÃO JULGADORA

Profª. Drª. Ana Maria Queijeiro López
(PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. Luiz Fernando Romanholo Ferreira
(ITP/UNIT- Aracaju/SE)

Prof. Dr. Roberto Caffaro Filho
(CTEC/UFAL)

Prof. Dr. Josealdo Tonholo
(PPGQB/IQB/UFAL)

Profª. Drª. Lúcia Maria Conserva
(PPGQB/IQB/UFAL)

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, e ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), pela estrutura física e financiamento desta pesquisa.

À Profa. Dra. Ana Maria Queijeiro López, pela oportunidade de trabalhar nesta tese e permissão para eu realizar outros projetos que são de valorosa contribuição para a minha vida profissional. Pela amizade, profissionalismo, voto de confiança, paciência e inúmeros ensinamentos, sou-lhe muito grata!

Ao Prof. Dr. Josealdo Tonholo, do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, pela doação da incubadora orbital ao Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Ambiental.

À Dra. Heidi Lacerda Alves da Cruz, da Plataforma de Sequenciamento de DNA do Laboratório Central da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pelo auxílio na identificação molecular dos microrganismos utilizados neste trabalho.

À Dra. Márcia Helena Braga Catroxo, do Instituto Biológico (Secretaria da Agricultura e Abastecimento/São Paulo), pelo apoio técnico necessário nos registros fotográficos utilizando microscópio eletrônico de transmissão.

Ao Prof. Dr. Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim, do Centro de Tecnologia da Universidade Federal de Alagoas, por gentilmente permitir o uso do cromatógrafo gasoso, bem como à doutoranda Norma Candida dos Santos Amorim, sua orientada. Aos dois, agradeço pela sempre disponibilidade em sanar quaisquer dúvidas referentes à utilização daquele equipamento.

À doutoranda Elane Cristina Lourenço dos Santos, pelo profissionalismo, trocas de experiências e amizade.

À toda a equipe do Laboratório de Bioquímica do Parasitismo e Microbiologia Ambiental (LBPM), especialmente Ítalo Almeida Paulo dos Santos, Everton Santos Martins e Samara Cristina Alves dos Santos, pela convivência e auxílio nos experimentos.

*Minha esperança é a de que eu seja capaz de
chegar ao fim sabendo que fiz meu melhor,
por mais imperfeito que eu tenha sido.*

Nick Vujicic

RESUMO

Polihidroxialcanoatos (PHAs) são poliésteres produzidos e degradados por procariotos, enquanto biosurfactantes/bioemulsificantes (BS/BE) são metabólitos que diminuem a tensão superficial e sintetizados por esse grupo de organismos. O interesse nas potenciais aplicações industriais para PHA e BS/BE tem aumentado devido ao apelo ecologicamente correto desses produtos. No presente estudo, isolaram-se 24 colônias bacterianas de solo de Mata Atlântica e lodo agroindustrial (Coruripe-AL, Brasil) em meio mineral mínimo, como indicativo da possível capacidade de sintetizar PHA. Todas as linhagens foram caracterizadas bioquimicamente, enquanto a amplificação do gene *phaC* evidenciou que os isolados BMA-05, BMA-10, BMA-13 e BDL-07 podem expressar a enzima-chave para a síntese de PHA (PHA sintase). O sequenciamento da região parcial 16S r-DNA dessas bactérias permitiu suas identificações respectivamente como *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca* e *Bacillus pumilus*. Os PHAs produzidos por cada isolado foram extraídos com clorofórmio quente e os filmes poliméricos foram obtidos. Experimentos em frascos agitados (0 – 96 h) foram conduzidos para comparar a biomassa, glicídios redutores totais, pH e proteínas totais em meio mínimo contendo diferentes conteúdos de glicose e peptona. O suplemento com peptona demonstrou induzir o crescimento das linhagens, e o sobrenadante livre de células proveniente do cultivo de *Pseudomonas fluorescens* BMA-05 não apresentou acidificação em nenhuma das condições testadas. Na produção de polihidroxibutirato (avaliada após 24 h de incubação), utilizou-se o meio mínimo com diferentes fontes de nitrogênio: acetato de amônio, cloreto de amônio, nitrato de amônio, nitrato de sódio, sulfato de amônio, extrato de carne, extrato de levedura, glicina e peptona. O acúmulo máximo de P(3HB), detectado por espectrofotometria UV-visível, foi obtido quando *P. fluorescens*, *E. aerogenes*, *K. oxytoca* e *B. pumilus* foram cultivados no sulfato de amônio, cloreto de amônio, extrato de carne e nitrato de sódio, respectivamente. As observações em microscópio eletrônico de transmissão mostraram *Pseudomonas fluorescens* BMA-05 com grânulos eletrólucos quando a linhagem foi cultivada na presença de sulfato de amônio ou nitrato de sódio. Embora nenhum grânulo tenha sido observado para as outras linhagens na presença do sulfato de amônio, as análises de cromatografia gasosa confirmaram a produção de P(3HB). Quando os testes de expressão de exoenzimas foram realizados, os resultados indicaram que as linhagens foram capazes de hidrolisar gelatina, amido e Tween 80, e *B. pumilus* causou hemólise em sangue de carneiro. Experimentos para a produção de biosurfactante/bioemulsificante indicam que *E. aerogenes* BMA-10 excretou um composto surfactante que colapsa na superfície hidrofóbica bem como emulsiona os hidrocarbonetos querosene, tolueno, óleo diesel e óleo de soja. O índice de emulsificação (E_{24}) usando o sobrenadante livre de células desse microrganismo foi termalmente estável no tolueno, mas não em querosene. Resultados similares foram obtidos quando o pH do sobrenadante livre de células desse microrganismo foi ajustado para 2, 7 e 10, bem como quando concentrações diferentes de NaCl (2, 6 e 10 %) foram adicionadas às amostras. Tais resultados revelam o potencial de *Enterobacter aerogenes* BMA-10 como produtora de P(3HB), e o meio de cultura livre de suas células para finalidades emulsificantes em biotecnologia ambiental, bem como em biorremediação.

Palavras-chave: Polihidroxibutirato. Bactéria. PhaC sintase. Biotensoativos.

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polyesters produced and degradable by prokaryotes, while biosurfactants/bioemulsifiers (BS/BE) are metabolites that reduces surface tension and synthesized by this group of organisms. Interest in the potential industrial applications for PHA and BS/BE has increased due to its eco-friendly appeal. In this study, 24 bacterial colonies were isolated from Atlantic forest soil and agro-industrial sludge (Coruripe-AL, Brazil) in minimum mineral medium, as indicative of the possible ability to synthesize PHA. All strains were submitted to biochemical characterization, while the *phaC* gene amplification showed that isolates BMA-05, BMA-10, BMA-13 and BDL-07 can express the key enzyme for the synthesis of PHA (PHA synthase). Sequencing of the partial 16S r-DNA region was able to identify these bacteria respectively as *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca* and *Bacillus pumilus*. The PHAs produced by each isolate were extracted with hot chloroform and the polymeric films were obtained. Experiments in shaken flasks (0 – 96 h) were conducted to compare the biomass, total reducing glycosides, pH, and total protein in minimal medium containing different contents of glucose and peptone. Supplementation with peptone was able to induce the growth of these strains, and cell-free supernatant from the cultivation of *Pseudomonas fluorescens* BMA-05 showed no acidification in any of the conditions tested. To polyhydroxybutyrate production (evaluated after 24 h incubation), minimal medium was used with different nitrogen sources: ammonium acetate, ammonium chloride, ammonium nitrate, sodium nitrate, ammonium sulfate, beef extract, yeast extract, glycine and peptone. The maximum accumulation of P (3HB), detected by UV-visible spectrophotometry, was obtained for *P. fluorescens*, *E. aerogenes*, *K. oxytoca* and *B. pumilus* grown in ammonium sulfate, ammonium chloride, meat extract and nitrate sodium, respectively. Observations in transmission electron microscope showed *Pseudomonas fluorescens* BMA-05 with electronlucent granules when the strain was cultivated in the presence of ammonium sulfate or sodium nitrate. Although no granule was observed for the other strains in the presence of ammonium sulfate, the gas chromatography analysis confirmed the production of P (3HB). When exoenzymes expression tests were conducted, the results indicated that the strains were able to hydrolyse gelatine, starch and Tween 80, and *B. pumilus* caused hemolysis of sheep blood. Experiments for biosurfactant/bioemulsifier production indicate that *E. aerogenes* BMA-10 excreted a compound surfactant which collapses the hydrophobic surface and emulsifies the hydrocarbons kerosene, toluene, diesel oil and soybean oil. The emulsification index (E_{24}) using the cell-free supernatant of this microorganism was thermally stable in toluene, but not in kerosene. Similar results were obtained when the pH of this microorganism cell-free supernatant was adjusted to 2, 7 and 10, as well as different concentrations of NaCl (2, 6, and 10 %) were added to the samples. These results reveal the potential of *Enterobacter aerogenes* BMA-10 as a P(3HB)-producing, and its growth medium free of cells an emulsifier for biotechnological purposes and also in bioremediation.

Keywords: Polyhydroxybutyrate. Bacteria. PhaC synthase. Biotensioactives.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura geral de um polihidroxialcanoato. $x = 1, 2, 3$ e 4 ; n variando de 100 a milhares de unidades; o R é variável. Fonte: REHM (2003)	22
Figura 2. Exemplos de polihidroxialcanoatos de cadeia curta (poli-3-hidroxibutirato e poli-3-hidroxivalerato) e de cadeia média (poli-3-hidroxihexanoato e poli-3-hidroxi octanoato).....	23
Figura 3. Reação catalisada pela PHA sintase, enzima encontrada aderida à superfície dos grânulos de polihidroxialcanoatos dos microrganismos produtores do biopolímero. Fonte: REHM (2003)	23
Figura 4. Modelos da formação do carbonossomo: modelo de micela (A), modelo de brotamento (B) e modelo de arcabouço (C). Fonte: adaptado de JENDROSSEK e PFIEFFER (2014)	25
Figura 5. Vias metabólicas microbianas para a biossíntese de polihidroxialcanoatos. Os nomes dos genes que codificam as enzimas-chaves encontram-se em caixas: PhaA, 3-cetotiolase; PhaB, (R)-3-cetoacil-CoA redutase; PhaC, PHA sintase; PhaG, (R)-3-hidroxiacil ACP:CoA transacilase; PhaJ, (R)- enoil-CoA hidratase. As linhas tracejadas representam reações cujas etapas metabólicas não são mostradas. Fonte: adaptado de REHM (2003)	27
Figura 6. Estrutura do surfactante sintético dodecil sulfato de sódio (SDS), mostrando sua natureza anfipática (Fonte: SINGH <i>et al.</i> , 2007)	33
Figura 7. Representação da formação de agregados espontâneos das moléculas surfactantes na presença de líquidos imiscíveis: vesícula (A), micela (B) e monocamada (C) (Fonte: adaptado de TANG <i>et al.</i> , 2013)	33
Figura 8. Subclasses de glicolipídios: ramnolipídio (A), soforolipídio (B) e trealoselipídio (C). Fonte: KOSARIC, 2001	35
Figura 9. Estrutura geral de um fosfolipídio (Fonte: KOSARIC, 2001)	36
Figura 10. Estrutura da surfactina, surfactante lipopeptídico produzido por <i>Bacillus subtilis</i> (Fonte: LIU <i>et al.</i> , 2007)	36
Figura 11. Estrutura do emulsan, surfactante polimérico produzido por <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> . (Fonte: KOSARIC, 2001)	37
Figura 12. Esquema de remediação utilizando surfactante em solo contaminado com óleo (Fonte: adaptado de MAO <i>et al.</i> , 2015)	39
Figura 13. Fluxograma das atividades experimentais desenvolvidas no presente trabalho	41
Figura 14. Estrutura química do preto de Sudão, um azocorante lipofílico capaz de identificar a presença de PHAs na célula bacteriana	55
Figura 15. Culturas de bactérias coradas com corantes lipofílicos por duas técnicas diferentes. Em (A), uma solução de preto de Sudão foi depositada sobre as estrias dos microrganismos 20 min antes da lavagem com etanol (produtoras de PHAs retiveram o corante). Em (B), o corante azul do Nilo foi acrescido como componente do meio de cultura, e após 72 h de incubação ($30 \pm 1^\circ\text{C}$), as colônias PHA-positivas apresentaram fluorescência alaranjada sob luz UV. <i>C. necator</i> ATCC 17699 foi utilizada como controle positivo e <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 como controle negativo em todos os experimentos	56

Figura 16. Estrutura química do azul do Nilo, uma oxazina lipofílica capaz de identificar a presença de PHAs na célula bacteriana	57
Figura 17. Gel de agarose (1 %) contendo <i>amplicons</i> de 492 pb do gene codante da <i>phaC</i> <i>синтase</i> dos isolados bacterianos BMA-05 (linha 1), BMA-10 (linha 2), BMA-13 (linha 3) e BLD-07(linha 4), de solo de Mata Atlântica e lodo de ETE sucroalcooleira de Coruripe-AL. Linha 5= controle negativo. M= marcador de peso molecular (100 pb)	58
Figura 18. Filme polimérico obtido a partir da biomassa seca da bactéria de referência, <i>Cupriavidus necator</i> ATCC 17699 (A) e do isolado BMA-10 (B), após 72 h de cultivo ($30 \pm 1^\circ\text{C}$).....	60
Figura 19. Gel de agarose (1 %) contendo <i>amplicons</i> de 790 pb do gene codante da região 16S rDNA dos isolados bacterianos BMA-05 (linha 1), BMA-10 (linha 2), BMA-13 (linha 3) e BLD-07 (linha 4), de solo de Mata Atlântica e lodo de ETE sucroalcooleira de Coruripe-AL. Linha 5= controle negativo. M= marcador de peso molecular (100 pb).	63
Figura 20. Árvores filogenéticas dos microrganismos utilizados no presente trabalho e os isolados com 99 % de identidade obtidos do GenBank, de acordo com a Família a qual foram identificados: LBPMA-05, <i>Pseudomonaceae</i> (A); LBPMA-10 e LBPMA-13, <i>Enterobacteriaceae</i> (B) e LBPMA-BLD-07, <i>Bacillaceae</i> . As árvores foram construídas usando o método neighbour-joining. Os valores expressos nos nós internos referem-se aos valores de <i>Bootstrap</i> > 50 %, em 1000 réplicas.	64
Figura 21. Valores de pH do meio de cultura, após 24 h de incubação do microrganismo em meio mineral contendo diferentes fontes de nitrogênio ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, 120 rpm). Letras diferentes nas barras do mesmo microrganismo indicam diferença estatística pelo teste Tukey ($p<0,05$), enquanto as letras iguais indicam que as fontes de nitrogênio não diferem entre si significativamente.....	70
Figura 22. Concentração de glicídios redutores totais (g.L^{-1}), após 24 h de cultivo do microrganismo em meio mineral contendo diferentes fontes de nitrogênio ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, 120 rpm). Letras diferentes nas barras do mesmo microrganismo indicam diferença estatística pelo teste Tukey ($p<0,05$), enquanto as letras iguais indicam que as fontes de nitrogênio não diferem entre si significativamente	71
Figura 23. Massa seca (g.L^{-1}) após 24 h de cultivo do microrganismo em meio mineral contendo diferentes fontes de nitrogênio ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, 120 rpm). Letras diferentes nas barras do mesmo microrganismo indicam diferença estatística pelo teste Tukey ($p<0,05$), enquanto as letras iguais indicam que as fontes de nitrogênio não diferem entre si significativamente.....	72
Figura 24. Rendimento da produção de polihidroxibutirato (PHB) em relação à massa seca de cada microrganismo em meio mineral contendo diferentes fontes de nitrogênio (30°C , 120 rpm). Letras diferentes nas barras do mesmo microrganismo indicam diferença estatística pelo teste Tukey ($p<0,05$), enquanto as letras iguais indicam que as fontes de nitrogênio não diferem entre si significativamente	74
Figura 25. Reação de conversão de polihidroxibutirato em ácido crotônico, na presença de ácido sulfúrico concentrado aquecido. Fonte: VAN-THUOC <i>et al.</i> , 2012	74
Figura 26. Cromatograma de propil-ésteres de 3-hidroxialcanoatos, indicando o tempo de retenção relativo aos picos do padrão interno (PI) e metil 3-hidroxibutirato (3HB), obtido após metanólise ácida do padrão poli-3-hidroxibutirato (Sigma®).....	75

Figura 27. Fotomicrografias obtidas em microscópio eletrônico de transmissão (MET) dos microrganismos cultivados em meio mínimo, após 24 h, tendo o sulfato de amônio como única fonte de carbono. A) *Pseudomonas fluorescens* BMA-05 (barra: 0,8 µm), B) *Enterobacter aerogenes* BMA-10 (barra: 0,5 µm). C) *Klebsiella oxytoca* BMA-13 (barra: 0,8 µm) e *Bacillus pumilus* BLD-07 (barra: 0,6µm)..... 76

Figura 28. Cromatogramas de propil-ésteres de 3-hidroxialcanoatos, indicando o tempo de retenção relativo aos picos do padrão interno (PI) e metil 3-hidroxibutirato (3HB), obtidos dos cultivos de *Pseudomonas fluorescens* BMA-05 (A), *Enterobacter aerogenes* BMA-10 (B), *Klebsiella oxytoca* BMA-13 (C) e *Bacillus pumilus* (D), após 24 h em meio mineral contendo sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. 77

Figura 29. Fotomicrografias obtidas em microscópio eletrônico de transmissão (MET) dos microrganismos cultivados em meio mínimo após 24 h. A fonte de nitrogênio variou entre os isolados. A) *Pseudomonas fluorescens* BMA-05: nitrato de sódio (barra: 0,6µm), B) *Enterobacter aerogenes* BMA-10: cloreto de amônio (barra: 0,64 µm), C) *Klebsiella oxytoca* BMA-13: extrato de carne (barra: 0,8 µm) e D) *Bacillus pumilus* BLD-07: nitrato de sódio (barra: 0,5 µm)..... 78

Figura 30. Cromatogramas de propil-ésteres de 3-hidroxialcanoatos, indicando o tempo de retenção relativo aos picos do padrão interno (PI) e metil 3-hidroxibutirato (3HB), obtidos dos cultivos de *Pseudomonas fluorescens* BMA-05 em meio mineral com nitrato de sódio (A), *Enterobacter aerogenes* BMA-10 em meio mineral com cloreto de amônio (B), *Klebsiella oxytoca* BMA-13 em meio mineral com extrato de carne (C) e *Bacillus pumilus* em meio mineral com nitrato de sódio (D), após 24 h de incubação. 79

Figura 31. Degradação do surfactante sintético Tween 80 pelo isolado BMA10, após 05 dias de incubação (30°± 1°C, escuro). A) Placa sem inóculo + vermelho de fenol. B) Placa com *Enterobacter aerogenes* BMA-10 sem o corante. C) Placa com o isolado *Enterobacter aerogenes* BMA-10 após adição do corante, evidenciando halo de degradação (seta) pela bactéria..... 80

Figura 32. *Enterobacter aerogenes* BMA-10 (A) e *Bacillus pumilus* BLD-07 (B), isolados de solo de Mata Atlântica (Coruripe-AL) e lodo, respectivamente, cultivados em meio nutritivo (72 h, 30 ± 1° C, escuro) contendo 5% de sangue de carneiro desfibrinado. A zona clara ao redor da colônia (seta) caracteriza a β-hemólise dos eritrócitos presentes e pode ser o indicativo da produção de biosurfactantes 82

Figura 33. Teste do colapso da gota utilizando os sobrenadantes livres de células das amostras de: 1) Controle (meio de cultura estéril e não inoculado); 2) *Pseudomonas fluorescens* BMA-05; 3) *Enterobacter aerogenes* BMA-10; 4) *Klebsiella oxytoca* BMA-13 e 5) *Bacillus pumilus* BLD-07. A solução de azul de metileno foi acrescentada ao sobrenadante para melhor visualização do colapso da gota. O teste foi realizado em triplicata 83

Figura 34. Emulsificação do meio de cultura sem prévia inoculação (A) e do sobrenadante proveniente do cultivo de *Enterobacter aerogenes* BMA-10 (B) em tubos contendo querosene (Q) tolueno (T), óleo de diesel (D) e óleo de soja (S) 24 h após a agitação das amostras 87

Figura 35. Emulsificação do sobrenadante (pós-tratamento térmico) proveniente do cultivo de *Enterobacter aerogenes* BMA-10 em tubos contendo querosene (A) ou tolueno (B). C= controle, ou seja, meio de cultura sem prévia inoculação e sem tratamento térmico. ST=

sobrenadante livre de células do mesmo microrganismo, o qual não foi submetido a quaisquer um dos tratamentos 88

Figura 36. Índices de emulsificação do sobrenadante proveniente do cultivo de *Enterobacter aerogenes* BMA-10 em tubos contendo querosene (A) ou tolueno (B), 24 h após a agitação das amostras. Letras diferentes nas barras do mesmo tipo de tratamento indicam diferença estatística pelo teste Tukey ($p < 0,05$), enquanto letras iguais indicam que as emulsificações obtidas nos não diferem entre si significativamente. Tipos de tratamento: NaCl (2, 6 e 10 %), temperatura (4, 30 e 100 °C) e pH (2, 7 e 10). Legenda: ST= sem tratamento 89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Degradabilidade ambiental dos plásticos sintéticos. O tracejado corresponde à cisão que ocorre na molécula.....	21
Tabela 2. Tipos de subunidades encontradas nas PhaC sintases, de acordo com a classe e suas organizações genéticas. <i>phaA</i> , β -cetotiolase; <i>phaB</i> , acetoacetil redutase; <i>phaC</i> (inclusive <i>phaC1</i> e <i>phaC2</i>): PHA sintase; <i>phaE</i> e <i>phaR</i> , subunidades da PHA sintase; <i>phaP</i> , fasina; <i>phaQ</i> , repressor; <i>phaZ</i> , PHA depolimerase. ORF: região aberta de leitura com função desconhecida	28
Tabela 3. Condições de cultivo para a produção de polihidroxialcanoatos em escala laboratorial	29
Tabela 4. Tecnologias a serem desenvolvidas e que são capazes de diminuir o custo da produção de polihidroxialcanoatos	31
Tabela 5. Principais empresas que produzem polihidroxialcanoatos em escala comercial	38
Tabela 6. Algumas características morfofioquímicas dos isolados bacterianos estudados. 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)	52
Tabela 7. 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)	54
Tabela 8. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) utilizados por diferentes pesquisadores na técnica de Reação em Cadeia d a Polimerase (PCR) para detectar a presença do gene codante da PhaC sintase em amostras ambientais e/ou culturas puras. As sequências de Romo <i>et al.</i> (2007) foram utilizadas no presente trabalho.	59
Tabela 9. Valores de pH, concentrações de 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, $30 \pm 1^\circ\text{C}$), em 50 mL de meio de cultura mínimo, modificado ou não	66
Tabela 10. Análise de variância (ANOVA) do pH do meio de cultura, após 24 h de cultivo dos microrganismos em meio mineral contendo diferentes fontes de nitrogênio ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, 120 rpm). Em todos os casos, consideraram-se 8 graus de liberdade entre grupos e 18 dentro dos grupos. F crítico= 2,51	69
Figura 11. Análise de variância (ANOVA) da concentração de glicídios redutores totais, após 24 h de cultivo dos microrganismos em meio mineral contendo diferentes fontes de nitrogênio ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, 120 rpm). Em todos os casos, consideraram-se 8 graus de liberdade entre grupos e 18 dentro dos grupos. Para <i>Bacillus</i> , F crítico= 2,30 e para os outros microrganismos, F crítico= 2,51	70
Tabela 12. Análise de variância (ANOVA) da massa seca dos microrganismos, após 24 h de cultivo em meio mineral contendo diferentes fontes de nitrogênio ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, 120 rpm). Em	

todos os casos, consideraram-se 8 graus de liberdade entre grupos e 18 dentro dos grupos. F crítico= 2,51..... 72

Tabela 13. Análise de variância (ANOVA) do rendimento da produção de polihidroxibutirato (PHB) em relação à massa seca de cada microrganismo, após 24 h de cultivo em meio mineral contendo diferentes fontes de nitrogênio ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, 120 rpm). Em todos os casos, consideraram-se 8 graus de liberdade entre grupos e 18 dentro dos grupos. F crítico= 2,51 73

Tabela 14. Testes bioquímicos realizados para a verificação de exoenzimas dos microrganismos produtores de PHAs selecionados e identificados molecularmente 81

Tabela 15. Testes realizados para verificar as capacidades surfactante (dos sobrenadantes livres de células) e emulsificante (do meio de cultura contendo células e de seus sobrenadantes) após 72 h de cultivo de *P. fluorescens* BMA-05, *E. aerogenes* BMA-10, *K. oxytoca* BMA-13 e *B. pumilus* BLD-07 em meio descrito por Diab e El Din (2013), contendo glicose como fonte de carbono 85

Tabela 16. Testes realizados para quantificar a capacidade emulsificante (do meio de cultura contendo células e de seus sobrenadantes) após 72 h de cultivo de *P. fluorescens* BMA-05, *E. aerogenes* BMA-10, *K. oxytoca* BMA-13 e *B. pumilus* BLD-07 em meio descrito por Diab e eEl Din (2013), contendo glicose como fonte de carbono 86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% – por cento

< – menor

× – vezes

µg – micrograma

µL – microlitro

API – Analytical Profile Index

BSA – Albumina de soro bovino

BS – Biosurfactante

BE – Bioemulsificante

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNSA – Ácido dinitrosalicílico

dNTP – Desoxirribonucleotídeo

trifosfatado

E₂₄ – Emulsificação após 24 horas

ETE – Estação de tratamento de efluentes

g – gramas

h – horas

He – altura da emulsão

Ht – altura total do líquido

IB – Instituto Biológico

IQB – Instituto de Química e

Biotecnologia

L – litros

LBPMA – Laboratório de Bioquímica do
Parasitismo e Microbiologia Ambiental

mg – miligrama

min – minuto

mL – mililitro

mM – milimol

Mn – Manganês

NCBI – *National Center for
Biotechnological Information*

°C – graus Celsius

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PHA – Polihidroxialcanoato

PHB – Polihidroxibutirato

pH – Potencial hidrogeniônico

rDNA – DNA ribossomal

rpm – rotações por minuto

s – segundo

v – volume

pmol – picomol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivo geral	18
2.2	Objetivos específicos	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	Plásticos biodegradáveis.....	20
3.2	Polihidroxialcanoatos.....	22
3.2.1	Características dos grânulos.....	25
3.2.2	Enzimas envolvidas na síntese de polihidroxialcanoatos	26
3.2.3	Produção microbiana de polihidroxialcanoatos	28
3.3	Características das moléculas surfactantes	32
3.4	Surfactantes de origem biológica	34
3.5	Áreas de utilização dos polihidroxialcanoatos, biosurfactantes e bioemulsificantes	38
4	METODOLOGIA	41
4.1	Coleta de amostras de solo e lodo	41
4.2	Isolamento de bactérias	42
4.3	Características morfo-bioquímicas das bactérias isoladas	42
4.4	Seleção de bactérias produtoras de PHAs.....	42
4.5	Coloração das colônias	43
4.6	Deteção do gene codante da phaC sintase.....	43
4.7	Produção e extração de PHA	44
4.8	Identificação molecular (16S rDNA) das bactérias produtoras de PHA	44
4.9	Monitoramento do crescimento das bactérias produtoras de PHA.....	45
4.9.1	Determinação do pH e da massa seca.....	45
4.9.2	Determinação de concentração de proteínas totais	45
4.9.3	Determinação de glicídios redutores totais	46
4.10	Produção de polihidroxibutirato	46
4.10.1	Dissolução em ácido sulfúrico	47
4.10.2	Metanólise ácida	47
4.10.3	Microscopia eletrônica de transmissão	48
4.11	Perfil de exoenzimas	48
4.12	Produção de biosurfactantes/bioemulsificantes extracelulares	49
4.12.1	Avaliação da capacidade surfactante	49

4.12.2 Avaliação da capacidade emulsificante	50
4.12.3 Estabilidade (E ₂₄) do sobrenadante livre de células	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 Perfil bioquímico dos microrganismos isolados	52
5.2 Seleção dos produtores de polihidroxialcanoatos	54
5.3 Evidências da capacidade de produção de polihidroxialcanoatos	55
5.3.1 Coloração das colônias	55
5.3.2 Detecção do gene codante da PhaC sintase	58
5.3.3 Extração de PHA após 72 h de cultivo dos microrganismos em meio mineral	60
5.4 Identificação molecular (16S rDNA) das bactérias produtoras de PHA	62
5.5 Experimentos em frascos agitados visando produção de PHAs	65
5.5.1 Monitoramento do crescimento dos isolados (0-96 h de incubação)	65
5.5.2 Produção de polihidroxibutirato após 24 h de incubação em frascos agitados	69
5.5.3 Análises de microscopia eletrônica de transmissão e cromatografia gasosa	75
5.6 Produção de exoenzimas	80
5.7 Produção de moléculas biosurfactantes/bioemulsificantes extracelulares	83
5.8 Estabilidade do surfactante produzido por <i>Enterobacter aerogenes</i> BMA-10	87
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
7 CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS	94
APÊNDICES	107
ANEXOS	112

1 INTRODUÇÃO

A Revolução Industrial, que se instalou no mundo a partir de 1760, tornou possível a produção de bens em larga escala, passando-se do trabalho manual para a produção em máquinas a vapor, concentradas em fábricas, e acarretou profundas modificações sociais e econômicas, em todos os ramos do conhecimento (MANO e MENDES, 2013). O surgimento das ciências exatas e o desenvolvimento científico e tecnológico, por exemplo, fizeram com que os produtos sintéticos cada vez mais se sobrepusessem (em quantidade e diversidade) aos produtos naturais (NUNES e LOPES, 2014). De origem petroquímica, uma fonte não renovável, os materiais plásticos e os surfactantes são os exemplos clássicos de produtos sintéticos que se tornaram parte importante no dia-a-dia de milhões de pessoas no mundo todo. O primeiro, devido a suas características – de versatilidade, força, durabilidade e resistência à degradação –, revolucionou as indústrias, que trocaram o vidro e o papel de suas embalagens pelo polímero sintético (CHOI e LEE, 1999). Já os surfactantes, com a capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais dos líquidos (KOSARIC, 2001), passaram a ser constituintes dos mais diversos produtos de limpeza e higiene pessoal (MULLIGAN, 2005).

Os mesmos motivos que fizeram o plástico tornar-se tão popular são os mesmos que o fazem ser extremamente danosos ao meio ambiente. A durabilidade desse material é tamanha que sua degradação é incapaz de ocorrer em tempo viável (SHAH *et al.*, 2008). Para sanar esse problema, o plástico sintetizado por seres vivos (bioplástico) tem sido proposto como substituto aos sintéticos (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998). Com 100 % de biodegradabilidade, os polihidroxialcanoatos (PHAs) são bioplásticos de grande interesse, pois além de serem completamente metabolizados pelos microrganismos naturalmente presentes no solo, eles possuem propriedades similares a vários plásticos convencionais em uso (do polipropileno a borrachas sintéticas) e ainda podem ser sintetizados a partir de matérias-primas renováveis pela agricultura (REHM, 2003; STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998; TOKIWA *et al.*, 2009).

Os PHAs destacam-se pelo potencial para outras aplicações além do uso como embalagens graças às suas propriedades únicas como, por exemplo, a biocompatibilidade, atoxicidade, propriedades termoplásticas e/ou elastoméricas (BUGNICOURT *et al.*, 2014; CHEN, 2009). Vários microrganismos acumulam PHAs – com grande destaque para o polihidroxibutirato (PHB) –, como fonte de carbono e energia, sob a forma de grânulos no citoplasma (REHM, 2003), e para conseguir esse polímero, portanto, é necessário o cultivo do microrganismo com posterior lise celular para a obtenção dos grânulos. Comumente, esse

processo utiliza solvente, além de requerer grandes volumes de meio de cultura para que o microrganismo possa se multiplicar e acumular o bioplástico em quantidade expressiva (KOLLER *et al.*, 2008; MARANG *et al.*, 2013). Por conta disso, sua extração ainda é um procedimento caro, mas empresas em diferentes países têm investido fortemente em pesquisa a fim de que os polímeros de origem biológica se tornem mais competitivos aos sintéticos em relação ao custo de produção (MADKOUR *et al.*, 2013; SQUIO e ARAGÃO, 2004; WANG *et al.*, 2014).

Assim como os plásticos, os surfactantes provenientes do petróleo também apresentam como vantagem a produção em grande escala com baixo custo de comercialização (BANAT *et al.*, 2000). Todavia, outras duas desvantagens ocorrem nesse produto: a alta toxicidade e a sua não biodegradabilidade (MULLIGAN, 2005). Portanto, em locais com saneamento básico precário, a poluição se intensifica: os esgotos domésticos, contendo grandes quantidades de moléculas de surfactantes sintéticos, acabam afetando as propriedades físico-químicas e biológicas dos solos e produzindo espuma nos rios. No Brasil, esse tipo de poluição pode ser visto em vários rios de cidades metropolitanas, em especial no Estado mais populoso e industrializado do país, isto é, em São Paulo. O Rio Tietê, que corta São Paulo de leste a oeste, com frequência apresenta acúmulo de espuma superficial ao longo dos municípios mais urbanizados, devido ao despejo desses detergentes não-biodegradáveis.

Os surfactantes provenientes de seres vivos, por sua vez, possuem baixa toxicidade, são eficazes (alguns deles apresentam eficácia maior do que a dos surfactantes sintéticos), sua produção é realizada a partir de matéria-prima barata e é totalmente biodegradável (RON e ROSENBERG, 2001). Em geral, os microrganismos produtores de surfactantes naturais podem secretá-los em resposta a presença de determinados nutrientes nos meios de cultivo, chegando a fabricá-los a partir de meios contendo resíduos poluentes (NITSCHKE e PASTORE, 2004; UZOIGWE *et al.*, 2015). Algumas linhagens bacterianas, contudo, podem sintetizar surfactantes sem lançá-los extracelularmente – são os chamados biosurfactantes intracelulares ou particulados de superfície (RON e ROSENBERG, 2001). As características peculiares de especificidade, estabilidade em diferentes temperaturas, pH e salinidade, fizeram dos biosurfactantes produtos de interesse industrial e para diversos fins, principalmente na indústria petrolífera visando remoção de poluição ambiental (SHOEB *et al.*, 2013).

O aumento da densidade demográfica mundial, que desde 2011 ultrapassa a marca dos 7 bilhões (ONU, 2011), aumenta a apreensão não só quanto à necessidade da ampliação da produção de alimentos e da disponibilidade de água potável, mas também como tratar o ambiente de forma mais racional. A pressão de consumidores para a necessidade de legislações

ambientais mais rígidas e o estímulo ao consumo de bens e produtos de maneira sustentável tem estimulado os diversos ramos industriais a prestarem mais atenção para os produtos de origem biológica que possuam as características vantajosas dos materiais sintéticos (CHEN, 2009), pois somente assim é possível reduzir o impacto ao meio ambiente sem perder os benefícios que a industrialização propicia. A marca belga Ecover tem desenvolvido surfactantes de origem biológica (especialmente soforolipídios) em seus cosméticos e produtos de limpeza, assim como a francesa Soliance, a japonesa Saraya e a sul-coreana MG Intobio. A Nestlé, L'Oreal, Procter & Gamble e Shiseido, por sua vez, são exemplos de empresas que investem em bioplástico nos seus produtos. O biodegradável, como fonte renovável, ajuda a reduzir a dependência do petróleo e a emissão de poluentes. Portanto, a busca por alternativas capazes de acelerar a degradação de plásticos e surfactantes quando descartados tornou-se uma necessidade para o aprimoramento do sistema produtivo quando se visa associar crescimento econômico e preservação ambiental (GAO *et al.*, 2011).

Diante da importância de conhecer a diversidade de microrganismos de interesse biotecnológico, o presente estudo teve o propósito de isolar bactérias autóctones de solo de Mata Atlântica e de lodo de Estação de Tratamento de Efluentes (ambos localizados em Coruripe-AL), produtoras de polihidroxialcanoatos e moléculas biosurfactantes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Isolar e identificar molecularmente microrganismos de solo de Mata Atlântica (Coruripe-AL) e de lodo da Estação de Tratamento de Efluentes da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (Coruripe-AL) produtores de polihidroxialcanoatos e moléculas biosurfactantes extracelulares.

