

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**  
**FACULDADE DE CIENCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS**

**BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

Mariana Bulhões Dos Santos

**POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS E ENZIMAS  
AMILASE E XILANASE POR BACTÉRIAS BIOPROSPECTADAS DE ÁGUA DO  
RIO MIMOSO (BONITO, MS)**

Dourados - MS

2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**  
**FACULDADE DE CIENCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS**

**BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

Mariana Bulhões Dos Santos

**POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS E ENZIMAS  
AMILASE E XILANASE POR BACTÉRIAS BIOPROSPECTADAS DE ÁGUA DO  
RIO MIMOSO (BONITO, MS)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biotecnologia, da UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maricy Raquel Lindenbah Bonfá

DOURADOS-MS

2019

Mariana Bulhões dos Santos

**POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS E ENZIMAS  
AMILASE E XILANASE POR BACTÉRIAS BIOPROSPECTADAS DE ÁGUA DO  
RIO MIMOSO (BONITO, MS)**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao curso de Biotecnologia, da  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE  
DOURADOS, como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Bacharel em  
Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Maricy Raquel Lindenbah Bonfá – Universidade Federal da Grande  
Dourados

---

Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira – Universidade Federal da Grande Dourados

---

Profa. Dra. Fabiana Gomes da Silva – Universidade Federal da Grande Dourados

## RESUMO

Os microrganismos são essenciais para a vida na Terra, já que promovem a ciclagem de nutrientes e além disso, com o advento da biotecnologia são responsáveis por diversos bioprodutos atualmente produzidos pela indústria, como enzimas e biopolímeros. Esse tipo de produção apresenta vantagens ambientais, uma vez que são provenientes de fontes renováveis, além de serem biodegradáveis. Fator de extrema importância já que muitos produtos e processos como a produção de plásticos convencionais deixam resíduos permanentes no planeta. O presente estudo teve como objetivo a bioprospecção de bactérias com o potencial de produção das enzimas de interesse comercial amilase e xilanase e também com o potencial para produzir o biopolímero polihidroxialcanoato (PHA) a partir de amostras de água do Rio Mimoso (Bonito, MS). O meio mínimo contendo amido ou xilana como única fonte de carbono selecionou aquelas culturas com potencial de produção das enzimas amilases e xilanase, respectivamente. Foram obtidos dez isolados potencialmente produtores de amilase e dez isolados potencialmente produtores de xilanase. Estas bactérias foram submetidas à avaliação do Índice Enzimático (IE) calculado a partir da razão entre o diâmetro da colônia e do halo de degradação formado ao redor das colônias. Das dez bactérias isoladas com amido sete apresentaram  $(IE) > 2,0$ . Dos dez isolados em xilana como fonte de carbono, oito apresentaram  $(IE) > 2,0$ . Visando a produção de PHA o isolamento foi procedido em meio ISP9 suplementado com glicerol (2%), no qual 10 bactérias foram isoladas e avaliadas quanto à produção de PHAs através de um *screening* inicial com coloração de colônias com Sudan Black B 0,02%, as colônias positivas foram posteriormente avaliadas após crescimento em meio de cultivo contendo corante Red Nile ( $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Após 24 e 48 horas as placas foram avaliadas no fotodocumentador para verificar fluorescência conferida quando as bactérias produzem PHAs. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que os isolados estudados possuem um alto potencial de produzir os bioprodutos PHA, amilase e xilanase quando comparados com os dados da literatura.

### Palavras-chave:

Bioprodutos; Biopolímeros; Potencial Biotecnológico; Microrganismos

## ABSTRACT

Microorganisms are essential for life on Earth, since they promote nutrient cycling and in addition, with the advent of biotechnology are responsible for several bioproducts currently produced by industry, such as enzymes and biopolymers. This type of production has environmental advantages, since they come from renewable sources, besides being biodegradable. An extremely important factor since many products and processes such as the production of conventional plastics leave permanent waste on the planet. The present study aimed to bioprospect bacteria with the potential production of enzymes with commercial interest amylase and xylanase and also with the potential to produce the biopolymer polyhydroxyalcanoate (PHA) from water samples of the Mimoso River (Bonito, MS). The minimum medium containing starch or xylana as the only source of carbon selected those strains with production potential of amylase enzymes and xylanase, respectively. Ten potentially producing amylase isolates and ten potentially xylanase-producing isolates were obtained. These bacteria were submitted to the evaluation of the Enzymatic Index (EI) calculated from the ratio between the diameter of the colony and the degradation halo formed around the colonies. From the ten bacteria isolated with starch, seven presented  $(EI) > 2.0$ . From the ten xylana isolates as a carbon source, eight presented  $(EI) > 2.0$ . Aiming at the production of PHA isolation was carried out in ISP9 medium supplemented with glycerol (2%), in which 10 bacteria were isolated and evaluated for the production of PHAs through an initial *screening* with colony color with Sudan Black B 0.02%, the positive colonies were later evaluated after growth in the medium of cultivation with red Nile dye ( $25 \mu\text{g. ml}^{-1}$ ). After 24 and 48 hours the plates were evaluated on the photometer to check for fluorescence conferred when bacteria produce PHAs. The results obtained in this study demonstrate that the isolates studied have a high potential to produce PHA, amylase and xylanase bioproducts when compared to the literature data.

