

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E ENSINO PROFISSIONAL
COORDENAÇÃO DO CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

CRISLAINE VIEIRA FARAGO

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS
PRODUTORES DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PONTA GROSSA
2015

CRISLAINE VIEIRA FARAGO

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS
PRODUTORES DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Diplomação, do Curso Superior de Tecnologia de Alimentos Coordenação do Curso Superior de Tecnologia de Alimentos – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Denise Milleo Almeida

**PONTA GROSSA
2015**

TERMO DE APROVAÇÃO
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS
PRODUTORES DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)

por

CRISLAINE VIEIRA FARAGO

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 18 de novembro de 2015 o como requisito parcial para a obtenção do título Tecnólogo em Alimentos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof.^a Dr.^a Denise Milléo Almeida

Orientadora

Prof.^a Dr.^a Giovana de Arruda Moura Pietrowski

Membro titular

Prof.^a Dr.^a Maria Carolina de Oliveira Ribeiro

Membro titular

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Curso

AGRADECIMENTO

A minha gratidão em primeiro lugar a Deus, por me mostrar que a fé e a perseverança nos nossos objetivos são necessárias para a concretização dos mesmos.

Agradeço imensamente a minha Professora e orientadora Denise Milléo Almeida, pela confiança depositada, pela chance de participar do projeto de Iniciação Científica que resultou no presente trabalho, pela paciência, dedicação e pelo conhecimento compartilhado.

Um agradecimento especial a professora Juliana V. M. Bittencourt, por me auxiliar na caracterização molecular dos micro-organismos isolados. Agradeço também as suas orientandas do mestrado Franciele e Cláudia, por se disponibilizarem e realizarem as análises comigo.

Aos amigos que conquistei durante os experimentos no laboratório de microbiologia Ana Letícia, Andréia, Bianca, Luciane, Matheus, Monique e Murilo, pelo carinho e conversas que sempre resultaram em risos e aprendizagem. Em especial a Fran Bonfim que foi uma amiga e companheira na realização desse trabalho.

A professora Giovana, que teve paciência em esclarecer-me dúvidas sobre as análises, e pelo conhecimento transmitido sobre microbiologia.

Agradeço ao professor Luís da UEPG, pela ajuda na análise de FTIR.

À PROGRAD pela concessão da bolsa de Apoio à execução de Trabalhos de Conclusão de Cursos.

Gostaria de agradecer aos meus pais e a minha família, que a todo momento deram-me carinho, incentivaram-me e acreditaram na conclusão de mais uma etapa da minha vida.

Obrigada, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização desse projeto e para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

RESUMO

FARAGO, Crislaine Vieira. **Isolamento e caracterização de micro-organismos produtores de polihidroxicanoatos (PHA)**. 2015. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso Tecnologia em Alimentos - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2015.

Os Polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres biodegradáveis de origem microbiana, composto por monômeros de ácidos hidroxialcanóicos e/ou hidroxialcenóicos. São sintetizados e acumulados como grânulos intracelulares em células bacterianas na presença de excesso de fonte de carbono e limitação de nutrientes, tendo como função à reserva de carbono e energia para o micro-organismo. Entre os principais fatores que interferem a viabilidade econômica de produção de PHAs está a seleção de linhagens, que sejam eficientes na conversão de substratos no biopolímero, com produção acima de 40% da massa seca celular em meio de cultivo de baixo custo. Considerando estes aspectos o objetivo deste trabalho foi isolar, selecionar, identificar e caracterizar micro-organismos produtores de biopolímeros da família dos polihidroxicanoatos (PHAs) a partir de ambientes contaminados com hidrocarbonetos. Foram coletadas amostras de solo de água contaminada com hidrocarbonetos, das regiões do porto de Itapoá-SC, Morretes - PR, Antonina - PR, Vila da Glória - SC e da areia da praia do Futuro em Fortaleza - CE. Foram aplicadas técnicas de isolamento em Meio Salino Mineral sem limitação. A seleção dos micro-organismos com potencial para produção de PHA, ocorreu após semeadura em Meio Salino Mineral com limitação adicionado do corante Vermelho Nilo, seguido de inspeção das colônias em um transiluminador. A extração do PHA celular ocorreu com auxílio de hipoclorito de sódio, acetona e álcool. Os micro-organismos foram caracterizados quanto a morfologia, motilidade, produção do esporo, coloração de Gram, crescimento em anaerobiose, teste de oxidase, catalase, citocromo oxidase, citrato, produção de ácidos a partir de açúcares (glicose, frutose, manitol e xilose), nitrato e hidrólise do amido, gelatina, caseína e ureia. A identificação dos micro-organismos foi por métodos moleculares. Foram isolados 32 colônias e selecionados 4 micro-organismos com potencial para produção de PHA, sendo identificados 2 gêneros, a *Sphingomonas sp.* e *Arthrobacter sp.*. O perfil bioquímico do gênero *Sphingomonas sp.*, com maior produção de PHA (32,8%) apresentou características Gram negativa, catalase positiva, oxidase negativa, motilidade em meio semi-sólido, negativo para produção de esporos, fermenta a frutose, não há fermentação da glicose (não produz butilenoglicol), manitol e xilose, utiliza o citrato, possui capacidade fermentativa tipo ácido misto, hidrolisa a caseína e a uréia, mas não hidrolisa o amido e a gelatina, cresce em anaerobiose a 20°C e faz redução do nitrato. A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) do biomaterial extraído do micro-organismo *Sphingomonas sp.*, mostrou bandas características da presença de P(3HB). No entanto, há necessidade de otimizar o meio de cultivo com intuito de estimular a produção do biopolímero.

Palavras- chave: Biopolímero P(3HB). Perfil bioquímico. Identificação molecular. *Sphingomonas sp.*. *Arthrobacter sp.*

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates are biodegradable polyesters from microbial origin composed of monomers of hydroxyalkanoic acids and/or hydroxyalkenoic ones. They are synthesized intracellularly and deposited as granules in bacterial cultures in the presence of carbon source in excess and a limiting nutrient growth, whose function is to stock carbon and energy for microorganisms. Among the main factors that affect economic viability of PHA production is the selection of bacterial strains that are efficient in the conversion of substrates into the biopolymer, with production above 40% of the dry cell weight in the low-cost medium growth. Through these considerations, the objective of this work was to isolate, select, identify and characterize new microorganisms' strains with potential polyhydroxyalkanoates (PHA) production from hydrocarbon contaminated environments. Samples of soil and water were collected (all contaminated with hydrocarbons) in the regions of Port of Itapóá-SC, Morretes – PR, Antonina - PR, Vila da Glória - SC and of the sand of Future Beach in Fortaleza – CE. Insulation techniques have been applied to the surface of pure colonies, in Medium Mineral Saline without limitation. The selection of microorganisms with PHA production capacity occurred after the sowing in Medium Mineral Saline with limited addition of Nile Red, following the inspection of bacterial colonies in the transilluminator. The cell extraction of the PHA occurred with the aid of sodium hypochlorite, acetone and alcohol. The microorganisms were characterized by its morphology, motility, spore production, Gram stain, growing in anaerobiosis, oxidase test, catalase, cytochrome oxidase, citrate, acetoin, acid production from sugars (glycose, fructose, mannitol, maltose and xylose), nitrate and starch hydrolysis, gelatin, casein and urea. The identification of microorganisms was by molecular methods. There were 32 isolated colonies and 4 selected microorganisms with PHA production capacity, two genders were identified, the *Sphingomonas sp.* and *Arthrobacter sp.*. The biochemical characteristics of the *Sphingomonas sp.*, with the largest PHA production (32,8%), are: gram-negative, motility in semi-solid medium, negative for spore production, fructose fermentation, glucose mannitol and xylose does not ferment (does not produce butylene glycol), citrate use, fermentation of a mixed acid type, hydrolysis of casein and urea, but does not hydrolyse starch and gelatin. It also grows anaerobically at 20 ° C and does reduce nitrate. The analysis in Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) of the biomaterial extracted from the microorganism *Sphingomonas sp.*, showed in its characteristics, bands of the presence of P(3HB). However, there is need to optimize the cultivation media with the aim to stimulate biopolymer production.

Key-words: Biopolymer P(3HB). Biochemical characteristics. Molecular identification. *Arthrobacter*, *Sphingomonas*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Fluorescência das colônias puras obtida com auxílio do corante Vermelho Nilo no meio de cultivo.....	22
Quadro 1 - Características morfológicas das colônias de micro-organismos com potencial para produção de polihidroxialcanoatos, em placas de Petri.....	24
Quadro 2 - Características de crescimento micro-organismos com potencial para produção de polihidroxialcanoatos, em tubos de ensaio com ágar inclinado.....	24
Quadro 3 - Crescimento de micro-organismos com potencial para produção de polihidroxialcanoatos, em caldo Nutriente.....	25
Quadro 4 - Perfil bioquímicos dos micro-organismos com potencial para produção de polihidroxialcanoatos.....	29
Figura 2 – Presença de DNA dos micro-organismos A, B, C e D em duplicata.....	30
Figura 3 – Produtos da amplificação por PCR (micro-organismos C, B e D).....	31
Figura 4 – Produtos da amplificação por PCR (micro-organismos B e A).....	32
Figura 5 – Produtos da PCR enviados para sequenciamento.....	33
Figura 6 - Espectro de FTIR de PHA produzido por <i>Sphingomonas sp.</i>	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Solução dos elementos traços utilizados em caldo Meio Salino Mineral com e sem limitação.....	13
Tabela 2 – Concentração da biomassa e PHA extraído.....	23
Tabela 3 - Identificação dos isolados por comparação das sequências no banco de dados BLAST.....	34
Tabela 4 - Relação das principais bandas do biopolímero de PHA produzido por <i>Sphingomonas sp</i> , em comparação com literatura.....	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1 ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE PHA	12
2.2 SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE PHA	12
2.3 PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE PHA.....	13
2.4 CARACTERIZAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE PHA.....	14
2.4.1 Morfologia.....	14
2.4.2 Coloração de Gram.....	15
2.4.3 Produção de catalase.....	16
2.4.4 Teste de Oxidase.....	16
2.4.5 Análise da Motilidade.....	16
2.4.6 Produção de Esporo	16
2.4.7 Fermentação da Glicose, Frutose, Manitol e Xilose.....	17
2.4.8 Utilização de Citrato.....	17
2.4.9 Teste de Voges- Proskauer e do Vermelho de Metila	17
2.4.10 Hidrólise do Amido	18
2.4.11 Hidrólise da Caseína.....	18
2.4.12 Teste da Urease.....	18
2.4.13 Hidrólise da Gelatina.....	19
2.4.14 Crescimento em Anaerobiose a 20 °C e 50 °C	19
2.4.15 Redução de Nitrato	19
2.5 IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE PHAS, POR ANÁLISE MOLECULAR	20
2.5.1 Extração de DNA.....	20
2.5.2 Amplificação por PCR.....	21
2.5.3 Sequenciamento do DNA	21
2.6 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) DO PHA.....	22
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	22