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar, entre isolados de bactérias de solo e de lodo (Coruripe-AL), aquelas capazes de crescer em meio limitado em nitrogênio e com excesso de fonte de carbono;
- Traçar o perfil morfo-bioquímico dos isolados bacterianos obtidos por meio de testes clássicos convencionais e o sistema API 20E (Biomeriëux®);
- Realizar a seleção de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos com base na turbidez das culturas em meio mínimo (em diferentes fontes de carbono) e coloração de suas colônias;
- Detectar o gene codante da PhaC sintase nos genomas dos microrganismos selecionados por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR);
- Identificar molecularmente, através de sequenciamento parcial da região 16S rRNA, os isolados bacterianos produtores de polihidroxialcanoatos;
- Monitorar o crescimento (biomassa seca), pH, consumo/produção de glicídios redutores totais, dos microrganismos selecionados e inoculados em meio de cultura com variações nas concentrações de suas fontes de nitrogênio, num intervalo de 0-96 h de incubação;
- Verificar o rendimento da produção de polihidroxibutirato (PHB), por espectrofotometria, dos microrganismos selecionados, após 24 h de cultivo em meio mínimo, variando-se as fontes de nitrogênio;
- Identificar a fonte de nitrogênio que mais favorecer o rendimento de polihidroxibutirato pelos microrganismos selecionados em 24 h de incubação e registrar por meio de cromatografia gasosa e fotografia em microscopia eletrônica de transmissão;
- Detectar e selecionar, entre os microrganismos comprovadamente produtores de polihidroxialcanoatos e identificados molecularmente, aqueles que são produtores de moléculas biosurfactantes/bioemulsificantes extracelulares através dos testes de colapso da gota, dispersão em óleo, índice e atividade emulsificante;

- Verificar a estabilidade do surfactante produzido pelo microrganismo selecionado como mais eficiente nessa característica através de variações de pH, temperatura e salinidade.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Plásticos biodegradáveis

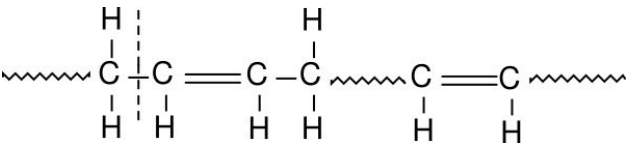
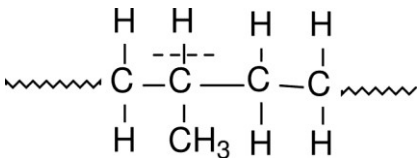
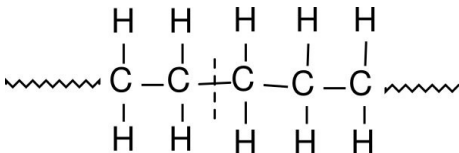
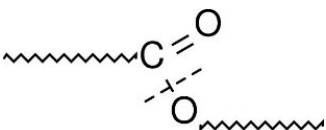
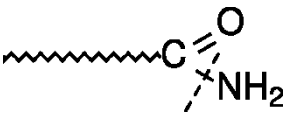
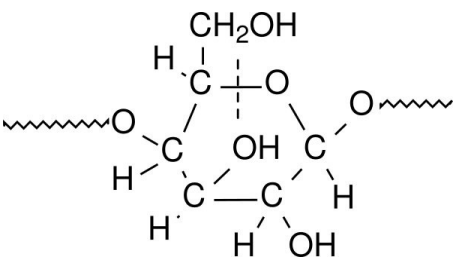
Polímeros (*poli*: muitos, *meros*: partes) são macromoléculas constituídas pela repetição de unidades químicas denominadas monômeros (VOET *et al.*, 2014). Eles podem existir em estado amorfo (isto é, com disposição desordenada das moléculas) ou cristalino (com ordenação tridimensional); sendo que na grande maioria dos casos, a estrutura do polímero se apresenta parcialmente amorfa ou cristalina, sendo chamados de polímeros semicristalinos (NUNES e LOPES, 2014). Uma vez que são bastante versáteis, os polímeros foram os responsáveis por grande parte das mudanças tecnológicas realizadas pelo ser humano neste último século: enquanto as borrachas e as fibras sintéticas revolucionaram o desenvolvimento dos setores automotivo, eletroeletrônico e têxtil (TOKIWA *et al.*, 2009; WEBB *et al.*, 2013; NUNES e LOPES, 2014), os plásticos dominaram especialmente a indústria de embalagens e se tornaram os polímeros industriais mais conhecidos no mundo.

A palavra plástico é de origem grega (*plastikos*) e significa “capaz de ser moldado em diferentes formas” (SHAH *et al.*, 2008). Compreendem materiais que têm como componente principal um polímero geralmente orgânico (MANO e MENDES, 2013), sintetizado na maioria das vezes a partir dos monômeros provenientes do petróleo. Dessa matéria-prima extraem-se por exemplo: etileno, propileno e butadieno, originando assim os materiais conhecidos como polietileno, polipropileno e polibutadieno, respectivamente. Em relação aos mecanismos pelos quais esses plásticos são degradados no ambiente, fazem parte a fotodegradação, a degradação termooxidativa, a degradação hidrolítica e a biodegradação por microrganismos (WEBB *et al.*, 2013).

Se por um lado, o uso dos polímeros popularizou e barateou diversos produtos, o elevado consumo dos bens gerados em diferentes setores tem resultado na deposição indiscriminada de resíduos recalcitrantes no ambiente (SHAH *et al.*, 2008). De maneira geral, a degradação natural dos plásticos começa com a fotodegradação, que leva a degradação termooxidativa: a luz ultravioleta (UV) solar fornece a energia de ativação necessária para iniciar a incorporação dos átomos de oxigênio no polímero, deixando o plástico quebradiço; como consequência, formam-se fragmentos até que as cadeias poliméricas sejam de peso molecular baixo o suficiente para só então serem metabolizadas por microrganismos. Estes, por sua vez, convertem o carbono presente em CO₂ ou o incorporam em biomoléculas (TOKIWA *et al.*, 2009; WEBB *et al.*, 2013). Para ser degradado, o polímero precisa atender a exigência de conter insaturação ou átomos de carbono terciário, e, para ser biodegradável, a molécula deve apresentar cadeia ou

sem ramificação (TOKIWA *et al.*, 2009) ou com grupos funcionais éster, amida ou acetal (MANO e MENDES, 2013) (Tabela 1). Comumente tais características não são atendidas pelos polímeros sintéticos, e por isso a sua degradação no ambiente ocorre lentamente.

Tabela 1. Degradabilidade ambiental dos plásticos sintéticos. O tracejado corresponde à cisão que ocorre na molécula.

Resistência à degradação ambiental	Requisito necessário na cadeia	Exemplo de cisão molecular
Degradável	Ligação insaturada entre carbonos	
	Átomo de carbono terciário	
Degradável e biodegradável	Cadeia sem ramificação	
	Ligação éster	
	Ligação amida	
	Ligação acetal	

Fonte: MANO, E.B.; PACHECO, E.B.A.V.; BONELLI, C.M.C. (2005) *apud* Mano e Mendes, 2013.

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. Dividem-se em três categorias (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005):

- Polímeros sintéticos: os quais são suscetíveis à degradação por microrganismos e/ou ataque enzimático, mas que não atendem a todas às propriedades dos plásticos necessárias para serem explorados comercialmente;
- Plásticos biodegradáveis feitos com amido: são plásticos parcialmente degradáveis, pois os microrganismos degradam o amido facilmente, porém o restante do plástico é recalcitrante;
- Polihidroxialcanoatos (PHAs): são os únicos polímeros 100% biodegradáveis em ambientes aeróbios ou anaeróbicos, e não há formação de produtos tóxicos (TOKIWA *et al.*, 2009).

3.2 Polihidroxialcanoatos

Os PHAs formam uma família de biopolímeros intracelulares, sintetizados por diversos microrganismos na forma de grânulos lipídicos citoplasmáticos (REHM, 2003), cuja função fisiológica é o fornecimento de nutrientes para energia e metabolismo do carbono durante as fases de falta de alimento (JENDROSSEK, 2009). Tratam-se de poliésteres estruturalmente simples (Figura 1), cujas características gerais são: insolubilidade em água e relativa resistência a degradação hidrolítica; boa resistência a UV, porém baixa resistência a ácidos e bases; e solubilidade em clorofórmio e outros hidrocarbonetos clorados (BUGNICOURT *et al.*, 2014).

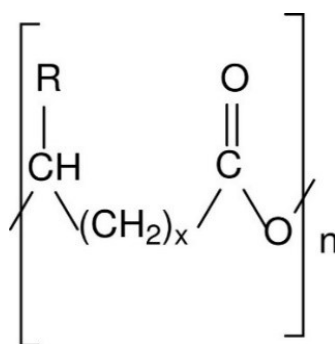


Figura 1. Estrutura geral de um polihidroxialcanoato. $x = 1, 2, 3$ e 4 ; n variando de 100 a milhares de unidades; o R é variável. Fonte: REHM (2003).

Mais de 150 diferentes unidades monoméricas são identificadas como constituintes dos PHAs (RIEDEL *et al.*, 2014), fazendo com que diferentes tipos de polímeros sejam criados, aumentando a gama de utilizações deste material. A classificação dos polihidroxilcanoatos é dependente do número de átomos de carbono que compõe o grupo funcional R . Assim, os PHAs

de cadeia curta constituem-se de polímeros cujos monômeros possuem de 3 a 5 carbonos, enquanto os PHAs de cadeia média são aqueles que têm de 6 a 14 (Figura 2) (GAO *et al.*, 2011). As propriedades também são diferenciadas: os PHAs de cadeia curta são geralmente mais cristalinos e termoplásticos, enquanto os de cadeia média exibem propriedades elastoméricas ou adesivas dependendo do comprimento da cadeia lateral específica e do grau de insaturação (SATO *et al.*, 2011).

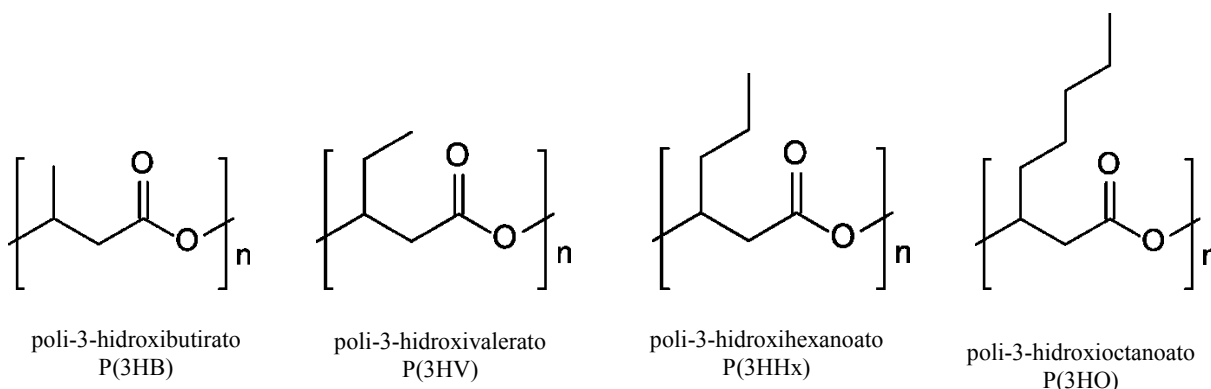


Figura 2. Exemplos de polihidroxialcanoatos de cadeia curta (poli-3-hidroxibutirato e poli-3-hidroxivalerato) e de cadeia média (poli-3-hidroxihexanoato e poli-3-hidroxioctanoato).

Para as bactérias, os PHAs servem como reserva de carbono e energia, e geralmente são sintetizados quando o meio de cultivo tem excesso de uma fonte de carbono, mas é deficiente em algum nutriente essencial (como nitrogênio, fósforo, magnésio ou oxigênio). Isso ocorre como uma estratégia de sobrevivência do microrganismo: uma vez que determinado nutriente é insuficiente para promover o crescimento celular, a célula então redireciona o fluxo de acetil-coA para sintetizar o polímero (VAN-THUOC *et al.*, 2012). Este, por sua vez, pode apresentar-se como homopolímero ou copolímero (GAO *et al.*, 2011), sendo a composição química e o peso molecular dos PHAs dependentes do substrato que é utilizado como precursor, da espécie bacteriana e do nível de expressão da PHA sintase (REHM, 2003; QUILLAGUAMÁN *et al.*, 2010; LÓPEZ-CUELLAR *et al.*, 2011). Aderidas à superfície dos grânulos, as PHA sintases são as enzimas responsáveis por catalisar a conversão dos tio-ésteres (R)-hidroxiacil-CoA em poliésteres com a concomitante liberação de CoA (JENDROSSEK, 2009) (Figura 3).

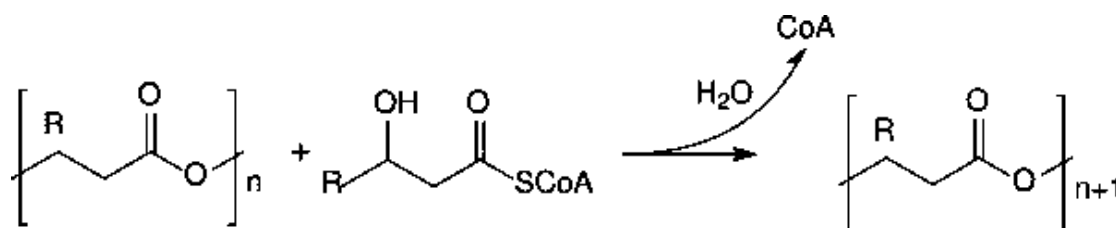


Figura 3. Reação catalisada pela PHA sintase, enzima encontrada aderida à superfície dos grânulos de polihidroxialcanoatos dos microrganismos produtores do biopolímero. Fonte: REHM (2003).

A polimerização das unidades monoméricas durante a síntese de PHA ocorre por meio de uma cisteína conservada da PHA sintase (Cys319), que atua como um sítio catalítico no qual a cadeia crescente de PHA é covalentemente ligada (VAN-THUOC *et al.*, 2012). O produto dessa reação geralmente é um homopolímero (GAO *et al.*, 2011) constituído de cadeias lineares de (R)-3-hidroxiбутирато (3HB), ou seja, o poli-R-3-hidroxiбутирато (PHB) (JENDROSSEK e PFIEFFER, 2014). Por ter sido o primeiro PHA descoberto (LEMOIGNE, 1926), ser acumulado com maior frequência pelos microrganismos e ainda possuir propriedades mecânicas muito similares aos plásticos convencionais [(tais como elevada temperatura de fusão (175 °C) e resistência à tração (30-35 MPa)], o poli-R-3-hidroxiбутирато é o polímero melhor caracterizado e explorado da família dos polihidroxialcanoatos (BUGNICOURT *et al.*, 2014).

De acordo com Jendrossek e Pfeiffer (2014), três tipos de PHB com diferentes números de unidades de 3HB são conhecidos: a) PHB de estoque: são PHBs de elevado peso molecular ($> 10^3$ resíduos de 3HB); b) oligo-PHB: PHB de baixo peso molecular (de 100 a 200 unidades de 3HB); c) PHB conjugado (cPHB): são aqueles nos quais um pequeno número de unidades de PHB (≤ 30) estão covalentemente ligadas a proteínas. O PHB de estoque está presente apenas nos procariotos (*Eubacterya* e *Archaea*), enquanto os oligo-PHB e cPHB são constituintes de todos os procariotos e nos eucariotos que já foram estudados, e assim eles devem estar presentes em todos os organismos, porém são poucos os estudos envolvendo oligo-PHB e cPHB.

O PHB de interesse como bioplástico é o PHB de estoque, entretanto o seu uso é limitado principalmente devido a sua fragilidade intrínseca. Como documentado na revisão de Bugnicourt *et al.* (2014), diversos autores têm constatado inclusive uma cristalização secundária (que ocorre no polímero quando em temperatura ambiente) que altera suas propriedades mecânicas ao longo do tempo: verificaram-se que amostras estocadas por 60 dias possuem alongamento de ruptura menor que as amostras que foram armazenadas na metade desse período. Considerando-se que a síntese de copolímeros a partir de carboidratos é uma situação rara (QUILLAGUAMÁN *et al.*, 2010) e que o PHB microbiano pode ser moldado e utilizado para a síntese de heteropolímeros com outros polímeros sintéticos (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005), a produção de blendas – mistura de duas ou mais espécies de polímeros – pode ser uma solução para esse problema. Na forma de blenda, o polímero tem suas propriedades físicas melhoradas (isto é, menos frágil), diminui-se a temperatura do processamento e reduz-se o custo de produção.

3.2.1 Características dos grânulos

Os grânulos de PHA são mais que simples organelas que estocam carbono e energia para a célula microbiana; a complexidade é tamanha que Jendrossek (2009) cunhou o termo “carbonossomo” para se referir a essa estrutura. Por conta disso, questões relacionadas à síntese, constituição, localização celular e degradação de grânulos de PHA têm sido objeto de estudo de diversos pesquisadores (REHM, 2003; THOMSOM *et al.*, 2010; JENDROSSEK e PFIEFFER, 2014). E para esse fim, a espécie *Cupriavidus necator* (também conhecida como *Wautersia eutropha*, *Ralstonia eutropha* e *Alcaligenes eutrophus*) é a bactéria mais utilizada (JENDROSSEK, 2009). No tocante à formação dos carbonossomos, a revisão publicada por Jendrossek e Pfeiffer (2014) descreve três modelos atualmente propostos para a formação *in vivo* destes: arcabouço, micela ou brotamento (Figura 4).

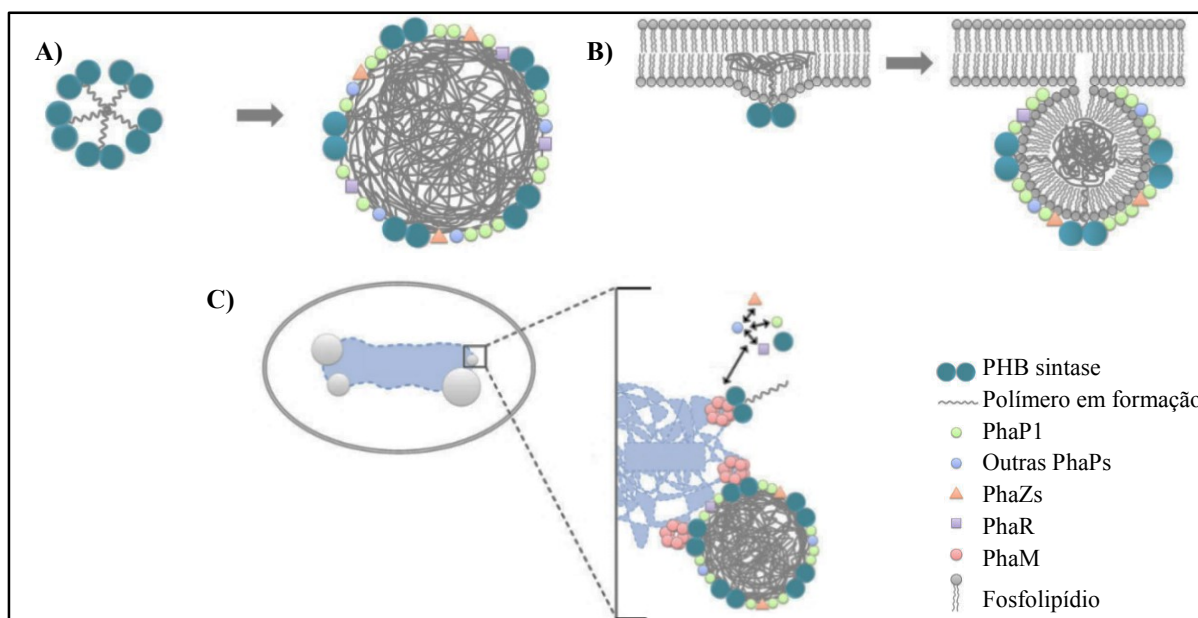


Figura 4. Modelos da formação do carbonossomo: modelo de micela (A), modelo de brotamento (B) e modelo de arcabouço (C). Fonte: adaptado de JENDROSSEK e PFIEFFER (2014).

Pelo modelo de micela, a enzima PHA sintase começa a produzir as moléculas de PHB desde que a concentração do substrato (3-hidroxibutiril-CoA) seja suficientemente elevada. A hidrofobicidade aliada a baixa solubilidade do PHB em ambiente aquoso resultam na agregação da cadeia polimérica nascente e formação de estruturas parecidas com micelas no citoplasma, sendo as moléculas de PhaC (parcialmente hidrofílicas) localizadas na superfície. Rehm (2003) afirmou que a PHA sintase é uma enzima inicialmente solúvel e torna-se anfipática somente quando começa a sintetizar a cadeia de poliéster, quando, então, se dá início o processo de automontagem. Por esse modelo, os grânulos podem surgir em qualquer região do citoplasma.

O modelo de brotamento, por sua vez, assume que a sintase está localizada ou ligada (direta ou indiretamente) à membrana citoplasmática, e que a cadeia de PHB nascente é liberada a partir da bicamada da membrana, levando a formação do grânulo contendo parte da membrana, e quando este atinge um tamanho específico, ele é liberado e então as fasinas e outras proteínas associadas juntam-se a ele. Em 2007, Jendrossek *et al.* provaram que os grânulos surgem próximos a membrana plasmática das bactérias, porém a ligação direta do grânulo à membrana não foi registrada até o presente momento.

Por último, o modelo de arcabouço considera que a PhaC sintase está (ou se torna) ligada à uma molécula – ainda desconhecida – que serve como uma âncora dentro da célula. Acontecendo dessa forma, a localização subcelular dos grânulos de PHB dependerá tanto da natureza como também da localização deste arcabouço no interior da célula produtora do polímero. Apesar de os autores terem concluído que esse é o melhor modelo para explicar a formação dos grânulos de PHB em *C. necator*, os outros dois modelos ainda não podem ser descartados.

Muito esforço tem sido direcionado também para tentativas de compreender e descrever com precisão a estrutura física das inclusões lipídicas. Além da PHA sintase (PhaC), ligada à superfície do grânulo de PHAs durante e após a polimerização, várias outras proteínas também se encontram nessa região, como as fasinas (PhaP), depolimerases (PhaZ) e proteínas regulatórias (PhaR). Juntas, essas moléculas formam uma monocamada de 4 nm ao redor do polímero, protegendo-o do citoplasma e regulando o número e tamanho da produção dos grânulos pelo microrganismo (THOMSON *et al.*, 2010). Frequentemente, as membranas dos grânulos de PHA são caracterizadas como contendo fosfolipídios, porém o grupo de pesquisa de Jendrossek não encontrou evidências *in vivo* da presença dessa molécula nas membranas dos grânulos de PHB em células de *C. necator*. Os pesquisadores alegam que a presença de fosfolipídio é um artefato resultante da metodologia de obtenção do polímero: durante o rompimento celular, os fosfolipídios presentes na membrana plasmática acabariam por se ligar à organela (JENDROSSEK e PFIEFFER, 2014).

3.2.2 Enzimas envolvidas na síntese de polihidroxialcanoatos

Ao contrário da formação dos grânulos de PHA, onde muitas questões ainda necessitam ser esclarecidas em definitivo, as vias biossintéticas da produção de PHA estão bem estabelecidas em diversos organismos, e o acetil-CoA, metabólito-chave para todos os organismos, é o precursor em todas elas. Em *C. necator* a produção de PHB envolve poucas enzimas e constitui-se de três etapas (RIEDEL *et al.*, 2014): 1) uma β -cetotiolase (codificada

pelo gene *phaA*) condensa duas moléculas de acetil-CoA, formando acetoacetil-CoA; 2) a acetoacetil-CoA formada é subsequentemente reduzida pela acetoacetil-CoA redutase (codificada por *phaB*) para formar 3-hidroxiacetil-CoA; 3) O monômero 3HB é polimerizado para formar poli(3HB) pela PhaC sintase. As outras vias que fornecem monômeros de (R)-3-hidroxiacetil-CoA para a síntese de PHA são a síntese de ácidos graxos e sua degradação (denominada β -oxidação) (Figura 5), as quais são encontradas em espécies de *Pseudomonas*, que possuem os genes *phaJ* e *phaG* (LEE, 2008). Enquanto *phaJ* codifica para uma hidratase que catalisa a conversão de cetoacetil-CoA ao precursor geral (R)-3-hidroxiacetil-CoA (e assim pode obter precursores para a síntese de PHA proveniente de intermediários da β -oxidação), *phaG* codifica para uma 3-hidroxiacetil-ACP:CoA transferase e esse gene é expresso quando o microrganismo necessita obter precursores a partir da biossíntese de ácidos graxos.

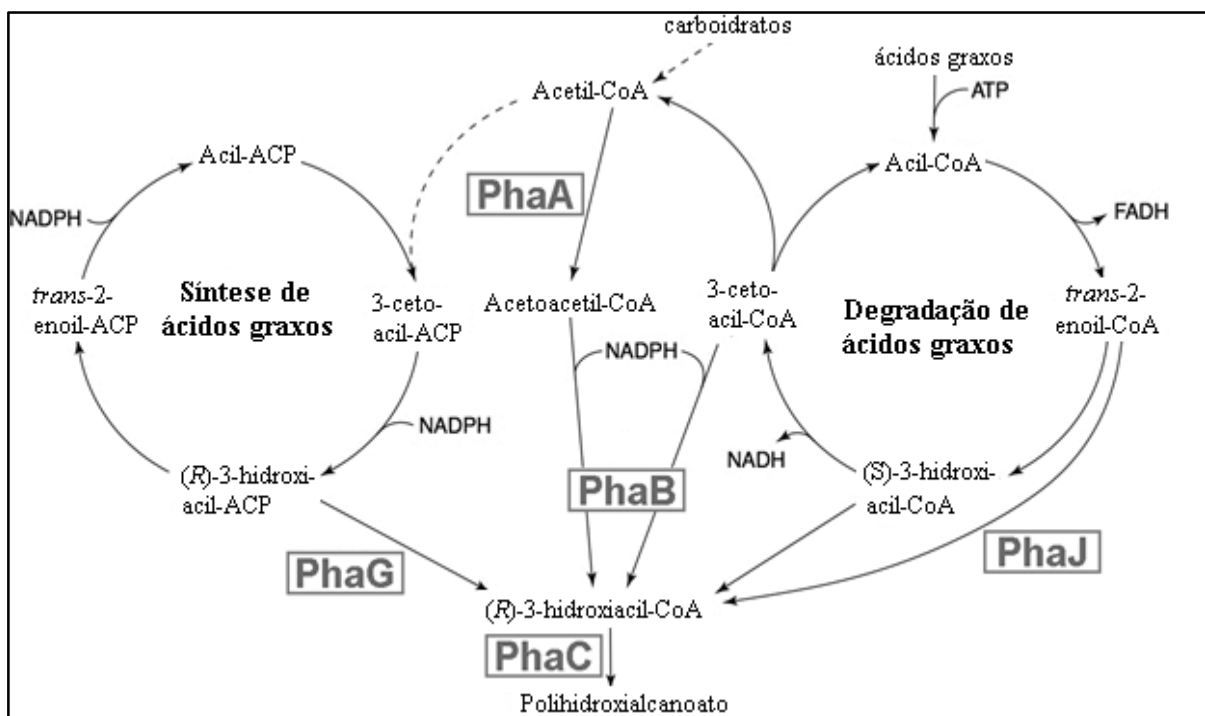
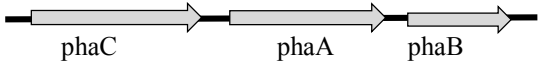
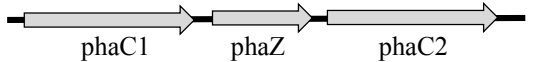
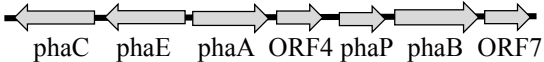
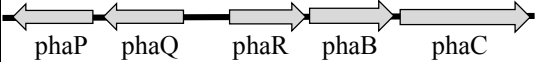


Figura 5. Vias metabólicas microbianas para a biossíntese de polihidroxialcanoatos. Os nomes dos genes que codificam as enzimas-chaves encontram-se em caixas: PhaA, 3-cetotiolase; PhaB, (R)-3-cetoacetil-CoA redutase; PhaC, PHA sintase; PhaG, (R)-3-hidroxiacetil ACP:CoA transacilase; PhaJ, (R)- enoil-CoA hidratase. As linhas tracejadas representam reações cujas etapas metabólicas não são mostradas. Fonte: adaptado de REHM (2003).

Uma vez que as pesquisas mais recentes sobre PHAs têm focado predominantemente nas enzimas que estão diretamente envolvidas na sua síntese, a maioria delas é bem caracterizada bioquímica e molecularmente (JENDROSSEK, 2009). Os genes codantes de tais enzimas estão geralmente agrupados em *operons* que podem ser encontrados em ilhas genômicas (TRIBELLI *et al.*, 2012), sugerindo-se que a transferência horizontal dos genes *pha* seja um mecanismo de adaptabilidade dos microrganismos às condições estressantes. Dessas, o gene codante da sintase (*phaC*) é o principal alvo para experimentos de mutação em

experimentos biotecnológicos em que se almeje elevar a produção de PHAs (REHM, 2003). Isolar microrganismos que possuam esse gene significa encontrar espécies potencialmente produtoras. O modelo atual das PHAs sintases ativas envolve duas subunidades, formando um homodímero ou heterodímero, sendo classificadas em quatro classes (Tabela 2).

Tabela 2. Tipos de subunidades encontradas nas PhaC sintases, de acordo com a classe e suas organizações genéticas. *phaA*, β -cetotiolase; *phaB*, acetoacetil redutase; *phaC* (inclusive *phaC1* e *phaC2*): PHA sintase; *phaE* e *phaR*, subunidades da PHA sintase; *phaP*, fasina; *phaQ*, repressor; *phaZ*, PHA depolimerase. ORF: região aberta de leitura com função desconhecida.

Classe	Subunidades da PhaC sintase	Microrganismo	Organização do operon
I	PhaC ~60-73 kDa	<i>Cupriavidus necator</i>	
II	PhaC ~60-65 kDa	<i>Pseudomonas</i> spp.	
III	PhaC ~40 kDa PhaE ~40 kDa	<i>Allochromatium vinosum</i> D	
IV	PhaC ~40 kDa PhaR ~22 kDa	<i>Bacillus megaterium</i>	

Fonte: adaptado de REHM (2003) e de SOLAIMAN e ASHBY (2005).

A PHA sintase de Classe I possui apenas subunidade PhaC que atua em substratos com 3 a 5 carbonos. A de Classe II também só possui subunidade PhaC, porém a enzima atua em substratos maiores, com 6 a 14 carbonos – situação encontrada em *Pseudomonas* spp. Já a de Classe III, além de PhaC, possui também PhaE (exemplo: *Allochromatium vinosum*); enquanto a Classe IV possui as subunidades PhaC e PhaR – é o caso do gênero *Bacillus* (REHM, 2003).

3.2.3 Produção microbiana de polihidroxialcanoatos

Existem mais de 300 microrganismos diferentes capazes de sintetizar PHAs (INOUE *et al.*, 2016). Há aqueles que necessitam da limitação de um elemento essencial como N, P, Mg, K, O ou S, e outras que produzem o polímero mesmo quando há abundância de todos os nutrientes (CHOI e LEE, 1999). O processo é realizado tipicamente em condições estéreis e envolve a utilização de uma fonte pura de carbono, mas alguns pesquisadores têm avaliado o uso de substratos alternativos, como a patente de Hsin-Ying e Falk (2013), que descreve um processo de produção de PHAs por microrganismos presentes em águas residuárias. Alguns exemplos de cultivo em escala laboratorial encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Condições de cultivo para a produção de polihidroxialcanoatos em escala laboratorial.

Condições Gênero	Meio de Cultura	pH inicial	Temperatura	Tempo	Agitação	Tipo de Experimento	Rendimento de PHA	Referência
<i>Pseudomonas</i>	meio mínimo + 1% de óleo de soja	7	37°C	72 h	Sim	SI	SI	MARJADI e DHARAIYA (2014)
	meio mínimo + 2% de óleo de milho	7	37°C	72 h	Sim	Frascos (100 mL)	26,47 %	CHAUDHRY <i>et al.</i> (2010)
	meio mínimo + 2% de glicerol	7	30°C	72 h	Sim	Frascos (2 L)	60 %	PALMERI <i>et al.</i> (2012)
<i>Enterobacter</i>	meio mínimo + 3% de melaço	7	37°C	24 h	Sim	Frascos (150 mL)	19,96 %	NAHEED <i>et al.</i> (2012)
	meio mínimo + extrato de levedura + óleo de máquina	5.1	30°C	7 dias	Sim	Reator (2 L)	35,66 %	ARUMUGAM <i>et al.</i> (2014)
	meio mínimo + 10 % de esgoto doméstico	7	37°C	30 h	SI	Frascos (200 mL)	60 %	CEYHAN e OZDEMIR, 2011
<i>Klebsiella</i>	meio mínimo + 5% de melaço	7	30°C	30 h	SI	Biorreator (5 L)	40 %	ZHANG <i>et al.</i> , 1994
	2,5% manitol + 0,5% extrato de levedura + 1% peptona	8	35°C	72 h	Não	Frascos (20 mL)	SI	SHENOY <i>et al.</i> , 2012
<i>Bacillus</i>	meio mínimo + 2% de sacarose	SI	30°C	72 h	Sim	Frascos (100 mL)	36,8 %	SHAMALA <i>et. al.</i> , 2003
	meio mínimo + 2% de sacarose	6,5	37°C	48 h	Sim	Frascos (SI)	42,6 %	NARAYANAN e RAMANA, 2012
	meio mínimo + 2% melaço + 0,08% de ureia	7	30°C	24 h	Sim	Frascos (50 mL)	42 %	KULPREECHA <i>et al.</i> , 2009
	meio mínimo + 2% de melaço	7	35°C	72 h	Sim	Frascos (400 mL)	62,53 %	GOMAA, 2014

SI: sem informação.

Na produção industrial de biopolímeros, o valor da fonte de carbono utilizada pode custar até 80% do gasto total (LÓPEZ-CUELLAR *et al.*, 2011), e por isso, para uso em escala comercial, é desejável a utilização de linhagens bacterianas que consigam aliar elevada densidade celular num curto período de tempo e grande produção do polímero a partir de substratos de baixo custo. Entretanto, na maioria das vezes a produtividade do PHA é menor quando a cepa bacteriana é cultivada em substratos alternativos encontrados no ambiente, quando comparada à produtividade desses isolados mantidos em fontes puras de carbono, como a glicose (CHOI e LEE, 1999). Por outro lado, há registros de sucesso como o de López-Cuellar *et al.* (2011), que conseguiram uma elevadíssima produção de PHA (92%) com o cultivo de *C. necator* em óleo de canola. A cepa selvagem de *Cupriavidus* isolada por outro grupo de pesquisadores (HUANG *et al.*, 2012) é capaz de acumular maior quantidade de PHA quando cultivada em metanol – uma das fontes de carbono mais baratas que existem – do que quando mantida em glicose. 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. Marang *et al.* (2013), por exemplo, verificaram que a população mista bacteriana com a qual trabalharam (com predomínio de *Plasticicumulans acidivorans*) preferiu esta fonte de carbono ao acetato, o qual também estava disponível no meio de cultivo.

Os PHAs são produzidos principalmente por culturas puras, muitas das quais já foram modificadas geneticamente. E, para isso, *Escherichia coli* ainda permanece como a linhagem preferida para as atividades industriais (INOUE *et al.*, 2016). A espécie tem sido usada como hospedeira de clonagem de genes da via biossintética de PHAs de *C. necator*. Como naturalmente não produzem bioplásticos, *E. coli* possui a vantagem de também não possuir depolimerases intracelulares capazes de degradar a grande quantidade (mais de 80% do peso seco) do polímero sintetizado (REHM, 2003). Além disso, a bactéria pode utilizar diversas fontes de carbono, como lactose, sacarose e xilose (CHOI e LEE, 1999). Na patente de Arias *et al.* 2015, por exemplo, os autores descrevem as condições de cultivo no qual um microrganismo contendo cópias extras do gene codante da PHA sintase produz maior quantidade do polímero, quando comparado à linhagem selvagem, após 24 h em meio mínimo contendo 15 mM de octanoato de sódio. Também utilizando engenharia genética, Fukui e Orita (2016) patentearam um método onde *Cupriavidus necator* é capaz de produzir poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) utilizando óleo vegetal como fonte de carbono. Segundo Wang *et al.* (2014), as tecnologias necessárias para a produção de linhagens bacterianas (selvagens ou modificadas geneticamente) úteis para a produção industrial desses polímeros encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Tecnologias a serem desenvolvidas e que são capazes de diminuir o custo da produção de polihidroxialcanoatos.

Tecnologia	Razão e/ou propósito	Metodologia
Fermentação com alta densidade celular	Crescimento dos microrganismos e facilidade para recuperação dessas células	Manipulação do <i>quorum sensing</i> e mecanismos de assimilação de oxigênio
Crescimento das células em substratos de baixo custo ou substratos impuros	Os substratos contribuem com 60% do custo de produção de PHA	Seleção de substratos específicos nos quais a bactéria produza alto conteúdo de PHA
Células de crescimento rápido	Tempo de fermentação reduzido e menor risco de contaminação microbiana	Minimização do genoma bacteriano e modificações nos padrões de crescimento
Rápido crescimento de bactérias que utilizem CO ₂	CO ₂ é um substrato gratuito	Manipulação dos mecanismo de assimilação de CO ₂ , como os carboxissomos
Processo de fermentação aberto (não estéril) e contínuo	Economia de energia para esterilização, redução da complexidade de fermentação e aumento da efetividade do processo	Seleção de produtores de PHA's capazes de crescer rapidamente em ambientes extremos de pH, temperatura e pressão osmótica
Síntese de PHA induzida por limitação de oxigênio	O oxigênio é um fator limitante em todo crescimento celular de alta densidade	Transferência dos <i>operons</i> de PHAs para regiões com promotores microaeróbicos
Acúmulo elevado de PHA (acima de 95% de PHA em células secas)	Evitar processos caros e complicados de purificação do polímero	Manipulação do mecanismo de síntese de PHA
Aumento do substrato para eficiência da conversão em PHA	Os substratos contribuem com 60% do custo de produção de PHA	Remoção das vias que consomem substratos para metabolismo não relacionados a PHA, e/ou reforço no fluxo de síntese do polímero
Aumento de células produtoras de PHA	Mais espaço para o acúmulo de PHA, o que também facilita a recuperação das células	Engenharia genética dos microrganismos
Indução de floculação celular	Facilita a recuperação da biomassa após fermentação	Expressão induzível de proteínas adesivas de superfície
Lise celular induzível	Permite a recuperação dos grânulos de PHA após centrifugação da biomassa	Expressão induzível de proteínas envolvidas na lise celular
Rompimento de células devido à hiperprodução de PHA	Economia do processo de centrifugação da biomassa	Manipulação do mecanismo de síntese de PHA
Produção extracelular de PHA	Ausência de limitação devido ao pequeno espaço celular, além de facilidade de recuperação dos grânulos	Necessidade de novos mecanismos de síntese de PHA
Grânulos grandes de PHA	Fácil recuperação dos grânulos de PHA a partir da lise do caldo de cultura	Manipulação da formação das proteínas associadas aos grânulos de PHA
Célula sintética combinando todas as propriedades acima	Elevada competitividade	Síntese de uma célula artificial com DNA funcional construído

Fonte: adaptado de WANG *et al.* (2014).