**Keywords:** Bioproducts; Biopolymers; Biotechnological Potential; Microorganisms.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	18
2.1. Produção de Bioprodutos por bactérias .....	18
2.2. Bioprospecção de Microrganismos de Água Doce.....	19
2.3. Biopolímeros .....	19
2.4. Enzimas microbianas .....	24
2.5. Amilases.....	24
2.6. Xilanases.....	26
3. OBJETIVOS .....	28
3.1. Gerais.....	28
3.2. Específicos.....	28
4. HIPÓTESE .....	28
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
5.2. Coleta da Amostra.....	29
5.3. Bioprospecção de Bactérias.....	30
5.4. Isolamento e Seleção de Bactérias.....	31
5.5. Teste de Halo de Crescimento: Xilanase e Amilase .....	32
5.6. <i>Screening</i> de Produção de PHA .....	32
5.6.1. Coloração com Sudan Black.....	32
5.6.2. Coloração com Nile Red .....	33
5.6.3. Caracterização Morfotintorial e Bioquímica.....	33
5.6.3.1 Teste de Gram.....	33
5.6.3.2. Teste de KOH.....	34
5.6.3.3. Teste de catalase .....	34
5.6.3.4. Teste de Oxidase.....	35
5.7. Preservação dos isolados .....	35
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	36
6.1. Bioprospecção de Bactérias.....	36
5.2. Índice enzimático .....	36
6.2. Coloração com Sudan Black B.....	38
5.4. Coloração com Red Nile .....	39
5.5. Caracterização Morfotintorial e Bioquímica das bactérias produtoras de PHA .....	41

7. CONCLUSÕES .....	42
8. REFERÊNCIAS .....	43

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 01.</b> Grânulos de PHA no interior de <i>Rastonia eutropha</i> .....	20
<b>Figura 02.</b> Estrutura geral dos polihidroxicanoatos.....	20
<b>Figura 03.</b> Vias da biossíntese de PHA. ....	22
<b>Figura 04.</b> Estrutura Molecular do Amido. ....	25
<b>Figura 05.</b> Estrutura da biomassa vegetal lignocelulósicas. ....	26
<b>Figura 06.</b> Estrutura química parcial das xilanas.. ....	26
<b>Figura 07.</b> Fluxograma dos experimentos. ....	29
<b>Figura 08.</b> Localização Geográfica do Rio Mimoso. ....	30
<b>Figura 09.</b> Diferenças de coloração das bactérias.....	34
<b>Figura 10.</b> Teste de halo. Fonte: Mariana Bulhões.....	38
<b>Figura 11.</b> Cultivos após coloração com corante Sudan Black.....	39
<b>Figura 12.</b> Coloração Fluorescente do corante Red Nile.....	40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Atividade de amilase produzidos pelos isolados calculados a partir do diâmetro dos halos.....	31
<b>Tabela 2.</b> Atividades de xilanase produzidos pelos isolados calculados a partir do diâmetro dos halos.....	32
<b>Tabela 3.</b> Caracterização morfotintorial das bactérias produtoras de PHA.....	36

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por Sua infinita bondade e graça. Por ter me sustentado todos os dias e me dado forças para continuar a caminhada mesmo quando eu julgava impossível.

Aos meus pais por todos esses anos de dedicação e amor. À minha mãezinha querida, que sempre me incentivou a buscar lugares maiores e a confiar eu Deus. Suas orações me sustentaram até aqui e continuarão sustentando. Agradeço por ser meu grande exemplo de mulher forte, dedicada e temente ao Senhor. Ao meu pai, por sempre ser meu orgulho acadêmico. Sua dedicação ao ensino me inspirou a começar minha vida de estudos. À minha irmã, que sempre me incentivou e é uma amiga pra vida toda, mesmo eu não sendo a irmã mais carinhosa do mundo o seu amor transborda por nós duas.