3.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE PHA	22
3.2 PRODUÇÃO DE PHA	24
3.4 CARACTERIZAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE PHA	24
3.4.1 Características Morfológicas dos Micro-Organismos com Potencial de Produção de PHA.	24
3.5 IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE PHAS, POR BIOLOGIA MOLECULAR	30
3.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) DO PHA	35
4. CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

Polihidroxialcanoatos (PHAs) são biomateriais compostos por monômeros de ácidos hidroxialcanóicos e/ou hidroxialcenóicos, formando poliésteres de cadeia alifática. Os micro-organismos capazes de produzir PHAs são procariontes e o acúmulo deste biomaterial ocorre em condições desfavoráveis de crescimento celular, ou seja, como a limitação de um nutriente essencial (N, P, S) e excesso de fonte de carbono, onde são produzidos na forma de grânulos intracelulares (chegando a 80% de sua massa seca celular), tendo como função à reserva de carbono e energia (CARMINATTI et al., 2008).

Entre os micro-organismos produtores de PHA estão *Cupriavidus necator* (Figueiredo et al. 2014), *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Methylobacterium organophilum*, *Protomonas oleovorans*, *Escherichia coli* recombinante, *Klebsiella aerogenes* recombinante (CHOI e LEE, 1999),

Dependendo do tipo de micro-organismo ou substrato utilizado no processo fermentativo pode haver uma variação na estrutura do PHA, principalmente no radical “R”. As propriedades físicas do polímero podem ser alteradas pela mudança de um simples metil, das estruturas funcionais contendo ligações insaturadas, duplas ou triplas, halogênios ou grupos benzil, cianida e epóxi, assim como o grau de polimerização (PAULA, 2012). Como pode ser visto na figura 1.

O interesse biotecnológico e industrial destes biopolímeros está associado as propriedades termoplásticas e/ou elastômeros, biodegradáveis, biocompatíveis e a possibilidade de serem sintetizados a partir de matérias-primas de fontes renováveis, com potencial para a substituição dos polímeros derivados do petróleo (PEREIRA, 2013). Para a produção de embalagens alimentícias os biopolímeros são considerados como uma forma sustentável. Segundo Forlin et al. (2002) a reciclagem de embalagens pós-consumo possuem um elevado nível de contaminação, tendo as mesmas um baixo nível de reciclabilidade e alto impacto sanitário-ambiental.

Os custos de produção de PHAs estão diretamente relacionados à seleção do micro-organismo e do substrato utilizado no processo fermentativo. As cepas produtoras de PHAs devem ter alta velocidade específica de crescimento e de produção em relação à

massa total seca e, ainda, elevado fator de conversão de substrato em PHAs (MARANGONI, 2000).

Existem várias espécies bacterianas produtoras de PHA, contudo ainda há necessidade de pesquisas que busquem novos gêneros e espécies produtoras com maior produtividade e utilização de substrato alternativo e otimizado. A busca por fontes biológicas com características que podem ter valor para o desenvolvimento comercial, tem grande potencial. Segundo SELEGHIM (2006) dados sobre a diversidade microbiana brasileira são escassos ou até mesmo inexistentes. O Brasil apresenta um dos mais elevados índices de biodiversidade vegetal e animal, tornando o país um potencial da diversidade microbiana.

Krueger (2009) estudou 72 linhagens de bactérias do gênero *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Geobacillus* de 21 espécies diferentes capazes de produzir PHA. Paula (2012) em seu trabalho avaliou 107 linhagens de micro-organismos capazes de produzir PHAs utilizando glicerol em meios de cultivo, sendo isolados do solo da Floresta Ombrofila Densa (Mata Atlântica) e do Mangue. Pereira (2013) isolou e identificou do solo da rizosfera e ao aderido à superfície do inhame, macaxeira, batata-doce, bactérias potencialmente produtoras de PHAs dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Cupriavidus* e *Microvirgaflocculans*.

Segundo Choi e Lee (1999) entre os principais fatores que interferem a viabilidade econômica de produção de PHAs está a seleção de linhagens que sejam eficientes na conversão de substratos no biopolímero. Selecionar novas linhagens visa buscar novos tipos biopolímeros (PHAs) e/ou produção acima de 40% da massa seca celular em meio de cultivo de baixo custo.

Considerando estes aspectos, o objetivo desse trabalho foi isolar, selecionar, identificar e caracterizar micro-organismos produtores de biopolímeros da família dos polihidroxicanoatos (PHAs) a partir de ambientes contaminados com hidrocarbonetos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE PHA

Foram coletadas 1Kg de amostras de solo e água contaminado com hidrocarbonetos em nove pontos diferentes, localizados nas regiões do Porto de Itapoá-SC (lat. - 26°1'14'', long. - 48°60'62''), Morretes - PR (lat. - 25°47'56'', long. - 48°83'59''), Antonina - PR (lat. - 25°43'25'', long. - 48°72'28'') Vila da Glória - SC (lat. - 25°42'78'', long. - 49°28'66'') e na areia da praia do Futuro em Fortaleza - CE.

Foram pesadas 25g de cada amostra em saco stomacker estéril e adicionado 225mL de água peptonada 0,1% e homogeneizado, obtendo a diluição 10^{-1} . Foi coletado 1 mL desta diluição e transferido para tubo de ensaio com 9 mL do mesmo diluente, obtendo a diluição 10^{-2} , seguido de sucessivas diluições até 10^{-10} . De cada diluição foi transferido 0,1 mL em placas de Petri contendo meio de cultivo Plate Count Ágar (PCA), semeadas em superfície com alça de Drigaski e incubadas a 30°C por 48 horas. Após o tempo de incubação, foram transferidas as diferentes colônias para tubos de ensaio com 9 mL de Caldo Nutriente e incubados a 30°C por 24 horas. Este processo foi repetido até a obtenção de colônias puras.

2.2 SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE PHA

Cada colônia pura foi inoculada em tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo Luria Bertani (LB) (10gL^{-1} de triptona, 5gL^{-1} de extrato de levedura e 10gL^{-1} de NaCl) e incubada a 37°C por 24 horas.

Foi transferido 5 mL do meio LB para o caldo Meio Salino Mineral (MSM) sem limitação (Ramsay, et. al, 1990) ($6,7\text{ gL}^{-1}$ de fosfato dissódico de potássio, $1,5\text{ gL}^{-1}$ de fosfato monobásico de potássio, 1 gL^{-1} de sulfato de amônio, $0,2\text{ gL}^{-1}$ de sulfato de magnésio, $0,01\text{ gL}^{-1}$ de cloreto de cálcio, $0,06\text{ gL}^{-1}$ de citrato de amônio ferroso, 5 gL^{-1} de glicose e 1 mL de elementos traços (Tabela 1), sendo incubado a 30°C por 48 horas.

Decorrido o tempo, 5mL do caldo MSM sem limitação e foram transferidos para o meio MSM sólido com limitação ($2,5\text{ gL}^{-1}$ de fosfato ácido de sódio heptahidratado, $0,83$

g L^{-1} de fosfato monobásico de potássio, 1 g L^{-1} de sulfato de amônio, $0,2 \text{ g L}^{-1}$ de sulfato de magnésio, $0,01 \text{ g L}^{-1}$ de cloreto de cálcio, $0,06 \text{ g L}^{-1}$ de citrato de amônio ferroso, 5 g L^{-1} de glicose, 20 g L^{-1} de ágar-ágar, 1 mL de elementos traços (Tabela 1), sendo acrescentado ao meio $0,03 \text{ mL L}^{-1}$ da solução do corante Vermelho Nilo com o dimetilsulfóxido (DMSO) ($0,0005 \text{ g}$ de corante vermelho Nilo dissolvido em 1 mL da solução de dimetilsulfóxido (DMSO) (25 g de DMSO e 100 mL de acetona) e incubados a 30°C por 5 dias (Wu et al., 2003)

Após o período de incubação, as colônias foram inspecionadas através da exposição direta à luz ultravioleta em transiluminador (L-Pix, Loccus Biotecnologia – Molecular Imaging) a um comprimento de onda de 312 nm. As colônias com presença de fluorescência foram identificadas como potenciais produtores de PHA.

Tabela 1 – Solução dos elementos traços utilizados em caldo Meio Salino Mineral com e sem limitação.

Elementos Traços (g L^{-1})	
H_3BO_3	0,30
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,20
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,10
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$	0,03
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,03
$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,02
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,01

Fonte: adaptado, Ramsay (1990).