A síntese de PHB não é comum do metabolismo de *Pseudomonas* spp. (SOLAIMAN e ASHBY, 2005) e aquelas linhagens capazes de produzirem PHA de cadeia curta são classificadas como pertencentes ao grupo *P. oleovorans* e *P. extramaustralis*. Essa última espécie é capaz de acumular grandes quantidades de PHB. Resultados do grupo de pesquisa de Catone *et al.* (2014) afirmam que os dois *operons* (codantes para PHA de cadeia curta e de cadeia média) presentes na linhagem são expressos, porém em níveis distintos: após cultivarem *P. extramaustralis* em duas condições de cultura diferentes em relação à fonte de carbono (octanoato e glicose), o mRNA proveniente da expressão de *phabC*, *phaC1* e *phaC2* foi quantificado, sendo os níveis de transcrição do gene codante da PhaC de classe I (*phabC*) – ou seja, específico para PHB – significativamente maiores que os dos genes *phaC1* e *phaC2* (os quais polimerizam PHA de cadeia média).

Portanto, além do substrato, as características do metabolismo bacteriano podem favorecer a produção de PHAs de diferentes maneiras, por isso é imprescindível investigar e entender o perfil do crescimento cinético da bactéria sob diferentes condições (MANANGAN e SHAWAPHUN, 2010). A utilização de microrganismos halófilos na síntese do biopolíéster, por exemplo, pode ser bem vantajosa. Considerando-se que esse grupo de microrganismos precisa de elevada concentração de sal no meio de cultura, o crescimento de outras bactérias (contaminantes) acaba sendo inibido. Assim, fazer a seleção de produtores de PHAs em um meio com elevada salinidade é uma proposta interessante, como ocorreu nos estudos de Sangkharak e Prasertsan (2012), que isolaram 50 linhagens de diferentes ambientes sob várias pressões seletivas além da concentração de sais, como pH e tipo de metal pesado. Uma outra maneira de combater os microrganismos indesejados no meio de cultura propício à produção de PHAs é selecionar bactérias que, além de sintetizarem o biopolímero, também sejam capazes de produzir antibióticos, como fizeram Rehman *et al.* (2006).

3.3 Características das moléculas surfactantes

Surfactantes são definidos como substâncias que podem diminuir com elevada eficácia a tensão superficial de solventes quando utilizadas em baixíssimas concentrações (KOSARIC, 2001), aumentando a solubilidade, a mobilidade, a biodisponibilidade e, conseqüentemente a biodegradação dos compostos orgânicos insolúveis e hidrofóbicos (SINGH *et al.*, 2007). Essa principal característica das moléculas surfactantes deve-se à natureza anfipática que elas possuem, isto é, uma região hidrofílica (denominada “cabeça” da molécula surfactante) e outra hidrofóbica (denominada “cauda”) (Figura 6), capazes de agregarem-se nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (BANAT *et al.*, 2000).

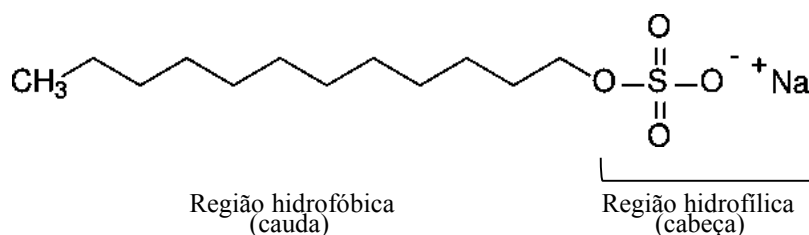


Figura 6. Estrutura do surfactante sintético dodecil sulfato de sódio (SDS), mostrando sua natureza anfipática (Fonte: SINGH *et al.*, 2007).

Quando os agentes anfipáticos se encontram em solução aquosa, dependendo da sua concentração, pode ocorrer a aproximação dessas moléculas à interface ou uma agregação em solução, através da formação de estruturas supramoleculares com diâmetro de 5 nm conhecidas como micelas (TANG *et al.*, 2013). De um modo geral, os grupos hidrofóbicos nas micelas formam o núcleo da estrutura que está separado do solvente polar pelos grupos hidrofílicos, os quais proporcionam proteção. A micelização é, portanto, uma propriedade intrínseca dos surfactantes e é responsável pela catálise e solubilização de gorduras (BANAT *et al.*, 2000; RON e ROSENBERG, 2001; MULLIGAN e WANG *et al.*, 2004). As micelas são as estruturas responsáveis para compatibilizar, por exemplo, a mistura de água com óleos, por meio da geração de emulsões (uma emulsão é a mistura homogênea entre dois líquidos não miscíveis) (SINGH *et al.*, 2007). Quando um surfactante é adicionado em uma solução, as tensões interfacial e superficial decaem até o início da agregação coloidal, denominado concentração micelar crítica (CMC). Ao se alcançar o valor da CMC, nenhuma redução da tensão é observada, mesmo com aumento da concentração de surfactante. Na CMC (a qual é dependente da estrutura do surfactante, pH, cadeia iônica e temperatura da solução), os monômeros de surfactantes realizam a associação de maneira espontânea (KOSARIC, 2001). Além das micelas, outras formas de agregação incluem as vesículas (com diâmetro de 40 a 400 nm) e monocamadas (Figura 7).

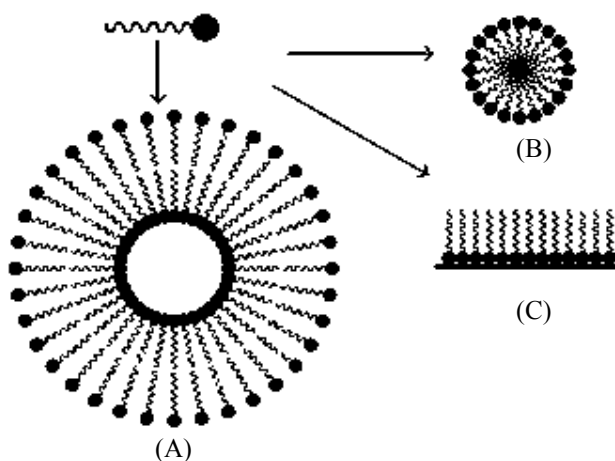


Figura 7. Representação da formação de agregados espontâneos das moléculas surfactantes na presença de líquidos imiscíveis: vesícula (A), micela (B) e monocamada (C) (Fonte: adaptado de TANG *et al.*, 2013).

De acordo com a origem, os surfactantes podem ser sintéticos ou biológicos. Os surfactantes sintéticos são classificados pela sua aplicação, estrutura molecular e natureza do seu grupo polar, podendo ser iônicos (aniônicos, catiônicos ou anfótero) ou não (BANAT *et al.*, 2000). Por sua vez, a porção apolar de um surfactante é composto por uma ou mais cadeias de hidrocarbonetos, podendo estas variar consideravelmente no seu tamanho, comprimento e grau de saturação (geralmente esse grupo contém entre 6 e 18 átomos de carbono), e podem ser alifáticas, aromáticas ou uma mistura de ambos (KOSARIC, 2001). Os surfactantes aniônicos são aqueles que, na dissociação, liberam íons carregados negativamente na superfície ativa, enquanto os surfactantes catiônicos liberam íons carregados positivamente, sendo que os mais importantes são formados por nitrogênio quaternário (MULLIGAN e WANG, 2004). Os surfactantes *zwitteriônicos*, também chamados de anfóteros, apresentam moléculas orgânicas cujo grupo hidrofílico pode ou não ser carregado (tanto com carga positiva ou negativa). Por último, têm-se os surfactantes não-iônicos, isto é, aqueles que não possuem grupos hidrofílicos ligados a cadeia graxa (SHOEB *et al.*, 2013).

Os surfactantes sintéticos apresentam a vantagem da produção em grande escala sem exigências de substratos puros e, com isso, baixo custo de comercialização (RON e ROSENBERG, 2001). Todavia, a alta toxicidade e os danos ambientais causados por sua não biodegradabilidade, uma vez que a maioria deriva do petróleo, representam desvantagens. Nesse sentido, os surfactantes produzidos por seres vivos (biosurfactantes) apresentam-se como uma alternativa aos sintéticos (HALLMANN e MEDRZYCKA, 2015).

3.4 Surfactantes de origem biológica

Sintetizados por muitos microrganismos como subprodutos de seu metabolismo primário (RON e ROSENBERG, 2001), os biosurfactantes possuem grande apelo na chamada tecnologia verde (MULLIGAN, 2005; FRACCHIA *et al.*, 2015). Além da biodegradabilidade, apresentam baixa toxicidade, elevadas especificidade e estabilidade em diferentes temperaturas, pH e salinidade (ADAMU *et al.* 2015). Os biosurfactantes são diferenciados por sua composição química, peso molecular, propriedades físico-químicas, modo de ação e origem microbiana. De acordo com o modo de ação, os biosurfactantes podem ser de dois tipos: há os que permanecem aderidos à membrana do microrganismo, enquanto outros são secretados para o ambiente extracelular (RON e ROSENBERG, 2001). Quando considerado o peso molecular, classificam-se em biosurfactantes de baixa massa molecular e biosurfactantes de elevado peso molecular (ou bioemulsificantes) (RON e ROSENBERG, 2001; SHOEB *et al.*, 2013; UZOIGWE *et al.*, 2015).

Embora por muito tempo os termos biosurfactante e bioemulsificante tenham sido utilizados como sinônimos, é necessário que se faça a distinção precisa entre eles. Biosurfactantes são moléculas geralmente de baixo peso molecular (SHOEB *et al.*, 2013) com excelente atividade superficial – permitindo-lhes baixar tanto as tensões superficial e interfacial entre diferentes fases – com capacidade para formar emulsões estáveis (GAUTAM e TIAGY, 2005). Já os bioemulsificantes têm maior peso molecular que os biosurfactantes e também formam emulsões estáveis, porém sem reduzir muito a tensão superficial (UZOIGWE *et al.*, 2015). Enquanto os biosurfactantes possuem açúcares, aminoácidos, ácidos graxos e grupos funcionais como os ácidos carboxílicos em sua composição, os bioemulsificantes são misturas complexas de heteropolissacarídeos, lipopolissacarídeos, lipoproteínas e proteínas. Usualmente, os biosurfactantes de baixo peso molecular compreendem os glicolipídios, lipopeptídeos e fosfolipídios (MULLIGAN, 2005; SHOEB *et al.*, 2013), sendo os glicolipídios (Figura 8) a classe de menor toxicidade.

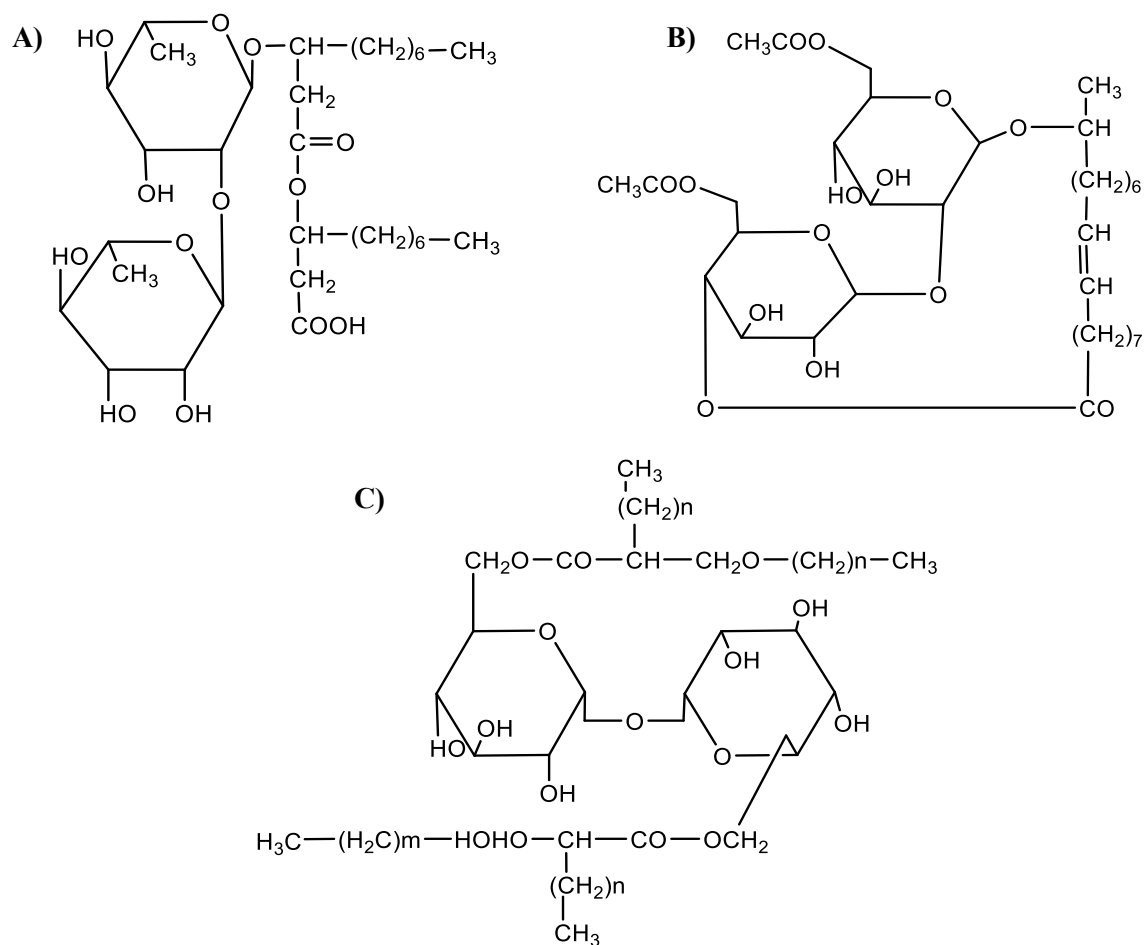


Figura 8. Subclasses de glicolipídios: ramnolipídio (A), soforolipídio (B) e trealoselipídio (C). Fonte: KOSARIC, 2001.

Constituídos a partir de uma combinação de carboidratos com longas cadeias de 26 ácidos alifáticos ou ácidos hidroxi-alifáticos, os glicolipídios estão envolvidos na assimilação de hidrocarbonetos de baixa polaridade por microrganismos. Dependendo da fonte de carbono disponível para seu crescimento, a linhagem será capaz de produzir diferentes tipos (BANAT *et al.*, 2000; KOSARIC, 2001), sendo que as subclasses mais conhecidas e estudadas compreendem os ramnolipídios, soforolipídios e os trealoselipídios.

Os fosfolipídios são componentes principais da membrana celular, formados por uma molécula de glicerol unida a dois ácidos graxos, através de ligações éster, e a um grupamento fosfato que pode apresentar diferentes substituintes (Figura 9) (GAUTAM e TIAGY, 2005). Esses surfactantes são capazes de formar microemulsões e diminuir a tensão superficial entre a água e o hexadecano. Quando em meio rico de hidrocarbonetos, tanto as bactérias quanto as leveduras aumentam consideravelmente o nível de fosfolipídios (BANAT *et al.*, 2000).

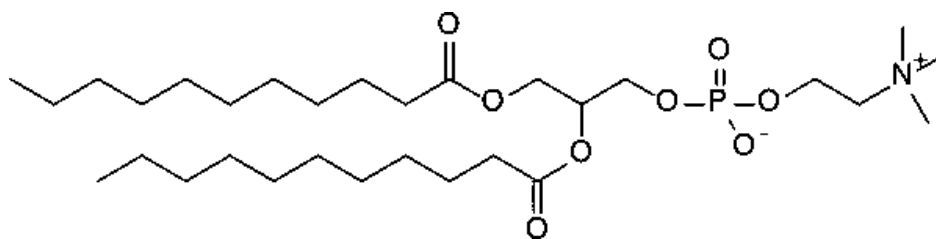


Figura 9. Estrutura geral de um fosfolipídio (Fonte: KOSARIC, 2001).

Os lipopeptídeos representam uma classe de surfactantes microbianos onde um ácido graxo específico está combinado com uma porção de aminoácidos (MORIKAWA *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2007). Isolada pela primeira vez no final da década de 60, a surfactina (Figura 10) é o representante mais conhecido dessa classe (ARIMA *et al.*, 1968; LIU *et al.*, 2007).

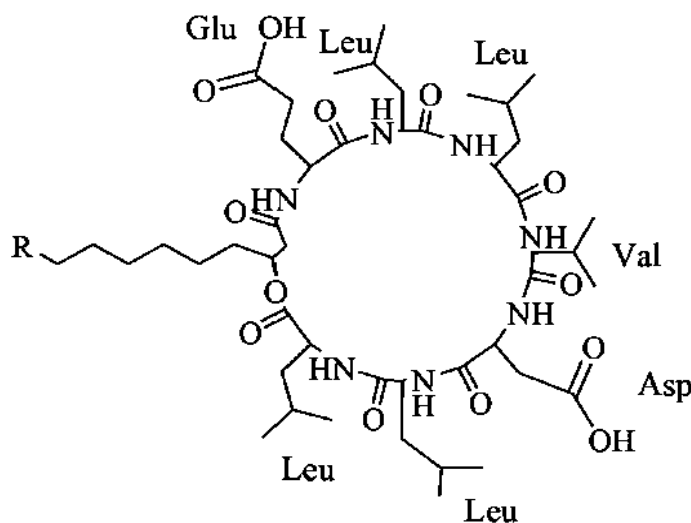


Figura 10. Estrutura da surfactina, surfactante lipopeptídico produzido por *Bacillus subtilis* (Fonte: LIU *et al.*, 2007).

Com estrutura cíclica, a surfactina é produzida por *Bacillus subtilis* e possui extraordinária atividade surfactante – na concentração de apenas 0,005 %, essa molécula é capaz de baixar a tensão superficial de 72 mN/m para 27 mN/m (MULLIGAN, 2005). Mais recentemente, Varadavenkatesan e Murty (2013) reportaram pela primeira vez o isolamento e o uso de *Bacillus siamensis* como produtor de biosurfactante do tipo lipopeptídeo, o qual foi capaz de reduzir a tensão superficial para 36,1 mN/m e apresentar grande potencial para ser utilizado em estratégias de remediação ambiental.

Os biosurfactantes de elevado peso molecular incluem os surfactantes poliméricos e os particulados, por exemplo as vesículas e células microbianas. Bactérias do gênero *Acinetobacter* produzem vesículas extracelulares, formadas em geral de proteínas, fosfolipídios e lipopolissacarídeos, que juntos apresentam função importante na captação de alcanos para a célula. Outros microrganismos produtores de biosurfactantes particulados são as cianobactérias e alguns gêneros patogênicos como *Staphylococcus* e *Serratia* (MULLIGAN e WANG, 2004; GAUTAM e TIAGY, 2005). Por sua vez, nos surfactantes poliméricos, geralmente os ácidos graxos estão ligados a um esqueleto de heteropolissacarídeos. Têm-se como exemplos: o alosan, o liposan e o emulsan. Produzido pela bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, o emulsan (Figura 11) caracteriza-se pelo alto poder de emulsificação, tem peso molecular de cerca de 1000 kDa (RON e ROSENBERG, 2001), é um dos bioemulsificantes mais estudados e um dos poucos surfactantes microbianos produzidos em grande escala.

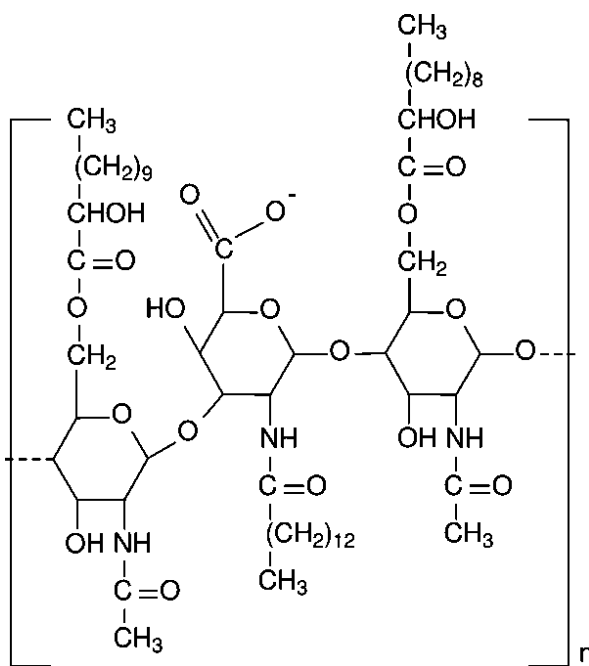


Figura 11. Estrutura do emulsan, surfactante polimérico produzido por *Acinetobacter calcoaceticus*. (Fonte: KOSARIC, 2001).

3.5 Áreas de utilização dos polihidroxialcanoatos, biosurfactantes e bioemulsificantes

Na busca de alternativas menos prejudiciais ao ambiente e capazes de serem produzidas a partir de matérias primas renováveis, grupos de pesquisa no mundo todo trabalham para viabilizar a produção de moléculas de origem biológica como os polihidroxialcanoatos (BRIGHAM e SINSKEY, 2012; CEYHAN e OZDEMIR, 2011; MADKOUR *et al.*, 2013; PITTMANN e STEINMETZ, 2014; WANG *et al.*, 2014), os biosurfactantes e bioemulsificantes (CHEN, 2009; FRACCHIA *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2007). A história da produção industrial de PHAs começou na década de 1950 (AVÉROUS e POLLET, 2012) e desde então as aplicações para os polihidroxialcanoatos só vêm crescendo. O primeiro produto industrial, um copolímero PHB/PHV de nome comercial Biopol®, foi lançado em 1980 pela *Imperial Chemical Industries* (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998). No Brasil, a produção biotecnológica de PHAs teve início na década de 90 (SQUIO e ARAGÃO, 2004), com o desenvolvimento da Biocycle®. As principais empresas que produzem PHAs encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5. Principais empresas que produzem polihidroxialcanoatos em escala comercial.

Empresa	País	Nome comercial	Tipo de polihidroxialcanoato
PHB Industrial	Brasil	Biocycle	PHB, PHBV
Biomatera	Canadá	Biomatera	PHBV
PolyFerm Canada	Canadá	VersaMer PHA	PHBV
Tianan	China	Enmat	PHBV
Tianjin & DSM	China	GreenBio	PHB
Biomer	Alemanha	Biomer	PHB, PHBV
Bio-On	Itália	Minerv PHA	PHB, PHBV
Kaneça	Japão	Kaneka	PHBHx
Meredian Holdings Group Inc.	Estados Unidos	MHG PHA	Copolímeros
Telles	Estados Unidos	Mirel	Copolímeros

Fonte: adaptado de AVÉROUS e POLLET (2012).

Inicialmente, os polímeros de PHA eram majoritariamente utilizados em materiais de embalagem (garrafas, filmes e sacolas), mas devido a sua biocompatibilidade, atoxicidade, propriedades elásticas e biodegradabilidade (GAO *et al.*, 2011; REHMAN *et al.*, 2006), os PHAs despertaram bastante interesse nos campos da Medicina e Farmácia. Dessa forma, os estudos dos PHAs atualmente estão voltados para produtos da área da saúde (BUGNICOURT *et al.*, 2014; INOUE *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2014), tais como suturas, materiais de procedimentos cirúrgicos, transplantes, sistemas de distribuição de fármacos e engenharia de

tecidos. Nesse último caso, as células são crescidas *in vitro* sobre o polímero biodegradável para que seja construído o tecido com a finalidade de implante (BRIGHAM e SINSKEY, 2012).

Ainda por conta da biocompatibilidade, os PHAs podem ser utilizados em produtos para a pele. Outras aplicações industriais compreendem o uso de PHA como transportadores biodegradáveis para liberação controlada de fertilizantes e biocidas, tubulações para irrigação, redes de pesca, fraldas e barbeadores (CHEN, 2009). De plástico biodegradável também se fazem tubetes para mudas de plantas – que se degradam no tempo exato de a muda estar pronta para ir ao campo (CHOI e LEE, 1999). Uma aplicação emergente dos PHAs é como fonte de ácidos orgânicos na alimentação animal (LAYCOCK *et al.*, 2013). A indústria química também tem benefícios ao utilizar PHA: como são facilmente coloridos, esse bioplástico tem potencial para ser usado na indústria fotográfica e de impressão. Uma vez que a hidrólise ácida dos PHAs produz ésteres metílicos de hidroxibutirato (além de hidroxialcanoatos de cadeia média), o polímero pode ser utilizado para a geração de energia (MADKOUR *et al.*, 2013).

Os biosurfactantes, por sua vez, são intensamente utilizados na indústria petrolífera. Dentre suas aplicações, estão incluídas a biorremediação e a dispersão do contaminante quando ocorre o derramamento de óleos (Figura 12) e a chamada “Recuperação Melhorada de Petróleo por Microrganismos” (MEOR).

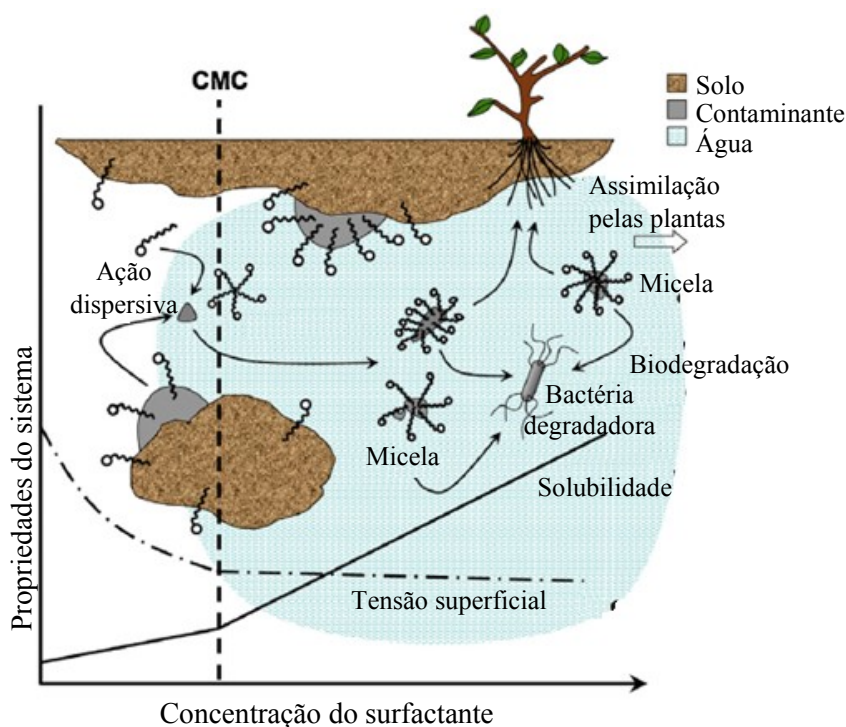


Figura 12. Esquema de remediação utilizando surfactante em solo contaminado com óleo (Fonte: adaptado de MAO *et al.*, 2015).

Devido ao aumento de acidentes com derramamento de petróleo e petroderivados de diferentes tipos e características, a utilização de biosurfactantes que elevam a interação superficial e aceleram a degradação de vários óleos tem crescido em grande escala (MULLIGAN e WANG, 2004; MADKOUR *et al.*, 2013). Essa técnica é utilizada tanto na biorremediação de águas ou de solos contaminados com hidrocarbonetos. Na pesquisa realizada por Santa Anna *et al.* (2007) foram estudadas formas de utilização de ramnolipídios produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas* na remoção de dois tipos de óleos contaminantes. Em estudo realizado por Hallmann e Medrzycka (2015), esse biotensoativo altamente umectante apresentou melhor eficiência na remoção de óleos do solo arenoso do que os surfactantes sintéticos. Os biosurfactantes também são utilizados para remoção de metais pesados, como níquel, cádmio, urânio, de solos, assim como para biodegradação de pesticidas. Surfactantes produzidos por *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* e *B. subtilis* demonstraram resultados promissores na remoção de piche em areias contaminadas (MULLIGAN e WANG, 2004).

Apesar do destaque na função ambiental dos surfactantes, suas aplicações se distribuem entre diversos setores industriais, como a indústria de alimentos, produção de papel, metais, na indústria têxtil, farmacêutica, higiene e cosméticos, agricultura entre outros (NITSCHKE e PASTORE, 2004). Os primeiros estudos sobre a produção de surfactantes biológicos em larga escala ocorreu em meados da década de 1980, quando se iniciou a comercialização de surfactina. De grande interesse científico e biotecnológico, esse lipopeptídeo desperta interesse da área médica pois apresenta atividade antibiótica (SHOEB *et al.*, 2013), podendo ser usado em catéteres visando a diminuição da formação de biofilmes, que são ambientes recalcitrantes que fornecem abrigo e proteção a flora microbiana e seus produtos extracelulares. Na indústria farmacêutica, já foi comprovada sua utilidade na inibição de coágulos e canais iônicos nas membranas (FRACCHIA *et al.*, 2015).

4 METODOLOGIA

As principais atividades experimentais deste trabalho encontram-se resumidas na Figura 13 e detalhadas nos subitens seguintes.

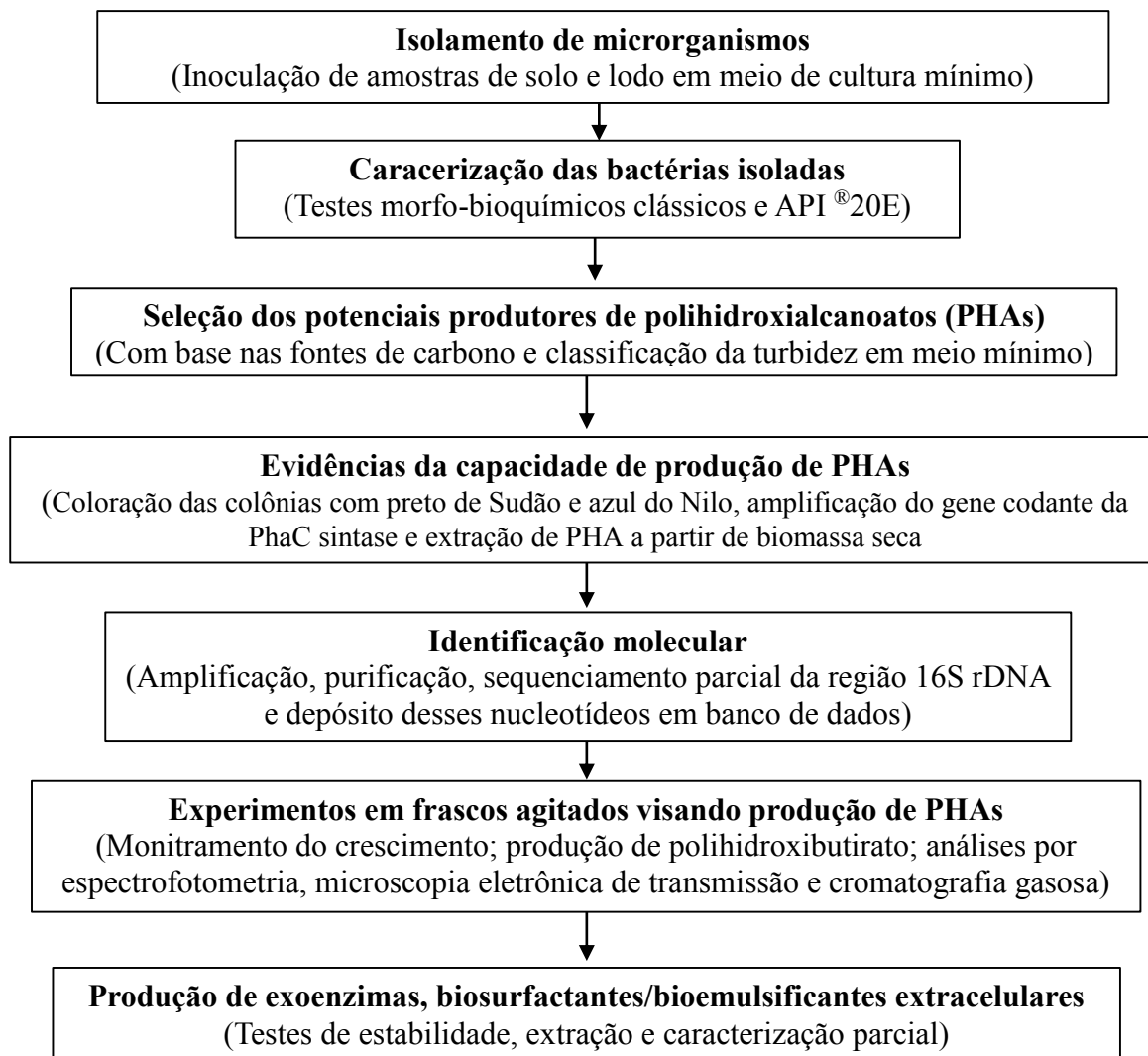


Figura 13. Fluxograma das atividades experimentais desenvolvidas no presente trabalho.

4.1 Coleta de amostras de solo e lodo

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" (camada orgânica superficial) foi removida com auxílio de ferramentas de jardinagem, e amostras do solo do horizonte "A" (camada caracterizada por atividade biológica devido aos microrganismos presentes) foram coletadas e depositadas no interior de tubos tipo *Falcon* previamente esterilizados, e transferidas para caixa de isopor com gelo ($\cong 4\text{ }^{\circ}\text{C}$), para o transporte ao laboratório de Bioquímica do Parasitismo e Microbiologia Ambiental (LBPMA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), onde foram mantidas sob refrigeração ($\cong 6\text{ }^{\circ}\text{C}$),

até seu processamento. As amostras de lodo ativado da Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) da “Usina Coruripe Açúcar e Alcool 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.

4.2 Isolamento de bactérias

A partir das amostras coletadas conforme descrito no item 4.1, inoculou-se individualmente 4 g de cada amostra em meio mínimo mineral (40 mL) com a seguinte composição (g L^{-1}): 0,2 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 13,3 $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,3 MgSO_4 ; 1,7 ácido nítrico; 10 mL solução de elementos traço esterilizada por filtração [$10 \text{ FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $2,25 \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $1 \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $0,5 \text{ MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $2 \text{ CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $0,23 \text{ Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$; $0,1 (\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$; 10 mL 35 % HCl] e glicose, 20 (NAHEED *et al.*, 2011). O pH foi ajustado para 7,0. 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, $30 \pm 1^\circ\text{C}$ em incubadora Shel Lab, modelo SSI3-2), as culturas foram submetidas a diluições seriadas e alíquotas dessas diluições re-inoculadas em meio sólido Ágar Nutriente, o qual é composto de (g L^{-1}): peptona, 5; extrato de carne, 3; NaCl , 1; ágar, 20, contendo $0,03 \text{ g L}^{-1}$ do antifúngico fluconazol (Medley®).

4.3 Características morfo-bioquímicas 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 (NEDER, 1992). 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 H_2S , urease, expressão da triptofanase, produção de indol, produção de acetoína, gelatinase, fermentação/oxidação de glicose, manitol, inositol, sorbitol, ramnose, sacarose, melibiose, amigdalina, 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 (SILVA, 1996).

4.4 Seleção de bactérias produtoras de PHAs

Além da verificação de quais fontes de carbono cada microrganismo pode utilizar (com base no sistema de galerias API® 20E descrito no item 4.3), 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

sacarose, 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 ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) (NAHEED *et al.*, 2011).

4.5 Coloração das colônias

Foram utilizadas duas metodologias de coloração das colônias microbianas produtoras de polihidroxialcanoatos 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 ($30 \pm 1^\circ\text{C}$). 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 (LEGAT *et al.*, 2010). 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 (SPIEKERMANN *et al.*, 1998). 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) em transiluminador Spectroline® foram considerados positivas para a produção de bioplástico.

4.6 Detecção do gene codante da phaC sintase

Após 24 h de incubação dos isolados bacterianos, sob agitação orbital (120 rpm, $30 \pm 1^\circ\text{C}$, em incubadora Shel Lab, modelo SSI3-2), em caldo nutriente, efetuou-se a extração de seu material genético por meio de *kit* comercial (*Bacterial Genomic DNA Isolation Kit*; Norgen Biotek). O par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) G-D (GTGCCGCCSYRSATCAACAAGT) e G-2R (GTAGTTCCASAYCAGGTCGTT), desenhado por Romo *et al.* (2007), 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 μmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,8 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl_2 , 2,5 μL de tampão 10X, 5 μg de albumina de soro bovino (BSA), 3 % de dimetilsulfóxido (DMSO) e 1 U de Taq DNA Polimerase (Biosystems). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Techne (Techgene) com o seguinte programa: 1 ciclo de 94°C por 10 min, 60°C por 2 min e 72°C por 2 min, seguido por 40 ciclos de 94°C por 20 s; $55,5^\circ\text{C}$ por 45 segundos e 72°C por 1 min e ciclo final de 72°C por 5 min. Os produtos de amplificação (*amplicons*) foram submetidos à

corrida eletroforética em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA). A visualização ocorreu com auxílio da luz ultravioleta emitida diretamente no gel utilizando-se um transiluminador Spectroline® com proteção acrílica, tendo o marcador de 100 pb (Amresco) como referência.