Aos meus parentes que mesmo distantes sempre torceram pelo meu sucesso e contribuíram de algum modo para a concretização dessa etapa da minha vida, seja com ajuda financeira, uma palavra amiga ou com orações. Agradeço em especial pela minha vó Nadir, e pela outra vó do coração, tia Ilda, vocês possuem os corações mais generosos dessa terra.

Às minhas queridas amigas da faculdade, obrigada por tornarem esses anos da faculdade em dias melhores. Obrigada pelo apoio nas horas do estudo e também de diversão, Amanda, Nathalia e Wênia vocês são os melhores presentes que a universidade me deu. Muito obrigada Thais pela parceria no laboratório, não sei o que teria feito sem sua ajuda.

Aos amigos da igreja, só posso agradecer a Deus mais uma vez pela vida de vocês. Obrigada por me incentivarem a estar mais perto da comunhão da igreja. Agradeço a Emely por ter me aturado todo esse tempo, acho que sobrevivemos muito bem a esses três anos e meio.

À professora Maricy Bonfá meus mais sinceros agradecimentos por sua enorme paciência e zelo. Muito obrigada por seu interesse genuíno por cada um de nós, seus alunos desempenhando mais do que sua função de orientadora. Sua dedicação a tudo que faz é inspiradora e o fato de que continua a lutar pelo ensino público de qualidade me dá coragem a continuar acreditando que podemos ter um futuro melhor. Ao professor Rodrigo Pereira, agradeço pelo apoio e ensino ao longo dos anos, tanto em sala de aula como na empresa júnior.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para minha caminhada como estudante e como pessoa. Jamais estaria aqui sem a contribuição de vocês e peço que o Senhor cuide da vida de cada um. Contem sempre com minhas orações.

## 1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia estuda a aplicação de organismos e de sistemas biológicos na produção de bens e serviços. Os microrganismos são um dos maiores aliados da produção biotecnológica sendo responsáveis por gerar grande parte dos produtos consumidos pela sociedade.

O Brasil tem um grande potencial para obter esses organismos. Já que considerado uma nação megadiversa, devido ao seu imenso espaço territorial abriga diferentes espécies, organismos, climas, biomas – incluindo o bioma Cerrado. Entretanto, se faz necessário mais pesquisas que explorem o potencial biotecnológico dessa megadiversidade. Portanto, necessário é de extrema importância um maior levantamento a respeito dos microrganismos existentes e suas possíveis aplicações. Nesse sentido, a bioprospecção é uma ferramenta que permite a obtenção de organismos do ambiente que tenham potencial econômico e, eventualmente, levam ao desenvolvimento de um produto.

O bioma do cerrado, é reconhecido como um local de ampla biodiversidade sendo classificado como uma das regiões de maior diversidade do mundo (SILVA E BATES, 2002). Desse modo, é grande a possibilidade de prospecção de diferentes espécies de bactérias, dentre elas, aquelas com capacidade de produção de biopolímeros e enzimas.

A cidade de Bonito, localizada no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, está integrada ao complexo turístico do Parque Nacional da Serra da Bodoquena. Essa região possui como vegetação dominante o cerrado e seus rios pertencem à bacia do rio Paraguai. Nessa região, os rios tem como característica a transparência cristalina de suas águas, que são originárias principalmente de rochas calcárias (SILVA e FONSECA, 2018). Apesar de sua importância como reservatório de várias espécies, o conhecimento sobre sua microbiota com potencial biotecnológico é muito limitado. Até o presente momento, nenhum artigo a respeito de bioprospecção de bactérias de água doce, com potencial de produção biotecnológica foi publicado na região de Bonito, MS.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Produção de Bioprodutos por bactérias

Os microrganismos são fundamentais para a existência do mundo como conhecemos. Esses organismos microscópicos possuem diversas aplicações, seja na manutenção do equilíbrio dos organismos vivos ou na geração de produtos. Com a demanda diária cada vez maior por produtos e bens de serviços e uma maior preocupação em relação ao meio ambiente, o uso dos microrganismos se apresenta como uma boa alternativa para os problemas de consumo desenfreado de matéria prima não renovável e acúmulo de lixo.

Dentre as diversas aplicações, pode-se destacar a área industrial, na qual os microrganismos são usados na síntese de produtos químicos como vitaminas, ácidos orgânicos, enzimas, biopolímeros, álcoois e fármacos. São também bastante importantes na indústria de alimentos, que os utiliza para produção de vinagre, bebidas alcoólicas, azeitonas verdes, molhos, queijos, iogurte e pão, por exemplo (TORTORA, 2012).