2.3 PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE PHA

As colônias que apresentaram fluorescência sob exposição direta à luz ultravioleta (312 nm) foram inoculadas em caldo MSM com limitação e incubadas a 30°C por 96 horas. Na sequência, o caldo foi centrifugado (Excelsa 4, modelo 280-R, Fanem) a 3400 rpm por 30 minutos para retirada da biomassa.

A extração do PHA foi realizada segundo o método adaptado de Figueiredo et al., (2014). Foi pesado 1g de biomassa e adicionado 1 mL de hipoclorito de sódio, incubado a 37°C por 1 hora. Após, foi adicionado 1 mL de acetona e novamente incubado por mais 1 hora. Decorrido o tempo, a amostra foi centrifugada a 5000 rpm durante 15 minutos. Após a centrifugação, o pellet (provável PHA) foi lavado três vezes com álcool e água destilada (1:1), seguido de filtragem com papel filtro e secagem a 40°C por 2 horas. O cálculo da produção de PHA foi obtido pela diferença do peso do filtro final em relação ao inicial.

2.4 CARACTERIZAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE PHA

Os micro-organismos selecionados como produtores de PHA foram caracterizados segundo metodologias descritas por Silva (1996), Molinario (2009) e Silva et. al (2010) como morfologia, coloração de Gram, produção de catalase, teste de oxidase, análise de motilidade, produção de esporo, fermentação da glicose, frutose, manitol e xilose, utilização de citrato, teste de Vermelho Metila, teste de Voges-Proskauer, hidrólise do amido, caseína, urease e gelatina, crescimento em anaerobiose a 20°C e 50° C e redução do nitrato.

2.4.1 Morfologia

O micro-organismo presente no caldo Meio Salino Mineral (MSM) sem limitação foi inoculado por estriamento descontínuo em placas de Petri contendo Plate Count Ágar (PCA) e incubadas a 37°C por 48 horas. As colônias isoladas foram observadas em contador de colônia (Phoenix, CP 600 plus) e analisadas quanto ao tamanho (grande – 5mm, média – 2 a 5mm e pequena – 2mm), forma (circular, irregular, rizoide, filamentosa ou puntiforme), elevação (côncava, elevada, ondulada, protuberante, achatada ou convexa) bordos (lisos, lacerados, lobados, filamentosos ou ondulados), estrutura (lisa, granulosa, filamentosa ou rugosa), brilho (transparente, translúcida ou opaca) cor (incolor, branca ou pigmentada).

O micro-organismo presente no caldo Meio Salino Mineral (MSM) sem limitação foi inoculado por estriamento contínuo em tubos de ensaio contendo Plate Count Ágar (PCA) inclinado, com bisel longo, sendo incubados a 37°C por 48 horas. O crescimento do micro-organismo foi analisado quanto à forma (difusa, espalhada ou equinulado), quantidade (escasso, abundante ou moderado), brilho (brilhante e sem brilho), cor (colorido ou sem cor).

O micro-organismo presente no caldo Meio Salino Mineral (MSM) sem limitação também foi inoculado em caldo Nutriente e incubados a 37°C por 48 horas. Em caldo Nutriente o crescimento foi observado quanto ao aspecto (turvo ou não turvo), sedimento (com ou sem sedimento), tipo de sedimento (granulado, feculento ou mucoide), película (com ou sem película na superfície), tipo da película (resistente, frágil, lisa, rugosa, aderente as paredes do tubo) e com ou sem anel nas paredes do tubo (MADIGAN et al., 2010).

2.4.2 Coloração de Gram

O micro-organismo presente no caldo Meio Salino Mineral (MSM) sem limitação foi inoculado por estriamento descontínuo em placas de Petri contendo Plate Count Ágar (PCA) e incubadas a 37°C por 48 horas

A partir das colônias isoladas foi realizado um esfregaço, fixação e coloração com cristal violeta por 3 minutos. Depois que o corante foi escorrido houve a adição de Lugol por 1 minuto. Escorrido o Lugol, a lâmina foi lavada com água deionizada e adicionada de álcool-acetona por 10 segundos. Na sequência, a lâmina foi lavada com água deionizada e adicionada Fucsina por 30 segundos e, novamente lavada com água deionizada. Após seca, a lâmina foi observada em microscópio óptico com objetiva de imersão. Micro-organismos Gram positivos apresentam coloração roxa e Gram negativos são vermelhos (SILVA, et al., 2010).

2.4.3 Produção de catalase

O micro-organismo presente no caldo Meio Salino Mineral (MSM) sem limitação foi inoculado por estriamento descontínuo em placas de Petri contendo Plate Count Ágar (PCA) e incubadas a 37°C por 48 horas. Na sequência, foi transferida uma colônia pura em lâmina de vidro e adicionado 1,0 mL de peróxido de hidrogênio 3%. O resultado positivo mostra borbulhamento imediato e o resultado negativo não apresenta borbulhamento (SILVA, et al., 2010).

2.4.4 Teste de Oxidase

Foram utilizadas tiras de oxidase (Laborclin) sendo formado por papel absorvente impregnadas com p-fenilenodiamina, acondicionadas em frasco escuro e opaco contendo agente dessecante. A tira foi colocada sobre uma lâmina de vidro onde foi transferida uma colônia pura e mantida por 2 minutos. O resultado positivo mostra o desenvolvimento de uma coloração violeta e resultado negativo não há alteração de cor (SILVA, et al., 2010).

2.4.5 Análise da Motilidade

O micro-organismo presente no caldo Meio Salino Mineral (MSM) sem limitação foi inoculado em tubo de ensaio com Agar Motilidade, por picada no centro do meio até a profundidade de 1 cm e incubados a 30°C por 24 horas. O resultado positivo mostra o crescimento fora da linha de inoculação e o negativo se restringe a linha da picada (MADIGAN, 2010).

2.4.6 Produção de Esporo

Foi preparado um esfregaço em lâmina de vidro com os micro-organismos presentes no caldo Meio Salino Mineral (MSM) sem limitação, fixadas e cobertas com uma solução aquosa de verde malaquita 5%, seguido de aquecimento até o desprendimento de vapor. A lâmina foi lavada com água deionizada e corada com safranina 1% por 30

segundos, seguido de secagem natural. As lâminas foram observadas ao microscópio óptico com objetiva de imersão (MOLINARIO, 2009).

2.4.7 Fermentação da Glicose, Frutose, Manitol e Xilose

O micro-organismo presente no caldo Meio Salino Mineral (MSM) sem limitação foi inoculado em tubos de ensaio com Ágar Vermelho de Fenol suplementado com o carboidrato testados, como glicose, frutose, manitol e xilose, sendo incubados a 35°C por 48 horas. O resultado positivo mostra a viragem ácida do indicador da cor de vermelho alaranjado para amarelo e o negativo há a viragem alcalina para a cor rosa escura (SILVA, 1996).

2.4.8 Utilização de Citrato

O micro-organismo presente no caldo Meio Salino Mineral (MSM) sem limitação foi inoculado em tubos de ensaio com Ágar Citrato de Simmons, em forma de bisel longo, e incubado a 35°C por 48 horas. O resultado positivo mostra o crescimento na rampa do meio de cultivo com viragem alcalina, com alteração da cor verde para azul e o negativo sem crescimento e sem alteração de cor (SILVA, 1996).

2. 4.9 Teste de Voges- Proskauer e do Vermelho de Metila

O micro-organismo presente no caldo Meio Salino Mineral (MSM) sem limitação foi inoculado com uma alçada leve em tubos de ensaio com Caldo Vermelho de Metila e Voges-Proskauer (VM-VP) e incubados a 35°C por 48 horas, com tampas levemente desrosqueadas.

Para teste de Voges Proskauer (VP) foi adicionado 2,5 mL da cultura, 6 gotas de solução alcoólica de 5% de α -naftol e 2 gotas de solução 40% de hidróxido de potássio, sendo o tubo agitado por 30 segundos a 1 minuto, para introduzir oxigênio atmosférico e promover a oxidação da acetoína. O resultado positivo, após 15 minutos, há o aparecimento

de cor vermelha ou rosa escuro na superfície do meio e a permanência da cor amarela indica resultado negativo.

O teste de Vermelho de Metila foi realizado após 96 horas de incubação, sendo adicionado 2,5 mL da cultura e 5 gotas de solução vermelho de metila. O resultado positivo mostra alteração do meio para a cor vermelha e o resultado negativo há permanência da cor amarela. O surgimento de uma cor alaranjada indica reação lenta (SILVA, 1996).

2.4.10 Hidrólise do Amido

O micro-organismo presente no caldo Meio Salino Mineral (MSM) sem limitação foi inoculado por picada, com auxílio de palitos estéreis, em placas de Petri contendo o Meio Ágar Amido adicionado de 1% de Iodo e 2% de Iodeto de potássio, sendo incubadas a 37°C por 48 horas. O resultado positivo mostra a hidrólise do amido pela formação de halo transparente ao redor da colônia e o resultado negativo não há formação de halo (SILVA, 2010).

2.4.11 Hidrólise da Caseína

O micro-organismo presente no caldo Meio Salino Mineral (MSM) sem limitação foi inoculado por picada, com auxílio de alça de platina, em meio Ágar Leite (90 mL de ágar nutriente e 10 mL de solução de leite desnatado [2 g de leite desnatado em 10 mL de água destilada]), sendo incubadas a 35°C por 48 horas. O resultado positivo há o desaparecimento do aspecto turvo do ágar, ficando uma zona mais límpida com o crescimento do micro-organismo. No resultado negativo não há hidrólise, o ágar se mantém turvo (MALAJOVICH, 2015).