4.7 Produção e extração de PHA

Para o ensaio de produção de PHA, cada isolado foi cultivado primeiramente em 50 mL de meio caldo nutriente por um período de 24 h a 30 ± 1 °C. Em seguida, alíquotas de cada cultura foram distribuídas em 800 mL de meio mineral (descrito no item 4.2), e cultivados por 72 h. Após esse período, as culturas foram centrifugadas em tubos tipo *Falcon* por 20 minutos a 5000 g (centrífuga Sigma, 2K15). O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* lavado duas vezes com solução salina (0,9 % NaCl). A massa de células foi transferida para placa de Petri (previamente pesada) e deixada em estufa (40 °C). A biomassa seca foi pesada, retirada cuidadosamente da vidraria e transferida para frasco de Duran.

A extração de PHA ocorreu a partir dessa biomassa seca: para cada 0,5 g, acrescentaram-se 20 mL de clorofórmio, o qual foi deixado sob agitação por 1h30 (60 °C, 200 rpm). Após filtração a vácuo para a retirada das células secas, o clorofórmio contendo PHAs foi transferido para placa de Petri semi-tampada, afim de deixar o solvente evaporar lentamente e formar-se o filme polimérico.

4.8 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 4.6, exceto pelo fato de que nas reações de PCR utilizou-se o par 356F/1064R (ACWCCTACGGGWWGGCWGC e AYCTCACGRCACGAGCTGAC) como oligonucleotídeos iniciadores da amplificação do gene 16S rDNA, e não houve acréscimo de DMSO (WINSLEY *et al.*, 2012). O *amplicon* de cada um dos isolados foi purificado por meio de kit comercial (*DNA Purification Kit*; Norgen Biotek) e, depois, sequenciado em ambas as direções pela Plataforma de Sequenciamento de DNA da Universidade Federal de Pernambuco. O sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger no Analisador Genético da Applied Biosystems® ABI 3500×L (Life Technologies), contendo os marcadores fluorescentes Big Dye® Terminator v3.1 (Life Technologies). As condições de PCR para a reação de sequenciamento foram: 95°C (10 s), 51°C (5 s) e 60°C (4 min). As sequências foram editadas, convertidas para o formato FASTA e comparadas com aquelas registradas para tal gene identificador nos bancos públicos do NCBI (*National Center*

for *Biotechnological Information*) e do RDP (*Ribosomal Database Project*). As sequências foram depositadas no GenBank (NCBI), os alinhamentos foram realizados no *software* MUSCLE (EDGAR, 2004) e o dendrograma foi criado no programa TreeDyn (CHEVENET *et al.*, 2006).

4.9 Monitoramento do 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, a composição do meio descrito anteriormente (item 4.2) foi modificada quanto à variação da concentração de glicose e quanto à presença de peptona. Os meios de cultura 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). Cultivos submersos 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 finais de 10⁶ céls mL⁻¹. Triplicatas das culturas foram incubadas (65 rpm, 30 ± 1 °C, em incubadora Shel Lab, modelo SSI3-2) 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 glicídios redutores totais. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

4.9.1 Determinação do pH e da massa seca

As amostras das culturas foram centrifugadas (5000 rpm, 20 min, 20 °C, em centrífuga Sigma, 2K15) e seus sobrenadantes tiveram os valores de pH medidos por meio de pHmetro eletrônico previamente calibrado com soluções-padrão. As células precipitadas nos tubos de centrifugação foram ressuspensas em 1mL de água destilada estéril e transferidas para microtubos de 1,5 mL (tipo *Eppendorf*), sendo estes submetidos a secagem em estufa, a 40 °C por 24 h, até massa constante, a qual foi determinada gravimetricamente e expressa em g.L⁻¹.

4.9.2 Determinação de concentração de proteínas totais

Os sobrenadantes obtidos conforme descrito em 4.9.1 foram também utilizados para a determinação de proteínas totais pelo método espectrofotométrico de Lowry *et al.* (1951), utilizando uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA), variando de 0 a 600 µg.mL⁻¹. Para tanto, inicialmente preparou-se o reagente A (2 mL de solução de sulfato de cobre 1 %, 2 mL de solução de tartarato de sódio e potássio 0,1 mol.L⁻¹ e 196 mL solução aquosa destilada

contendo 3,92 g de carbonato de sódio e 0,784 g de hidróxido de sódio) e o reagente B (Folin-Ciocalteu 0,2 mol, 1:1 v:v). A mistura reacional consistiu de 0,5 mL da amostra centrifugada (sobrenadante de cada cultura, em triplicata) e 2 mL do reagente A. Depois de 10 min, acrescentaram-se 200 µL do reagente B, e deixou-se em temperatura ambiente por 30 min (no escuro). A partir disso, a absorvância do produto das reações (amostras dos sobrenadantes ou soluções de BSA) foi mensurada a temperatura ambiente em espectrofotômetro Femto 800xi a 660 nm.

4.9.3 Determinação de glicídios redutores totais

A curva padrão foi produzida variando-se a concentração de 0,2 a 4 mg.mL⁻¹ de D-glicose. Os glicídios redutores foram quantificados através de modificação do método do ácido 3,5 - dinitrosalicílico (DNSA), de modo que um volume de 200 µL de solução aquosa do reagente (0,25 g DNSA, 75 g de tartarato de sódio e potássio, 50 mL de hidróxido de sódio 2 M, 250 mL de água destilada) foi acrescido a 200 µL das amostras (sobrenadante) ou das soluções do padrão, aquecendo-se (100 °C, 5 min) a mistura de reação e, depois, diluindo-se para 5 mL com água destilada. As absorvâncias foram determinadas a temperatura ambiente em espectrofotômetro Femto 800xi a 540 nm (MILLER, 1959).

4.10 Produção de polihidroxibutirato

Para os ensaios de produção de P(3HB), cada um dos microrganismos foi inoculado em caldo nutriente e após 24 h de incubação (120 rpm, 30 ± 1 °C), esse meio foi centrifugado (20 min, 5000 rpm), o sobrenadante descartado e a ressuspensão das células deu-se em solução salina (0,9 %). Um total de 10⁹ células dessa suspensão foram utilizadas para inocular os meios de cultura líquidos, distribuídos em volume de 50 mL em erlenmeyers cuja capacidade máxima é de 125 mL. O meio de cultura utilizado é aquele descrito no item 4.2. Além desse meio original, os microrganismos foram inoculados nos meios alterados, onde o sulfato de amônio foi substituído por uma das quatro fontes inorgânicas de nitrogênio, a saber: acetato de amônio, cloreto de amônio e nitrato de amônio; além de outras quatro orgânicas: extrato de carne, extrato de levedura, glicina e peptona, sempre na concentração de 0,2 g.L⁻¹. As culturas foram incubadas sob agitação (120 rpm, 30 ± 1 °C), e após 24 h procederam-se as análises de determinação de pH, biomassa (conforme item 4.9.1), glicídios (conforme item 4.9.3) e rendimento de PHB (conforme item 4.10.1). Como controle, 1 mL de água estéril foi utilizado como inóculo e submetido às mesmas condições das cepas microbianas. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 9 tratamentos e 3 repetições. Os resultados de cada

parâmetro foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) e suas médias, através do teste de Tukey, sempre ao nível de 5 % de significância.

4.10.1 Dissolução em ácido sulfúrico

A biomassa obtida para cada meio de cultura (descrito no item **4.9.1**) foi colocada em tubo tipo *Falcon* (previamente lavado com etanol e clorofórmio quente) e macerada com bastão de vidro. O clorofórmio foi acrescido e a amostra ficou sob agitação (150 rpm, 60 °C) durante 1 h. Após esse período, a solução de clorofórmio + PHAs foi transferida para tubos de vidro e deixada evaporar. Acrescentaram-se 5 mL de H₂SO₄, e após 10 min a 100 °C, as absorvâncias foram verificadas em espectrofotômetro Femto 800xi a 235 nm (MARJADI e DHARAIYA, 2014). O rendimento da produção de PHB foi calculado dividindo-se o valor de PHB pela biomassa seca e expresso em porcentagem.

4.10.2 Metanólise ácida

A detecção de P(3HB) foi realizada por cromatografia gasosa, seguindo a metodologia de metanólise ácida descrita por Brandl *et al.* (1988): após o cultivo de cada microrganismo em meio líquido (conforme item **4.10**) e obtenção de suas biomassas secas (conforme item **4.9.1**), adicionou-se 1 mL de uma solução de metanol acidificado [(H₂SO₄ 15 % e 85 % de metanol) com ácido benzóico na concentração de 0,4 g.L⁻¹] e 1 mL de clorofórmio. Essa mistura foi aquecida em banho termostatizado a 100 °C durante 3 h, sendo agitada durante 30 segundos após uma hora de aquecimento. Ao final desse processo, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e adicionou-se 1 mL de água destilada. Após agitação de cada amostra por 30 segundos, deixou-se decantar.

A fase inferior (orgânica) foi recolhida com auxílio de uma pipeta Pasteur e armazenada sob refrigeração por 24 h. Após esse período, as amostras foram levadas para o “Laboratório de Saneamento Ambiental”, localizado no Centro de Tecnologia da Universidade Federal de Alagoas, para análise em cromatógrafo gasoso (Shimadzu), equipado com coluna Supelcowax 10 de sílica fundida (0,25 mm X 30 m), utilizando-se o sistema de detecção de ionização em Chama (FID). A análise foi realizada utilizando um protocolo, onde se estabeleceu uma rampa de temperatura (60 °C por 2 min), com aumento de 10 °C/min até atingir 200°C (durante 10 min). A temperatura utilizada para o injetor e o detector foram de 90 °C e 230 °C, respectivamente e como gás de arraste, utilizou-se nitrogênio na vazão de 1 mL/min.

4.10.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Após o cultivo de cada microrganismo em meio líquido (conforme item 4.10), 10 mL de cada cultura foram centrifugados (20 min, 5000 rpm) e o sobrenadante foi descartado. Para a fixação das células, adicionou-se 5 mL de solução de glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,2). As amostras foram encaminhadas ao “Laboratório de Microscopia Eletrônica” do Instituto Biológico (Secretaria da Agricultura e Abastecimento/São Paulo), sob refrigeração. A técnica realizada na visualização das células microbianas foi a de contrastação negativa. Para tanto, o material foi lavado 4 vezes no tampão já descrito, e para a pós-fixação do material, utilizou-se solução de tetróxido de ósmio 1 % (também no mesmo tampão). O material foi desidratado em uma série de soluções de concentrações crescentes de acetona (30 %, 50 %, 70 %, 90 % e 100 %), por 20 min em cada concentração, e depois foi infiltrado lentamente em resina *Spurr* e polimerizado em moldes horizontais em estufa (70 °C, 72 h). Os cortes ultra-finos foram realizados utilizando uma navalha de diamante e contrastados em acetato de uranila 2 % durante 10 min no escuro, e, logo após, em citrato de chumbo 0,5 % durante 7 min (REYNOLDS, 1963).

4.11 Perfil de exoenzimas

Após cultivo em caldo nutriente por 24 h (30 ± 1 °C), cada microrganismo foi inoculado no sistema de galerias API[®] ZYM e nos meios específicos para a verificação da lise de eritrócitos e hidrólises de Tween 80, de amido e de gelatina. O sistema de galerias API[®] ZYM foi utilizado de acordo as recomendações do fabricante, onde avaliou-se a presença das seguintes enzimas/reações, após 4 h de incubação: fosfatases, esterases, lipase (C14), leucina arilamidase, valina arilamidase, cistina arilamidase, tripsina, a-quimiotripsina, naftol-AS-BI-fosfohidrolase, α galactosidase, β glucoronidase, glucosidases, *N*-acetil- β glucosaminidase, α manosidase e α fucosidase. Nos outros meios de cultivo, o tempo de incubação foi de 72 h.

Para verificar a hidrólise do Tween 80, foi preparado o meio descrito por SLIFKIN (2000), contendo (g.L⁻¹): 10 peptona, 5 NaCl, 0,1 CaCl₂, 1,7 ágar e 10 mL de polisorbato (Tween 80) como substrato. Além da verificação da zona clara ao redor da colônia, a avaliação foi feita cobrindo-se o meio com solução de vermelho de fenol a 2 %. A revelação com esse corante torna o meio rosa quando o resultado é positivo, e a cor permanece inalterada (amarelo) em caso de não degradação do Tween.

A produção de amilases foi detectada em meio ágar nutriente contendo 0,5 % de amido solúvel, e a degradação foi avaliada depois da adição de lugol ao meio (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975), verificando-se a presença de uma zona amarelada ao redor da

colônia, contra um fundo roxo-azulado. A hidrólise da gelatina foi verificada no meio composto de (g.L⁻¹): 10 peptona, 5 extrato de carne e 120 gelatina, o qual foi distribuído em tubos e, após o tempo de incubação, foi colocado em banho gelado por 10 minutos. A liquefação da gelatina foi considerada como resultado positivo.

Para o teste de hemólise, utilizou-se o ágar sangue, preparado com (g.L⁻¹): 3 extrato de carne, 5 peptona, 1 NaCl, 20 ágar e 5 mL de sangue desfibrinado de carneiro (acrescido após a autoclavagem da mistura dos demais componentes). A atividade hemolítica foi configurada da seguinte forma: a) α -hemólise, caracterizada pela perda parcial de hemoglobina pelas hemácias do sangue, ocorrendo uma zona cinza-esverdeada no meio de cultura ao redor da colônia; b) β -hemólise, caracterizada pela lise completa das hemácias que rodeiam a colônia, ocorrendo uma zona transparente (zona de lise total) ao redor da colônia; c) γ -hemólise, caracterizada pelo crescimento no meio sem a constatação de lise de hemácias e/ou extravasamento de hemoglobina.

4.12 Produção de biosurfactantes/bioemulsificantes extracelulares

Aliquotas (10⁸ células.mL⁻¹) de suspensões aquosas de cada microrganismo foram inoculadas no meio de produção de biosurfactante descrito por Diab e El Din (2013), preparado com a seguinte composição (g.L⁻¹): 1 g NaNO₃, 0,5 NaCl, 2 HPO₄, 1 H₂PO₄, 0,5 MgSO₄.7H₂O, 0,01 FeCl₃, 0,5 extrato de levedura e 20 g glicose. As culturas foram incubadas por 72 h (30 ± 1°C, ao abrigo da luz) sob agitação orbital constante (180 rpm) em frascos contendo 50 mL do meio de cultura. Após esse período, 40 mL das culturas em cada erlenmeyer foi centrifugado (20 min, 5.000 x g) e do sobrenadante livre de células, verificou-se a produção de biosurfactantes por meio dos testes de avaliação das capacidades emulsificante (índice de emulsificação e atividade emulsificante) e surfactante (colapso da gota e dispersão do óleo mineral), além de ser verificado o pH final do meio de cultura (conforme item 4.9.1). Os 10 mL restantes, isto é, o meio de cultura contendo as células bacterianas, foram utilizados para verificar a capacidade emulsificante através do índice de emulsificação.

4.12.1 Avaliação da capacidade surfactante

Para determinar a capacidade surfactante dos sobrenadantes livres de células, utilizou-se a metodologia de colapso da gota de Kuiper *et al.* (2004). Para tanto, 50 µL das amostras (sobrenadante) foram depositados sobre superfície hidrofóbica (*Parafilm*® M), verificando-se o comportamento da gota. Quando a gota se apresenta dispersa na superfície hidrofóbica, a amostra é caracterizada como portadora de capacidade surfactante. Para melhor visualização

fotográfica, acrescentaram-se quatro gotas de uma solução de azul metileno (0,4 %) na amostra. Como controle negativo, utilizou-se o meio de cultura não inoculado.

Para também medir a capacidade surfactante, utilizou-se a metodologia descrita por Youssef *et al.* (2004): numa placa de Petri de 15 cm de diâmetro limpa e sem resíduos de lipídios, verteu-se 100 mL de água destilada estéril. No centro dessa placa, sobre a água, depositou-se cuidadosamente 20 µL de óleo mineral estéril. Novamente no centro, mas então sobre a micela oleosa, depositou-se gentilmente um volume de 10 µL das amostras (sobrenadante), sendo o deslocamento do óleo o indicativo da capacidade surfactante.

4.12.2 Avaliação da capacidade emulsificante

O índice de emulsificação das amostras foi obtido pelo método descrito por Cooper e Goldemberg (1987). Para tal, alíquotas de 2 mL destas foram depositadas em tubos contendo 3 mL de óleo de soja ou hidrocarbonetos (querosene, tolueno, óleo diesel e óleo de soja). Após homogeneização em vórtex (2 min, temperatura ambiente), esse material foi incubado por 24 h a temperatura ambiente. Então, mensurou-se a altura da zona de emulsão formada para o volume total da mistura. O índice de emulsificação foi calculado através da equação abaixo, sendo que E_{24} corresponde ao índice de emulsificação após 24h, He a altura da emulsão e Ht a altura total do líquido. O teste foi realizado em triplicata.

:

$$E_{24}(\%) = \frac{He \times 100}{Ht}$$

As amostras (sobrenadantes) foram avaliadas quanto a sua atividade emulsificante, conforme metodologia de Kokare *et al.* (2007), modificado. Após o cálculo de E_{24} , descrito no item anterior, a fase aquosa foi removida cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro e sua absorvância foi determinada a 400 nm (temperatura ambiente). Nesse comprimento de onda, uma absorvância de 0,010 unidades representou uma unidade de atividade emulsificante por mL (UE.mL⁻¹).

4.12.3 Estabilidade (E_{24}) do sobrenadante livre de células

Para a verificação da estabilidade do índice de emulsificação (E_{24}) do biosurfactante presente no sobrenadante livre de células, a cultura foi cultivada por 72 h em 100 mL do meio descrito no item 4.12. Após esse período, as amostras foram centrifugadas (5000 rpm, 20 min), e o sobrenadante livre de células foi dividido em alíquotas de 5 mL (em triplicatas) para a realização dos diferentes tratamentos, a saber: a) salinidade: acrescentou-se NaCl ao meio de

cultura nas concentrações de 2, 6 e 10 %; b) temperatura: as amostras foram mantidas às temperaturas de 4, 30 e 100 °C durante uma hora; c) alteração de pH: utilizou-se uma solução de NaOH ou HCl 5 M para ajuste do pH em 2, 7 e 10. Como controles, uma alíquota foi mantida sem tratamento. Em todos os casos, alíquotas provenientes do meio de cultura não inoculado foram submetidas às mesmas variações de salinidade, temperatura e pH.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 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. As características morfológicas e algumas das características bioquímicas dos isolados obtidos neste trabalho estão expostas na Tabela 6.

Tabela 6. Algumas características morfológicas 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	Nit	NaCl
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: En= 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 acetoina, Nit= redução de nitratos em nitrito, NaCl= crescimento em meio nutritivo contendo NaCl 6,5 %.

A composição do meio de cultura que foi utilizado para o isolamento, isto é, limitado em nitrogênio [0,2 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄], favoreceu a obtenção dos microrganismos capazes de sobreviver nessa condição. 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 (SREEKANTH *et al.*, 2013). 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. Uma vez que as bactérias sintetizam maior quantidade de PHA quando o meio é limitante (CHOI e LEE, 1999), o meio mínimo limitado em nitrogênio é escolhido pelos pesquisadores (SHAMALA *et al.*, 2003; KULPREECHA *et al.*, 2009; CHAUDHRY *et al.*, 2010; GOMAA, 2014) quando buscam selecionar microrganismos autóctones produtores do polímero.

Apesar de gêneros formadores de endósporos serem comumente encontradas no solo (como *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporosarcina* e *Streptomyces*) (NAHEED *et al.*, 2011), 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 formadoras 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. Os isolados codificados como BMA-01, 03, 04, 05, 08 e 09 mostraram-se incapazes de realizar fermentação da glicose. BMA-11, 12, 14 e 16, por sua vez, além de oxidar, também fermentam a glicose utilizando a via ácida mista, com a produção de diferentes ácidos. Os treze isolados restantes têm metabolismo oxifermenativo com capacidade de fermentação pela via butilenoglicólica, produzindo acetoína, butilenoglicol e pequenas quantidades de ácidos. A maioria dos isolados (75 %) foi capaz de suportar meio de cultura com elevada concentração de sal (6,5 % NaCl). Com base nas características morfofisiológicas apresentadas, os isolados foram identificados como pertencentes aos seguintes gêneros: *Pseudomonas* (BMA-01, BMA-03, BMA-04, BMA-05 e BMA-09), *Corynebacterium* (BMA-06, BMA-14), *Enterobacter* (BMA-10, BLD-03, BLD-04 e BLD-06) *Actinomyces* (BMA-07), *Listeria* (BMA-08), *Neisseria* (BMA-17), *Bacillus* (BLD-05 e BLD-07), *Klebsiella* (BMA-13), *Nocardia* (BMA-15), e *Serratia* (BMA-02, BMA-11, BMA-12, BMA-16, BLD01 e BLD-02).

5.2 Seleção dos produtores de polihidroxialcanoatos

Todos os microrganismos obtidos no presente trabalho utilizam a glicose como fonte de carbono e a maioria utiliza também sacarose e manitol (Tabela 7). A utilização dessas fontes mais puras para o cultivo bacteriano pode aumentar em até 80 % os gastos de produção, mas, em geral, aumentam a produtividade do PHA (CHOI e LEE, 1999; HUANG *et al.*, 2012). No caso dos testes aqui efetuados, essa informação apenas facilita a seleção de substratos com riqueza nos mesmos.

Tabela 7. 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 Isolado	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).

A procura por bactérias produtoras de PHAs deve levar em consideração o substrato disponibilizado a elas, pois o mesmo determinará o tipo de biopolímero sintetizado e os custos do processo, uma vez que a produção de bioplástico dá-se em grandes volumes, isto é, cultura submersa em biorreatores (TYO *et al.*, 2006). Portanto, a otimização das condições fermentativas – aliado ao uso de substratos que seriam descartados pelas indústrias – constituem uma maneira de baratear a produção de PHAs (REHMAN *et al.*, 2006). Pelo seu baixo custo, alguns substratos brutos como melaços de cana, soro de leite, óleos vegetais, além de hidrolisados (amido, celulose e hemicelulose), podem ser excelentes substratos para a produção de PHAs para bactérias (SQUIO e ARAGÃO, 2004).

Para verificar a utilização de outras fontes de carbono (óleo de soja, glicerol 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, provavelmente houve mais síntese do bioplástico. Dessa forma, constatou-se que a maioria dos isolados utilizam outros substratos além da glicose para crescer e provavelmente produzir PHAs (Tabela 6).

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 sintase*.

5.3 Evidências da capacidade de produção de polihidroxialcanoatos

5.3.1 Coloração das colônias

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 (TYO *et al.*, 2006). O preto de Sudão (Figura 14) foi o primeiro corante a ser utilizado com o objetivo de detectar produtores de PHAs (SCHLEGEL *et al.*, 1970), e seu uso antes da descoberta de outros corantes foi consideravelmente grande.

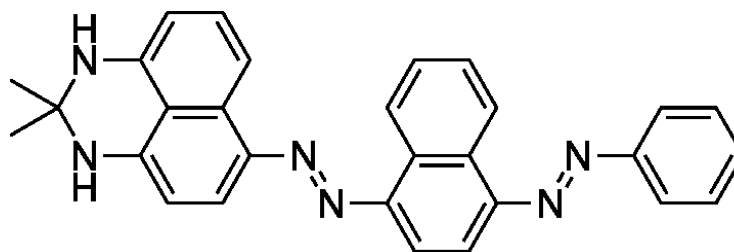


Figura 14. Estrutura química do preto de Sudão, um azocorante lipofílico capaz de identificar a presença de PHAs na célula bacteriana.

Os quatro microrganismos selecionados retiveram o preto de Sudão em suas colônias, com destaque para o isolado codificado como BMA-05 (Figura 15A). Entretanto apenas o isolado codificado como BMA-10 produziu fluorescência sob luz UV no meio de cultura onde o corante azul do Nilo estava presente, e em intensidade inferior à da bactéria de referência, *Cupriavidus necator* ATCC 17699 (Figura 15B).

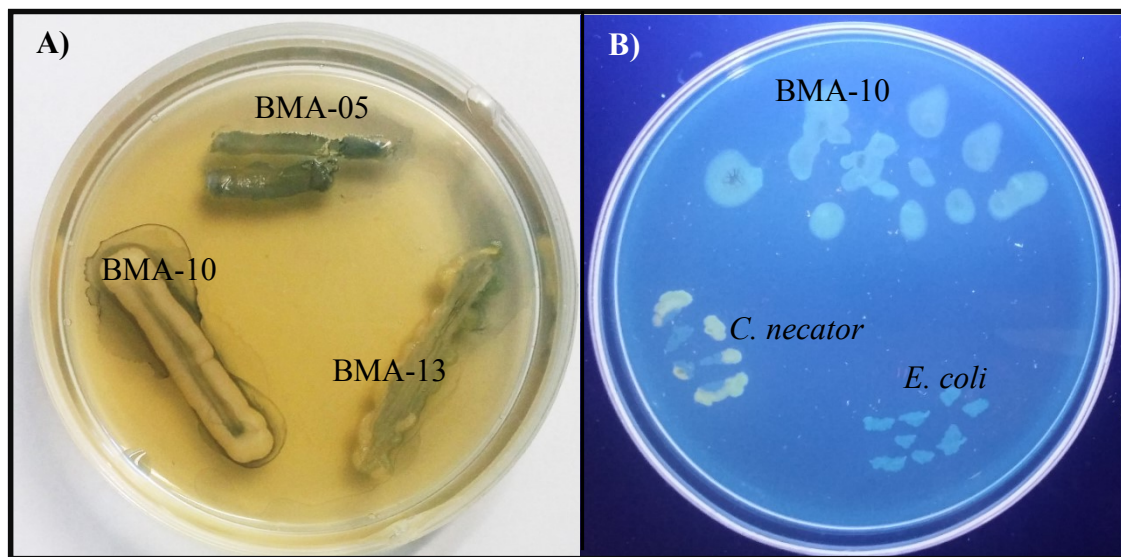


Figura 15. Culturas de bactérias coradas com corantes lipofílicos por duas técnicas diferentes. Em (A), uma solução de preto de Sudão foi depositada sobre as estrias dos microrganismos 20 min antes da lavagem com etanol (produtoras de PHAs retiveram o corante). Em (B), o corante azul do Nilo foi acrescido como componente do meio de cultura, e após 72 h de incubação ($30 \pm 1^\circ\text{C}$), as colônias PHA-positivas apresentaram fluorescência alaranjada sob luz UV. *C. necator* ATCC 17699 foi utilizada como controle positivo e *Escherichia coli* ATCC 25922 como controle negativo em todos os experimentos.

Reconhece-se que o preto de Sudão não é específico para PHA, uma vez que é capaz de agir em todos materiais lipídicos presentes na célula. Contudo, seu uso na identificação de microrganismos produtores ainda é a etapa inicial de muitas pesquisas (HUANG *et al.*, 2012). 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. Ele pode ser empregado de duas maneiras: a) em esfregaço fixado pelo calor: nessa metodologia, os grânulos de PHAs ficam escurecidos pelo corante (visível em microscópio óptico) enquanto o restante da célula fica avermelhada devido à safranina; b) sobre a colônia bacteriana (LEGAT *et al.*, 2010), que foi a metodologia empregada no presente trabalho e também a mais indicada quando se tem um elevado número de microrganismos para ser testado: as colônias dos microrganismos produtores têm a capacidade de manter-se coradas mesmo após serem lavadas com álcool etílico.

O azul do Nilo (Figura 16), 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 (FRICK *et al.*, 2014), acredita-se que este seja o responsável pela coloração e fluorescência dos grânulos de PHA nas células bacterianas.

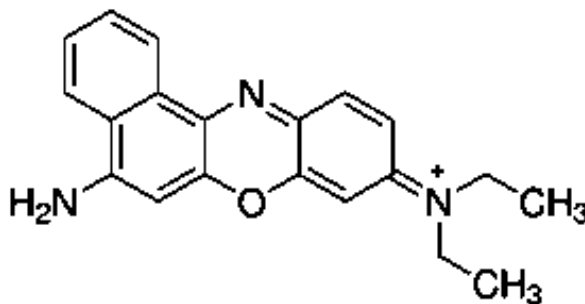


Figura 16. Estrutura química do azul do Nilo, um corante básico de oxazina capaz de identificar a presença de PHAs na célula bacteriana.

Legat *et al.* (2010) foram os primeiros pesquisadores que acrescentaram o corante vermelho do Nilo no meio de cultivo para detectar *Archaea* produtoras de polihidroxialcanoatos. No mesmo trabalho, os autores descreveram um experimento onde eles coloriram, com o azul do Nilo, as culturas de haloarchaea produtoras de polihidroxibutirato e visualizaram as células em microscópio óptico. Segundo os autores, na maioria das células, os grânulos de PHB eram bem distintos, capazes de destacarem-se contra o fundo escuro; entretanto, algumas células apresentaram uma coloração difusa, delineando um esboço da morfologia bacteriana. Os autores atribuíram essa situação à afinidade lipofílica do corante, que se ligou também à membrana (ou envelope celular) dos microrganismos estudados. Como o azul do Nilo apresenta menor custo que o vermelho do Nilo, o seu uso é recomendado por diversos pesquisadores.

Por conta dessa inespecificidade, mesmo utilizando-se azul do Nilo, desde o início da utilização de corantes para detectar produtores de PHAs discute-se a eficiência desses processos (OSTLE e HOLT, 1982; KUNG *et al.*, 2007; MESQUITA *et al.*, 2015). Além de PHAs, os triacilgliceróis e ésteres de cera são encontrados como inclusões citoplasmáticas em bactérias – embora os PHAs sejam polímeros ao invés de lipídios *strictu sensu*, todos os três tipos de inclusões são denominados lipídios por conveniência (THOMSON *et al.*, 2010) – e elas possuem basicamente as mesmas características: são grânulos citoplasmáticos bem definidos, com 200 a 500 nm em diâmetro, com a região central contendo o lipídio amorfo e recoberta com proteínas. Quando o azul do Nilo começou a ser empregado em metodologias visando a detecção de microrganismos produtores de polihidroxialcanoatos, defendia-se a ideia que esse corante possuía 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 (OSTLE e

HOLT, 1982). Todavia, apesar da maior especificidade do azul do Nilo aos PHAs, Mesquita *et al.* (2015) 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.

5.3.2 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, especialmente as PHA sintases (BRIGHAM e SINSKEY, 2012; BUGNICOURT *et al.*, 2014; CATONE *et al.*, 2014). Existem quatro classes de PHA sintases, das quais destacam-se as PHA sintases da classe I, capazes de polimerizar unidades de hidroxiaxil-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) (REHM, 2003). 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 referente ao gene codante da PhaC sintase (Figura 17).

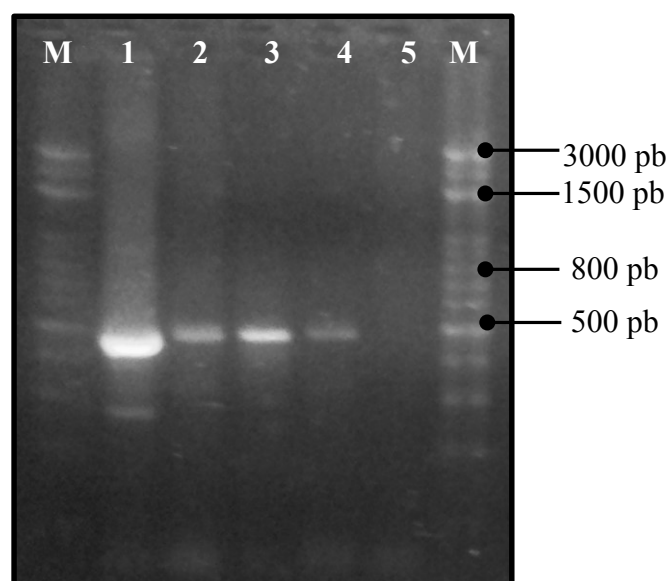


Figura 17. Gel de agarose (1 %) contendo amplicons de 492 pb do gene codante da *phaC* sintase dos isolados bacterianos BMA-05 (linha 1), BMA-10 (linha 2), BMA-13 (linha 3) e BLD-07 (linha 4), de solo de Mata Atlântica e lodo de ETE sucroalcooleira de Coruripe-AL. Linha 5= controle negativo. M= marcador de peso molecular (100 pb).

López *et al.* (1997) 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.* (2000), foram um 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 (Tabela 8) são comumente utilizadas para detectar genes *phaC* das classes I e II.

Tabela 8. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados por diferentes pesquisadores na técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detectar a presença do gene codante da PhaC sintase em amostras ambientais e/ou culturas puras. As sequências de Romo *et al.* (2007) foram utilizadas no presente trabalho.

Nome	Sequências	Referência
-	5'GTTGCAGTACAAGCCGCT3'	LÓPEZ <i>et al.</i> , 1997
-	5'CACGGCACGATATGGTCT3'	
phaCF2 phaCR4	5'GT(CCC/GG)TTC(GGG/AA)T(GGG/CC)(AAA/GG)T (CC/G)(TT/A)(CCC/GG)CTGGCGCAACCC3' 5'AGGTAGTTGT(TT/C)GAC(CCC/GG)(AAA/CC) (AAA/CC)(GGG/A)TAG (TTT/G)TCCA3'	SHEU <i>et al.</i> , 2000
G-D G-2R	5'GTGCCGCC(GC)(CT)(AG)(GC)ATCAACAAGT3' 5'GTAGTTCCA(GC)A(CT)CAGGTCGTT3'	ROMO <i>et al.</i> , 2007
phaCF1BO phaCR2BO	5'TC(A/C)(C/T)CT(C/G)(G/T)ACTGC(C/G)CTGG(C/T)G3' 5'T(A/T)GCT(A/G)GAC(C/T)AGACCTGGAT3'	HUANG <i>et al.</i> , 2012

Mais recentemente, Huang *et al.* (2012) desenharam três pares de oligonucleotídeos iniciadores degenerados capazes de amplificar o gene que sintetiza PhaC sintase, e os testaram em bactérias cultivadas em meio mínimo. O grupo de Huang verificou que, ao serem realizadas reações de PCR com os próprios *primers* e com aqueles já descrito anteriormente na literatura por Sheu *et al.* (2000) para amplificar essa mesma região do genoma, houve eficácia para detectar a grande maioria (90%) dos microrganismos produtores do polímero. Assim, Huang *et al.* (2012) propuseram a utilização dos dois pares de *primers* a fim de abranger um maior número de microrganismos que contenham o gene em questão.

Os *primers* utilizados nas reações de PCR do presente trabalho também são degenerados, mas sem as diferenças em proporções de bases presentes nas sequências desenhadas por Sheu *et al.* (2000) e são capazes de hibridizar internamente o gene codante da

PhaC sintase (classes I e II) de maneira universal (ROMO *et al.*, 2007). Com a constatação da presença do gene codante da PHA sintase nos genomas dos quatro microrganismos, é possível afirmar que todos eles têm potencial para a produção de polihidroxialcanoatos.

Até o presente momento, não há *primers* universais para detectar genes de *phaC* das classes III e/ou IV (INOUE, 2016), embora existam aqueles que são específicos para bactérias redutoras de sulfato, e *haloarchaea* que codificam para a PhaC sintase de classe III (HAI *et al.*, 2004; HAN *et al.*, 2009). Shamala *et al.* publicaram um trabalho em 2003 divulgando *primers* não degenerados que delimitam a 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 Ashby (2005) 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 sintase está presente em cada uma dessas bactérias. Os pesquisadores que utilizam metodologias genotípicas para a seleção dos microrganismos produtores de PHAs não descartam as fenotípicas. Ou seja, além de ser realizada a detecção do gene que codifica a *phaC* sintase no genoma bacteriano, também se selecionam microrganismos cujos grânulos se coram com o preto de Sudão ou fluorescem sob luz UV (no caso de utilizar o vermelho/azul do Nilo (KUNG *et al.*, 2007).

5.3.3 Extração de PHA após 72 h de cultivo dos microrganismos em meio mineral

A adição de clorofórmio quente à biomassa seca de cada um dos microrganismos selecionados (BMA05, BMA10, BMA13 e BLD07) resultou na formação de um filme polimérico após 72 h de evaporação do solvente (Figura 18).

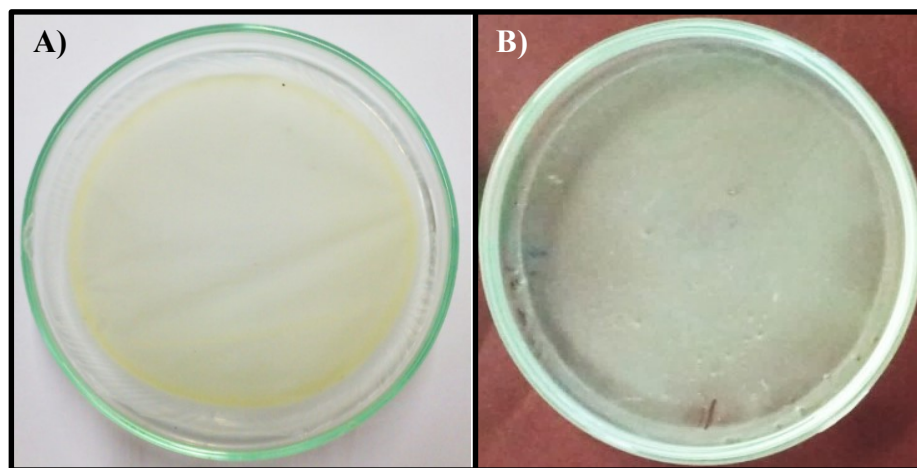


Figura 18. Filme polimérico obtido a partir da biomassa seca da bactéria de referência, *Cupriavidus necator* ATCC 17699 (A) e do isolado BMA-10 (B), após 72 h de cultivo ($30 \pm 1^\circ\text{C}$).