Uma área de bastante interesse comercial é o de produção enzimática. As enzimas são um dos grupos de produtos biológicos mais importantes, pois são utilizadas em várias etapas de processos industriais, especialmente na área de biotecnologia ambiental, industrial e de alimentos (FERNANDES, 2009). Os microrganismos podem ser manipulados geneticamente de modo que passem a produzir substâncias que normalmente não sintetizariam. Estas substâncias incluem a celulose, digestivos e compostos para limpeza de tubulações, além de substâncias de grande importância terapêutica como a insulina (TORTORA, 2012).

Outro exemplo de utilização enzimática são as amilases. Estas são aplicadas em processos de hidrólise do amido para produção, entre outras coisas, de biocombustíveis a partir de fontes vegetais. As xilanases são essenciais para a indústria de papel e celulose durante o branqueamento do papel sem a necessidade de utilização de compostos clorados.

Além das enzimas, outro importante bioproduto são os biopolímeros. Muitos microrganismos podem armazenar inclusões intracelulares inorgânicas e / ou orgânicas denominadas polihidroxialcanoatos (PHA). Esses compostos, quando em grande quantidade, são uma alternativa aos polímeros de origem fóssil, sendo assim mais sustentáveis do ponto de vista ambiental (POLI, 2011).

## **2.2. Bioprospecção de Microrganismos de Água Doce**

Apesar de haver um interesse econômico, social e ambiental cada vez maior a respeito da preservação e importância da água doce, esses ecossistemas são muito menos pesquisados que outros ecossistemas como o terrestre e marinho. Menos de 10% dos dados de limnologia são focados em vírus, bactérias, fungos e protistas e seus processos metabólicos em águas doces (DEBROAS, 2009). Os bio-recursos nos ecossistemas de água doce são amplamente inexplorados, especialmente no campo da microbiologia (ZOTHANPUIA, 2018).

A despeito de despertarem menor interesse de estudo, os ecossistemas de água doce se apresentam como uma área promissora para a obtenção de microrganismos de interesse comercial. Zothanpuia e colaboradores (2018) conseguiram isolar actinomicetos de água doce com potencial para produção de compostos antimicrobianos. Silva e Fonseca (2018), bioprospectaram diferentes espécies de microalgas de água doce em Bonito, MS.

Porém, não há registros na literatura de bioprospecção de microrganismos com potencial biotecnológico em ambiente de água doce de Bonito, MS, onde foram coletadas as amostras deste estudo.

## **2.3. Biopolímeros**

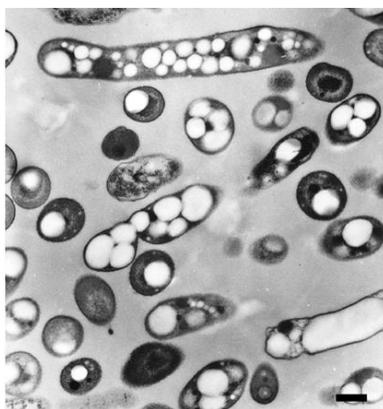
Ao longo dos anos o acúmulo de resíduos plásticos tem se tornando um sério problema ambiental. Esses polímeros provenientes de fonte de petróleo possuem como características principais grande durabilidade, fácil manipulação e baixo custo o que os tornam de grande interesse industrial, entretanto, por essas mesmas razões seu descarte ocorre na grande maioria das vezes de forma inadequada gerando grande acúmulo de materiais não degradáveis.

Esse tipo de resíduo quando no ambiente, sofre apenas degradação mecânica, gerando a fragmentação desse material até tamanhos minúsculos (<5 mm), os chamados microplásticos, que podem ser encontrados em praticamente todos os ambientes naturais (ARAÚJO e SILVA-CAVALCANTI, 2016). Eles são um poluente único e potencialmente acumulável no ecossistema marinho que compromete a capacidade dos oceanos já estressados de fornecer serviços essenciais ao ecossistema que sustentam a vida em terra (ANDRADY, 2017). No cenário nacional, o Brasil apresenta apenas 1 % de reciclagem do material plástico pós-consumo. Dos

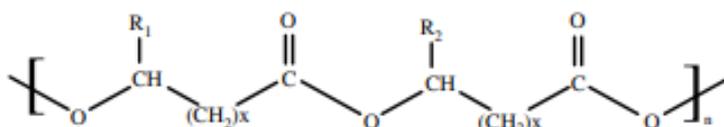
6,2 milhões de toneladas de produto gerado somente 615 mil recebe uma destinação correta (ABIPLAST, 2018).