2.4.12 Teste da Urease

O micro-organismo presente no caldo Meio Salino Mineral (MSM) sem limitação foi inoculado com uma alçada em tubo de ensaio com caldo uréia de Christensen, sendo incubados a 37 °C por 24 horas. O resultado positivo mostra a viragem alcalina do

indicador, com alteração da cor do meio de alaranjado para cor rosa escuro, o que indica que o micro-organismo produz a enzima urease, responsável pela decomposição da uréia em amônia. No resultado negativo há permanência da cor original (SILVA, 2010).

2.4.13 Hidrólise da Gelatina

O micro-organismo presente no caldo Meio Salino Mineral (MSM) sem limitação foi inoculado por picada, com auxílio de palitos estéreis, em tubos de ensaio com Ágar-Ágar a 12%, até a profundidade de 1 cm e incubados a 37°C por 24 horas. Após incubação foram retirados e colocados em banho de gelo por 10 minutos. O resultado positivo mostra a liquefação do meio de cultura e no resultado negativo o meio se mantém sólido (MADIGAN et al., 2010).

2.4.14 Crescimento em Anaerobiose a 20 °C e 50 °C

Foi inoculado 1 mL do micro-organismo presente no caldo Meio Salino Mineral (MSM) sem limitação em placas de Petri contendo Plate Count Ágar (PCA) com sobrecamanda, por Pour Plate e incubados em jarra de anaerobiose a 20°C ou 50° C conforme a análise, por 24 horas. Para promover a atmosfera de anaerobiose foi colocado dentro da jarra um béquer com 0,5g de carbonato de cálcio, 2,5 mL de água destilada e 2,5 mL de ácido clorídrico decimolar. O resultado positivo mostra o crescimento de colônias enquanto que o negativo não apresenta crescimento (NEDER, 1992).

2.4.15 Redução de Nitrato

O micro-organismo presente no caldo Meio Salino Mineral (MSM) sem limitação foi inoculado com uma alçada em tubos de ensaio com caldo nitrato e tubo de Durhan invertidos, sendo incubados a 35°C por 5 dias. O resultado positivo apresenta a formação de gás nos tubos de Durhan. Não ocorrendo a produção de gás, foi adicionado 5 gotas da solução de 0,6% de α -naftol e 5 gotas da solução de 0,8% de ácido sulfanílico e agitado

delicadamente os tubos. O desenvolvimento da cor vermelha entre 1 a 2 minutos indicava resultado positivo (presença de nitrito), se não era adicionado 20 mg de pó de zinco aos tubos contendo as soluções de α -naftol e ácido sulfanílico. O desenvolvimento da cor vermelha entre 5 a 10 minutos indica redução de nitrato a nitrito pelo zinco resultando em negativo. O não desenvolvimento da cor vermelha indica ausência de nitrato no meio, resultando em positivo (SILVA, 1996).

2.5 IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE PHAS, POR ANÁLISE MOLECULAR

2.5.1 Extração de DNA

A metodologia utilizada para a extração de DNA total foi adaptada a partir do protocolo estabelecido e descrito por Moreira et al. (2010).

Os micro-organismos foram cultivados em 10 mL de caldo nutriente a temperatura de 30°C por 24 horas. Foram recolhidas alíquotas de 1,5 mL do caldo de cultivo e centrifugados (HettichZentrifugen - Mikro 200) por 1 minuto a 12000 rpm. O precipitado foi ressuspensionado em 450 μ L de CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio), agitado em agitador de bandeja (Vortex- Genie modelo SI-T236) por 1 minuto e, colocado em banho ultrassônico com gelo por 1 minuto e 30 segundos. O precipitado foi novamente ressuspensionado em 300 μ L de CTAB e solubilizado em banho-seco por 20 minutos à 65 °C. Na sequência foi adicionado 750 μ L de clorofórmio e agitado por 5 minutos em agitador de bandeja, sendo centrifugado por 7 minutos à 12000 rpm. Foi transferido 1,5 mL do sobrenadante para outro microtubo de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) e acrescentado etanol 96% (1:2) gelado, homogeneizado por inversão suavemente, sendo incubados a -20 °C por 30 minutos. Esta solução foi centrifugada por 7 minutos à 12000 rpm e descartado a fase líquida. Ao precipitado foi adicionado 750 μ L de etanol 70% gelado e centrifugado por 7 minutos à 12000. Após, foi descartado o sobrenadante e o pellet formado foi seco a temperatura ambiente. O DNA foi ressuspensionado em 50 μ L de

água- Milli-Q e sua integridade verificada por eletroforese em gel agarose à 0,8%, corado em brometo de etídio (2µg/mL) por 15 minutos e submetidos à uma voltagem de 70 v por 30 minutos, sendo visualizados em transluminador com luz ultravioleta.

2.5.2 Amplificação por PCR

Para realização do sequenciamento, o DNA extraído foi submetido à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para amplificação do segmento dos genes 16S rDNA, utilizando-se um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) (fD1 – AGAGTTTGAAATCCTGGCTCA) e (rD1 – AAGGAGGTGATCCAGCC).

A reação de PCR foi realizada em termociclador (MaxyGeneGradient – THERM-1000), as reações de amplificação (PCR) foram preparadas num volume de 25 µL, contendo 13,4 µL de água Milli-Q, 2,5 µL de tampão da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen), 2,0 µL de dNTP's, 1,5 µL de cloreto de magnésio - MgCl₂ (Invitrogen), 0,6 µL de cada *primer* e 0,4 µL de Taq polimerase (Invitrogen) e 3 µL de DNA. As condições de amplificação foram de 4 minutos a 94°C, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 30 segundos, e à 72°C por 1 minuto, e uma extensão final de 4 minutos a 72°C.

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose (1,4%), por aproximadamente 1 hora e 20 minutos, utilizando 70 volts. O gel de agarose foi submerso em solução de brometo de etídio (2µg/mL) durante 15 minutos e fotografado, e foto documentado em transiluminador (LBT- 20X20 HE) ultravioleta, utilizando software 38 LpiXImage para a visualização das bandas. Foi utilizado marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen) para estimativa do tamanho dos produtos de PCR.

2.5.3 Sequenciamento do DNA

Os produtos da amplificação foram sequenciados em empresa especializada Ludwig Biotecnologia LTDA, utilizando o equipamento ABI-Prism 3500 GeneticAnalyzer (Applied Biosystems).

As sequências completas de nucleotídeos das três amostras estudadas foram utilizadas para buscar sequências similares em bancos de dados, usando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) na página do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, acessado em jun. de 2015).

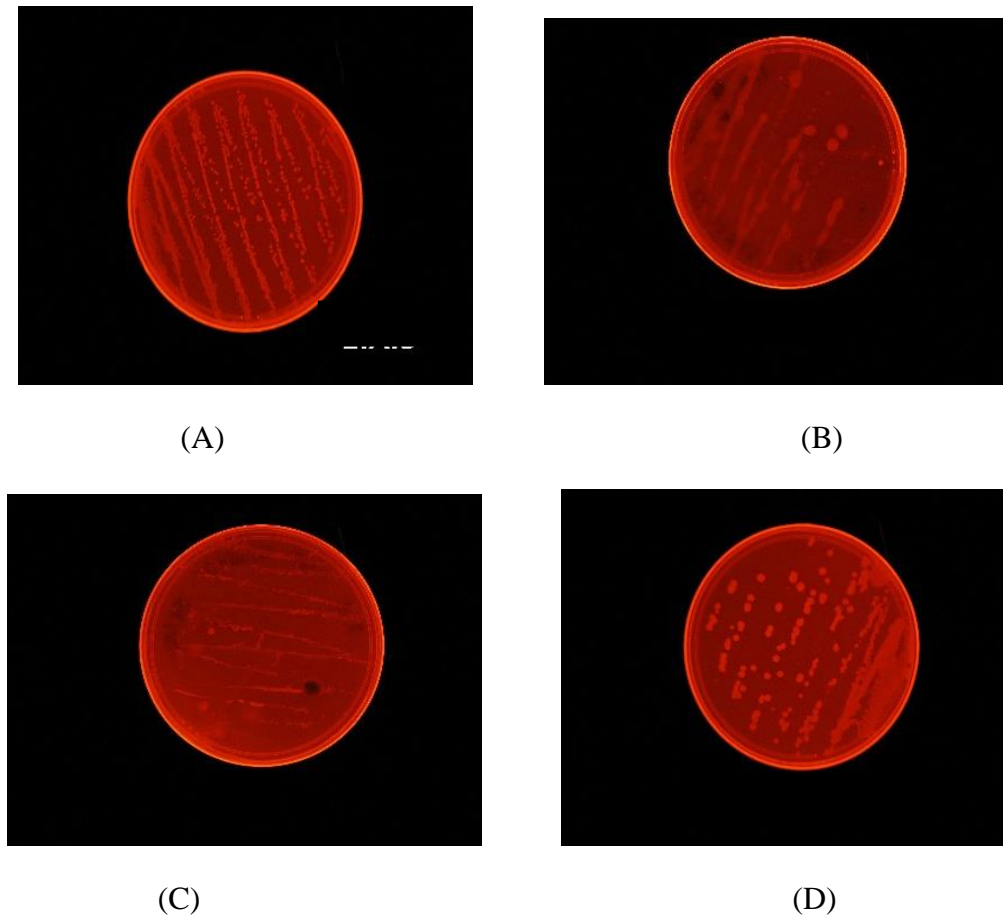
2.6 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) DO PHA

O biopolímero produzido pelo micro-organismo foi analisado em espectrofotômetro de infravermelho Nicolet, modelo FTIR 4700, na região espectral entre 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} , com varredura de 60 scans. Pastilha com 40 mg de brometo de potássio (KBr) (Merck), previamente dessecado, foi utilizado para correção de ruídos instrumentais. O biopolímero foi preparado na forma de pastilhas, com 0,0391mg de KBr e 0,0009 mg da amostra.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE PHA

Foram isoladas 32 colônias puras, das quais 4 colônias foram selecionadas por apresentarem fluorescência, indicando possível produção de polihidroxialcanoatos (Figura 1). As 4 colônias foram codificadas como **A** e **B** (amostras de terra coletadas em Morretes-PR), **C** (amostra de água coletada em Antonina-PR) e **D** (amostra de areia da praia do Futura coletada em Fortaleza-CE).