A extração de PHA por meio de clorofórmio é frequentemente reportada desde que a patente US-3275610 (COTY, 1966), relativa a essa metodologia, foi concedida (SIDIKMARSUDI e SETIADI, 1997; REHMAN *et al.*, 2006; KOLLER *et al.*, 2010; GAMAL *et al.*, 2013). A grande vantagem de utilizar o clorofórmio é que, por meio desse solvente, obtêm-se PHAs muito puros (>99 %) (QUINES *et al.*, 2015). Entretanto, muitos autores relatam que a solução de polímero extraída é muito viscosa e a remoção do material celular é difícil (SILVA *et al.*, 2007; KOLLER *et al.*, 2010). Para as linhagens utilizadas, essas dificuldades não foram encontradas. Por outro lado, como reportado em outros trabalhos (KOLLER *et al.*, 2010; WANG, 2013) e no presente, a necessidade de se conseguir biomassa bacteriana em grande quantidade faz com que o processo seja demorado. Soma-se a isso o fato de que tais métodos de extração necessitam de grandes volumes de solventes. Sabendo-se que os principais custos para a produção de PHAs são o substrato e o processo de extração do polímero produzido pelos microrganismos (REHMAN *et al.*, 2006), o uso do clorofórmio é também atrativo em relação a esse último quesito. Por ser barato, a utilização desse solvente orgânico não aumenta o custo total de produção, e as consequências ambientais adversas podem ser minimizadas pela indústria (CHOI e LEE, 1997; TOMINAGA e MIDIO, 1999).

Ademais, é preciso destacar que a necessidade de se obter PHA puro é dependente da destinação do polímero. A aplicação comercial dos PHAs, na maioria dos casos, precisa alto nível de pureza para boas propriedades plásticas. Mas se o objetivo é que ele seja utilizado como combustível, não é necessário PHA altamente purificado (BUGNICOURT *et al.*, 2014). Para essa situação, o polímero pode até ser extraído de águas residuárias ricas em nutrientes, sem competir com a água destinada ao consumo humano (GAO *et al.*, 2011). Assim, o desenvolvimento de metodologia que permita a recuperação por processo simples, eficiente e menos poluente dos PHAs é uma proposta necessária e atrativa. A patente brasileira PI 9302312-0 (DERENZO *et al.*, 2002) descreve um processo de extração alternativo, no qual se utilizam álcoois com cadeia superior a três carbonos e seus ésteres, como álcool isoamílico, acetato de amila, acetato de isoamila e óleo fúsel (constituído principalmente de álcool isoamílico, é um subproduto gerado em decorrência da destilação do álcool).

A digestão usando hipoclorito também é utilizada em algumas pesquisas, mas apresenta desvantagens: por tal metodologia, durante a digestão dos materiais celulares não poliméricos, a degradação do PHA também é observada (SILVA *et al.*, 2007; MANANGAN e SHAWAPHUN (2010). A realização de um pré-tratamento com surfactante e posterior digestão com hipoclorito (sob condições otimizadas) pode resultar em um filme de PHA puro e pouco degradado (TAN *et al.*, 2014). Gamal *et al.* (2013), trabalhando com a produção de

polihidroxialcanoato produzido por *Pseudomonas fluorescens* S48, testou seis metodologias de extração do polímero fazendo as seguintes combinações: solução comercial de hipoclorito de sódio, hipoclorito de sódio + clorofórmio, acetona + clorofórmio, somente clorofórmio, somente hipoclorito, clorofórmio com prévio tratamento das células secas com 10 % de SDS. Já Manangan e Shawaphun (2010) observaram que a extração contínua com Soxhlet apresentou um rendimento significativamente maior do que a extração direta com solvente.

Os autores concluíram que, nas condições testadas, para aquele microrganismo, a extração onde se utilizou a combinação hipoclorito de sódio + clorofórmio foi a mais eficiente. Em trabalho recentemente publicado, Vizcaino-Caston *et al.* (2016) avaliaram o uso de dimetilsulfóxido (DMSO) na extração de PHA sintetizado por *Cupriavidus necator* H16. Os resultados do grupo sugerem que o DMSO entra no microrganismo, interage com PHB e acaba rompendo a célula. Essa pesquisa constatou que o solvente ocasionou a lise apenas das bactérias produtoras de PHB: a linhagem *C. necator* PHA⁻⁴, também utilizada no estudo e incapaz de sintetizar o polímero devido à deleção de genes envolvidos na produção de PHA, não foi afetada. Ao contrário do clorofórmio, o DMSO é um solvente atóxico, capaz de dissolver moléculas lipofílicas e passar facilmente por membranas biológicas (NOTMAN *et al.*, 2006).

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

Muitos métodos são utilizados na caracterização e identificação de comunidades microbiológicas. Considerando que os métodos clássicos de identificação de microrganismos, incluindo os testes bioquímicos e fisiológicos, podem ser influenciados por fatores de crescimento e, por conta disso, podem fornecer resultados variáveis, são necessárias outras técnicas que visem um diagnóstico mais objetivo. Uma vez que conhecer a espécie precisa dos microrganismos isolados é essencial para direcionar futuros estudos para qualquer que seja a finalidade biotecnológica (DRAPER e REHM, 2012; SANGKHARAK e PRASERTSAN, 2012), e que dentre os vários marcadores químicos usados, somente DNA e RNA não são afetados pelas condições de cultivo, a identificação por meio do sequenciamento (total ou parcial) das regiões 16S rDNA é uma ferramenta muito útil (ROSSELLÓ-MÓRA e AMANN, 2015). Os *primers* utilizados nas reações de PCR deste trabalho, em reações para amplificar parcialmente a região 16S rDNA, resultaram em fragmentos gênicos com cerca de 790 pb em todos os quatro isolados testados (Figura 19).

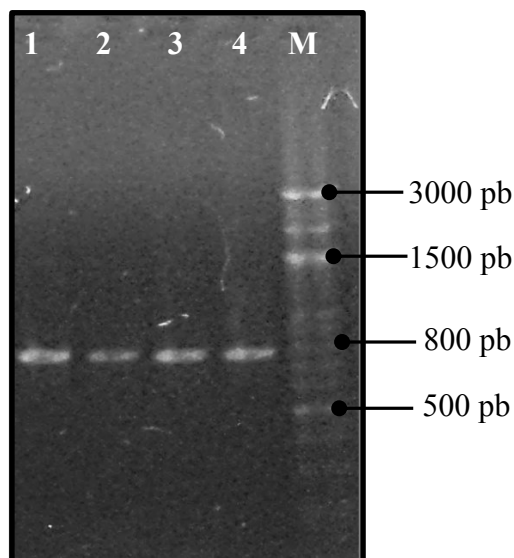


Figura 19. Gel de agarose (1 %) contendo *amplicons* de 790 pb do gene codante da região 16S rDNA dos isolados bacterianos BMA-05 (linha 1), BMA-10 (linha 2), BMA-13 (linha 3) e BLD-07 (linha 4) de solo de Mata Atlântica e lodo de ETE sucroalcooleira de Coruripe-AL. M= marcador de peso molecular (100 pb).

Após purificação dos *amplicons* e sequenciamento dos mesmos, as análises das sequências nucleotídicas no *software CodonCode Aligner* atestaram a qualidade (> 70 %) tanto das amstras obtidas utilizando o *primer forward* quanto das sequências onde foram utilizadas o *primer reverse* nas reações de sequenciamento. Constatou-se que não houve diferença estatística entre elas ($p=0,11$). Após edição, o tamanho das sequências foi diminuído para 600 pb e somente então compararam-se as bases nucleotídicas obtidas com aquelas que estão depositadas nos bancos de dados. As comparações permitiram confirmar 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 regiões parciais 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. Os números de acesso no GeneBank do NCBI das sequências depositadas são: KU555925 (*Pseudomonas fluorescens* BMA-05), KU555926 (*Enterobacter aerogenes* BMA-10), KU555927 (*Klebsiella oxytoca* BMA-13) e KU555928 (*Bacillus pumilus* BLD-07). Das quatro espécies identificadas no presente trabalho, aquelas pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* são as mais largamente utilizados na produção de PHAs (SHAMALA *et al.*, 2003; KUNG *et al.*, 2007; NARANCIC *et al.*, 2012; GOMAA *et al.*, 2014). A Figura 20 apresenta as árvores filogenéticas dos microrganismos utilizados no presente trabalho e os isolados com os quais eles tiveram 99 % de identidade naquele banco de dados.

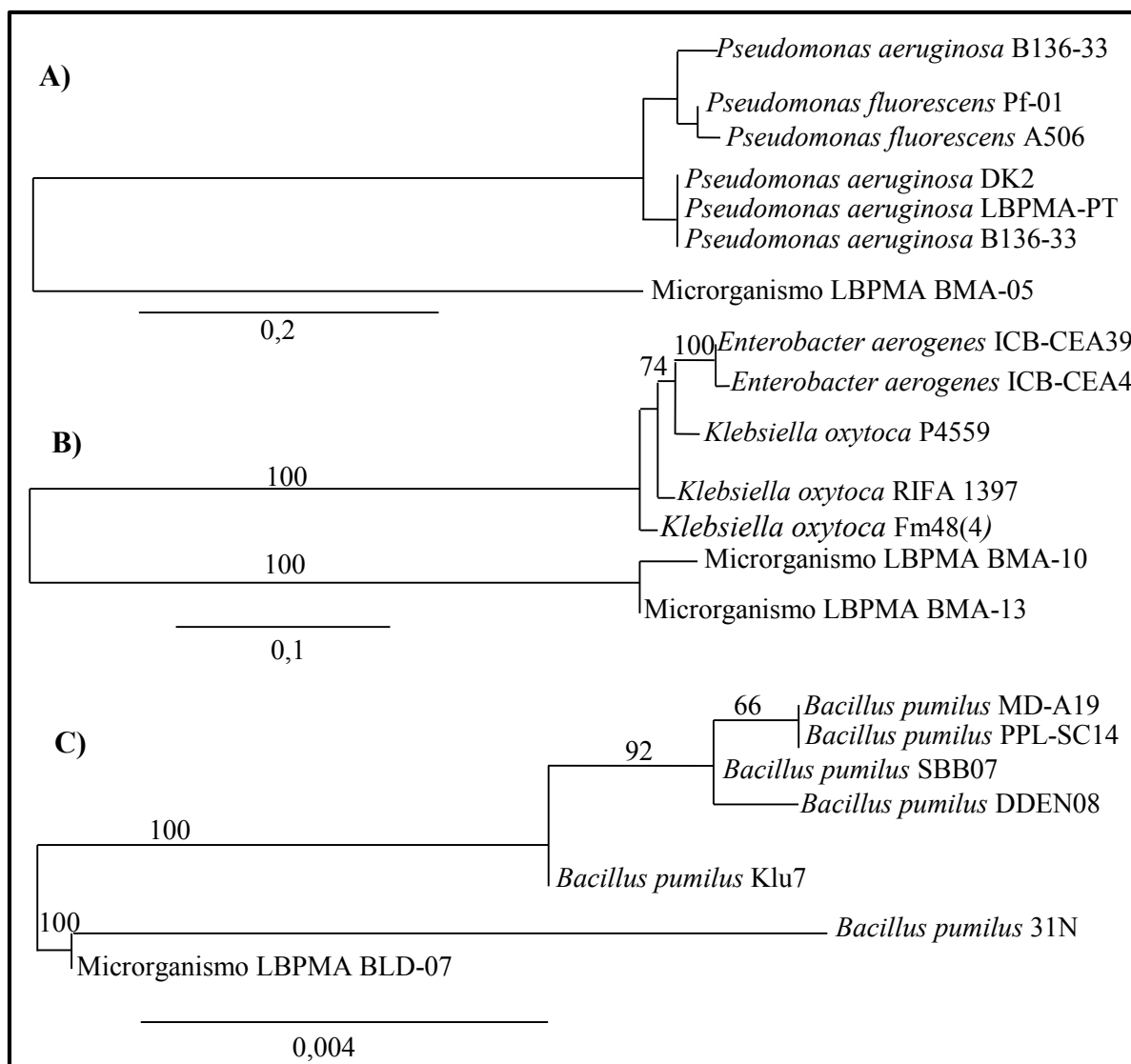


Figura 20. Árvores filogenéticas dos microrganismos utilizados no presente trabalho e os isolados com 99 % de identidade obtidos do GenBank, de acordo com a Família a qual foram identificados: LBPMA-05, *Pseudomonaceae* (A); LBPMA-10 e LBPMA-13, *Enterobacteriaceae* (B) e LBPMA-BLD-07, *Bacillaceae*. As árvores foram construídas usando o método neighbour-joining. Os valores expressos nos nós internos referem-se aos valores de *Bootstrap* > 50 %, em 1000 réplicas.

Sabe-se que a especificidade do substrato das PHA sintases de cada espécie bacteriana é estimada por meio de experimentos de cultivo com diferentes substratos precursores fornecidos como fonte de carbono (REHM, 2003). Porém trata-se de um trabalho limitado, especialmente em *Pseudomonas* spp., que possuem mais de um gene para PHA sintase. Além disso, para qualquer espécie, o perfil fisiológico pode variar muito. A diversidade é tão grande que recentemente Chen e Hajnal (2015) cunharam o termo “PHAoma” em alusão ao conjunto de diversos polihidroxialcanoatos que uma única bactéria pode ser capaz de sintetizar. Enquanto o gênero *Pseudomonas* é mais conhecido por produzir PHAs de cadeia média, as espécies de *Bacillus* têm sido estudadas tanto na produção de PHB como também de copolímeros (WARD *et al.*, 2005; NARANCIC *et al.*, 2012; SACCO *et al.*, 2015). Exemplos de autores que

reportaram *Pseudomonas* spp. produtoras de PHB incluem Catone *et al.* (2014) e David *et al.* (2015). Esses últimos divulgaram o isolamento de uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* capaz de sintetizar PHB e que demonstrou ser tolerante ao metal pesado cromo.

O gênero *Bacillus* é ainda mais heterogêneo. Com base nas sequências 16S rDNA, as linhagens de *Bacillus* são divididas em 5 grupos: *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. circulans* and *B. brevis*, sendo que *Bacillus pumilus* está filogeneticamente relacionado ao grupo de *B. subtilis* (BERKELEY *et al.*, 2008), mas já tem sido proposta a criação de um outro grupo que contemple essa espécie (LIU *et al.*, 2013). Contendo mais de 50 espécies, o rendimento da produção de PHAs por *Bacillus* spp. pode variar de 11 a 69 % (p/p de massa seca celular), sendo que o polímero biodegradável é produzido em condições de excesso ou limitantes de algum nutriente (NAHEED *et al.*, 2011). Frequentemente realizarem-se pesquisas que objetivam a obtenção do polímero bacteriano somente na fase estacionária de crescimento, e por isso o tempo de 72 h é o considerado o tempo padrão. Porém, são conhecidas linhagens de *Bacillus* spp. que acumulam PHAs durante a fase de crescimento (NARAYANAN e RAMANA, 2012), e portanto, o tempo de cultivo menor pode ser averiguado nesse gênero.

Bacillus pumilus é um microrganismo ambiental e tem sido estudado principalmente para aplicações comerciais das várias enzimas que a espécie é capaz de produzir (MURPHY *et al.*, 2012). Segundo Parvathi *et al.* (2009), *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 (ZHANG *et al.*, 1994; NAHEED *et al.*, 2012).

5.5 Experimentos em frascos agitados visando produção de PHAs

5.5.1 Monitoramento do crescimento dos isolados (0-96 h de incubação)

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 (Tabela 9).

Tabela 9. Valores de pH, concentrações de 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

		<i>Pseudomonas fluorescens</i> BMA-05				<i>Enterobacter aerogenes</i> BMA-10				<i>Klebsiella oxytoca</i> BMA-13				<i>Bacillus pumilus</i> BLD-07			
Meio	Tempo	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 ^c	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 ^d	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 ± 0,61 ^a	18,47 ± 0,91 ^{ab}	0,29 ± 0,01 ^a	4,83 ± 0,01 ^a	4,73 ± 0,47 ^a	14,55 ± 0,40 ^c	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 ^c	1,94 ± 0,08 ^{ab}	4,84 ± 0,00 ^b	3,4 ± 0,30 ^a	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 ^c	0,02 ± 0,01 ^a	1,97 ± 0,02 ^a	6,99 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,06 ± 0,01 ^{ab}	1,17 ± 0,08 ^c	6,99 ± 0,00 ^a	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 ^b	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 ^b	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 ^a	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 ^d	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 ^a
	24 h	6,95 ± 0,01 ^a	3,13 ± 1,19 ^c	1,48 ± 0,06 ^c	2,27 ± 0,56 ^a	6,80 ± 0,00 ^a	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 ^a	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	0,00 ± 0,00 ^c	0,04 ± 0,00 ^a	0,04 ± 0,01 ^c	6,99 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^a	0,06 ± 0,00 ^c	6,99 ± 0,00 ^a	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	5,2 ± 0,26 ^a	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	6,03 ± 0,76 ^a	0,03 ± 0,00 ^b	0,14 ± 0,01 ^a	7,21 ± 0,00 ^b	2,70 ± 0,70 ^a	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 ^a	0,01 ± 0,00 ^a	0,08 ± 0,01 ^{ab}	7,25 ± 0,00	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	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 ^a
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 ^c	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 ^b	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 ^a

Legenda: 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. 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.

Condições de fermentação como a relação C:N, a concentração de oxigênio dissolvido e quantidade de células no meio de cultura (MANANGAN e SHAWAPHUN, 2010) aliada à otimização das vias metabólicas (MAGDOULI *et al.*, 2015) 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. Esse resultado está de acordo com Sreekanth *et al.* (2013) que estudaram como diferentes fontes de nitrogênio (0,2 g N L⁻¹) afetam o rendimento da produção de PHA e α -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.

Considerando-se que 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 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 e Lee (2007) 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.

No presente trabalho, é possível afirmar que a adição de hidrolisado de proteínas favoreceu o crescimento de *Enterobacter aerogenes* BMA-10 e *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 (KULPREECHA *et al.*, 2009). A fim de verificar o comportamento dos quatro microrganismos selecionados em meios de cultura contendo diferentes fontes

nitrogenadas além da peptona, procederam-se ensaios cujas análises foram realizadas após 24 h de cultivo de cada linhagem no meio mineral.

5.5.2 Produção de polihidroxibutirato após 24 h de incubação em frascos agitados

Constatou-se que após 24 h de incubação, o pH final dos meios cultivados com *Pseudomonas fluorescens* BMA-05 não variou ($p=0,4226$). No caso de *Klebsiella oxytoca* BMA-13, mesmo o valor de F calculado ter sido maior que o F crítico (Tabela 10), no teste de Tukey não foram encontradas diferenças significativas entre contrastes das médias de pH dos meios contendo as diferentes fontes de nitrogênio avaliadas.

Tabela 10. Análise de variância (ANOVA) do pH do meio de cultura, após 24 h de cultivo dos microrganismos em meio mineral contendo diferentes fontes de nitrogênio ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, 120 rpm). Em todos os casos, consideraram-se 8 graus de liberdade entre grupos e 18 dentro dos grupos. F crítico= 2,51.

Microrganismo	Fonte da variação	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F calculado	valor <i>P</i>
<i>P. fluorescens</i> BMA-05	Entre grupos	0,00	0,00	1,07	0,42
	Dentro dos grupos	0,00	0,00		
	Total	0,00			
<i>E. aerogenes</i> BMA-10	Entre grupos	0,00	0,00	10,01	0,00
	Dentro dos grupos	0,00	0,00		
	Total	0,00			
<i>K. oxytoca</i> BMA-13	Entre grupos	0,00	0,00	3,78	0,01
	Dentro dos grupos	0,00	0,00		
	Total	0,00			
<i>B. pumilus</i> BLD-07	Entre grupos	0,00	0,00	8,94	0,00
	Dentro dos grupos	0,00	0,00		
	Total	0,00			

Ainda em relação ao pH, nenhum dos meios de cultura foi desfavorável para *Bacillus pumilus* BLD-07 produzir polihidroxialcanoatos. Apesar de o cálculo de F da ANOVA nos resultados nos meios cultivados com *B. pumilus* BLD-07 terem indicado variação para esse parâmetro ($p < 0,001$), os valores mantiveram-se próximos da neutralidade. De acordo com Singh *et al.* (2007), o pH 7 é o mais indicado para a produção de PHB por *Bacillus* spp. Em pH ácido, as células dessa bactéria esporulam e o conteúdo intracelular do poliéster diminui. As linhagens de *Bacillus* são conhecidas pela produção de metabólitos intermediários como acetato e lactato durante o crescimento, e o PHB acumulado é utilizado como fonte de energia no momento da sua esporulação (NARAYANAN e RAMANA, 2012). Já *Enterobacter aerogenes* BMA-10 cultivado na presença de cloreto de amônio acidificou mais o meio mineral quando comparado com as outras fontes ($\text{pH}_{\text{final}} = 5,7 \pm 1,02$; $p < 0,001$) (Figura 21).

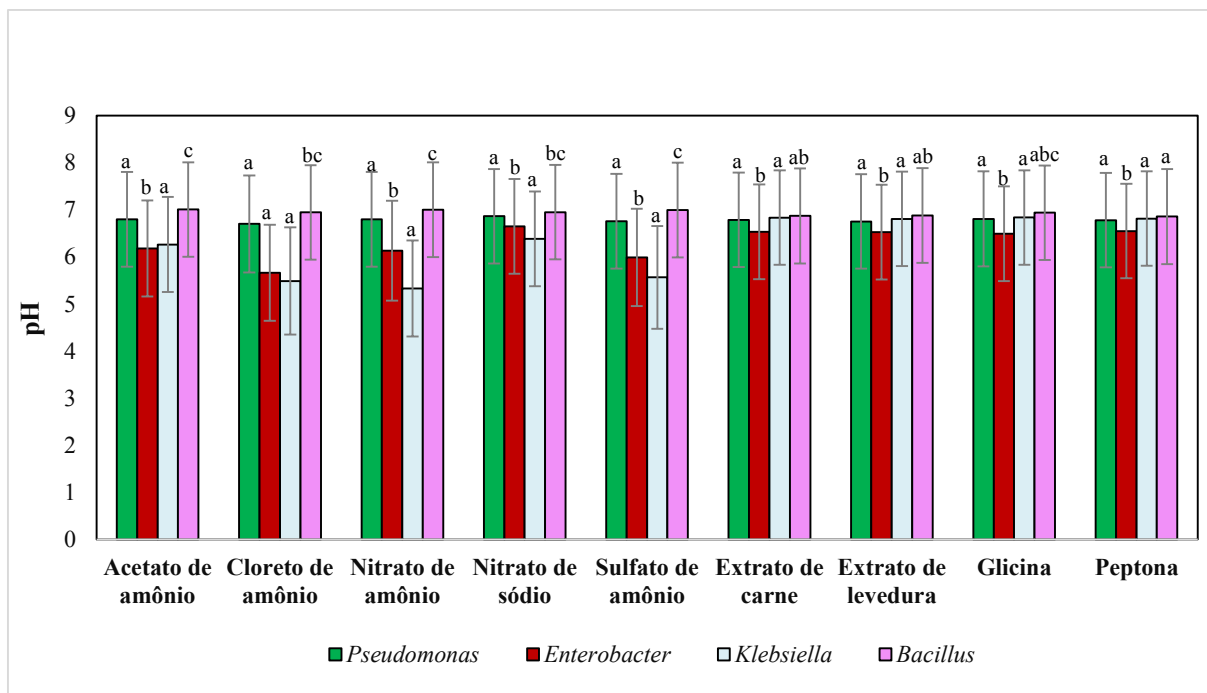


Figura 21. Valores de pH do meio de cultura, após 24 h de incubação do microrganismo em meio mineral contendo diferentes fontes de nitrogênio ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, 120 rpm). Letras diferentes nas barras do mesmo microrganismo indicam diferença estatística pelo teste Tukey ($p < 0,05$), enquanto as letras iguais indicam que as fontes de nitrogênio não diferem entre si significativamente.

As concentrações de glicídios redutores totais foram similares entre os meios de cultura avaliados para *Pseudomonas fluorescens* BMA-05 ($p = 0,7075$) e *Bacillus pumilus* BLD-07 ($p = 0,4358$). Para os outros dois microrganismos, as análises de variância indicaram que há diferenças entre os resultados dos grupos (Tabela 11).

Tabela 11. Análise de variância (ANOVA) da concentração de glicídios redutores totais, após 24 h de cultivo dos microrganismos em meio mineral contendo diferentes fontes de nitrogênio ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, 120 rpm). Em todos os casos, consideraram-se 8 graus de liberdade entre grupos e 18 dentro dos grupos. Para *Bacillus*, F crítico= 2,30 e para os outros microrganismos, F crítico= 2,51.

Microrganismo	Fonte da variação	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F calculado	valor <i>P</i>
<i>P. fluorescens</i> BMA-05	Entre grupos	6,95	0,87	0,67	0,71
	Dentro dos grupos	23,17	1,29		
	Total	30,12			
<i>E. aerogenes</i> BMA-10	Entre grupos	392,65	49,08	11,36	0,00
	Dentro dos grupos	77,76	4,32		
	Total	470,41			
<i>K. oxytoca</i> BMA-13	Entre grupos	222,12	27,76	9,86	0,00
	Dentro dos grupos	50,68	2,82		
	Total	272,79			
<i>B. pumilus</i> BLD-07	Entre grupos	44,26	5,53	1,03	0,44
	Dentro dos grupos	144,50	5,35		
	Total	188,76			

O teste de Tukey mostrou que nos meios contendo cloreto de amônio ou nitrato de amônio, o consumo de glicose por *Enterobacter aerogenes* BMA-10 e *Klebsiella oxytoca* BMA-13 foi maior em comparação aos meios contendo outras fontes nitrogenadas. Também foi possível verificar que para esses dois microrganismos, o meio contendo sulfato de amônio teve um resultado parecido, mas não ao ponto de pertencerem ao mesmo grupo das duas fontes citadas (Figura 22).

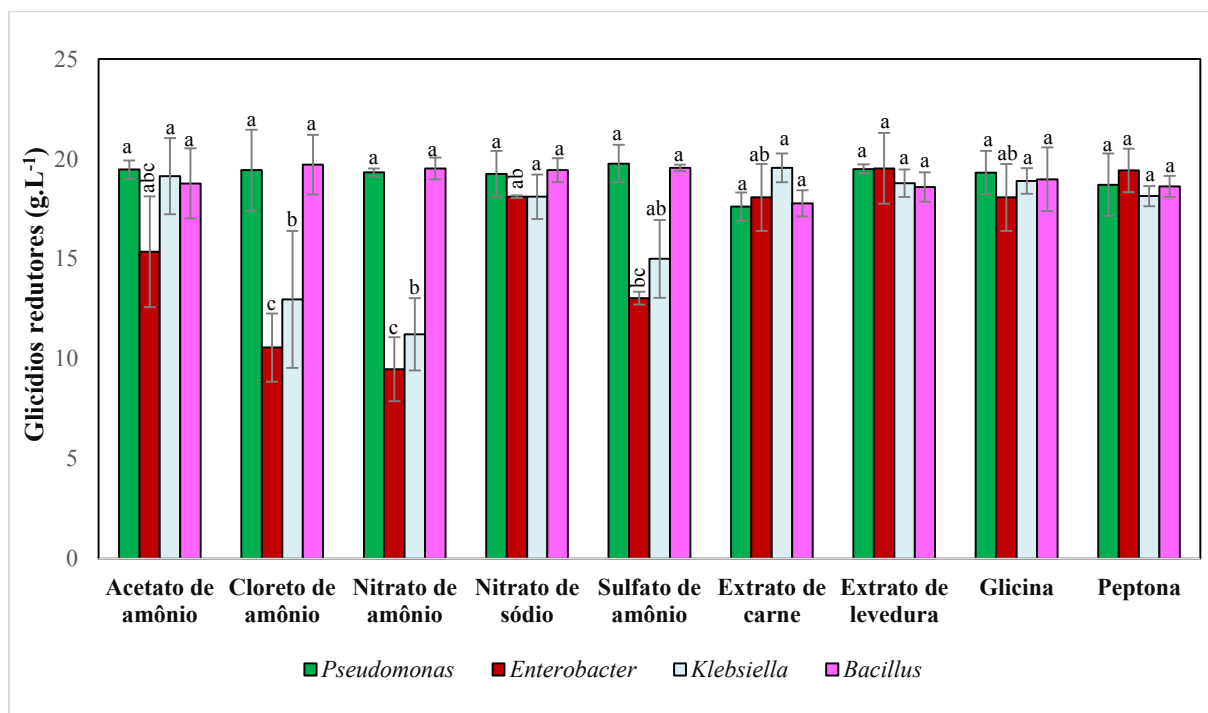


Figura 22. Concentração de glicídios redutores totais (g.L⁻¹), após 24 h de cultivo do microrganismo em meio mineral contendo diferentes fontes de nitrogênio (30 ± 1°C, 120 rpm). Letras diferentes nas barras do mesmo microrganismo indicam diferença estatística pelo teste Tukey ($p < 0,05$), enquanto as letras iguais indicam que as fontes de nitrogênio não diferem entre si significativamente.

Conforme observado na Tabela 12, a massa seca obtida após 24 h de cultivo variou para todos os microrganismos sob estudo ($p < 0,001$). O meio que mais favoreceu o crescimento tanto de *Enterobacter aerogenes* BMA-10 como *Klebsiella oxytoca* BMA-13 foi aquele contendo nitrato de amônio. Já o teste de Tukey aplicado nos resultados de *Pseudomonas fluorescens* BMA-05 mostrou que o cultivo desta linhagem em meio mínimo com cloreto de amônio resultou em maior quantidade de células. Encontrar a condição ideal para a produção de PHB varia não somente de acordo com a espécie bacteriana, mas também entre as diferentes cepas da mesma espécie (SAHARAN *et al.*, 2014), e como o nitrogênio faz parte da composição de macromoléculas como proteínas e ácidos nucleicos, a adição dele faz-se necessária à multiplicação microbiana. Esse fato explica porque a massa de *Bacillus pumilus* BLD-07 foi significativamente maior quando proveniente do cultivo nas fontes orgânicas complexas dos

extratos de levedura ou de carne. Os valores de biomassa do cultivo em meio contendo a peptona, um substrato que também é complexo, foram próximos àqueles obtidos dos extratos, mas não a ponto de fazerem parte do mesmo grupo (Figura 23).

Tabela 12. Análise de variância (ANOVA) da massa seca dos microrganismos, após 24 h de cultivo em meio mineral contendo diferentes fontes de nitrogênio ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, 120 rpm). Em todos os casos, consideraram-se 8 graus de liberdade entre grupos e 18 dentro dos grupos. F crítico= 2,51.

Microrganismo	Fonte da variação	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F calculado	valor <i>P</i>
<i>P. fluorescens</i> BMA-05	Entre grupos	0,00	0,00	7,69	0,00
	Dentro dos grupos	0,00	0,00		
	Total	0,00			
<i>E. aerogenes</i> BMA-10	Entre grupos	0,00	0,00	12,03	0,00
	Dentro dos grupos	0,00	0,00		
	Total	0,00			
<i>K. oxytoca</i> BMA-13	Entre grupos	0,00	0,00	52,02	0,00
	Dentro dos grupos	0,00	0,00		
	Total	0,00			
<i>B. pumilus</i> BLD-07	Entre grupos	0,00	0,00	8,86	0,00
	Dentro dos grupos	0,00	0,00		
	Total	0,00			

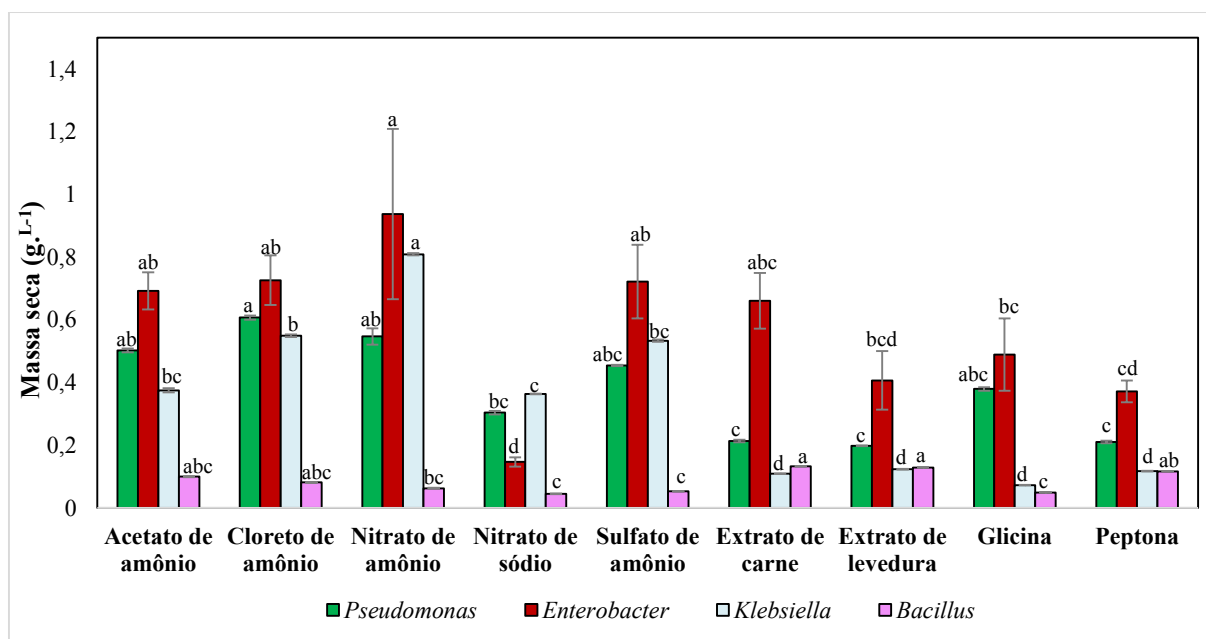


Figura 23. Massa seca (g.L^{-1}) após 24 h de cultivo do microrganismo em meio mineral contendo diferentes fontes de nitrogênio ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, 120 rpm). Letras diferentes nas barras do mesmo microrganismo indicam diferença estatística pelo teste Tukey ($p < 0,05$), enquanto as letras iguais indicam que as fontes de nitrogênio não diferem entre si significativamente.

Rendimentos de PHA diferenciados como reflexo da fonte nitrogenada presente no meio de cultura têm sido documentados por vários pesquisadores (SREEKANTH *et al.* 2013; LEE

et al., 2008; YÜKSEKDAĞ *et al.*, 2004; GOMAA, 2014). No presente trabalho, para todos os microrganismos, houve variância em relação ao rendimento de polihidroxibutirato (PHB) (Tabela 13).

Tabela 13. Análise de variância (ANOVA) do rendimento da produção de polihidroxibutirato (PHB) em relação à massa seca de cada microrganismo, após 24 h de cultivo em meio mineral contendo diferentes fontes de nitrogênio ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, 120 rpm). Em todos os casos, consideraram-se 8 graus de liberdade entre grupos e 18 dentro dos grupos. F crítico= 2,51.

Microrganismo	Fonte da variação	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F calculado	valor <i>P</i>
<i>P. fluorescens</i> BMA-05	Entre grupos	4368,76	546,10	170,60	0,00
	Dentro dos grupos	57,62	3,20		
	Total	4426,38			
<i>E. aerogenes</i> BMA-10	Entre grupos	298,81	37,35	73,79	0,00
	Dentro dos grupos	9,11	0,51		
	Total	307,92			
<i>K. oxytoca</i> BMA-13	Entre grupos	1262,85	157,86	48,05	0,00
	Dentro dos grupos	59,14	3,29		
	Total	1321,99			
<i>B. pumilus</i> BLD-07	Entre grupos	2055,14	256,89	17,49	0,00
	Dentro dos grupos	264,35	14,69		
	Total	2319,49			

Os resultados de rendimento de polihidroxialcanoatos são divergentes entre os diferentes estudos. Yüksekdağ *et al.* (2004), 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 2 g.L^{-1}). Já Gomaa *et al.* (2014) 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. A concentração de PHAs dentro de uma bactéria é dependente tanto da espécie bacteriana como também da fonte de carbono (GAO *et al.*, 2011), e por isso, estudos envolvendo outras fontes, além da glicose, devem ser realizados para esses microrganismos.

Exceto para *Klebsiella oxytoca* BMA-13, cujo maior rendimento ocorreu quando a mesma foi cultivada na presença de extrato de carne, as bactérias produziram maior quantidade de PHB em relação à sua massa seca quando uma fonte inorgânica de nitrogênio estava presente: para *Pseudomonas fluorescens* BMA-05, sulfato de amônio; para *Enterobacter aerogenes* BMA-10, cloreto de amônio e para *Bacillus pumilus* BLD-07, nitrato de sódio (Figura 24).