Diante disso, outras fontes têm sido utilizadas. Os bioplásticos surgiram como uma alternativa aos plásticos derivados de petróleo, que ao contrário desses são produzidos a partir de fontes renováveis e apresentam biodegradação (DELGADO e CORDOBA, 2015). Polímeros biodegradáveis, ou biopolímeros, são aqueles polímeros nos quais a degradação resulta da ação de microrganismos de ocorrência natural como bactérias, fungos e algas, podendo ser degradados ou decompostos em semanas ou meses sob condições adequadas. A origem desses biopolímeros pode ser diversa como fontes naturais renováveis (milho, celulose, batata, cana-de-açúcar), ou sintetizados por bactérias (BRITO, 2011).

Dentre os biopolímeros estão os polihidroxicanoatos endocelulares (PHAs), que são uma família de poliésteres compostos de ácidos graxos que são biossintetizados e armazenados no citoplasma de alguns microrganismos como inclusões lipídicas de geralmente 0,2 – 0,5 µm de diâmetro (Figura 01) (SUDESH, 2000). Sua estrutura é composta de poliésteres lineares de 3, 4, 5 e 6-hidroxiácidos (Figura 02).



**Figura 01.** Grânulos de PHA no interior de *Rastonia eutropha*. **Fonte:** TIAN, 2004.

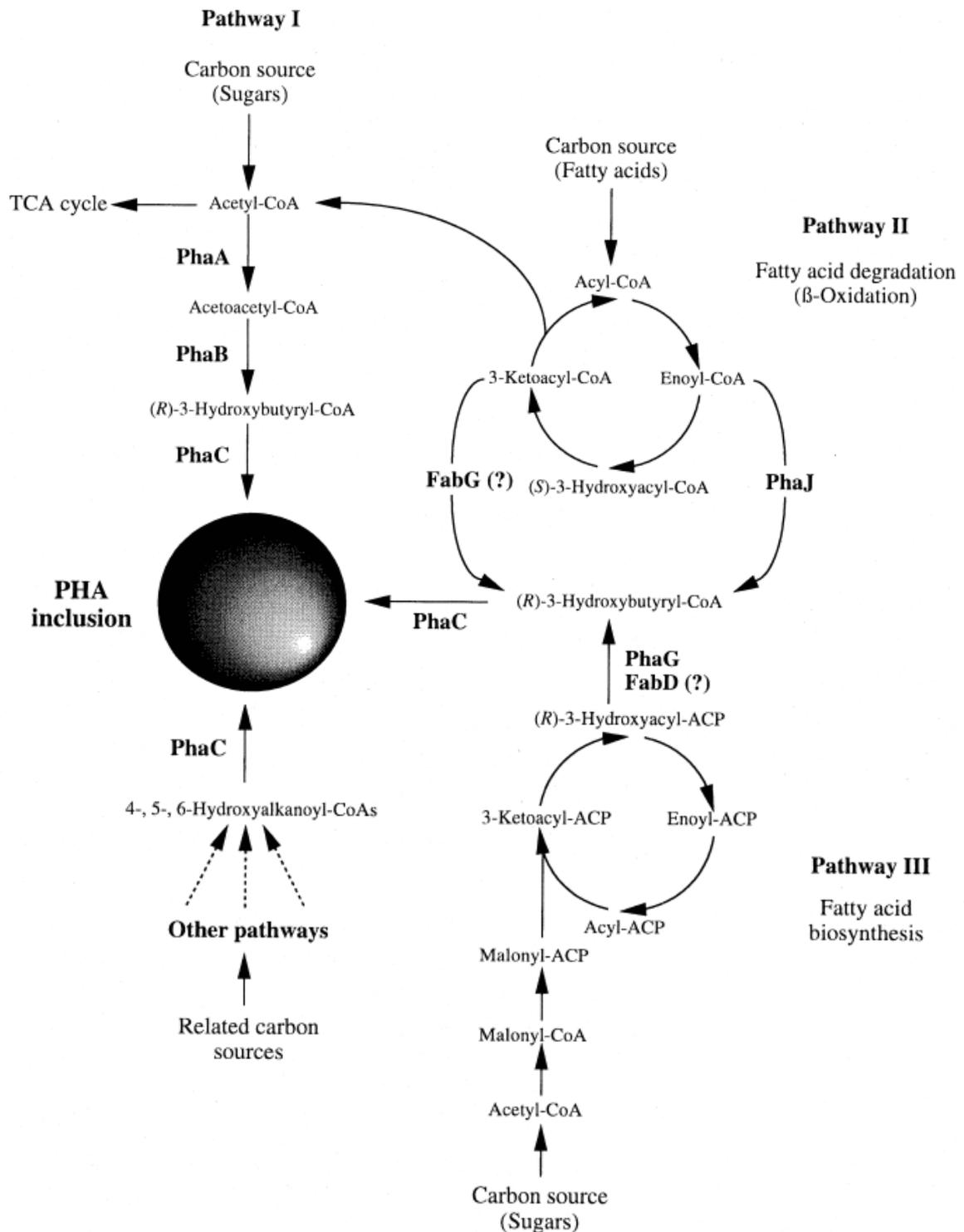


**Figura 02.** Estrutura geral dos polihidroxicanoatos. R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> = grupos alquila; x = 1 – 4; n = 100 – 30000. **Fonte:** PHILIP, 2007.