Nota - Colônia A - amostras de terra coletadas em Morretes-PR; Colônia B - amostras de terra coletadas em Morretes-PR; Colônia C - amostra de água coletada em Antonina-PR; Colônia D - amostra de areia coletada em Fortaleza-CE.

Figura 2- Fluorescência das colônias puras obtida com auxílio do corante Vermelho Nilo no meio de cultivo.

Fonte: Autoria própria, 2015.

A fluorescência emitida pelo uso do corante Vermelho Nilo proporciona um fácil e rápido rastreamento para identificar micro-organismos com potencial para produção de PHAs, sendo utilizado para isolar do meio ambiente possíveis linhagens produtoras do biopolímero (BERLANGA, et. al., 2006). O uso do vermelho Nilo como corante penetra na célula viável e cora os grânulos do biopolímero, permitindo assim identificar as bactérias produtoras de PHA pela fluorescência (SPIEKERMANN, 1999).

3.2 PRODUÇÃO DE PHA

Os micro-organismos da colônia B apresentaram maior porcentagem da relação de biomassa por produção de PHA, ou seja, de 32,8% entre as colônias isoladas.

Tabela 2 mostra as concentrações de biomassas e PHAs produzidas pelas 4 colônias puras de micro-organismos selecionados, como potenciais produtores de PHA.

Tabela 2 – Concentração da biomassa e PHA extraído

Micro-organismos	Biomassa (g L ⁻¹)	PHA (g L ⁻¹)	% PHA**
A	4,25	0,96	22,58
B	8,65	2,84	32,83
C	4,80	1,39	28,95
D	6,45	1,38	21,39

**% P(3HB) = (g de PHA seco)/g de biomassa) x 100

Fonte: autoria própria, 2015.

A quantidade encontrada de PHA pelos micro-organismos estão abaixo do produzido por bactérias comerciais (50-90%), como a *Cupriavidus* ou recombinante de *Escherichia coli* (Steinbuechel, 2001). Chen et al (1991), isolaram PHA em 11 diferentes linhagens de *Bacillus spp.*, sendo encontrado 50% (w/v) de PHB em relação ao peso seco de células das bactérias.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE PHA

3.4.1 Características Morfológicas dos Micro-Organismos com Potencial de Produção de PHA.

O teste morfológico mostra que todos os micro-organismos (A, B, C e D) isolados com potencial para produção de PHA são brancas e com brilho opaco (Quadro 1).

Micro-organismos	Morfologia das colônias de micro-organismos com potencial para produção de PHA						
	Tamanho	Forma	Elevação	Bordos	Estrutura	Brilho	Cor
A	Grande	Irregular	Elevada	Lobados	Rugosa	Opaca	Branca
B	Pequena	Circular	Achatada	Lisos	Lisa	Opaca	Branca
C	Pequena	Circular	Achatada	Lisos	Lisa	Opaca	Branca
D	Pequena	Puntiforme	Convexa	Lisos	Granulosa	Opaca	Branca

Quadro 1- Características morfológicas das colônias de micro-organismos com potencial para produção de polihidroxialcanoatos, em placas de Petri

Fonte: autoria própria, 2015.

Todos os micro-organismos (A, B, C e D) apresentaram crescimento em ágar inclinado com características brilhante e incolor (Quadro 2).

Micro-organismos	Crescimento de micro-organismos com potencial para produção de PHA, em tubos de ensaio com ágar inclinado			
	Forma	Quantidade	Brilho	Cor
A	Difuso	Escasso	Brilhante	Incolor
B	Espalhado	Abundante	Brilhante	Incolor
C	Espalhado	Abundante	Brilhante	Incolor
D	Equinulado	Moderado	Brilhante	Incolor

Quadro 2- Características de crescimento micro-organismos com potencial para produção de polihidroxialcanoatos, em tubos de ensaio com ágar inclinado.

Fonte: autoria própria, 2015.

Todos os micro-organismos (A, B, C e D) apresentaram crescimento em caldo nutriente com as mesmas características, ou seja, turbidez fraca, sem película e sem anel na superfície do caldo (Quadro 3).

Micro-organismos	Crescimento de micro-organismos com potencial para produção de PHA, em caldo Nutriente			
	Cor	Tipo	Película	Anel
A	Turbidez fraca	Mucóide	Sem película	Sem anel
B	Turbidez fraca	Feculento	Sem película	Sem anel
C	Turbidez fraca	Mucóide	Sem película	Sem anel
D	Turbidez fraca	Mucóide	Sem película	Sem anel

Quadro 3 - Crescimento de micro-organismos com potencial para produção de polihidroxialcanoatos, em caldo Nutriente

Fonte: autoria própria, 2015.

O micro-organismo B com maior produção de PHA teve como características colônia pequena, circular, achatada, lisa, estrutura lisa e com sem brilho (opaca), de coloração branca, com crescimento espalhado, abundante, brilhante e incolor em ágar inclinado e, ainda em caldo Nutriente mostrou turbidez fraca, do tipo feculento e sem a presença de película e anel (Quadro 1, 2 e 3).

3.4.2 Perfil Bioquímico dos Micro-organismos com Potencial de Produção de PHA.

Os 4 micro-organismos A,B, C E D apresentaram coloração de Gram negativos e resultados positivos para produção de catalase, indicando que são capazes de converter o H_2O_2 em água e oxigênio gasoso. Nenhum dos micro-organismos analisados apresentou a enzima citocromo c, umas das enzimas oxidases que participam da respiração celular (Quadro 4).

Almeida (2006) obteve resultados positivos para o teste de catalase e oxidase, ao analisar cepas de *Chromobacterium violaceum* como possíveis produtoras de polihidroxialcanoato. Este aspecto também foi observado pelos micro-organismos neste trabalho, no entanto, apenas para a capacidade de produzir catalase.

Apenas os micro-organismos B, C e D mostraram capacidade de motilidade, o que indica a presença de flagelos produzindo movimento em meio de cultivo solidificado. Almeida (2006) também verificou resultados positivos para motilidade em 13 linhagens de *Chromobacterium violaceum*.

Somente o micro-organismo A mostrou habilidade para formação de esporos, mostrando que os outros micro-organismos analisados podem ter dificuldades em sobreviver em ambientes desfavoráveis (Quadro 4), mas com maior potencial para produção de PHA (Tabela 2).

Segundo Wu et al. (2001) a energia necessária para esporulação provém da degradação do biopolímero produzido pelo micro-organismo, da fonte de carbono e nutrientes do meio de cultura, onde a proporção do consumo destes implicará numa redução do acúmulo final de PHA na célula. Segundo Slepecky e Law (1961) a limitação do meio

de cultivo favorece a formação de esporos, onde durante esse processo se observa menor produção de biopolímero e um rápido consumo do mesmo que antecede a esporulação.

Testes	Perfil bioquímicos dos micro-organismos			
	A	B	C	D
Coloração de Gram	-	-	-	-
Produção de Catalase	+	+	+	+
Análise Oxidase	-	-	-	-
Análise Motilidade	-	+	+	+
Produção de Esporo	+	-	-	-
Glicose	-	-	+	-
Frutose	-	+	+	-
Manitol	-	-	+	-
Xilose	-	-	-	-
Utilização do Citrato	-	+	-	+
Vermelho Metila	-	+	-	+
Voges-Proskauer	-	-	-	-
Hidrólise Amido	-	-	+	-
Hidrólise Caseína	+	+	+	-
Hidrólise Uréia	+	+	+	+
Hidrólise Gelatina	-	-	-	-
Anaerobiose 20°C	+	+	+	+
Anaerobiose 50°C	-	-	-	+
Redução Nitrato	-	+	+	+

Nota: sinal (+) indica positivo e (-) negativo para o respectivo teste.

Quadro 4 - Perfil bioquímicos dos micro-organismos com potencial para produção de polihidroxialcanoatos

Fonte: autoria própria, 2015.

Os micro-organismos A e D não apresentaram capacidade de fermentação da glicose, frutose, manitol e xilose, mas o B fermentou apenas a frutose. Porém, o micro-organismo C mostrou capacidade de fermentar a glicose, frutose e manitol (Quadro 4). Este aspecto sugere que este micro-organismo possui capacidade de introduzir o carboidrato na célula e convertê-lo em glicose, realizando fermentação por reação de oxi-redução produzindo um ou mais compostos de carbono, gerando energia no final do processo (SILVA, 1996).

A empresa brasileira PHB Industrial S.A. tem capacidade máxima de 60 toneladas de PHB por ano, a partir da cana-de-açúcar e utiliza uma produção integrada em usina sucroalcooleira. Mesmo com a utilização de sacarose como fonte de carbono, os custos de

produção da empresa são os menores do mundo. Este biopolímero tem um custo de produção de US\$ 10 - 20/kg na Europa e no Brasil de US\$ 2,5 - 5/kg, no entanto, este valor representa cerca de 4 a 5 vezes o custo dos polímeros convencionais (FIORESE, 2008).

O fato dos micro-organismos B e C metabolizarem outras fontes de carbono que não a glicose presente no caldo Meio Salino Mineral (MSM) sem limitação, mas da triptona e extrato de levedura do meio de cultivo mãe, pode ser uma alternativa para utilização de substratos ainda de menor custo, o que representaria uma economia no processo de produção.

No teste do citrato somente os micro-organismos B e D foram capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono para o seu crescimento. Estes resultados corroboram com a falta de capacidade de fermentação dos açúcares pelo micro-organismo D. No entanto, o micro-organismo B mostrou capacidade de fermentar a frutose e o citrato (Quadro 4).