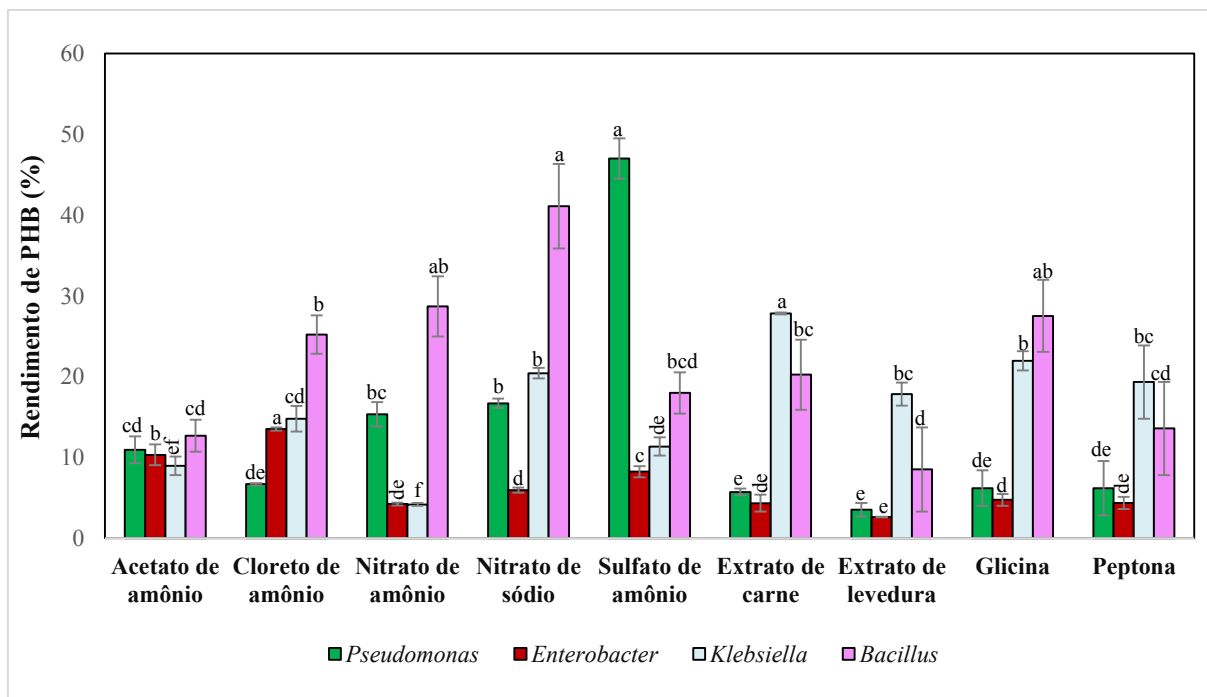


Figura 24. Rendimento da produção de polihidroxibutirato (PHB) em relação à massa seca de cada microrganismo em meio mineral contendo diferentes fontes de nitrogênio (30°C, 120 rpm). Letras diferentes nas barras do mesmo microrganismo indicam diferença estatística pelo teste Tukey ($p < 0,05$), enquanto as letras iguais indicam que as fontes de nitrogênio não diferem entre si significativamente.

Para produzir PHA de maneira economicamente viável, é essencial obter elevada quantidade do polímero (CHOI e LEE, 1999). Uma maneira de monitorar a quantidade de PHA bacteriano é por meio da análise de expressão gênica (utilizando PCR em tempo real), como fizeram WANG e NOMURA (2010), no estudo da produção de PHAs em *Pseudomonas putida* KT2440 em diferentes fontes de carbono: glicerol, glicose, citrato e ácido láurico. Dentre essas fontes, apenas a última não influenciou a quantidade de PHA produzido quando o nitrogênio foi o fator limitante no meio de cultura. Porém, tradicionalmente – e da maneira que ocorreu no presente estudo –, realiza-se a mensuração do ácido crotônico como um indicativo da quantificação de P(3HB) presente na amostra (MADISON e HUISMAN, 1999). Para isso, o P(3HB) é dissolvido em ácido sulfúrico concentrado e convertido em ácido crotônico após aquecimento (Figura 25). Como o ácido crotônico tem forte absorção da luz ultravioleta em 235 nm no ácido sulfúrico, ele pode ser mensurado por espectrofotometria UV visível.

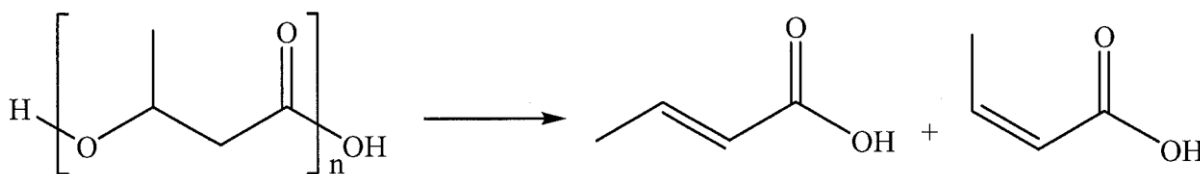


Figura 25. Reação de conversão de polihidroxibutirato em ácido crotônico, na presença de ácido sulfúrico concentrado aquecido. Fonte: VAN-THUOC *et al.*, 2012.

Se por um lado, esse método é uma maneira rápida e fácil de quantificar P(3HB), ele tende a superestimar o conteúdo do polímero (MANANGAN e SHAWAPHUNA, 2010; LÓPEZ-CUELLAR *et al.*, 2011; LAYCOCK *et al.*, 2013). Outros métodos de quantificação e caracterização incluem a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), a de ressonância magnética nuclear e as cromatografias (líquida e gasosa) (TAN *et al.*, 2014). Essas técnicas são capazes de informar o tipo dos monômeros presentes no PHA, mas são deficientes em detectar outras informações importantes como peso molecular e viscosidade do bioplástico (KOLLER *et al.*, 2010). Enquanto a FTIR é eficiente na detecção e distinção entre os diferentes tipos de PHA, presentes tanto nas células intactas ou como polímero purificado, os métodos baseados em cromatografia necessitam que o PHA seja despolimerizado e quimicamente convertido em ácidos, dióis ou derivados de metil-éster.

5.5.3 Análises de microscopia eletrônica de transmissão e cromatografia gasosa

O cromatograma do padrão de P(3HB) (Sigma Aldrich®) revelou que o principal pico é referente ao metil 3-hidroxibutirato, com tempo de retenção de 3,20 min (Figura 26).

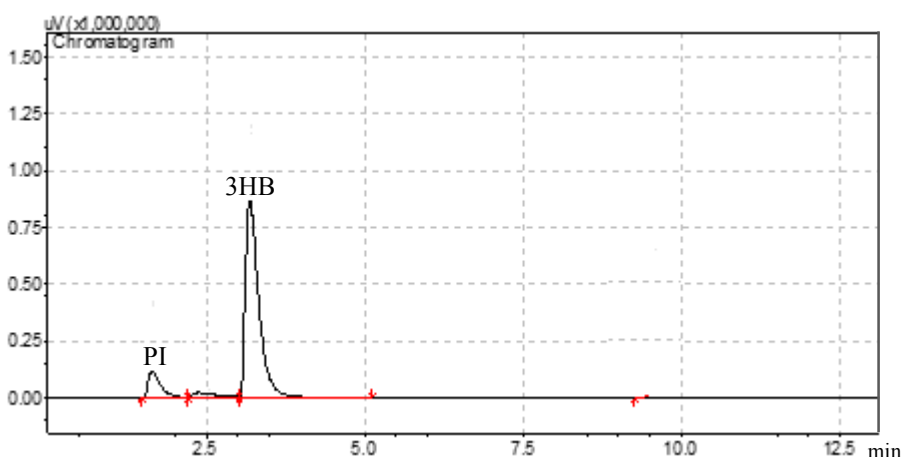


Figura 26. Cromatograma de propil-ésteres de 3-hidroxialcanoatos, indicando o tempo de retenção relativo aos picos do padrão interno (PI) e metil 3-hidroxibutirato (3HB), obtido após metanólise ácida do padrão poli-3-hidroxibutirato (Sigma®).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET), juntamente com a cromatografia gasosa (GC) são as análises mais utilizadas para a obtenção de imagens dos grânulos e identificação dos grupos funcionais – respectivamente – dos polihidroxialcanoatos produzidos por bactérias (TAN *et al.*, 2014). No presente trabalho, apenas nas células de *P. fluorescens* BMA-05 foi possível observar grânulos eletrólucos, típicos de polihidroxialcanoatos, quando o microrganismo foi cultivado no meio contendo sulfato de amônio. Para os outros microrganismos, observaram-se manchas brancas indefinidas no interior celular quando cultivados em meio contendo essa fonte de nitrogênio (Figura 27).

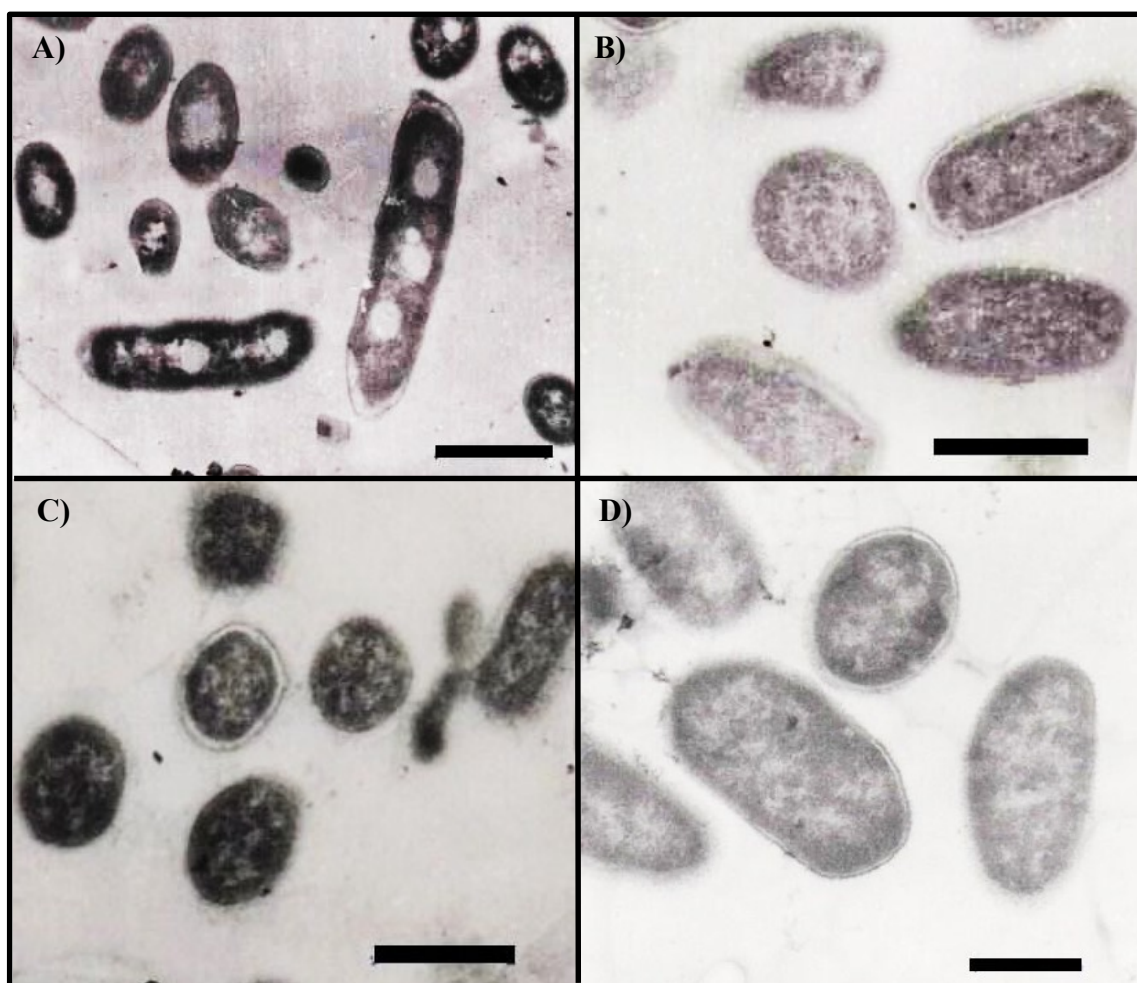


Figura 27. Fotomicrografias obtidas em microscópio eletrônico de transmissão (MET) dos microrganismos cultivados em meio mínimo, após 24 h, tendo o sulfato de amônio como única fonte de carbono. A) *Pseudomonas fluorescens* BMA-05 (barra: 0,8 μm), B) *Enterobacter aerogenes* BMA-10 (barra: 0,5 μm). C) *Klebsiella oxytoca* BMA-13 (barra: 0,8 μm) e *Bacillus pumilus* BLD-07 (barra: 0,6 μm).

Uma vez que os grânulos de PHB são fracamente corados por metais pesados, eles se apresentam transparentes (“brancos”) (WAHL *et al.*, 2012). Eles ficam acumulados no interior das bactérias como grânulos discretos, e o número por célula varia dependendo das diferentes espécies, sendo que frequentemente são encontrados de 2 a 8 grânulos (de 0,2 a 0,5 μm) por célula (REHM, 2003). Logo, acerca da quantidade de grânulos, a fotografia obtida da cultura de *P. fluorescens* BMA-05 está de acordo com a literatura. Como as fotografias obtidas na microscopia eletrônica de transmissão foram obtidas de cortes aleatórios do material fixado, elas não podem ser consideradas como uma exata representação do material original, mas dão uma ideia do comportamento de cada microrganismo nos meios averiguados. Por outro lado, a ausência dos grânulos nos outros microrganismos deve-se provavelmente à baixa produção de polihidroxialcanoatos por essas culturas no tempo analisado (24 h), mas os cromatogramas de todos demonstraram que houve a síntese do polímero pelas bactérias (Figura 28).

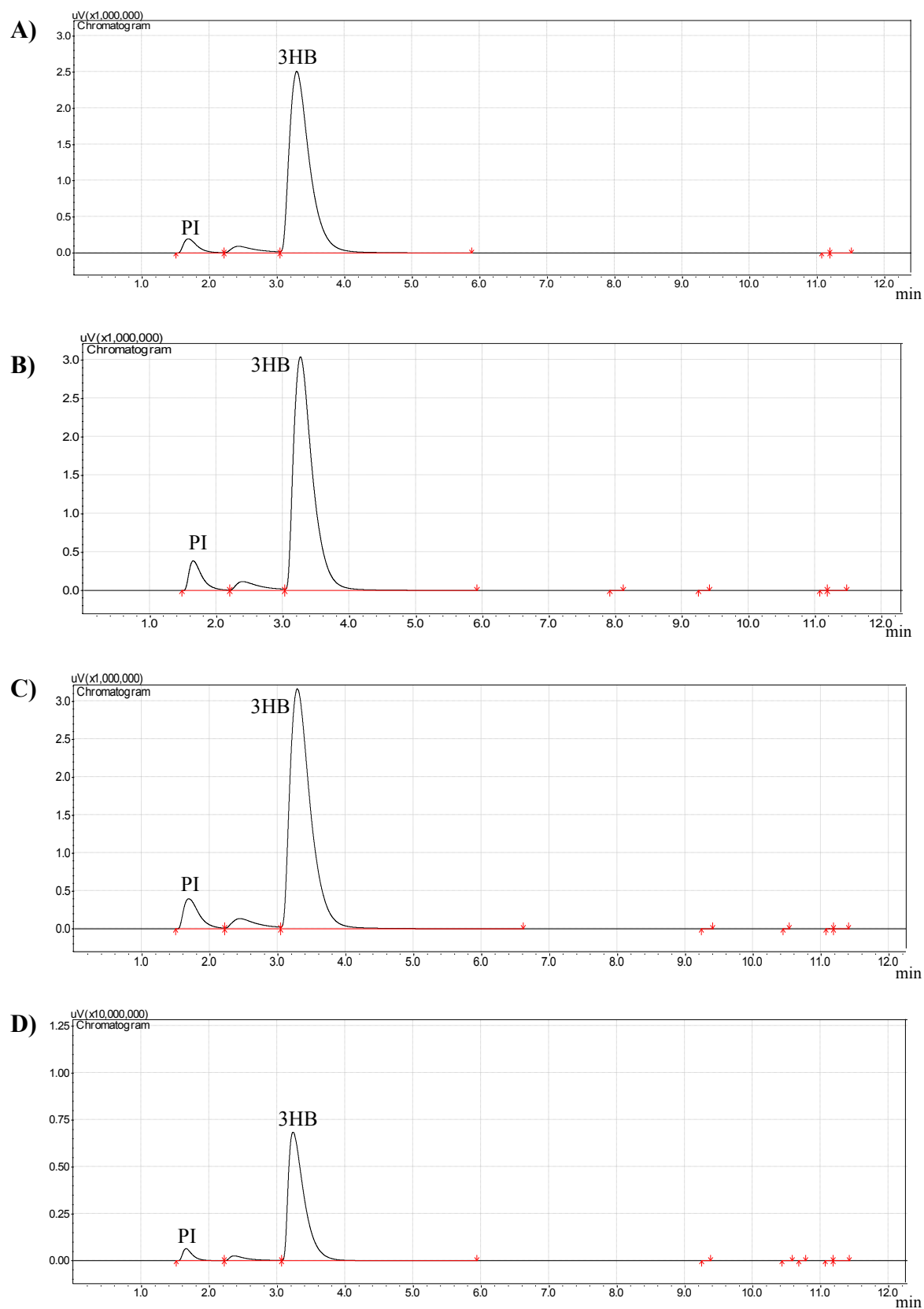


Figura 28. Cromatogramas de propil-ésteres de 3-hidroxiálcanoatos, indicando o tempo de retenção relativo aos picos do padrão interno (PI) e metil 3-hidroxi-butarato (3HB), obtidos dos cultivos de *Pseudomonas fluorescens* BMA-05 (A), *Enterobacter aerogenes* BMA-10 (B), *Klebsiella oxytoca* BMA-13 (C) e *Bacillus pumilus* (D), após 24 h em meio mineral contendo sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

Assim como nos cultivos em meio contendo sulfato de amônio, nos cortes ultrafinos de 70 nm de espessura para análise em MET dos microrganismos que foram cultivados em fonte nitrogenada alterada (nitrato de sódio para *P. fluorescens* e *B. pumilus*, cloreto de amônio para *E. aerogenes* e extrato de carne para *K. oxytoca*) durante 24 h, observaram-se células de *P. fluorescens* BMA-05 medindo entre 450 e 1700 nm; as de *E. aerogenes* BMA-10 entre 650 e 1500 nm; *K. oxytoca* BMA-13, de 400 a 1500 nm; e de *B. pumilus* BLD-07, medindo entre 1000 e 1700 nm. Devido à resolução muito superior das imagens obtidas (THOMSON *et al.*, 2010), a MET é um excelente método de visualização de grânulos de PHB em comparação à microscopia óptica, apesar de não ser um procedimento simples (LEGAT *et al.*, 2010). Em todos os casos, observou-se que nem todas as células presentes acumularam polímeros; e dentre as que acumularam, as mesmas continham até 5 grânulos eletrônicos (Figura 29). Os padrões de cromatogramas que foram obtidos para as amostras de todos os microrganismos após cultivo em fonte nitrogenada alterada encontram-se na Figura 30.

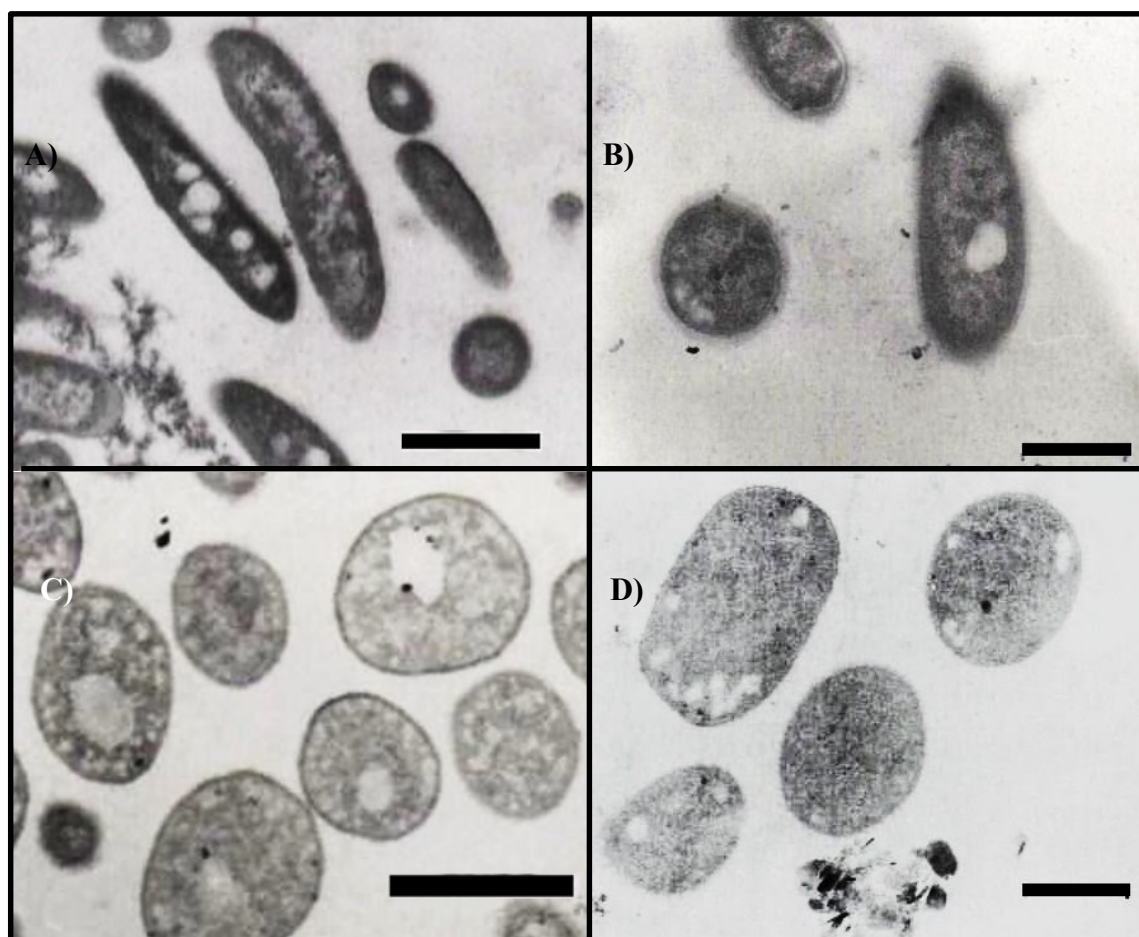


Figura 29. Fotomicrografias obtidas em microscópio eletrônico de transmissão (MET) dos microrganismos cultivados em meio mínimo após 24 h. A fonte de nitrogênio variou entre os isolados. A) *Pseudomonas fluorescens* BMA-05: nitrato de sódio (barra: 0,6 μm), B) *Enterobacter aerogenes* BMA-10: cloreto de amônio (barra: 0,64 μm), C) *Klebsiella oxytoca* BMA-13: extrato de carne (barra: 0,8 μm) e D) *Bacillus pumilus* BLD-07: nitrato de sódio (barra: 0,5 μm).

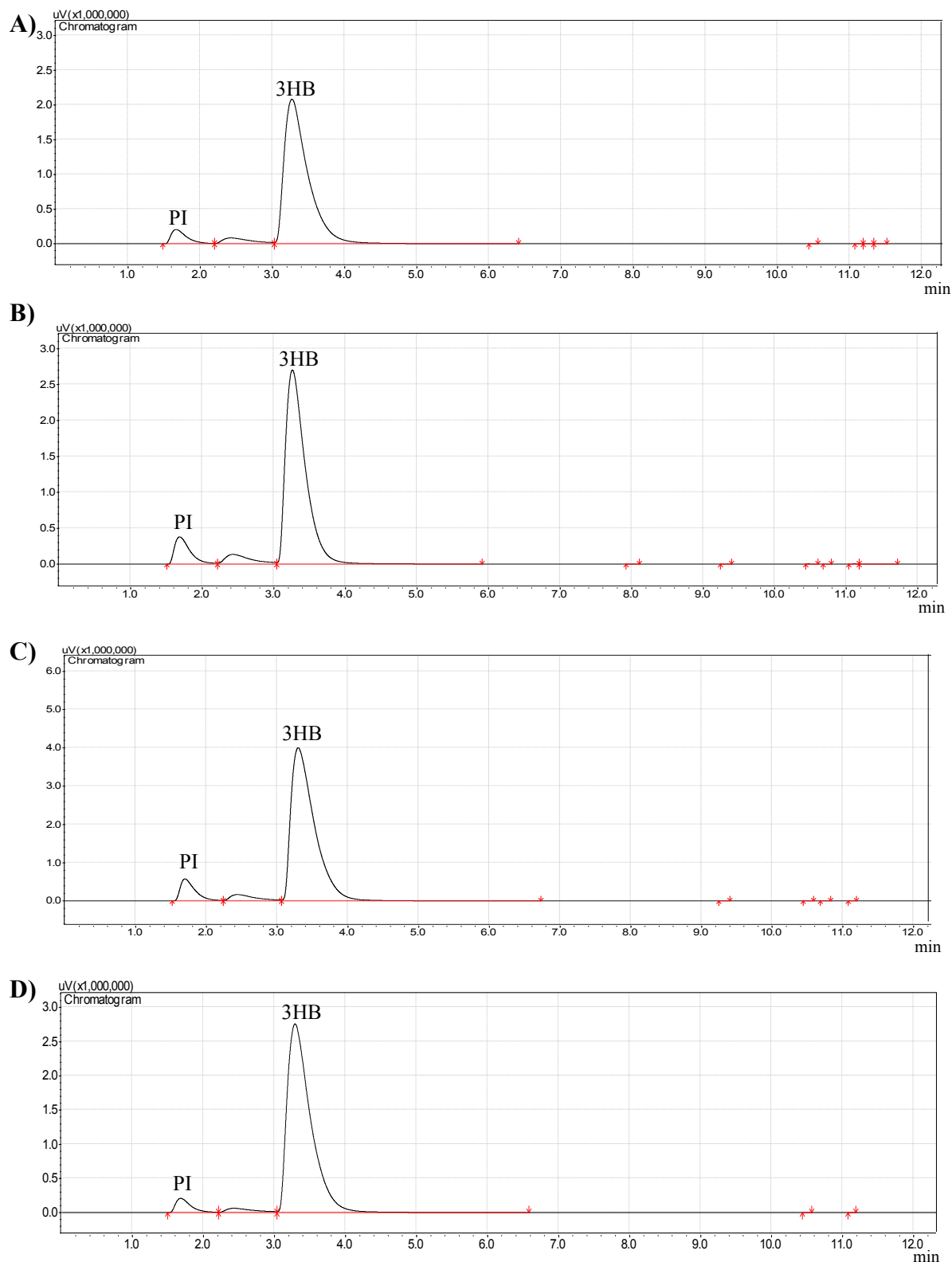


Figura 30. Cromatogramas de propil-ésteres de 3-hidroxialcanoatos, indicando o tempo de retenção relativo aos picos do padrão interno (PI) e metil 3-hidroxibutirato (3HB), obtidos dos cultivos de *Pseudomonas fluorescens* BMA-05 em meio mineral com nitrato de sódio (A), *Enterobacter aerogenes* BMA-10 em meio mineral com cloreto de amônio (B), *Klebsiella oxytoca* BMA-13 em meio mineral com extrato de carne (C) e *Bacillus pumilus* em meio mineral com nitrato de sódio (D), após 24 h de incubação.

No momento, não se consegue aproveitar inteiramente a capacidade resolutive dos melhores microscópios eletrônicos em razão das dificuldades em preservar as células e, sobretudo, em obter cortes extremamente finos, os quais são imprescindíveis para a resolução máxima (THOMSON *et al.*, 2010). Por meio de microscopia óptica, a determinação exata dos diâmetros dos grânulos de PHA é difícil devido à resolução do equipamento; no caso da microscopia eletrônica de transmissão, a confiabilidade dos resultados depende da posição do corte, pois somente se o grânulo tiver sido cortado exatamente no meio é que seu diâmetro pode ser corretamente mensurado. Por conta disso, Jendrossek e Pfeiffer (2014) desaconselham determinar o tamanho dos grânulos por análise de fotografia obtida em microscópio eletrônico de transmissão sem análise estatística. Segundo esses autores, os trabalhos que costumam informar o tamanho dos grânulos frequentemente subestimam o valor devido à imprecisão do corte e da disposição tridimensional (JENDROSSEK e PFIEFFER, 2014).

5.6 Produção de exoenzimas

Nos testes de expressão de exoenzimas dos microrganismos selecionados e reconhecidos como produtores de polihidroxialcanoatos, registrou-se a ação enzimática sobre ésteres de cadeia curta (< 10 carbonos), presentes no Tween 80 (Figura 31).

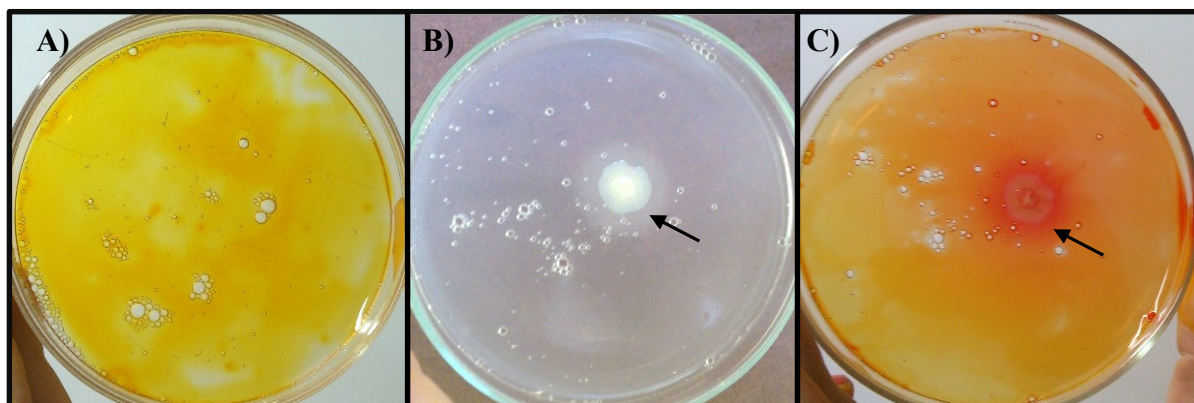


Figura 31. Degradação do surfactante sintético Tween 80 pelo isolado BMA10, após 05 dias de incubação ($30^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, escuro). A) Placa sem inóculo + vermelho de fenol. B) Placa com *Enterobacter aerogenes* BMA-10 sem o corante. C) Placa com o isolado *Enterobacter aerogenes* BMA-10 após adição do corante, evidenciando halo de degradação (seta) pela bactéria.

Observou-se também que todos os isolados foram capazes de hidrolisar o amido, quando esse substrato estava presente no meio de cultura especificado. Por outro lado, os microrganismos sob estudo não sintetizam as proteases tripsina e quimiotripsina, nem produzem lipases capazes de atuar em substratos com 14 carbonos (Tabela 14).

Tabela 14. Testes bioquímicos realizados para a verificação de exoenzimas dos microrganismos produtores de PHAs selecionados e identificados molecularmente.

Teste	<i>P. fluorescens</i> BMA-05	<i>E. aerogenes</i> BMA-10	<i>K. oxytoca</i> BMA-13	<i>B. pumilus</i> BLD-07
Fosfatase alcalina	+	+	+	-
Esterase (C4)	+	-	-	+
Esterase Lipase (C8)	+	+	-	+
Lipase (C14)	-	-	-	-
Leucina arilamidase	+	+	+	-
Valina arilamidase	+	-	-	-
Cistina arilamidase	-	-	+	-
Tripsina	-	-	-	-
A-quimiotripsina	-	-	-	-
Fosfatase ácida	+	+	+	-
Naftol-AS-BI-fosfohidrolase	+	+	+	+
α galactosidase	-	-	-	-
β glucoronidase	-	-	-	-
α glucosidase	-	+	-	-
β glucosidase	-	-	+	+
N-acetil- β glucosaminidase	-	+	-	-
α manosidase	-	-	-	-
α fucosidase	-	-	-	-
Hidrólise da gelatina	+	+	-	+
Hidrólise do amido	+	+	+	+
Hidrólise do Tween 80	+	+	+	+
Hemólise	-	-	-	+

Em relação à localização celular, os biopolímeros podem ser intracelulares ou extracelulares. Enquanto os biopolímeros que permanecem dentro das células são poucos e de uso limitado, a variedade de biopolímeros extracelulares é muito grande e suas funções, para o microrganismo, incluem desde a aderência celular a superfícies até a proteção da comunidade microbiana aos efeitos de dessecação no solo e de ataques de diferentes agentes antimicrobianos (NWODO *et al.*, 2012). Os avanços tecnológicos, por sua vez, levaram à descoberta da utilidade dos biopolímeros extracelulares para o ser humano, e consequentemente, a diversas aplicações industriais (VAN-THUOC *et al.*, 2012). Assim como os polihidroxialcanoatos, os biopolímeros excretados pelas bactérias são biocompatíveis e atóxicos (ABBASI e AMIRI, 2008) e podem ser bastante úteis na produção de bioplástico, como registrado por Halami (2008), que documentou uma linhagem de *Bacillus* produtora de PHA e também degradadora de amido a partir de amostra de solo. A constatação do potencial microbiano em degradar amido é interessante quando a produção em escala industrial de PHA é almejada, pois se o substrato utilizado for algum resíduo com alto teor desse polímero (tais como fécula ou farelo de mandioca), a hidrólise prévia – seja por via química ou enzimática – torna-se desnecessária; e

ausência dessa etapa barateia a produção de PHAs (VAN-THUOC *et al.*, 2012). No cultivo em ágar sangue, dentre os quatro microrganismos estudados, apenas *Bacillus pumilus* BLD-07, apresentou características de β -hemólise após o período de incubação por 72 h, à temperatura de 30 °C (Figura 32).

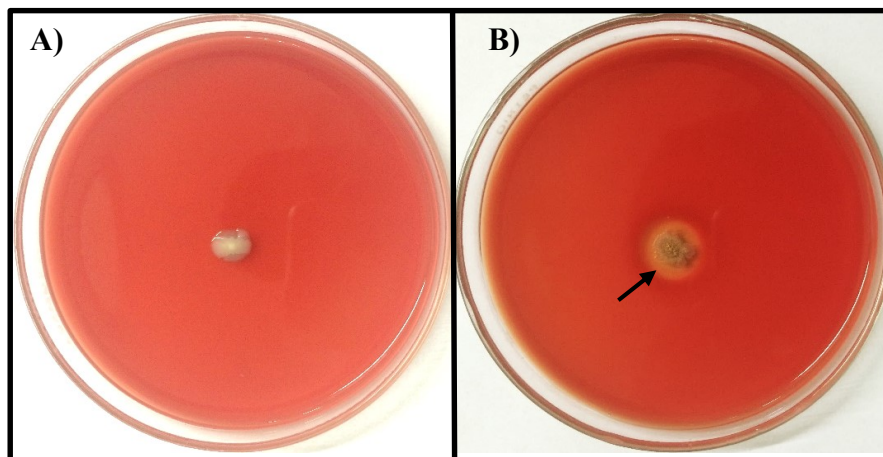


Figura 32. *Enterobacter aerogenes* BMA-10 (A) e *Bacillus pumilus* BLD-07 (B), isolados de solo de Mata Atlântica (Coruripe-AL) e lodo, respectivamente, cultivados em meio nutritivo (72 h, 30 $\pm$ 1° C, escuro) contendo 5% de sangue de carneiro desfibrinado. A zona clara ao redor da colônia (seta) caracteriza a β -hemólise dos eritrócitos presentes e pode ser o indicativo da produção de biosurfactantes.

O ágar sangue é um meio rico em nutrientes que propicia o crescimento de diversos microrganismos capazes de se desenvolver usando a hemoglobina como fonte de ferro (KITAMOTO, 2002; REHMAN *et al.*, 2006). Carrillo *et al.* (1996) recomendaram o uso da metodologia de cultivo microbiológico nesse meio seletivo quando se pretende realizar uma seleção inicial de bactérias produtoras de biosurfactantes. Segundo Kitamoto (2002), a formação do halo hemolítico nesse meio tem sido uma das formas utilizadas para selecionar microrganismos produtores de surfactina e ramnolipídios, sendo o tamanho do halo de hemólise associado à capacidade de produção dessas substâncias. Khopade *et al.* (2012), por exemplo, encontraram uma significativa correlação entre a zona de hemólise (23 mm) e a produção de biosurfactante numa linhagem de *Streptomyces*.

O teste de hemólise, portanto, é uma técnica para triagem de produtores de biotensoativos, desde que seja acompanhado de outras técnicas baseadas no índice de atividade emulsificante ou de tensão superficial, como teste do colapso de gota ou dispersão de óleo, devido inclusive ao baixo custo, simplicidade e rapidez (MULLIGAN, 2005). Esse resultado sugere que uma linhagem bacteriana é possível produtora de biosurfactante. Os outros microrganismos foram classificados como γ -hemolíticos, uma vez que não apresentaram nenhuma modificação no ágar sangue. Mas este método possui suas limitações que foram elencadas na revisão publicada por Walter *et al.* (2000), a saber: 1) A metodologia não é

específica, já que enzimas líticas excretadas pelo microrganismo podem levar ao clareamento ao redor da colônia; 2) Substratos hidrofóbicos não podem ser adicionados ao meio de cultura como a única fonte de carbono; 3) A restrição de difusão do surfactante pode inibir a formação das zonas claras. Portanto, a ausência de hemólise em ágar sangue não exclui a possibilidade de o microrganismo produzir surfactantes.

O resultado positivo quanto à presença das fosfatases em *Pseudomonas fluorescens* BMA-05, *Enterobacter aerogenes* BMA-10 e *Klebsiella oxytoca* BMA-13, já era esperado, uma vez que essas bactérias foram isoladas de solo. Sabe-se que diversos microrganismos, tanto bactérias (*Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Rhizobium*) como fungos (*Aspergillus*, *Candida*) têm papel importante na solubilização do fósforo desse *hábitat*; e o fazem principalmente por meio das fosfatases ácidas (FITRIATIN *et al.*, 2011), as quais podem ser mais eficientes na hidrólise de compostos orgânicos (tais como fitina, lecitina e glicerofosfato) presentes no solo, quando comparada com a enzima de origem vegetal (TARAFDAR *et al.*, 2001). Segundo Mahesh *et al.* (2010), apesar disso, são poucos os estudos envolvendo a produção extracelular de fosfatases alcalinas por *Bacillus* spp.