Esses biopolímeros são geralmente encontrados em microrganismos isolados de um ambiente natural e pobre em fontes de nutrientes, provenientes do solo ou da água de nascentes (POLI, 2011). As bactérias envolvidas na produção de PHA podem compor dois grupos distintos. No primeiro, estão as bactérias que só acumulam biopolímeros se houver limitação de um nutriente e a produção do PHA não ocorre durante o crescimento celular. Já o segundo grupo é composto das bactérias que não precisam de um limitante e acumulam PHA durante a fase de crescimento (RAZA et al., 2018).

São conhecidos três tipos de PHA, que variam de acordo com o comprimento da cadeia lateral, são estes: PHA scl (comprimento da cadeia curta), PHA mcl (comprimento da cadeia média) e PHA lcl (comprimento da cadeia longa), onde a cadeia lateral alquil varia de 1 a 14 carbonos (SUDESH, 2000; DELGADO, 2015). A síntese dos PHAs pode ocorrer por diferentes microrganismos e servem como reservas energéticas quando em presença de excesso de fonte de carbono ou restrição de um nutriente essencial. Quando carbono e energia são necessários, o PHA é normalmente despolimerizado em ácido D (-) - hidroxibutírico e depois metabolizado para acetoacetato e acetoacetyl-CoA (POLI, 2011).

O substrato utilizado para a síntese é importante, pois o PHA formado depende da fonte de carbono para a formação de monômeros e sua polimerização, duas etapas fundamentais do processo de biossíntese (PHILIP, 2007). A fonte de carbono pode dar origem a monômeros com estrutura idêntica a esse substrato e por isso são classificadas como fontes “relacionadas”, já as matérias que originam monômeros completamente diferentes de sua estrutura são chamadas de “não relacionadas”. A diferença na assimilação dessas fontes de carbono pode ser compreendida pelas diferentes vias metabólicas que operam no microrganismo (PHILIP, 2007). São três as vias biossintéticas bem conhecidas para formação de PHA (Figura 03).



**Figura 03.** Vias da biossíntese de PHA. **Fonte:** SUDESH, 2000.

A via I usada por *Rasltonia eutopha* é a mais conhecida entre as vias biossintéticas do PHA. Nesta via, duas porções de acetil-CoA são condensadas em acetoacetil-CoA por uma b-cetotiolase (PhaA). O produto sofre então uma redução

por uma redutase dependente de NADPH (PhaB), que produz o isômero (R)-3-hidroxi-butiril-CoA. Finalmente, a enzima PHA sintase catalisa a polimerização via esterificação de 3-hidroxi-butiril-CoA em poli (3-hidroxi-butirato) (P (3HB)) (SUDESH, 2000; PHILIP, 2007).

Devido às variações estruturais nos monômeros que constituem os PHAs, esses biopolímeros se diferem na composição química como homo ou copolímeros e também apresentam propriedades físicas distintas (DELGADO, 2015). Por exemplo, o poli(3-hidroxi-butirato) ou PHB, um tipo de PHA, é comparável ao polipropileno (PP) em temperatura de fusão, cristalinidade, força de tensão (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002), além de também mostrar boa resistência à umidade e adquirir excelentes propriedades de barreira aos gases.

Os PHAs são insolúveis em água, apresentam boa resistência ao ataque hidrolítico, são resistentes aos raios UV, características interessantes do ponto de vista comercial, porém afundam na água, facilitando a biodegradação anaeróbica em sedimentos (RAZA, 2018). Os polihidroxi-alcanoatos possuem uma grande capacidade de serem degradados sob condições aeróbicas e anaeróbicas, por meios térmicos ou por hidrólise enzimática. Em um sistema biológico, os PHAs podem ser degradados usando despolimerases microbianas, bem como por hidrólise não enzimática e enzimática em tecidos animais (PHILIP, 2007).