O teste de Vermelho de metila (VM) mostrou que os micro-organismos B e D apresentam metabolismo fermentativo do tipo ácido misto, com redução acentuada do pH, superando a capacidade tamponante do tampão fosfato presente (Quadro 4).

No teste de Voges-Proskauer (VP) nenhum micro-organismo apresentou capacidade de produzir butilenoglicol, como resultado do produto final da fermentação da glicose. O que se confirma pela falta da capacidade de fermentar a glicose pelos micro-organismos A, B e D, com exceção do C (Quadro 4).

Oliveira et al. (2013), analisou o perfil bioquímico de 19 bactérias presentes em solo de Mata Atlântica, capazes de sintetizar PHAs a partir de glicose, sendo identificados como dos gêneros *Vibrio*, *Aeromonas* e *Staphylococcus*. O teste VP evidenciou a produção de butanodiol em doze isolados, ao passo que o teste VM mostrou que dezessete bactérias possuem metabolismo misto. Cinco isolados mostraram ser os mais promissores para aplicações biotecnológicas, pois utilizam glicose e citrato como fontes de carbono, degradam ureia e gelatina e são capazes de produzir PHAs em condições limitantes de nitrogênio e conseguem sobreviver e ambientes anaeróbicos.

A hidrólise do amido foi verificada apenas pelo micro-organismo C, portanto, capaz de hidrolisar o amido em carboidratos menores (Quadro 4). Este aspecto também foi observado por Krueger (2009) quando testou 72 bactérias pertencentes aos gêneros

Bacillus, *Paenibacillus* e *Geobacillus*, quanto a capacidade de utilizar o amido como única fonte de carbono, onde 55 cepas mostraram esta habilidade. Contudo, o crescimento foi variável, indicando como causa a diferença na atividade amilolítica, seja pela especificidade das enzimas ao substrato amiláceo ou pela acessibilidade das enzimas aos grânulos de amido.

Os micro-organismos A, B e C hidrolisaram a caseína, sendo resultado da reação hidrolítica com formação de aminoácidos não coloidais (Quadro 4). Resultados diferentes foram verificados por Krueger (2009) quando 13 micro-organismos investigados apresentaram resultado positivo para hidrólise da caseína, mas os que obtiveram melhor resultado para produção de biopolímero foram os que não hidrolisaram a caseína, o que não ocorreu neste trabalho.

Todos os micro-organismos, A, B, C e D apresentaram a capacidade de hidrolisar a uréia formando duas moléculas de amônia pela ação da enzima urease, mas não hidrolisaram a gelatina em aminoácidos, ou seja, não possuem a enzima gelatinase (Quadro 4). Os micro-organismos através da ação enzimática, fizeram a decomposição da uréia em fontes de nitrogênio, sendo essencial para o crescimento microbiano. Porém, o acúmulo de PHA tem início quando este elemento se apresenta limitante no meio. Resultado diferente foi observado por Almeida (2006) em que todas as linhagens de *Chromobacterium violaceum* apresentaram resultados negativos para o teste da uréia e da gelatinase.

Todos os micro-organismos, A, B, C e D apresentaram habilidade de crescimento sem utilização do oxigênio em temperatura à 20°C. Efeito contrário foi verificado em atmosfera anaeróbia à 50°C, onde apenas o micro-organismo D mostrou crescimento em meio de cultivo sem oxigênio (Quadro 4). Silva e Weingartner (2008) (apud Krueger, 2009) também observaram que a maioria dos micro-organismos investigados com potencial para produção de P(3HB), ou seja, 15 apresentaram crescimento a 20°C, e apenas 4 não cresceram a 50°C.

A capacidade de reduzir o nitrato em nitrito foi verificada pelos micro-organismos B e C, sendo um processo desenvolvido em anaerobiose, confirmado pelo crescimento em anaerobiose a 20° C por estes micro-organismos (Quadro 4). Neste processo de redução o

micro-organismo consegue suprir a ausência do oxigênio atmosférico derivando-o do nitrato (Silva, 1996).

Portanto, o perfil bioquímico do micro-organismo B, com maior produção de PHA, apresentou características: Gram negativa, catalase positiva, oxidase negativa, motilidade em meio semi-sólido, negativo para produção de esporos, fermenta a frutose, não há fermentação da glicose (não produz butilenoglicol), manitol e xilose, utiliza o citrato, possui capacidade fermentativa tipo ácido misto, hidrolisa a caseína e a uréia, mas não hidrolisa o amido e a gelatina, cresce em anaerobiose a 20°C e faz redução do nitrato.

3.5 IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE PHAS, POR BIOLOGIA MOLECULAR

Foi possível a extração do DNA dos micro-organismos A, B, C e D. Foi observado que os grupos de moléculas migraram na matriz de agarose, assumindo a forma dos seus poços, constituindo as bandas de DNA (Figura 2). Porém, foi verificada diferença na intensidade de fluorescência, principalmente na duplicata do micro-organismo B. Segundo Corrêa e Possik (2015), a intensidade de fluorescência emitida é proporcional à concentração de DNA presente na amostra.

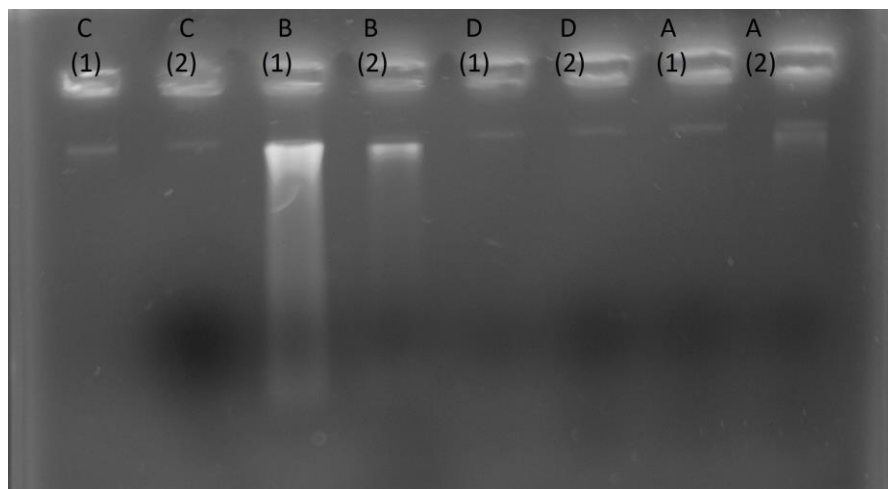
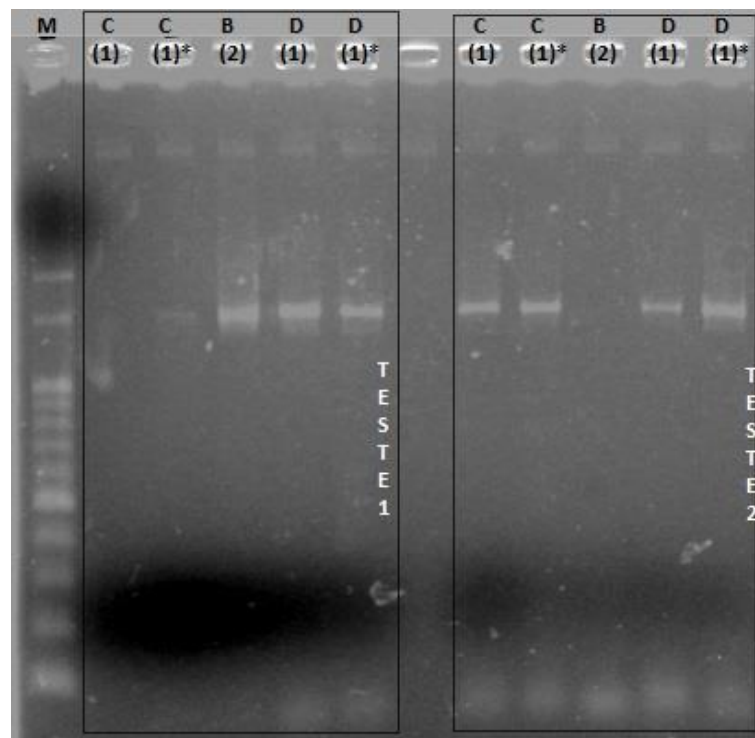


Figura 2 – Presença de DNA dos micro-organismos A, B, C e D em duplicata.

Fonte: autoria própria, 2015.

Na figura 3 pode ser observado os produtos amplificados por PCR, utilizando as amostras dos micro-organismos C (duplicata nº 1), B (duplicata nº 2) e D (duplicata nº1), por apresentarem maior intensidade e definição das bandas.

As reações de amplificação diferiram na quantidade de DNA alvo aplicado, que foi de 2 µL e 3 µL, nas amostras dos micro-organismos C e D. A amostra do micro-organismo B (duplicata nº2) apresentou quantidade de DNA superior as outras, por isso foi diluída na proporção de 1:10, e foi usado 2 µL de DNA alvo, sendo realizado dois testes (Figura 3).



Nota: Quantidade de DNA alvo 3 µL

Figura 3 – Produtos da amplificação por PCR (micro-organismos C, B e D)

Fonte: autoria própria, 2015.

A figura 4 apresenta à amplificação das amostras dos micro-organismos B (duplicata nº 1 e 2) diluídas na proporção 1:10. A quantidade de DNA alvo utilizada foi de 2 µL, no entanto, as amostras dos micro-organismos A (duplicata nº 1 e 2) não houve

diluição, sendo utilizado 4 μ L de DNA alvo para cada duplicata, pois na extração de seus DNAs essas amostras apresentaram bandas com menor intensidade, indicando de maneira qualitativa menor concentração de DNA.