5.7 Produção de moléculas biosurfactantes/bioemulsificantes extracelulares

Quando cada um dos quatro microrganismos foi cultivado no meio descrito por Diab e El Din (2013), a amostra proveniente do cultivo de *Pseudomonas fluorescens* BMA-05 foi a única cujo sobrenadante livre de células não colapsou quando colocado sobre superfície hidrofóbica. Essa metodologia apresenta a vantagem de poder visualizar a ação biosurfactante presente na amostra de maneira imediata (Figura 33).



Figura 33. Teste do colapso da gota utilizando os sobrenadantes livres de células das amostras de: 1) Controle (meio de cultura estéril e não inoculado); 2) *Pseudomonas fluorescens* BMA-05; 3) *Enterobacter aerogenes* BMA-10; 4) *Klebsiella oxytoca* BMA-13 e 5) *Bacillus pumilus* BLD-07. A solução de azul de metileno foi acrescentada ao sobrenadante para melhor visualização do colapso da gota. O teste foi realizado em triplicata.

Em trabalho recente, Mounira e Abdelhadi (2015) ressaltam a necessidade de somente utilizar o sobrenadante livre de células e não o meio de cultivo com o microrganismo presente, quando se deseja selecionar bactérias produtoras de biosurfactantes por meio do teste qualitativo do colapso da gota. Os autores afirmam que seguindo esse critério, é possível excluir os microrganismos falso-positivos, já que determinadas linhagens podem ser naturalmente hidrofóbicas, colapsando a gota de água, mas não produzirem moléculas surfactantes. Por outro

lado, de acordo com Satpute *et al.* (2010), quando uma amostra contém pouca quantidade de surfactante, o teste de colapso da gota pode dar um falso resultado negativo. Sabe-se que o gênero *Pseudomonas* é capaz de utilizar diversos substratos para produzir biosurfactante do tipo ramnolípido (BANAT *et al.*, 2000), e assim, é possível considerar que o resultado negativo observado para essa linhagem seja devido à pouca quantidade de surfactante que esta linhagem produziu, ou até mesmo que esteja no interior celular, pois de acordo com Walter (2000), a estabilidade da gota é dependente da concentração de surfactante presente na amostra, além de correlacionar-se com as tensões superficial e interfacial.

A baixa quantidade de surfactante produzido pela linhagem pode ser devido à diminuição do valor do pH final do meio ($4,32 \pm 0,03$), que dificulta o crescimento e bom desenvolvimento celular da espécie. Segundo Saharan *et al.* (2014), a biossíntese de surfactante é usualmente regulada pelo pH do meio e/ou temperatura de cultivo. Kanna *et al.* (2014) verificaram a produção de biosurfactante por *Pseudomonas putida* MTCC 2467 em diferentes valores de pH (5, 6, 7 e 8) num meio cujas fontes de carbono e nitrogênio eram sacarose e sulfato de amônio. Os autores verificaram que os maiores valores de biomassa e de biosurfactante produzido pela linhagem foram no meio com pH 8, enquanto que a menor produção do tensoativo ocorreu no meio com pH ácido. Por outro lado, valores mais baixos de pH pareceram não influenciar a produção de biosurfactante em *Enterobacter aerogenes* BMA-10 e *Klebsiella oxytoca* BMA-13, cujos sobrenadantes tiveram valores de $4,69 \pm 0,02$ e $5,50 \pm 0,00$, respectivamente. Os valores de pH nos sobrenadantes do cultivo de *Bacillus pumilus* BLD-07 ao final do experimento foi de $6,20 \pm 0,00$.

A capacidade emulsificante, por sua vez, foi encontrada em cada um dos meios de cultura contendo os microrganismos após intensa homogeneização com o tolueno. Quando considerados os sobrenadantes livres de células, apenas as amostras provenientes dos isolados *Enterobacter aerogenes* BMA-10 e *Bacillus pumilus* BLD-07 foram positivos no teste onde esse hidrocarboneto foi utilizado. Já os sobrenadantes de *Pseudomonas fluorescens* BMA-05 e *Klebsiella oxytoca* BMA-13 mostraram-se incapazes de emulsificar quaisquer um dos líquidos imiscíveis sob estudo. O resultado de *P. fluorescens* BMA-05 corrobora a hipótese que a linhagem tenha produzido pouca quantidade de surfactante, já que seu sobrenadante não colapsou na superfície hidrofóbica ou emulsificou algum hidrocarboneto, embora tenha emulsificado quando as células estavam presentes. Sugere-se que os biosurfactantes podem se manter ligados à superfície celular até atingir um ponto de saturação; e que somente aí o biosurfactante é liberado para o meio externo; e nesses casos, a emulsificação ocorre como um

mecanismo de introduzir substratos insolúveis em água para o interior celular (CASSIDY *et al.*, 2002).

A medida da dispersão do óleo seguiu a técnica desenvolvida por Morikawa *et al.* (2000), sendo um parâmetro de extrema importância quando se pretende verificar o potencial da molécula produzida, já que a aplicabilidade mais comum dos biosurfactantes é a dispersão dos contaminantes na fase aquosa (SILVA *et al.*, 2007). Quando disperso, o substrato hidrofóbico torna-se mais acessível aos microrganismos, o que facilita a sua degradação. No presente trabalho, nenhum dos sobrenadantes livres de células foi capaz de dispersar o óleo mineral colocado sobre a água (Tabela 15).

Tabela 15. Testes realizados para verificar as capacidades surfactante (dos sobrenadantes livres de células) e emulsificante (do meio de cultura contendo células e de seus sobrenadantes) após 72 h de cultivo de *P. fluorescens* BMA-05, *E. aerogenes* BMA-10, *K. oxytoca* BMA-13 e *B. pumilus* BLD-07 em meio descrito por Diab e El Din (2013), contendo glicose como fonte de carbono.

Isolados		<i>P. fluorescens</i> BMA-05	<i>E. aerogenes</i> BMA-10	<i>K. oxytoca</i> BMA-13	<i>B. pumilus</i> BLD-07
Parâmetros	Colapso da gota	-	+	+	+
	Dispersão de óleo	-	-	-	-
Capacidade emulsificante do meio de cultura contendo células	Querosene	+	+	-	-
	Tolueno	+	+	+	+
	Óleo diesel	-	+	-	-
	Óleo de soja	-	+	-	-
Capacidade emulsificante do sobrenadante livre de células	Querosene	-	+	-	-
	Tolueno	-	+	-	+
	Óleo diesel	-	+	-	-
	Óleo de soja	-	+	-	-

Os microrganismos diferem em relação às suas necessidades nutricionais e condições de cultivo, os quais podem influenciar suas atividades metabólicas (MULLIGAN e WANG, 2004). O índice de emulsificação, por exemplo, é uma metodologia cujos resultados podem variar dependendo da fase do crescimento bacteriano, bem como devido a interações bacterianas e o hidrocarboneto testado (KREPSKY *et al.*, 2007). Uma vez que a estabilidade do índice de emulsificação determina a força da molécula surfactante (SATPUTE *et al.*, 2010), as alturas das emulsificações obtidas foram mensuradas somente após 24 h de repouso, momento onde também foi determinada a atividade emulsificante de cada amostra (Tabela 16).

Tabela 16. Testes realizados para quantificar a capacidade emulsificante (do meio de cultura contendo células e de seus sobrenadantes) após 72 h de cultivo de *P. fluorescens* BMA-05, *E. aerogenes* BMA-10, *K. oxytoca* BMA-13 e *B. pumilus* BLD-07 em meio descrito por Diab e El Din (2013), contendo glicose como fonte de carbono.

Parâmetros \ Isolados		<i>P. fluorescens</i> BMA-05	<i>E. aerogenes</i> BMA-10	<i>K. oxytoca</i> BMA-13	<i>B. pumilus</i> BLD-07
Atividade emulsificante (UE.mL ⁻¹)	Querosene	2,00 ± 0,00	18,00 ± 0,01	7,00 ± 0,00	19,00 ± 0,00
	Tolueno	0,00 ± 0,00	10,00 ± 0,02	4,00 ± 0,00	7,00 ± 0,00
	Óleo diesel	0,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Óleo de soja	3,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00
E ₂₄ (%) do meio de cultura contendo células	Querosene	48,50 ± 1,62	20,00 ± 0,65	-	-
	Tolueno	3,00 ± 0,56	78,75 ± 2,47	9,56 ± 2,30	10,40 ± 1,07
	Óleo diesel	-	8,40 ± 2,40	-	-
	Óleo de soja	-	8,90 ± 1,56	-	-
E ₂₄ (%) do sobrenadante livre de células	Querosene	-	47,30 ± 0,49	-	-
	Tolueno	-	73,90 ± 1,56	-	20,07 ± 0,88
	Óleo diesel	-	7,75 ± 0,35	-	-
	Óleo de soja	-	9,85 ± 2,50	-	-

O sobrenadante livre de células proveniente do cultivo de *Enterobacter aerogenes* BMA-10 apresentou as melhores propriedades emulsificantes na presença do tolueno (10,00 ± 0,02 UE.mL⁻¹ e E₂₄ de 73,90 ± 1,56 %). Resultados semelhantes foram obtidos por Cruz *et al.* (2010), ao trabalharem com um consórcio microbiano para a produção de biosurfactantes. Os autores verificaram os valores de E₂₄ do sobrenadante livre de células nos hidrocarbonetos tolueno, octadecano e óleo diesel, sendo que os maiores valores foram obtidos na presença do tolueno, sugerindo assim que biosurfactante produzido por *E. aerogenes* BMA-10 tem elevada afinidade por hidrocarbonetos aromáticos.

De acordo com Amiriyan *et al.* (2004), o índice de emulsificação depende da afinidade do bioemulsificante ao substrato hidrofóbico, e tal afinidade depende muito mais da interação direta do que o efeito da tensão superficial do meio. Os microrganismos que liberam biosurfactantes no meio de cultura são mais interessantes do ponto de vista industrial, já que o produto pode ser mais facilmente obtido (KUYUKINA *et al.*, 2001). Assim, por ter sido o único microrganismo que excretou moléculas de interesse – além de ter sido a única linhagem cujo meio de cultura e/ou sobrenadante foi capaz de emulsionar o óleo diesel (Figura 34) –, *Enterobacter aerogenes* BMA-10 foi selecionado para os testes de estabilidade.

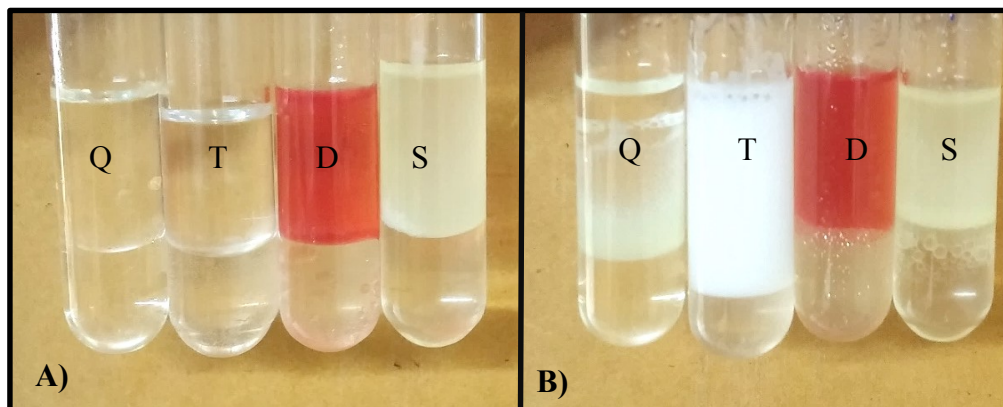


Figura 34. Emulsificação do meio de cultura sem prévia inoculação (A) e do sobrenadante proveniente do cultivo de *Enterobacter aerogenes* BMA-10 (B) em tubos contendo querosene (Q) tolueno (T), óleo de diesel (D) e óleo de soja (S) 24 h após a agitação das amostras.

5.8 Estabilidade do surfactante produzido por *Enterobacter aerogenes* BMA-10

De acordo com Liang *et al.* (2014), a atividade emulsificante dos biosurfactantes pode ser compreendida pela investigação do seu índice de emulsificação, e portanto, a maioria dos pesquisadores que trabalham com biosurfactantes e/ou bioemulsificantes utiliza unicamente a metodologia do índice de emulsificação para verificar o potencial da molécula em questão em emulsificar diferentes hidrocarbonetos (ABBASI e AMIRI, 2008; LOPES *et al.*, 2014; ADAMU *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos com o sobrenadante do cultivo de *Enterobacter aerogenes* BMA-10 no meio descrito por Diab e El Din (2013) mostraram que nenhum dos tratamentos (salinidade, temperatura e pH) ao qual a amostra foi submetida foi capaz de alterar a capacidade emulsificante (E_{24}) na presença do tolueno. Resultados semelhantes foram obtidos por Abbasi e Amiri (2008), que verificaram a estabilidade do bioemulsificante produzido por *Enterobacter cloacae* frente a variações de NaCl ($5 - 40 \text{ g.L}^{-1}$) na emulsificação tanto de tolueno como também do óleo de milho.

No trabalho Liang *et al.* (2014), a caracterização do surfactante excretado por uma linhagem de *Paenobacillus* deu-se por meio da investigação da estabilidade do índice de emulsificação (E_{24}) de suas amostras em óleo de máquina perante diferentes condições de salinidade, pH e temperatura. O biosurfactante daquele microrganismo apresentou-se estável mesmo quando submetidos a altas temperaturas, variações de pH e salinidade $< 5 \%$. No presente trabalho, quando se utilizou querosene – cuja composição inclui hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e naftênicos, com cadeias carbônicas variando entre 9 e 16 – todos os tratamentos tiveram efeito nas amostras do sobrenadante proveniente do cultivo de *Enterobacter aerogenes* BMA-10 (Figura 35).

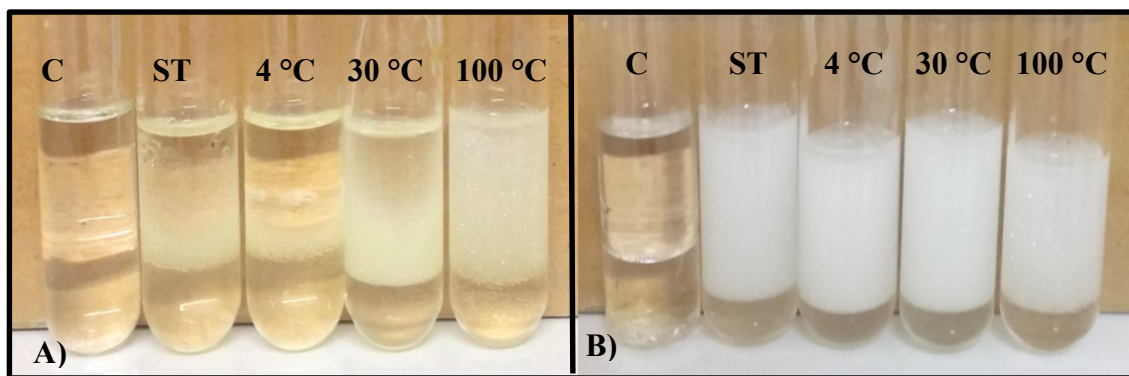


Figura 35. Emulsificação do sobrenadante (pós-tratamento térmico) proveniente do cultivo de *Enterobacter aerogenes* BMA-10 em tubos contendo querosene (A) ou tolueno (B). C= controle, ou seja, meio de cultura sem prévia inoculação e sem tratamento térmico. ST= sobrenadante livre de células do mesmo microrganismo, o qual não foi submetido a quaisquer um dos tratamentos.

A aplicabilidade dos biosurfactantes, seja na indústria farmacêutica ou em campos de petróleo, depende da sua estabilidade em diferentes condições, por isso a investigação do comportamento do surfactante frente a variações de pH, temperatura e salinidade é importante na caracterização da molécula excretada por *Enterobacter aerogenes* BMA-10. Em trabalho recente, Adamu *et al.* (2015) submeteram os sobrenadantes do cultivo das linhagens de *B. sphaericus* EN3 e *B. azotoformans* EN16, livres de células, a temperaturas, valores de pH e concentrações de NaCl variados, e mensuraram a estabilidade do biosurfactante por meio do teste de emulsificação (E_{24}), observando que o sobrenadante do meio de cultivo com o biotensoativo excretado pelos microrganismos estudados apresentavam uma melhor estabilidade quando submetidos a salinidade entre 2 % a 4 % de NaCl e pH de 8,0 a 10,0, em temperaturas de até 50 °C, indicando que o compostos presentes no surfactante biológico produzido por esses microrganismos não são degradados em condições físico-químicas extremas, assim podendo explorar melhor a aplicabilidade dos compostos produzidos.

A necessidade de se verificar a estabilidade da emulsificação frente a diferentes concentrações de sal é justificada pelo fato de que um dos possíveis usos de biosurfactantes microbianos é a recuperação de ambientes marinhos impactados por derramamentos de petróleo, pois sabe-se que concentrações salinas acima de 3 % são suficientes para inativar os surfactantes convencionais (NITSCHKE e PASTORE, 2004). No presente trabalho, a emulsificação do querosene foi maior quando 2 % NaCl estava presente no sobrenadante em comparação com o sobrenadante não tratado. Nas concentrações de 6 e 10 %, observaram-se valores reduzidos de E_{24} . Na Figura 36 é possível verificar que a temperatura de 100 °C por uma hora aumentou o poder de emulsificação do biosurfactante na presença do querosene. A temperatura de 4 °C, por sua vez, resultou numa porcentagem menor de emulsificação ($20,75 \pm 4,17$) quando comparado ao sobrenadante sem tratamento ($52,87 \pm 1,63$). A acidificação (pH

2) e alcalinização (pH 10) do sobrenadante favoreceram os índices de emulsificação das amostras ($61,61 \pm 1,4$ e $62,59 \pm 3,57$, respectivamente) enquanto o pH neutro foi desfavorável ($E_{24} = 37,81 \pm 1,44$).

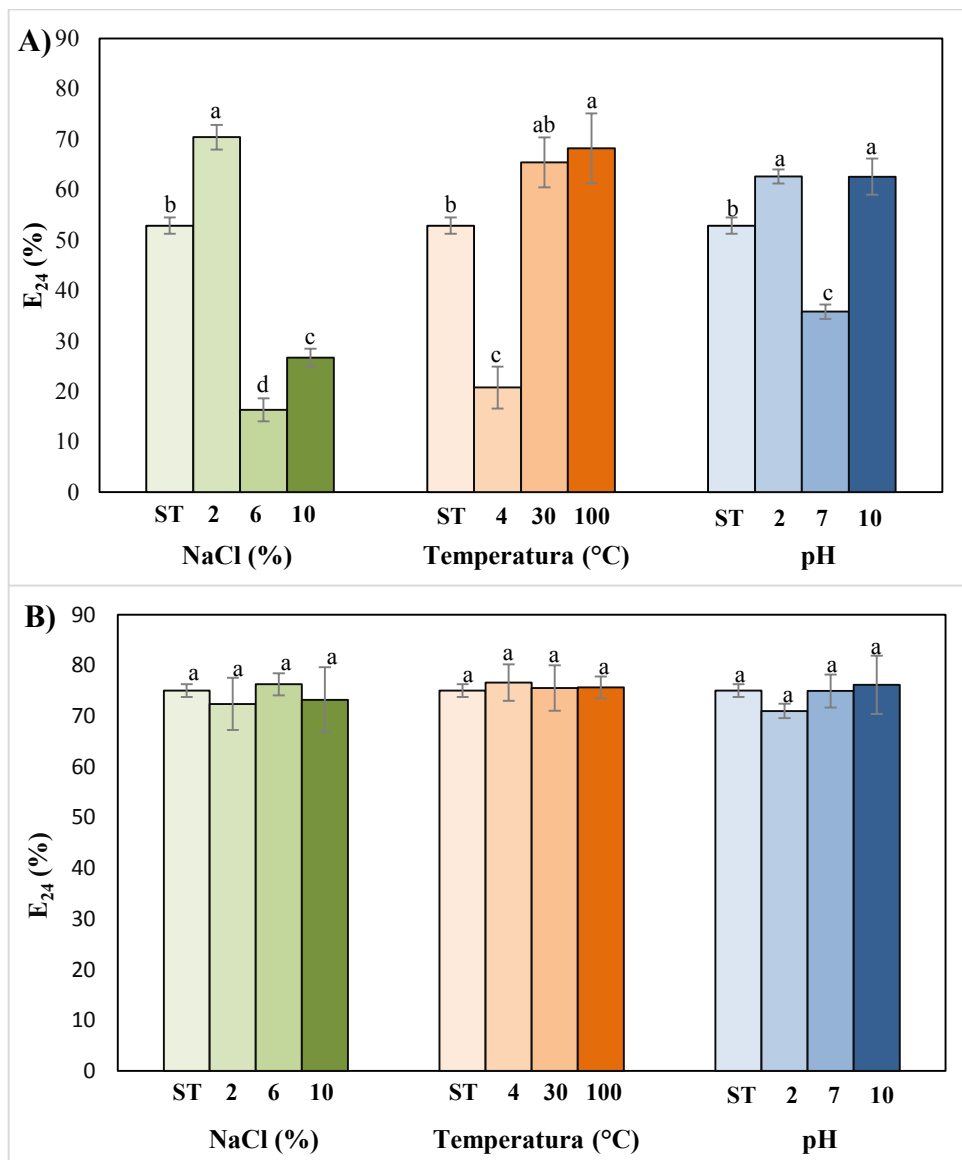


Figura 36. Índices de emulsificação do sobrenadante proveniente do cultivo de *Enterobacter aerogenes* BMA-10 em tubos contendo querosene (A) ou tolueno (B), 24 h após a agitação das amostras. Letras diferentes nas barras do mesmo tipo de tratamento indicam diferença estatística pelo teste Tukey ($p < 0,05$), enquanto letras iguais indicam que as emulsificações obtidas nos não diferem entre si significativamente. Tipos de tratamento: NaCl (2, 6 e 10 %), temperatura (4, 30 e 100 °C) e pH (2, 7 e 10). Legenda: ST= sem tratamento.

Além de ser possível estudar a estabilidade dos surfactantes da maneira como foi feita no presente trabalho, isto é, realizando-se os tratamentos no sobrenadante livre de células após o cultivo do microrganismo, pode-se também já cultivar as células microbianas em condições diferenciadas, e então verificar a estabilidade do biosurfactante produzido. Por exemplo, Dadrasnia e Ismail (2015) realizaram pesquisas com o sobrenadante livre de células do cultivo

de *Bacillus salmaya* 139SI e observaram que o surfactante produzido por esse microrganismo apresentou melhor estabilidade quando a linhagem foi inoculada em meio com o pH 6,5. Abbasi e Amiri (2008), por sua vez, cultivaram *Enterobacter cloacae* em caldo nutriente e em meios de cultura alternativos [água do mar; água do mar + NaH_2PO_4 (1 %) + NaNO_3 (1 %); água do mar + água destilada nas proporções de 90:10, 80:20 e 70:30], e aquele microrganismo foi incapaz de produzir biosurfactante quando cultivado no meio complexo (caldo nutriente). Por outro lado, ao contrário de Diab e El Din (2013), que registraram a produção de biosurfactantes nesse meio de cultura.

Sabe-se que a combinação de polissacarídeos, ácidos graxos e componentes protéicos dos bioemulsificantes conferem a essas moléculas um elevado potencial não somente para formar as emulsões, como também para estabilizá-las (UZOIGWE *et al.*, 2015), por isso a detecção dos aminoácidos e o estudo da contribuição dos componentes protéicos tem sido reportada na literatura (NAVON- VENEZIA *et al.*, 1995; RON e ROSENBERG, 2001). Da mesma forma, os polissacarídeos também podem atuar eficientemente na formação de emulsões estáveis. Hua *et al.* (2010), por exemplo, trabalharam com a linhagem *Enterobacter cloacae* TU, e constataram que o microrganismo, ao ser cultivado em meio tendo n-hexadecano como única fonte de carbono, excreta um exopolissacarídeo com atividade bioemulsificante. Após a precipitação ácida da molécula, os autores realizaram sua purificação por meio de cromatografia de troca iônica e verificaram que o exopolissacarídeo daquele microrganismo é composto de glicose e galactose com peso molecular de 12.4 ± 0.4 kDa. Freitas *et al.* (2014) documentaram que a linhagem *Enterobacter* A47 é capaz de sintetizar exopolissacarídeos com poder emulsificante, sendo que a sua composição variou de acordo com o substrato utilizado para o crescimento celular (xilose, glicose e glicerol). De acordo com esses autores, os polímeros produzidos pela linhagem A47 quando a glicose estava presente no meio de cultura eram menos estáveis, tanto em temperatura ambiente como após tratamento térmico, ao contrário do que foi observado no presente trabalho.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, foi possível observar que:

- A limitação de nitrogênio na composição do meio de cultura utilizado para o isolamento [0,2 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄], restringiu o número de isolados bacterianos obtidos tanto solo de Mata Atlântica (17), como de lodo (07).
- A soma das técnicas de coloração das colônias bacterianas por meio do preto de Sudão e da detecção do gene codante da phaC sintase no genoma das bactérias selecionadas, foi eficiente na seleção de microrganismos produtores de polihidroxialcanoatos.
- Os microrganismos preliminarmente codificados como BMA-05, BMA-10, BMA-13 e BLD-07, foram identificados molecularmente como pertencentes às espécies: *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca* e *Bacillus pumilus*, respectivamente.
- *Pseudomonas fluorescens* BMA-05 mostrou-se eficiente na produção de PHB, uma vez que suas colônias foram coradas fortemente com o preto de Sudão e, por meio de microscopia eletrônica de transmissão, grânulos eletrólucos típicos de polihidroxialcanoatos no interior de suas células foram detectados nas duas condições testadas.
- A cromatografia gasosa realizada com as amostras de sobrenadantes das culturas dos isolados *Enterobacter aerogenes* BMA-10, *Klebsiella oxytoca* BMA-13 e *Bacillus pumilus* BLD-07 em meios com diferentes fontes de nitrogênio confirmou a presença de polihidroxibutirato em todas as condições testadas, embora a microscopia eletrônica de transmissão não tenha revelado grânulos de PHA quando as células foram cultivadas em meio contendo sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.
- Meio mineral contendo cloreto de amônio, extrato de carne e nitrato de sódio favoreceu respectivamente a formação de grânulos de PHA no interior de células de *Enterobacter aerogenes* BMA-10, *Klebsiella oxytoca* BMA-13 e *Bacillus pumilus* BLD-07.
- A ausência do colapso de gota em superfície hidrofóbica pelo sobrenadante livre de células proveniente do cultivo de *Pseudomonas fluorescens* BMA-05 ocorreu possivelmente devido à acidificação do meio de cultura, que desfavoreceu a excreção de biosurfactantes pelo microrganismo.
- Dentre os microrganismos selecionados, *Enterobacter aerogenes* BMA-10 foi o único capaz de produzir PHB e excretar moléculas biosurfactantes/bioemulsificantes com capacidade de emulsionar óleo diesel.

- As emulsões formadas pelo sobrenadante livre de células de *Enterobacter aerogenes* BMA-10 são estáveis no tolueno mesmo quando as amostras são previamente tratadas com diferentes concentrações de sal (NaCl 2, 6 e 10 %), alterações no pH (2, 7 e 10) ou submetidas durante uma hora às temperaturas de 4, 30 e 100 °C, indicativos que a molécula excretada tem elevada afinidade por hidrocarbonetos aromáticos.

7 CONCLUSÃO

Pseudomonas fluorescens BMA-05, *Enterobacter aerogenes* BMA-10, *Klebsiella oxytoca* BMA-13 e *Bacillus pumilus* BLD-07 isolados de solo de Mata Atlântica e de lodo agroindustrial e identificados bioquímica e molecularmente são microrganismos de interesse biotecnológico, uma vez que são capazes de produzir polihidroxialcanoatos em até 24 h de cultivo em meio mineral contendo glicose como fonte de carbono. Por ser biocompatível, termoplástico e biodegradável, o polímero produzido por esses isolados – polihidroxibutirato, P(3HB) – pode vir a ser utilizado na composição de diversos produtos, inclusive àqueles que são destinados à saúde humana. Os grânulos do polímero no interior das células das linhagens bacterianas, os quais foram detectados por meio de microscopia eletrônica de transmissão e identificados por cromatografia gasosa, apresentaram rendimentos diferenciados a depender da fonte nitrogenada disponível. Com os resultados obtidos desse experimento, foi possível estabelecer as melhores condições para a produção de P(3HB) para cada um dos isolados. Dentre eles, *Enterobacter aerogenes* BMA-10 destacou-se por também apresentar capacidade de sintetizar e excretar molécula emulsificante de elevada afinidade por hidrocarbonetos aromáticos, estável após condições variadas de salinidade, pH e temperatura, mas que não apresenta atividade hemolítica.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, A. e AMIRI, S. Emulsifying behavior of an exopolysaccharide produced by *Enterobacter cloacae*. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 10, p. 1574-1576, 2008.
- ADAMU, A. Study on biosurfactant production by two *Bacillus* species. **International Journal of Scientific Research in Knowledge**, v. 3, n.1, p. 013-020, 2015. DOI: 10.12983/ijsrk-2015-p0013-0020.
- AMIRIYAN *et al.* Bioemulsan Production by Iranian Oil Reservoirs Microorganisms. **Iranian Journal of Environmental Health and Science Engineering**, v.1, n.2, p.28-35, 2004.
- ARIAS, S. et al. **PHA-producing genetically engineered microorganisms**. US 20150203878 A1. 11 abr. 2013. 23 jul. 2015. PCT/EP2013/057630.
- ARIMA, K.; KAKINUMA A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 31, n. 3, p.488-494, 1968. DOI: 10.1016/0006-291x(68)90503-2.
- ARUMUGAM, A.; SANDHYA, M.; PONNUSAMI, V. Biohydrogen and polyhydroxyalkanoate co-production by *Enterobacter aerogenes* and *Rhodobacter sphaeroides* from *Calophyllum inophyllum* oil cake. **Bioresource Technology**, v.164, n.1, p.170-176, 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.04.104.
- AVÉROUS, L.; POLLET, E. Environmental silicate nano-biocomposites. **Green Energy and Technology**, p. 13-39, 2012. DOI: 10.1007/978-1-4471-4108-2_2.
- BANAT, I.; MAKKAR, R.; CAMEOTRA, S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v 53, n. 5, p. 495-508, 2000. DOI: 10.1007/s002530051648.
- BERKELEY, R. et al. From Phylogeny to Systematics: The dissection of the genus *Bacillus* in: **Applications and systematics of *Bacillus* and relatives**. Wiley-Blackwell, 2008. DOI: 10.1002/9780470696743.
- BRANDL, H. et al. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(beta-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.8, p.1977-1982, 1988.
- BRIGHAM, C.; SINSKEY, A. Applications of polyhydroxyalkanoates in the medical industry. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v. 1, n.1, p. 53-60, 2012. DOI: 10.6000/1927-3037.2012.01.01.03.
- BUGNICOURT, E. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA): review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. **eXPRESS Polymer Letters**, v. 8, n. 11, p.791-808, 2014. DOI: 10.3144/expresspolymlett.2014.82.

CARRILLO, P. et al. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.12, n.1, p.82-84, 1996. DOI: 10.1007/BF00327807.

CASSIDY, D. et al. *In situ* rhamnolipid production at an abandoned petroleum refinery. **Soil Sediment Contamination**, v.11, n. 5, p. 769-787, 2002. DOI: 10.1080/20025891107087.

CATONE, M. et al. High Polyhydroxybutyrate production in *Pseudomonas extremaustralis* is associated with differential expression. of horizontally acquired and core genome polyhydroxyalkanoate synthase genes. **PlosOne**, v. 9, n. 6, p.1-8, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0098873.

CEYHAN, N.; OZDEMIR, G. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production from domestic wastewater using *Enterobacter aerogenes*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 6, p. 690-702, 2011. DOI: 10.5897/AJMR10.864.

CHAUDHRY, W. et al. Screening for polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacterial strains and comparison of PHA production from various inexpensive carbon sources. **Annals of Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 623-629, 2010. DOI: 10.1007/s13213-010-0181-6.

CHEN, G. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 8, p. 2434-2446, 2009. DOI: 10.1039/b812677c.

CHEN, G.; HAJNAL, I. The “PHome”. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 10, p. 559-564. 2015. DOI: 10.1016/j.tibtech.2015.07.006.

CHEVENET, F. et al. TreeDyn: Towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 7, p. 439, 2006.

CHOI, J.; LEE, S. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoates production by bacterial fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 1, p. 13-21, 1999. DOI: 10.1007/s002530051357.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* Species. **Applied of Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987. DOI: 0099-2240/87/020224-06\$02.00/0.

COTY, V.F. Mobil Oil Corporation. **Microbial synthesis of polymers**. US3275610, 24 mar. 1964, 27 set. 1966.

CRUZ, G. et al. Exopolymeric substances (EPS) produced by petroleum microbial consortia. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.21, n.8, p. 1517-1523, 2010. DOI: 10.1590/S0103-50532010000800016.

DADRASNIA A.; ISMAIL, S. Biosurfactant production by *Bacillus salmalaya* for lubricating oil solubilization and biodegradation. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.12, n.8, p. 9848–9863, 2015. DOI: 10.3390/ijerph120809848.

DAVID, C. et al. Decolorization of distillery spent wash using biopolymer synthesized by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from tannery effluent. **BioMed Research International**, v.2015, n.1, p.1-9, 2015. DOI: 10.1155/2015/195879.

DERENZO, S. et al. Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo SA. Br PI 9302312-0, 30 jun. 1993, 30 abril 2002.

DIAB, A.; EL DIN, S. G. Application of the biosurfactants produced by *Bacillus* spp. (SH 20 and SH 26) and *Pseudomonas aeruginosa* SH 29 isolated from the rhizosphere soil of an Egyptian salt marsh plant for the cleaning of oil - contaminated vessels and enhancing the biodegradation of oily sludge. **African Journal of Environmental Science and Technology**, v. 7, n. 7, p. 671-679, 2013. DOI: 10.5897/AJEST2013.1451.

DRAPER, J.; REHM, B. Engineering bacteria to manufacture functionalized polyester beads. **Bioengineered**, v.3, n.4, p.203–208, 2012. DOI: 10.4161/bioe.19567.

EDGAR, R.C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v.32, n.5, p. 1792-1797, 2004. DOI: 10.1093/nar/gkh340.

FITRIATIN, B. *et al.* Phosphatase-producing bacteria isolated from Sanggabuana forest and their capability to hydrolyze organic phosphate. **Journal of Soil Science and Environmental Management**, v.2, n.10, p.299-303, 2011.

FRACCHIA, L. et al. Potential therapeutic applications of microbial surface-active compounds. **AIMS Bioengineering**, v. 2, n. 3, p. 144-162, 2015. DOI: 10.3934/bioeng.2015.3.144.

FRICK, A. et al. Aqueous Nile blue: a simple, versatile and safe reagent for the detection of latent fingerprints. **Chemical Communications**, v.50, n.25, p.3341-3343, 2014. DOI: 10.1039/c3cc49577a.

FUKUI, T.; ORITA, I. **Production method for copolymer polyhydroxyalkanoate using genetically modified strain of fatty acid -oxidation pathway**. EP 2963119 A1. 27 fev. 2014. 6 jan. 2016. EP20140756513.

GAMAL, R. et al. Semi-scale production of PHAs from waste frying oil by *Pseudomonas fluorescens* S48. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 539-549, 2013. DOI: 10.1590/s1517-83822013000200034.

GAO, X. et al. Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n.6, p. 768-774, 2011. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.06.005.

GAUTAM, K.; TYAGI, V. Microbial surfactants: a review. **Journal of Oleo Science**, v. 55, n. 4, p. 155-166, 2005. DOI: 10.5650/jos.55.155

GOMAA, E. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* grown on cane molasses fortified with ethanol. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n.1, p. 145-154, 2014. ISSN 1516-8913.

GUNTHER, N. et al. Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a Nonpathogenic Bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.5, p. 2288–2293, 2015. DOI: 10.1128/AEM.71.5.2288–2293.2005.

HAI, T. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation in sulfate-reducing bacteria and identification of a class III PHA synthase (PhaEC) in *Desulfococcus multivorans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4440–4448. 2004. DOI: 10.1128/aem.70.8.4440-4448.2004.

HALAMI, P. Production of polyhydroxyalkanoate from starch by the native isolate *Bacillus cereus* CFR06. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, n.6, p. 805-812, 2008. DOI: 10.1007/s11274-007-9543-z.

HALLMANN, E.; MEDRZYCKA, K. Wetting properties of biosurfactant (rhamnolipid) with synthetic surfactants mixtures in the context of soil remediation. **Annales UMCS**, v. 70, n. 1, p. 29-39, 2015. DOI: 10.1515/umcschem-2015-0003.

HAN, J. et al. Identification of the polyhydroxyalkanoate (PHA)-specific acetoacetyl coenzyme A reductase among multiple fabG paralogs in *Haloarcula hispanica* and reconstruction of the PHA biosynthetic pathway in *Haloferax volcanii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n.19, p. 6168–6175, 2009. DOI: 10.1128/aem.00938-09.

HANKIN, L. E ANAGNOSTAKIS, S. The use of solid media for identification of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v.67, n.3, p. 597-607, 1975. DOI: 10.2307/3758395.

HSIN-YING, L.; FALK, M. **Polyhydroxyalkanoate production during wastewater treatment**. WO2013022874 A1. 7 ago. 2012. 14 fev. 2013. PCT/US2012/049828.