Graças a sua compatibilidade, fácil degradação e menor impacto ambiental, os PHAs têm sido amplamente utilizados em diferentes setores (RAZA, 2018). Na área industrial o PHA látex pode ser usado para criar superfícies resistentes à água (LAUZIER et al, 1993), a empresa alemã Biomer produz P (3HB) em larga escala. usando para fabricação de artigos comerciais como pentes, canetas e balas de borracha, também os grânulos de polímero são vendidos comercialmente (CHEN, 2005).

Os polímeros de PHAs também podem ser utilizados como biocombustíveis através da técnica de esterificação de metila, síntese de dispositivos médicos e farmacêuticos e possuem muitas outras aplicações como: engenharia de tecidos, aplicações cirúrgicas, bio-implantes (RAZA, 2018).

## 2.4. Enzimas microbianas

As enzimas são catalizadoras das reações que ocorrem nos sistemas biológicos. A função do catalisador é aumentar a velocidade de uma reação, tendo um grau de especificidade por seus substratos (NELSON, 2014).

Os microrganismos apresentam características desejáveis em relação a produção industrial de enzimas em relação a fontes vegetais e animais. Apresentam grande variedade da atividade catalítica, possuem baixo custo de produção, o cultivo pode ser feito em pouco tempo e em grande escala, o bioprocessamento independe das variações climáticas ambientais e espaço geográfico e há menor gasto com matéria prima (ZIMMER, et al., 2009).

Os microrganismos com potencial para produção enzimática podem ser selecionados pelo uso de meios líquidos ou sólidos. Também deve-se considerar o rendimento na produção da enzima, a facilidade no cultivo e se aquele organismo apresenta o status GRAS (geralmente reconhecido como seguro) (FERNANDES, 2009; HASAN et al., 2005).

Em relação a geração de capital, a indústria enzimática possui um gigantesco mercado financeiro. O estudo conduzido pela *Freedonia Group Incorporated*, "Word Enzyme to 2009", mostrou que a indústria mundial de enzimas faturou um total de US\$ 3,7 bilhões em 2004, com uma previsão de crescimento da demanda de 6,5% ao ano até 2009, com projeção para o mercado norte americano no ano de 2012 de aproximadamente US\$ 2,5 bilhões em demanda por enzimas (MONTEIRO e SILVA, 2009). O mercado externo brasileiro foi avaliado no ano de 2005 em 147,2 milhões de dólares, correspondendo a 3,7% do mercado internacional (ZIMMER, 2009).

As enzimas possuem diversas funções na indústria, não apenas restrita a despolimerização de um produto como o amido, por exemplo, mas como também de outros carboidratos complexos como a celulose e xilana, e são mais facilmente obtidas de microrganismos como fungos e bactérias (GONÇALVES, 2019). Dentre as enzimas de importância industrial podemos destacar a amilase e a xilanase, devido as suas amplas aplicabilidades.

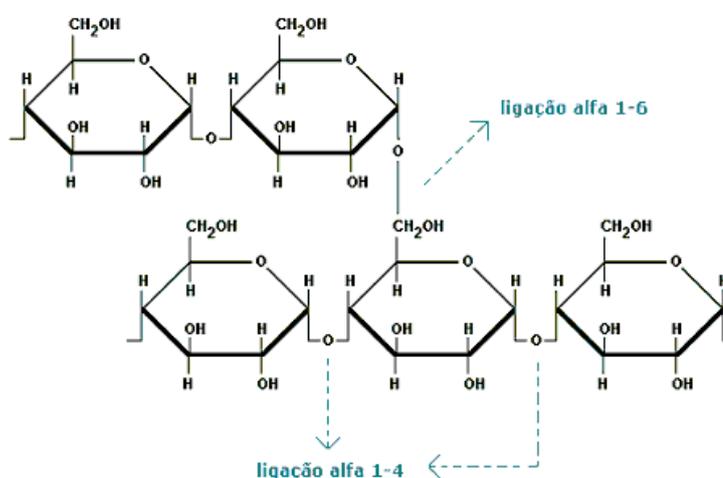
## 2.5. Amilases

As amilases são enzimas que hidrolisam a molécula de amido gerando pequenos polímeros provenientes das unidades de glicose e obtendo-se outros

diversos produtos. Essas enzimas catalisam a hidrólise do amido em oligossacarídeos curtos através da clivagem das ligações  $\alpha$ -D1, 4 glicosídicas (GUPTA et al., 2003).

Hoje em dia, as amilases são de maior interesse devido a suas potenciais aplicações comerciais, como liquefação de amido, fabricação de cerveja, dimensionamento de indústrias têxteis, indústrias de papel e detergente. No entanto, a aplicação da amilase é expandida para campos médicos, clínicos e químicos analíticos, envolvidos na formulação de loções, pomadas, produção de biopolímeros, como suturas cirúrgicas e sistemas controlados de administração de medicamentos (FERNANDES, 2009).