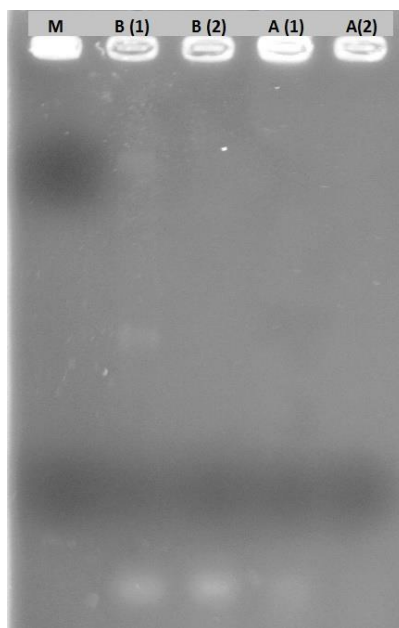


Figura 4– Produtos da amplificação por PCR (micro-organismos B e A)

Fonte: autoria própria, 2015.

Foi observado pela análise em eletroforese à amplificação dos DNAs, onde os produtos da PCR apresentaram 1500 pares de base.

Na figura 3 foi verificado a falta de bandas nas amostras dos micro-organismos C (duplicata nº 1) no teste 1 e para o micro-organismo B no teste 2, indicando que a amplificação do DNA não ocorreu, possivelmente a um erro operacional ou pela utilização reagentes diferentes entre as análises. A figura 4 mostra apenas a banda da amostra do micro-organismo B (duplicata nº 1), as dos outros micro-organismos se apresentaram sem definição e com baixa intensidade. Desta forma, se optou pela não continuidade do sequenciamento das amostras do micro-organismo A (duplicata nº 1 e 2).

Para maior confiabilidade e visibilidade das amostras enviadas para o sequenciamento, foi realizado a corrida de outro gel de agarose contendo as amostras dos micro-organismo B (duplicata nº 2) do teste 1 e os micro-organismos C (duplicata nº 1) e D

(duplicata nº 1) do teste 2, sendo verificado as três amostras aplicadas no gel apresentaram bandas de 1500 pares de base (Figura 5).



erro na
figura é d (1)

Figura 5 – Produtos da PCR enviados para sequenciamento

Fonte: autoria própria, 2015.

Após o sequenciamento da região 16S rDNA dos micro-organismos isolados, foi utilizada a ferramenta BLAST - Basic Local Alignment Search Tool, buscando identificar caracteres que sejam semelhantes, no caso nucleotídeos, entre a sequência de entrada e o banco de dados. Na ferramenta BLAST são observadas as regiões semelhantes e os conjuntos de caracteres são estendidos para a direita e esquerda a fim de aumentar as regiões de semelhança. A cada alinhamento entre um par de caracteres gera uma pontuação que, quando somados, determinam o valor de *score* para o trecho de similaridade.

Para maior segurança de que o *score* não é reflexo de uma aleatoriedade, deve ser usado o *E-Value* (SOUZA e LIFSCHITZ, 2007). O valor do *e-value* para um determinado *score*, representa à probabilidade de conseguir outro alinhamento com *score* similar ou superior para outra sequência aleatória de mesmo tamanho e composição de

caracteres. Quanto mais próximo o valor de *E*-value for de zero, melhor é o resultado do alinhamento (SOUZA e LIFSCHITZ, 2007).

De acordo como López et al. (2006), a identificação das bactérias em nível de espécie pode ser entendida quando a sequência do fragmento, comparada a outras sequências de 16 rDNA, apresentar valores acima de 97% de similaridade. Desta forma, o micro-organismo C foi identificado como *Arthrobacter chlorophenolicus* A6, com 97% de identidade e o micro-organismo D foi identificado com 90% de identidade, indicando o mesmo gênero (Tabela 3). Com 78% de confiança de identidade a amostra do micro-organismo B foi identificada com o gênero *Sphingomonas*. A baixa porcentagem de similaridade, pode estar relacionada a resquícios de proteínas associadas, sugerindo uma extração deficiente, esse resultado poderia ser melhorado realizando uma purificação do DNA.

Tabela 3 - Identificação dos isolados por comparação das sequências no banco de dados BLAST

Micro-organismo	Identificação por BLAST	Número de Acesso	Identidade em %	Sequência de nucleotídeos	<i>E</i> -value
B	<i>Sphingomonas spp.</i>	NC_009511.1	78	924	3e-102
C	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> A6	NC_011886.1	97	925	0.0
D	<i>Arthrobacter spp.</i>	NC_011886.1	90	301	3e-92

Fonte: autoria própria, 2015.

Segundo Souza (2013) o gênero *Arthrobacter*, pertence à família Micrococcaceae, formado por cocos Gram positivos, não móveis e não formadores de esporos. Foram identificadas 80 espécies para este gênero, sendo os micro-organismos amplamente distribuídos na natureza, principalmente encontrados no solo, tendo elevada tolerância à dessecação, inanição (*starvation*) e outros estresses ambientais. Algumas espécies deste gênero podem degradar vários compostos xenobióticos, como 4-clorofenol e 4-nitrofenol.

Melo et al. (2001), descreveu o gênero *Arthrobacter* entre outros gêneros com capacidade de biotransformar petróleo e derivados. Esta característica corrobora com o local onde foi isolado este micro-organismo, ou seja, ambiente com vestígios de resíduo de hidrocarbonetos presentes da água do mar da cidade de Antonina-PR (micro-organismo C) e da areia coletada em Fortaleza-CE (micro-organismo D).

Neste trabalho foi observado que o gênero *Arthrobacter* apresenta características semelhantes para incapacidade de formar esporos, mas não para a coloração de Gram e motilidade. A diferença observada no tipo de Gram e capacidade de motilidade pode estar relacionada a espécie, idade celular e meio de cultivo em que foi submetido o micro-organismo. Segundo Jawetz et al. (1984) colônias de bactérias apresentam fenômeno do monomorfismo, ou seja, as bactérias têm sempre as mesmas características, tendo como reprodução a divisão binária. No entanto, existem algumas bactérias que apresentam polimorfismo, devido a variações fenotípica e/ou variação genotípica. As variações fenotípicas ocorrem em função do meio ambiente e assim que cessado o estímulo, a bactéria volta a ser o que era antes.

O gênero *Sphingomonas* foi classificado por muitos anos como gênero *Pseudomonas*, mas em 1990 renomeado. Este gênero pertence ao subgrupo α -Proteobacterium, sendo caracterizadas como bactérias Gram-negativas, aeróbicas, com pigmentação amarela (WHITE et al., 1996), não possuem flagelos, mas em algumas espécies foi observado motilidade em meio semi-sólido, são catalase e oxidase positivas, não possuem necessidade de fatores de crescimento especializado, não apresentam produção de indol nem acetilmetilcarbinol, não hidrolisam gelatina e produzem ácidos por oxidação de carboidratos (BERWANGER, 2005). Neste trabalho foi observado características semelhantes para esse gênero de bactéria, como coloração Gram negativas, motilidade em meio sólido, catalase positiva, não hidrolisam gelatina e produção de ácidos a partir de carboidrato (frutose).

3.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) DO PHA

A confirmação e caracterização o biomaterial extraído como PHA do micro-organismo isolado (B) com maior produção de PHA, *Sphingomonas sp.*, foi realizado análise em Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

Foram identificados os grupos funcionais dos grânulos de PHA extraídos como o grupo C=O e estão apresentados na Figura 6, que ilustram bandas de absorção intensa e

características de poliésteres. O espectro apresenta as bandas semelhantes as características do P(3HB) e PHA descritos na literatura por Catoni (2011), Oliveira (2010) e Shah (2012) (Tabela 4), porém, demonstra estar mais relacionado aos polihidroxibutiratos.

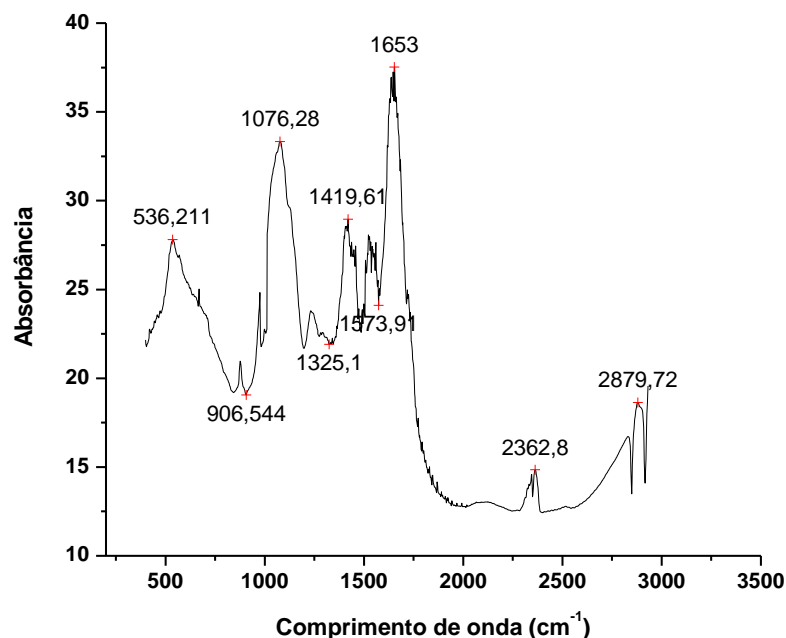


Figura 6 - Espectro de FTIR de PHA produzido por *Sphingomonas sp.*
Fonte: autoria própria, 2015.

Tabela 4 - Relação das principais bandas do biopolímero de PHA produzido por *Sphingomonas sp.*, em comparação com literatura.