HUANG, YU-TZU et al. Detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria from domestic wastewater treatment plant using highly sensitive PCR primers. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 22, n.8, p. 1141-1147, 2012. DOI: 10.4014/jmb.1111.11040.

INOUE, D. et al. Polyhydroxyalkanoate production potential of heterotrophic bacteria in activated sludge. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 1, p. 47-51, 2016. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.04.022.

JENDROSSEK, D. Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). **Journal of Bacteriology**, v. 191, n.10, p. 3195-3202, 2009. DOI: 10.1128/JB.01723-08.

JENDROSSEK, D.; PFEIFFER, D. New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). **Environmental Microbiology**, v.16, n. 8, p. 2357-2373, 2014. DOI: 10.1111/1462-2920.12356.

JENDROSSEK, D.; SELCHOW, O.; HOPPERT, M. Poly(3-Hydroxybutyrate) granules at the early stages of formation are localized close to the cytoplasmic membrane

in *Caryophanon latum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 2, p. 586-593, 2007. DOI: 10.1128/AEM.01839-06.

KANNA, R., GUMMADI, S.; KUMAR, G. Production and characterization of of biosurfactant by *Pseudomonas putida*. *Journal of Biological Sciences*, v.14, n.3, p.436-445, 2014. DOI: 10.3923/jbs.2014.436.445.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, v. 40, n.2, p. 607-619, 2005. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.01.053.

KHOPADE, A. et al. Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 367, n. 1, p. 311-318, 2012. DOI: 10.1016/j.jcis.2011.11.009.

KITAMOTO, D et al. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants - from energy-saving materials to gene delivery carriers. **Journal of Bioscience and Engineering**, v.94, n. 3, p. 187-201, 2002. 10.1016/s1389-1723(02)80149-9.

KOKARE, C. R. et al. Studies on bioemulsifier production from marine *Streptomyces* sp. S1. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 78-84, 2007.

KOLLER, M. et al. Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p.4854-4863, 2008. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.09.049.

KOLLER, M. Modern Biotechnological Polymer Synthesis: A Review. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n.3, p. 255–269, 2010.

KOSARIC, N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 295-304, 2001. ISSN: 1330-9862.

KREPSKY, N. et al. Alternative methodology for isolation of biosurfactant producing bacteria. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, n.1, p. 117-124, 2007. DOI: 10.1590/s1519-69842007000100016.

KUIPER, I. et al. Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 97-113, 2004. DOI:10.1046/j.1365-2958.2003.03751.x.

KULPREECHA, S. et al. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 3, p. 240-245, 2009. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2008.10.006.

KUNG, S. et al. Isolation of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria using a combination of phenotypic and genotypic approach. **Letters in Applied Microbiology**, v.44, n.4, p.364-371, 2007. DOI: 10.1111/j.1472-765x.2006.02090.x.

KUYUKINA, M. et al. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary - butyl ether extraction. **Journal of Microbiological Methods**, v. 46, n. 2, p.149-156. 2001. DOI: 10.1016/s0167-7012(01)00259-7.

LAYCOCK, B. et al. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 3-4, p. 536-583, 2013. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2012.06.003.

LEE, W. et al. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. **Bioresource Technology**, v.99, n.15, p. 6844–6851, 2008. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.01.051.

LEGAT, A. et al. Identification of polyhydroxyalkanoates in *Halococcus* and other *Haloarchaeal* species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.87, n.3, p.1119-1127, 2010. DOI: 10.1007/s00253-010-2611-6.

LEMOIGNE, M. Produits de dehydration et de polymerisation de l'acide β -oxobutyrique. **Bulletin de la Société de Chimie Biologique**, v. 8, p. 770-782, 1926.

LIANG, T. et al. Exopolysaccharides and Antimicrobial Biosurfactants produced by *Paenibacillus macerans* TKU029. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.172, n.2, p. 933–950, 2014. DOI 10.1007/s12010-013-0568-5.

LIU, C. et al. Composition diversity and nutrition conditions for accumulation of polyhydroxyalkanoate (PHA) in a bacterial community from activated sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.97, n.21, p. 9377–9387, 2013. DOI: 10.1007/s00253-013-5165-6

LIU, X. et al. Structural characterization of eight cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* HSO 121. **Protein & Peptide Letters**, v.14, n.8, p. 766-773, 2007. DOI: 10.2174/092986607781483642.

LOPES, E. Emulsification Properties of Bioemulsifiers Produced by Wild-Type and Mutant *Bradyrhizobium elkanii* Strains. **Bioremediation & Biodegradation**, v.5, n.6, p.245-250, 2014. DOI: 10.4172/2155-6199.1000245.

LÓPEZ, N.; PETTINARI, J.; MÉNDEZ, B. Detection of reserve polymer synthesis genes in natural bacterial populations. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 22, n.2, p.129-136, 1997. DOI: 10.1111/j.1574-6941.1997.tb00364.x.

LÓPEZ-CUELLAR, M. et al. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 1, p. 74-80, 2011. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2010.09.016.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n.1, p. 265-275, 1951.

MADISON, L.; HUISMAN, G. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, n. 1, p. 21–53, 1999.

MADKOUR, M. et al. PHA recovery from biomass. **Biomacromolecules**, v.14, n. 9, p. 2963-2972, 2013. DOI: 10.1021/bm4010244.

MAGDOULI, S. et al. How to direct the fatty acid biosynthesis towards polyhydroxyalkanoates production? **Biomass and Bioenergy**, v.74, n.1, p.268-279, 2015. DOI: 10.1016/j.biombioe.2014.12.017.

MAHESH.M. et al. Isolation and characterization of extracellular thermostable alkaline phosphatase enzyme from *Bacillus* spp. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, v.1, n. 1, p. 21-33.

MANANGAN, T.; SHAWAPHUNA, S. Quantitative extraction and determination of polyhydroxyalkanoate accumulated in *Alcaligenes latus* dry cells. **ScienceAsia**, v.36, n.3, p. 199-203, 2010. DOI: 10.2306/scienceasia1513-1874.2010.36.199.

MANO, E.; MENDES, L. **A natureza e os polímeros**: meio ambiente, geopolímeros, fitopolímeros e zoopolímeros. São Paulo: Blücher, 2013.

MAO, X. et al. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 285, p. 419–435. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2014.12.009.

MARANG, L. et al. Butyrate as preferred substrate for polyhydroxybutyrate production. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 232-239, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.05.031.

MARJADI, D.; DHARAIYA, N. Recovery and characterization of poly(3-Hydroxybutyric acid) synthesized in *Staphylococcus epidermidis*. **African Journal of Environmental Science and Technology**, v. 8, n. 6, p. 319-329, 2014. DOI: 10.5897/AJEST2014.1645.

MESQUITA, D. et al. Polyhydroxyalkanoate granules quantification in mixed microbial cultures using image analysis: Sudan Black B *versus* Nile Blue A staining. **Analytica Chimica Acta**, v. 20, n.1, p 8–15, 2015. DOI:10.1016/j.aca.2015.01.018.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p. 426-428, 1959. DOI: 10.1021/ac60147a030.

MORIKAWA, M. et al. A Study on the structure-function relationship of lipopeptides biosurfactants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1488, n. 3, p. 211-218, 2000. DOI: 10.1016/S1388-1981(00)00124-4.

MOUNIRA, A.; ABDELHADI, G. Assessment of four different methods for selecting biosurfactant producing extremely halophilic bacteria. **African Journal of Biotechnology**, v.14, n.21, p. 1764-1772. 2015. DOI: 10.5897/AJB2015.14611.

MULLIGAN, C. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 2, p. 183-198, 2005. DOI: 10.1016/j.envpol.2004.06.009.

MULLIGAN, C.; WANG, S. An evaluation of surfactant foam technology in remediation of contaminated soil. **Chemosphere**, v. 57, n. 9, p. 1079-1089, 2004. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2004.08.019.

MURPHY, S., HOLMES, M.; WRIGHT, S. *Bacillus pumilus*: possible model for the bioweapon *Bacillus anthracis*. **Advances in Microbiology**, v.2, n.1, p. 382-387, 2012. DOI: 10.4236/aim.2012.23048.

NAHEED, N.; JAMIL, N.; HASNAIN, S. Screening of contaminated soils for biodegradable plastic producing bacteria and profiling of their resistance markers. *African Journal of Microbiology*, v. 5, n. 24, p. 4097-4104, 2011. DOI: 10.5897/ajmr11.123.

NAHEED, N. et al. Biosynthesis of polyhydroxybutyrate in *Enterobacter* sp. SEL2 and *Enterobacteriaceae bacterium* sp. PFW1 using sugar cane molasses as media. **African Journal of Biotechnology**, 11, n.16, p. 3321-3332, 2012. DOI: 10.5897/AJB11.1405.

NARANCIC, T. et al. Medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production by newly isolated *Pseudomonas* sp. TN301 from a wide range of polyaromatic and monoaromatic hydrocarbons. **Journal of Applied Microbiology**, v.113, n.3, p.508-520, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05353.x.

NARAYANAN, A.; RAMANA, K. V. Polyhydroxybutyrate production in *Bacillus mycoides* DFC1 using response surface optimization for physico-chemical process parameters. **Biotech**, v. 2, n. 4, p. 287-296, 2012. DOI: 10.1007/s13205-012-0054-8.

NAVON- VENEZIA, S. et al. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.9, p. 3240-3233, 1995.

NEDER, R. **Microbiologia**: manual de Laboratório. São Paulo: Nobel, 1992.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using cassava-processing effluent. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.112, n.3, p.163-172, 2004. DOI: 10.1385/abab:112:3:163.

NOTMAN, R. et al. Molecular basis for dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes. **Journal of the American Chemical Society**, v.128, n.43, p.13982–13983, 2006. DOI: 10.1021/ja063363t.

NUNES, E.; LOPES, F. **Polímeros**: conceitos, estrutura molecular, classificação e propriedades. São Paulo: Érica, 2014.

NWODO, U.; GREEN, E.; OKOH, A. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, n.12, p. 14002-14015, 2012. DOI:10.3390/ijms131114002.

ONU: Organização das Nações Unidas. Disponível em: <http://www.onu-brasil.org.br/> Acesso em: 01/12/2011.

OSTLE, A.; HOLT, J. Nile Blue A as a Fluorescent Stain for Poly-3-Hydroxybutyrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v.44, n.1. p. 238-241, 1982.

PALMERI, R. et al. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production through conversion of glycerol by selected strains of *Pseudomonas mediterranea* and *Pseudomonas corrugata*. **Chemical Engineering Transactions**, v. 27, p. 121-126, 2012. DOI: 10.3303/CET1227021.

PARVATHI, A. et al. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 269-275, 2009. DOI: 10.1590/s1517-83822009000200012.

PITTMANN, T.; STEINMETZ, H. Polyhydroxyalkanoate production as a side stream process on a municipal waste water treatment plant. **Bioresource Technology**, v.167, n.1, p. 297-302, 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.06.037.

QUILLAGUAMÁN, J. et al. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1687-1696, 2010. DOI: 10.1007/s00253-009-2397-6.

QUINES, L. et al. Extração de poli(3-hidroxibutirato), produzido por *Cupriavidus necator*, com carbonato de propileno. **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 214-220, 2015. DOI: 10.5935/0100-4042.20140297.

REHM, B. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. **Biochemical Journal**, v. 376, n.1, p. 15-33, 2003. DOI: 10.1042/BJ20031254.

REHMAN, S.; JAMIL, N.; HUSSNAIN, S. Characterization and optimization of antibiotic resistant bacterial strains for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production. **Pakistan Journal of Agricultural Research**, v. 19, n.4, p. 81-86, 2006.

REYNOLDS, E. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v.17, n.1, p.208–212,1963. DOI: 10.1083/jcb.17.1.208.

RIEDEL, S. et al. Lipid and fatty acid metabolism in *Ralstonia eutropha*: relevance for the biotechnological production of value-added products. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v. 98, n. 4, p. 1469-1483, 2014. DOI: 10.1007/s00253-013-5430-8.

ROMO, D. et al. A most effective method for selecting a broad range of short and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate producing microorganisms. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 3, 2007. DOI: 10.2225/vol10-issue3-fulltext-13

RON, E.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 229-236, 2001. DOI: 10.1046/j.1462-2920.2001.00190.x.

ROSSELLÓ-MÓRA, R; AMANN, R. Past and future species definitions for *Bacteria* and *Archaea*. **Systematic and Applied Microbiology**, v.38, n.4, p.209-216. DOI: 10.1016/j.syapm.2015.02.001.

SACCO, L. et al. Properties of polyhydroxyalkanoate granules and bioemulsifiers from *Pseudomonas* sp. and *Burkholderia* sp. isolates growing on glucose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 1, n.1, p. 1-12, 2015. DOI: 10.1007/s12010-015-1923-5.

SAHARAN, B.; GREWAL, A.; KUMAR, P. Biotechnological production of polyhydroxyalkanoates: a review on trends and latest developments. **Chinese Journal of Biology**, v.2014, n.1, p. 1-19, 2014. DOI: 10.1155/2014/802984.

SANGKHARAK, K.; PRASERTSAN, P.J. Screening and identification of polyhydroxyalkanoates producing bacteria and biochemical characterization of their possible application. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 173-182, 2012. DOI: 10.2323/jgam.58.173.

SANTA ANNA, L. et al. Use of biosurfactant in the removal of oil from contaminated sandy soil. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, n.7, p. 687-691, 2007. DOI: 10.1002/jctb.1741.

SATOH, Y. et al. Isolation of a thermotolerant bacterium producing medium-chain-length polyhydroxyalkanoate. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n.4, p. 811-817, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05093.x.

SATPUTE, S. K. et al. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 2, p. 127-144, 2010. DOI: 10.3109/07388550903427280.

SCHLEGEL, H.; LAFFERTY, R.; KRAUSS, I. The isolation of mutants not accumulating poly-beta-hydroxybutyric acid. **Archiv für Microbiologie**, v.70, n.1, p.283- 294,1970.
SHAH, A. et al. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 3, p. 246-265, 2008. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.12.005.

SHAMALA, T. et al. Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing *Bacillus* spp. using the polymerase chain reaction (PCR). **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 369-374, 2003. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.01838.x.

SHENOY, S.; MASCARENHAS, J.; ARUNA, K. Optimization of polyhydroxalkanoate accumulation by *Klebsiella* sp. NCCP-138 isolated from oil contaminated soil. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 3, n.4, p. 559-570, 2012. ISSN: 0975-6299.

SHEU, D.; WANG, Y.; LEE, C. Rapid detection of polyhydroxyalkanoate accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. **Microbiology**, v. 146, n. 8, p. 2019-2025, 2000. DOI: 10.1099/00221287-146-8-2019.

SHI, H.; LEE, C. Phosphate removal under denitrifying conditions by *Brachymonas* sp. strain P12 and *Paracoccus denitrificans* PP15. *Canadian Journal of Microbiology*, v.53, n.6, p. 727-737, 2007. DOI: 10.1139/w07-026.

SHOEB, E. et al. Classification and industrial applications of biosurfactants. **Academic Research International**, v. 4, n.3, p. 243-252, 2013. ISSN:2223-9553.

SIDIKMARSUDI; SETIADI, T. Preliminary study of polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis by a photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* (IFO 12203) on volatile fatty acid medium. **The Indonesian Biotechnology Conference**, p.1-9,1997.

SILVA, L. et al. Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**, v. 30, n.7, p.1732-1743, 2007. DOI: 10.1590/s0100-40422007000700040.

SILVA, N. Informes Técnicos Nº1. **Testes Bioquímicos Para Identificação de Bactérias em Alimentos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1996.

SINGH, A. et al. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 1, p. 99-121, 2007. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.10.004.

SLIFKIN, M. 2000. Tween 80 Opacity Test Responses of Various *Candida* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.12, p. 4626-4628.

SOLAIMAN, D.; ASHBY, R. Rapid genetic characterization of poly(hydroxyalkanoate) synthase and its applications. **Biomacromolecules**, v.6, n. 2, p. 532-537, 2005. DOI: 10.1021/bm0493640.

SPIEKERMANN et al. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. **Archives of Microbiology**, v. 171, n. 2, p. 73-80, 1998. DOI: 10.1007/s002030050681

SQUIO, C.; ARAGÃO, G. Estratégias para Produção dos Plásticos Biodegradáveis Poli (3-Hidroxibutirato) e Poli (3-Hidroxibutirato-co-3-Hidroxivalerato) por Bactérias. **Química Nova**, v. 27, n.4, p. 615-622, 2004. DOI: 10.1590/s0100-40422004000400016.

SREEKANTH et al. Effect of carbon and nitrogen sources on simultaneous production of α -amylase and green food packaging polymer by *Bacillus* sp. CFR 67. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n.2, p. 404-408, 2013. DOI 10.1007/s13197-012-0639-6.

STEINBÜCHEL, A.; FÜCHTENBUSCH, B. Bacterial and other biological systems for polyester production. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n.10, p. 419-427, 1998. DOI: 10.1016/s0167-7799(98)01194-9.

TAN, G. et al. Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): a review. **Polymers**. v.6, n.1, p.706-754, 2014. DOI:10.3390/polym6030706.

TANG, C.; QIU, F.; ZHAO, X. Molecular design and applications of self-assembling surfactant-like peptides chengkang. **Journal of Nanomaterials**, v. 2013, n. 1, p. 1-9, 2013. DOI: 10.1155/2013/469261.

TARAFDAR, J.C.; YADAV, R.S.; MEENA, S.C. Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 164, n.3, p. 279-282, 2001. DOI: 10.1002/1522-2624(200106)164:3<279::aid-jpln279>3.0.co;2-l.

THOMSON, N.; SUMMERS, D.; SIVANIAH, E. Synthesis, properties and uses of bacterial storage lipid granules as naturally occurring nanoparticles. **Soft Matter**, v. 6, n.17, p. 4045-4057, 2010. DOI: 10.1039/B927559B.

TOKIWA, Y. et al. Biodegradability of plastics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n.1, p. 3722-3742, 2009. DOI: 10.3390/ijms10093722.

TOMINAGA, M.; MIDIO, A. Exposição humana a trihalometanos presentes em água tratada. **Revista de Saúde Pública**, v. 33, n.4, p. 413-21,1999.

TRIBELLI, P.M. et al. Genome sequence of the polyhydroxybutyrate producer *Pseudomonas*, a highly stress-resistant antarctic bacterium. **Journal of Bacteriology**, v.194, n.9, p. 2381-2382, 2012. DOI: 10.1128/JB.00172-12.

TYO, K.; ZHOU, H.; STEPHANOPOULOS, G. High-throughput screen for poly-3-hydroxybutyrate in *Escherichia coli* and *Synechocystis* sp. strain PCC6803. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3412-3417, 2006. DOI: 10.1128/AEM.72.5.3412-3417.2006.

UZOIGWE, C. et al. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n.1, p. 1-6, 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00245.

VAN-THUOC, D. et al. Polyester production by halophilic and halotolerant bacterial strains obtained from mangrove soil samples located in northern Vietnam. **Microbiology Open**, v.1, n. 4, p. 395-406, 2012. DOI: 10.1002/mbo3.44.

VARADAVENKATESAN, T.; MURTY, V. Production of a lipopeptide biosurfactant by a novel *Bacillus* sp. and its applicability to enhanced oil recovery. **ISRN Microbiology**, v. 2013, p.1-8, 2013. DOI: 10.1155/2013/621519.

VIZCAINO-CASTON, I. et al. Development of a rapid method to isolate polyhydroxyalkanoates from bacteria for screening studies. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.121, n.1, p. 101-104, 2016. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.04.021.
VOET, D.; VOET, J.; PRATT, C. **Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

WAHL, A. et al. PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in *Ralstonia eutropha*. **BMC Microbiology**, v.12, n.1, p. 262-272, 2012. DOI:10.1186/1471-2180-12-262.

WALTER, V.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 672, p. 1-13, 2010. DOI: 10.1007/978-1-4419-5979-9_1.

WANG, B. Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* using sugarbeet juice. **Industrial Crops and Products**, v.43, n.1, p.802– 811, 2013. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.08.011.

WANG, Q.; NOMURA, C. Monitoring differences in gene expression levels and polyhydroxyalkanoate (PHA) production in *Pseudomonas putida* KT2440 grown on different carbon sources. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 653-659, 2010. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2010.08.001.

WANG, Y.; YIN, J.; CHEN, G. Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. **Current Opinion in Biotechnology**, v.30, n.1, p. 59-65, 2014. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.06.001.

WARD, P.; ROO, G.; O'CONNOR, K. accumulation of polyhydroxyalkanoate from styrene and phenylacetic acid by *Pseudomonas putida* CA-3. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n.4, p. 2046–2052, 2005. DOI:10.1128/aem.71.4.2046–2052.2005.

WEBB, H. et al. Plastic degradation and its environmental implications with special reference to poly(ethylene terephthalate). **Polymers**, v.5, n.1, p.1-18, 2013. DOI: 10.3390/polym5010001.

WINSLEY, T. et al. Capturing greater 16S rRNA gene sequence diversity within the domain Bacteria. **Applied of Environmental Microbiology**, v. 78, n. 16, p. 5938-5941, 2012. DOI: 10.1128/AEM.01299-12.

YOUSSEF, N. H. et al. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v.56, n.3, p. 339-347, 2004. DOI: 10.1016/j.mimet.2003.11.001.

YÜKSEKDAĞ, Z.N. Effect of carbon and nitrogen sources and incubation times on poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Bacillus subtilis* 25 and *Bacillus megaterium* 12. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n.1, pp. 63-66, 2004. DOI: 10.5897/AJB2004.000-2011.

ZHANG, H. et al. Production of Polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 1198-1205, 1994.

APÊNDICES

A: Sequência parcial do gene 16S r-DNA do microrganismo BMA-05

LOCUS KU555925 642 bp DNA linear BCT 27-JAN-2016
 DEFINITION *Pseudomonas fluorescens* strain BMA05 16S ribosomal RNA gene,
 partial sequence.
 ACCESSION KU555925
 VERSION KU555925
 KEYWORDS .
 SOURCE *Pseudomonas fluorescens*
 ORGANISM *Pseudomonas fluorescens*
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;
Pseudomonadaceae; Pseudomonas.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 642)
 AUTHORS Silva,A.L., Cruz,H.L. and Lopez,A.M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (19-JAN-2016) Biotechnology and Chemistry Institute,
 LBPMA, Campus A.C. Simoes, Maceio, Alagoas 57072-970, Brazil
 COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..642
 /organism="*Pseudomonas fluorescens*"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="BMA05"
 /isolation_source="Atlantic Forest"
 /db_xref="taxon:294"
 /country="Brazil"
 /collection_date="2012"
 /collected_by="Amanda Lys dos Santos Silva"
 /PCR_primers="fwd_name: 356F, fwd_seq: acwctacgggwggcwgc,
 rev_name: 1064R, rev_seq: aytccacgacgagctgac"
 rRNA <1..>642
 /product="16S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 tccagccatg ccgcgtgtgt gaagaaggtc ttcggattgt aaagcacttt aagttgggag
 61 gaaggggtgt acgttaatac cgtgcaattt tgacgttacc gacagaataa gcaccggcta
 121 actctgtgcc agcagccgcg gtaatacaga ggggtgcaagc gttaatcgga attactgggc
 181 gtaaagcgcg cgtaggtggt tcgttaagtt ggatgtgaaa tccccgggct caacctggga
 241 actgcatcca aaactggcga gctagagtat ggtagagggt ggtggaattt cctgtgtagc
 301 ggtgaaatgc gtagatatag gaaggaacac cagtggcgaa ggcgaccacc tggactgata
 361 ctgacactga ggtgcgaaag cgtgggggagc aaacaggatt agataccctg gtagtccacg
 421 ccgtaaacga tgtcaactag ccgttgggag ccttgagytc ttagtggcgc agctaacgca
 481 ttaagtgac cgctgggga gtacggccgc aaggttaaaa ctcaaatgaa ttgacggggg
 541 cccgcacaag cgggtggagca tgtggtttaa ttcgaagcaa cgcgagaac cttaccaggc
 601 cttgacatgc agagaacttt ccagagatgg attggtgcct tc

B: Sequência parcial do gene 16S r-DNA do microrganismo BMA-10

LOCUS KU555926 631 bp DNA linear BCT 27-JAN-2016
 DEFINITION *Enterobacter aerogenes* strain BMA10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION KU555926
 VERSION KU555926
 KEYWORDS .
 SOURCE *Enterobacter aerogenes* (*Klebsiella mobilis*)
 ORGANISM *Enterobacter aerogenes*
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Enterobacter.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 631)
 AUTHORS Silva,A.L., Cruz,H.L. and Lopez,A.M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (19-JAN-2016) Biotechnology and Chemistry Institute, LBPMA, Campus A.C. Simoes, Maceio, Alagoas 57072-970, Brazil
 COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..631
 /organism="*Enterobacter aerogenes*"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="BMA10"
 /isolation_source="Atlantic Forest"
 /db_xref="taxon:548"
 /country="Brazil"
 /collection_date="2012"
 /collected_by="Amanda Lys dos Santos Silva"
 /PCR_primers="fwd_name: 356F, fwd_seq: acwctacgggwggcwgc, rev_name: 1064R, rev_seq: aycacacgcacgagctgac"
 rRNA <1..>631
 /product="16S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gcagccatgc cgcgtgtatg aagaaggcct tcgggttgta aagtacttc agcgaggagg
 61 aaggcgtyaa ggtaataac ctggygatt gacgttact gcagaagaag caccggctaa
 121 ctccgtgcc aagccgcgg taatacggag ggtgcaagcg ttaacggaa ttactgggcg
 181 taaagcgcac gcaggcggtc tgtcaagtc gatgtgaaat ccccgggctc aacctgggaa
 241 ctgcattcga aactggcagg ctagagtctt gtagaggggg gtagaattcc aggtgtagcg
 301 gtgaaatgcg tagagatctg gaggaatacc ggtggcgaag gcggccccct ggacaaagac
 361 tgacgctcag gtgcgaaagc gtggggagca aacaggatta gataccctgg tagtccacgc
 421 cgtaaacgat gtcgacttgg aggttggtcc ctgaggcgt ggctccgga gtaaacgcgt
 481 taagtcgacc gcctggggag tacggccgca aggttaaac tcaaatgaat tgacgggggc
 541 ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgatgcaac gcgaagaacc ttacctactc
 601 ttgacatcca gagaactag cagagatgct t

C: Sequência parcial do gene 16S r-DNA do microrganismo BMA-13

LOCUS KU555927 602 bp DNA linear BCT 27-JAN-2016
 DEFINITION *Klebsiella oxytoca* strain BMA13 16S ribosomal RNA gene, partial
 sequence.
 ACCESSION KU555927
 VERSION KU555927
 KEYWORDS .
 SOURCE *Klebsiella oxytoca*
 ORGANISM *Klebsiella oxytoca*
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;
Enterobacteriaceae; Klebsiella.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 602)
 AUTHORS Silva,A.L., Cruz,H.L. and Lopez,A.M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (19-JAN-2016) Biotechnology and Chemistry Institute,
 LBPMA, Campus A.C. Simoes, Maceio, Alagoas 57072-970, Brazil
 COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..602
 /organism="*Klebsiella oxytoca*"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="BMA13"
 /isolation_source="Atlantic Forest"
 /db_xref="taxon:571"
 /country="Brazil"
 /collection_date="2012"
 /collected_by="Amanda Lys dos Santos Silva"
 /PCR_primers="fwd_name: 356F, fwd_seq: acwctacgggwggcwgc,
 rev_name: 1064R, rev_seq: ayctcacgacgagctgac"
 rRNA <1..>602
 /product="16S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 tgccgcgtgt atgaagaagg ccttcgggtt gtaaagtaat ttcagcgggg aggaagggag
 61 tgaggtaat aacctyattc attgacgtta cccgcagaag aagcaccggc taactccgtg
 121 ccagcagccg cggtaatagc gaggggtgcaa gcgtaatcg gaattactgg gcgtaaagcg
 181 cagcagggcg gtctgtcaag tcggatgtga aatccccggg ctcaacctgg gaactgcatt
 241 cgaaactggc aggctggagt cttgtagagg ggggtagaat tccaggtgta gcggtgaaat
 301 gcgtagagat ctggaggaat accggtggcg aaggcggccc cctggacaaa gactgacgct
 361 caggtgcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagatcccc tggtagtcca cgctgtaaac
 421 gatgtcact tggaggtgt tccttgagg agtggcttcc ggagctaacg cgtaagtcg
 481 accgctggg gagtacggc gcaaggttaa aactcaatg aattgacggg ggcccgcaca
 541 agcggtaggag catgtggtt aattcgatgc aacgcgaaga accttaccta ctcttgacat
 601 cc

D: Sequência parcial do gene 16S r-DNA do microrganismo BLD-07

LOCUS KU555928 669 bp DNA linear BCT 27-JAN-2016
 DEFINITION *Bacillus pumilus* strain BLD07 16S ribosomal RNA gene, partial
 sequence.

ACCESSION KU555928

VERSION KU555928

KEYWORDS .

SOURCE *Bacillus pumilus*

ORGANISM *Bacillus pumilus*

Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 669)

AUTHORS Silva,A.L., Cruz,H.L. and Lopez,A.M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (19-JAN-2016) Biotechnology and Chemistry Institute,
 LBPMA, Campus A.C. Simoes, Maceio, Alagoas 57072-970, Brazil

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..669

/organism="*Bacillus pumilus*"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="BLD07"

/isolation_source="sludge"

/db_xref="taxon:1408"

/country="Brazil"

/collection_date="2012"

/collected_by="Amanda Lys dos Santos Silva"

/PCR_primers="fwd_name: 356F, fwd_seq: acwcctacgggwggcwgc,
 rev_name: 1064R, rev_seq: ayctcacgrcacgagctgac"

rRNA <1..>669

/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

```

1 caatggacga aagtctgacg gagcaacgcc gcgtgagtga tgaaggttt cggatcgtaa
61 agctctgttg ttagggaaga acaagtgcaa gagtaactgc ttgcacctg acggtaccta
121 accagaaagc cacggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt
181 tgtccggaat tattgggcgt aaagggctcg caggcgggtt cttaagtctg atgtgaaagc
241 ccccggtcga accggggagg gtcattggaa actgggaaac ttgagtgcag aagaggagag
301 tggaattcca cgtgtagcgg tgaaatgcgt agagatgtgg aggaacacca gtggcgaaag
361 cgactctctg gtctgtaact gacgtgagg agcgaaagcg tggggagcga acaggattag
421 atacctggt agtcacgcc gtaaacgatg agtgctaagt gttagggggt ttccgccctt
481 tagtgctgca gtaacgcat taagcactcc gcctggggag tacggtcgca agactgaaac
541 tcaaaggaat tgacgggggc ccgcmcaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac
601 gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatcct ytgacaacc tagagatagg gctttccctt
661 cggggacag
```

ANEXOS

A: Laudo da microscopia eletrônica de transmissão



INSTITUTO BIOLÓGICO
Laboratório de Microscopia Eletrônica

PABX: (11)5087-1700
Laboratório de Microscopia Eletrônica: (11) 5087-1750
www.biológico.sp.gov.br
Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252
Vila Mariana - São Paulo/SP

Relatório de ensaio nº: **LMESA-1859/15**

Identificação do cliente:

Triagem nº: 1859/15

Proprietário: AMANDA LYS DOS SANTOS SILVA

Propriedade: LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA DO PARASITISMO E MICROBIOLOGIA AMBIENTAL

Endereço: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS, AV. LOURIVAL DE MELO MOTA, S/nº – CAMPUS A.C. SIMÕES, CIDADE UNIVERSITÁRIA, MACEIÓ, AL, CEP: 057072-970

Requisitante: DRA. AMANDA LYS DOS SANTOS SILVA - TEL.: (82) 3214.1925/99999.3072–E-MAIL: bio.amandalys@hotmail.com

Identificação do procedimento:

Exame Solicitado: Técnica de Inclusão em Resina

Método Utilizado: Técnica de Inclusão em Resina

Espécie: -

Tipo de amostra: Cultivo Celular

Quantidade: 08

Data de entrada no laboratório:

14/08/2015

Data da realização do exame: 17/09/2015

Ordem	ID Amostra*	ID Amostra no LME	Resultado
1	Cultivo Celular de <i>Bacillus pumilus</i> NS	LME-340/15	Nos cortes ultrafinos de 70 nm de espessura, foram observadas partículas de <i>Bacillus pumilus</i> , medindo entre 1000 e 1700 nm arredondadas ou alongadas, contendo grânulos eletrólucos.
2	Cultivo Celular de <i>Pseudomonas fluorescens</i> SA	LME-341/15	Nos cortes ultrafinos de 70 nm de espessura, foram observadas partículas de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , arredondadas ou alongadas, medindo entre 450 e 1700 nm, contendo grânulos eletrólucos.
3	Cultivo Celular de <i>Pseudomonas fluorescens</i> NS	LME-342/15	Nos cortes ultrafinos de 70 nm de espessura, foram observadas partículas de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , medindo entre 450 e 1700 nm, arredondadas ou alongadas, contendo grânulos eletrólucos.
4	Cultivo Celular de <i>Enterobacter aerogenes</i> SA	LME-343/15	Nos cortes ultrafinos de 70 nm de espessura, foram observadas partículas de <i>Enterobacter aerogenes</i> , medindo entre 650 e 1500 nm, arredondadas ou alongadas, sem presença de grânulos eletrólucos.
5	Cultivo Celular de <i>Enterobacter aerogenes</i> CA	LME-344/15	Nos cortes ultrafinos de 70 nm de espessura, foram observadas partículas de <i>Enterobacter aerogenes</i> , medindo entre 650 e 1500 nm, arredondadas ou alongadas, contendo grânulos eletrólucos.
6	Cultivo Celular de <i>Klebsiella oxytoca</i> SA	LME-345/15	Nos cortes ultrafinos de 70 nm de espessura, foram observadas partículas de <i>Klebsiella oxytoca</i> , medindo entre 400 e 1500 nm, arredondadas ou alongadas, sem presença de grânulos eletrólucos.
7	Cultivo Celular de <i>Klebsiella oxytoca</i> EC	LME-346/15	Nos cortes ultrafinos de 70 nm de espessura, foram observadas partículas de <i>Klebsiella oxytoca</i> , medindo entre 400 e 1500 nm, arredondadas ou alongadas, contendo grânulos eletrólucos.
8	Cultivo Celular de <i>Bacillus pumilus</i> SA	LME-347/15	Nos cortes ultrafinos de 70 nm de espessura, foi observada a presença de partículas de <i>Bacillus pumilus</i> , arredondadas ou ovaladas, medindo entre 1000 e 1700 nm, sem presença de grânulos eletrólucos.

*Id. Amostra = identificação do animal conforme o formulário de requisição

Reproduções parciais deste documento só tem validade se forem autorizadas por escrito pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME-REG-04 rev. 01 de 23/04/15)

Página 1 de 2



INSTITUTO BIOLÓGICO
Laboratório de Microscopia Eletrônica

PABX: (11)5087-1700
Laboratório de Microscopia Eletrônica: (11) 5087-1750
www.biológico.sp.gov.br
Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252
Vila Mariana - São Paulo/SP

Relatório de ensaio n°: **LMESA-1859/15**

Triagem n°: 1859/15

Identificação do cliente:

Proprietário: AMANDA LYS DOS SANTOS SILVA
Propriedade: LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA DO PARASITISMO E MICROBIOLOGIA AMBIENTAL
Endereço: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS, AV. LOURIVAL DE MELO MOTA, S/n° – CAMPUS A.C. SIMÕES, CIDADE UNIVERSITÁRIA, MACEIÓ, AL, CEP: 057072-970
Requisitante: DRA. AMANDA LYS DOS SANTOS SILVA - TEL.: (82) 3214.1925/99999.3072 – E-MAIL: bio.amandalys@hotmail.com

OBS: Os resultados se referem somente aos itens ensaiados acima.

Observações: NA

São Paulo, 17 de setembro de 2015

MHB

Marcia Helena Braga Catroxo
CRBio 18001/01-D
Responsável Técnico
Instituto Biológico

B: Carta de aceite para publicação na revista Química Nova

from: onbehalfof+qnova.editores+gmail.com@manuscriptcentral.com

reply-to: qnova.editores@gmail.com

to: bio.amandalys@gmail.com

date: Thu, Mar 10, 2016 at 3:26 PM

subject: Química Nova - Decision on Manuscript ID QN-2015-0762.R1

mailed-by: manuscriptcentral.com

10-Mar-2016

Dear Ms. Silva:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "SELEÇÃO POLIFÁSICA DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE POLIHIDROXIALCANOATOS" in its current form for publication in the Química Nova. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Due to funding issues, Química Nova will be printed in black and white from March 2015 onwards. If the authors want to make any changes to the manuscript figures and its captions to avoid loss of information when printed, please contact us. The online version of Química Nova will remain available in color.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Química Nova, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Dr. Editores QN
Associate Editor, Química Nova
qnova.editores@gmail.com

Entire Scoresheet:
Reviewer: 1

Recommendation: Accept

Comments:
(There are no comments.)

Additional Questions:

Does the manuscript contain new and significant information to justify publication?: Yes

Does the Abstract (Summary) clearly and accurately describe the content of the article?: Yes

Is the problem significant and concisely stated?: Yes

Are the methods described comprehensively?: Yes

Are the interpretations and conclusions justified by the results?: Yes

Is adequate reference made to other work in the field?: Yes

Length of article is: Adequate

Number of tables is: Adequate

Number of figures is: Adequate

Please state any conflict(s) of interest that you have in relation to the review of this paper (state "none" if this is not applicable).: O artigo está adequado para publicação.

Rating:

Interest: 2. Good

Quality: 2. Good

Originality: 2. Good

Overall: 2. Good