Atribuições das bandas	PHA (cm ⁻¹)	PHB (cm ⁻¹) Catoni, 2011	Referências	
			PHB (cm ⁻¹) Oliveira, 2010	PHA (cm ⁻¹) SHAH, 2012
Deformação axial da ligação C=O	1653,0	1719,70	1721	1720
Deformação axial da ligação C-C	979,8	978,0	---	---
Deformação angular da ligação C-C	----	-----	----	----
Deformação axial da ligação C-O no grupo ester	1230,5	1275,06	1221,0	1162
Deformação axial assimétrica e simétrica da ligação C-H no grupo metil	1419,61	1453,17	1453,0 - 1379,0	1380
Deformação assimétrica da ligação C-H do grupo metileno	2931,8	2933, 15	2933,0	2933,0

Fonte: autoria própria, 2015.

4. CONCLUSÃO

Os micro-organismos isolados B, C e D e identificados como *Sphingomonas sp.*, *Arthrobacter chlorophenolicus A6* e *Arthrobacter sp.*, respectivamente, mostraram potencial para produção de PHAs.

O micro-organismo B foi identificado como uma bactéria pertencente ao gênero *Sphingomonas* e apresentou maior capacidade de produção de PHA, 32,8%. No entanto, há necessidade de otimizar o meio de cultivo com intuito de estimular a produção do biopolímero.

A análise de FTIR mostrou que o biopolímero produzido pela bactéria do gênero *Sphingomonas sp* contém os grupos funcionais dos grânulos da família dos PHAs extraídos como grupo C=O, tendo semelhança com os polihidroxibutiratos (PHB).

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Adriana Antunes. **Chromobacterium violaceum: Caracterização cultural, bioquímica, molecular e detecção da produção de polihidroxicanoatos – PHA.** 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCB – Ciências Biológicas. Recife, 2006.

BERLANGA, M.; MONTERO, M. T.; BORREL, J. F.; GUERRERO, R. Rapid spectro fluorometric screening of polyhydroxyalkanoate producing bacteria from microbial mats. **International Microbiology**, v.9, p. 95-102, 2006.

BERWANGER, Ana Luiza da Silva. **Produção e caracterização de biopolímero sintetizado por *Sphingomonas capsulata*.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Mestrado em Engenharia em Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões –URI, Campus de Erechim, Erechim, 2005.

CARMINATTI, Claudimir Antonio. **Copolímeros de 3-Hidroxicanoato-co-3-Hidroxicanoato (PHBV) produzidos por *Chromobacterium violaceum*.** 2008. 127 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

CATONI, S. E. M. **Biossíntese e obtenção de PHB e PHBV plastificados com PEG visando aplicação em liberação controlada de fármacos.** 2011. 87f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE, Joinville, 2011.

CHEN GQ, KONIG KH, LAFFERTY RM. Occurrence of poly-D-3- hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus*. **FEMS Microbiol Lett.** v. 84. p: 174-176, 1991.

CHOI, J.; LEE, S. Y.; Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 1999.

CORRÊA, Elisete Marcia; POSSIK, Patrícia Abrão. **A análise de DNA por eletroforese.** Disponível em:<http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/biologia_molecular/testes_geneticos.pdf>. Acesso em: jun. 2015.

FIGUEIREDO, T. V. B.; CAMPOS, M. I.; SOUSA, LUCIANE S.; SILVA, J. R. DA; DRUZIANA, J. I. Produção e caracterização de polihidroxicanoatos obtidos por fermentação da glicerina bruta residual do biodiesel. **Quím. Nova**, v. 37, n. 7, p. 1111-1117, 2014.

FIGUEIREDO, Mônica Lady. **Estratégias de cultivo e recuperação e caracterização de poli (3-hidroxicanoato) produzido por *Ralstonia eutropha*.** 2008. 180 f. Tese (Doutorado) -

Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

JAWETZ, E.; BROOKS, G.; MELNICK, J.; BUTEL, J.; Adelberg, E.; Ornston, L. N. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 10^o Ed.568 p, 1984.

FORLIN, Flávio J.; FARIA, José de Assis F. Considerações sobre a reciclagem de embalagens plásticas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 12, nº 1, p. 1-10, 2002

KRUEGER, C.L. **Seleção de linhagens de *Bacillus* produtoras de polihidroxialcanoatos a partir de resíduo do processamento de mandioca**. 2009. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

LÓPEZ, M.A.; ZAVALA Diaz de la Serna F. J.; JANROBLERO J; ROMERO JM; HERNANDEZ-RODRIGUE C. Z. Phylogenetic analysis of a biofilm bacterial population in water pipeline in the Gulf of Mexico. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 58, p. 145-154, 2006.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. Editora: Artmed S.A. 12^a Edição. São Paulo. 2010.

MALAJOVICH, Maria Antonia. **Guias de atividades Biotecnologia: ensino e divulgação, Meio de ágar leite**. Disponível em: <http://www.bteduc.bio.br/guias/79_Preparacao_do_meio_de_agar-leite.pdf>. Acesso em: junho, 2015.

MARANGONI, C. **Estudo de estratégias de produção de Poli(3 hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por *Ralstonia eutropha* utilizando substrato de baixo custo e ácido propiônico**. 220f. Dissertação (Mestrado). UFSC/CTC/EQA, Florianópolis, 2000.

MELO, I. S et al. **Biodegradação**. Jaraguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2001. 440p.

MOLINARIO, Etelcia Moraes. **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; IOV, volume 4, 2009.

MOREIRA, M., NOSCHANG, J., NEIVA, I.F., CARVALHO, Y., HIGUTI, I.H., VICENTE, V.A. Methodological variations in the isolation of genomic from *Streptococcus* bacteria. **Brazilian Archives of Biology and Technology**.v.53, n.4, p.845-849, 2010.

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

OLIVEIRA, C. F. **Produção de Polihidroxibutirato: Bioprospecção de *Beijerinckia sp.* da coleção de bactérias do Laboratório de Biopolímeros do CDTEC**. 2010. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

OLIVEIRA, D.L.L.; SILVA, A.L.S.; LÓPEZ, A.M.Q. Perfil bioquímico de microrganismos produtores de polihidroxialcanoatos (PHAs) isolados do solo da mata atlântica (Maceió - AL). **27º CMB - Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Natal, 2013.

PAULA, Fabrício Coutinho de. **Polihidroxialcanoatos (PHAs): Bioprospecção de microrganismos e produção a partir de glicerol**. 2012. 221 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração em microbiologia aplicada). Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho – Instituto de Biociências. Rio Claro, 2012.

PEREIRA, Juliana de Castro Nunes. **Identificação de bactérias da rizosfera de inhame, macaxeira e batata-doce potencialmente produtoras de polihidroxialcanoatos**. 2013. 52 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Saúde Humana e Meio Ambiente. Universidade Federal de Pernambuco. Vitória de Santo Antão, 2013.

RAMSAY, B. A., LOMALIZA, K., CHAVARIE, C., DUBE, B., BATAILLE, P., & RAMSAY, J. A. Production of poly-(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v 56, n. 7, p 2093-2098, 1990.

SELEGHIM, M.H REGALI. **Taxonomia: microbiana, de procariontes, de fungos, de protozoários e de vírus. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos - Ciência, Tecnologia e Inovação (CGEE)**. 50p. 2006. Disponível em <http://www.cgEE.org.br/atividades/redirect.php?idProduto=1752>. Acesso em: agosto, 2015.

SHAH K R. FTIR analysis of polyhydroxyalkanoates by novel *Bacillus sp.* AS 3-2 from soil of Kadi region, North Gujarat, India. **J Biochem Tech**, v 3, nº 4, p. 380-383, 2012.

SILVA, M. A. C.; WEINGARTNER, V. Atividade Antimicrobiana de Bactérias Formadoras de Endósporos Isoladas de Ambientes Impactados pela Mineração do Carvão. **REA – Revista de estudos ambientais**. v.10, n. 2, p. 45-53, jul./dez. 2008.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. de A.; TANIWAKI, M. H; GOMES, R. A. R.; SANTOS, R. F.S. dos. **Manual de métodos de análise Microbiológica de Alimentos e água**. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

SILVA, Neusely da. **Testes bioquímicos para identificação de bactérias em alimentos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos; Laboratório de Microbiologia, 1996.

SLEPECKY, R.A.; LAW, J.H. Synthesis and degradation of poly-3-hydroxybutyric acid in connection with sporulation of *Bacillus megaterium*. **Journal of Bacteriology**, 82, p. 37-42, 1961.

SOUSA, Daniel Xavier de; LIFSCHITZ, Sérgio. **Avaliação do E-value para Execução do BLAST sobre Bases de Dados Fragmentadas**. Monografia (Graduação) – Ciência da Computação. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

SOUZA, Adriana Fidelis Couto. **Caracterização molecular e avaliação de resistência a chumbo e cádmio em bactérias isoladas de rizosferas de plantas coletadas em Santo Amaro (BA) Feira de Santana.** 213 f. Dissertação (Mestrado) - Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, 2013.

SPIEKERMANN, P.; REHM, B.H.A.; KALSCHEUER, R.; BAUMEISTER, D. and STEINBUCHER, A. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Arch. Microbiol.*, v, 171, 73-80, 1999.

WHITE D.C.; SUTTON S. D, RINGELBERG D. B. The genus *Sphingomonas*: physiology and ecology. **Curr. Opin. Biotechnol.** 1996, p. 301-306.

WU, Q.; HUANG, H.; HU, G.H.; CHEN, J.; HO, K.P.; CHEN, G.Q. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus sp.* JMa5 cultivated in molasses media. **Antonie van Leeuwenhoek**, 80, p. 111–118, 2001.

WU, H. A.; SHEU, D. S.; LEE, C. Y. Rapid differentiatio between short chain length and medium chain length polyhydroxyalkanoate accumulating bacteria with spectrofluorometry. **Journal of Microbiological Methods**, 2003. v. 53, nº 1, p. 131 - 135.