O amido, principal carboidrato de reserva das plantas, é constituído por uma mistura de polímeros de  $\alpha$ -glicose unidos por ligações glicosídicas, a amilose e a amilopectina (Figura 04). Enzimas capazes de quebrar as ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 da amilose e amilopectina, permitem a formação de compostos de baixa massa molecular, como glicose, maltose e dextrinas, utilizados em indústrias de alimentos (bebidas, panificação, confeitaria, sorvetes, etc) e de álcool combustível (DAMODARAN et al.; 2010).

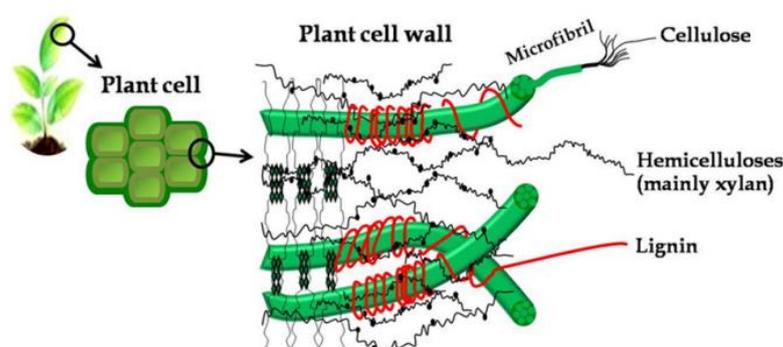


**Figura 04.** Estrutura Molecular do Amido. **Fonte:** UNESP Bioquímica de alimentos.

A principal vantagem do uso de microrganismos para a produção das amilases é a capacidade econômica de produção em massa e a fácil manipulação desses organismos para obter enzimas com as características desejadas. A  $\alpha$ -amilase tem sido obtida de vários fungos, leveduras, bactérias e actinomicetos, no entanto, enzimas de fontes fúngicas e bacterianas dominam aplicações em setores industriais (GUPTA et al., 2003).

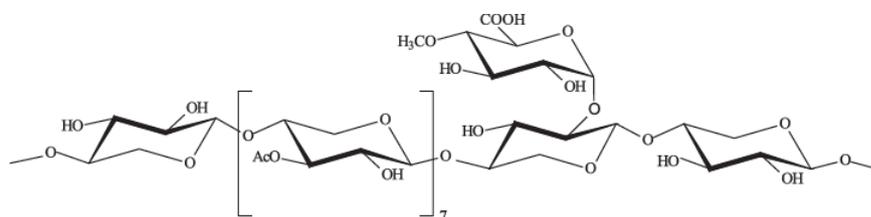
## 2.6. Xilanases

As hemiceluloses são uma classe heteropolissacarídicos ramificados que representam de 15 a 30% da biomassa vegetal (Figura 05) e tem como função unir quimicamente a celulose e a lignina. São formadas principalmente por pentoses (xilose, raminose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose), ácidos urônicos e radicais acetila (GIRIO et al., 2010).



**Figura 05.** Estrutura da biomassa vegetal lignocelulósicas. **Fonte:** RATANAKHANOKCHAI, 2013.

As hemiceluloses mais relevantes são as xilanas e glucomanos, sendo as xilanas as mais abundantes. As xilanas (Figura 6) são os principais componentes da hemicelulose das paredes celulares secundárias, constituindo cerca de 20 a 30% da biomassa de madeiras duras e plantas herbáceas (GIRIO et al., 2010).



**Figura 06.** Estrutura química parcial das xilanas. **Fonte:** Palmeiras et al., 2010.

As xilanases representam uma classe de enzimas responsáveis pela hidrólise completa do polissacarídeo linear  $\beta$ -1,4-xilana em compostos mais simples, compostos principalmente por xilose, quebrando assim a hemicelulose (BURLACU et al., 2016).

As xilanases são as enzimas que mais se destacam na indústria de papel e celulose e possuem grande aplicação desde a década de 1980. São empregadas nas indústrias de papel, como auxiliares no branqueamento de polpas Kraft; uso na indústria alimentícia, na fabricação de pães de melhor qualidade; no processamento de sucos, frutas e vegetais, visando à clarificação de sucos e vinhos; assim como, na etapa da filtração da cerveja (BECKER et al., 2009).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Gerais**

- Bioprospectar bactérias com potencial biotecnológico de amostras de água do Rio Mimoso localizado no município de Bonito-MS.

#### **3.2. Específicos**

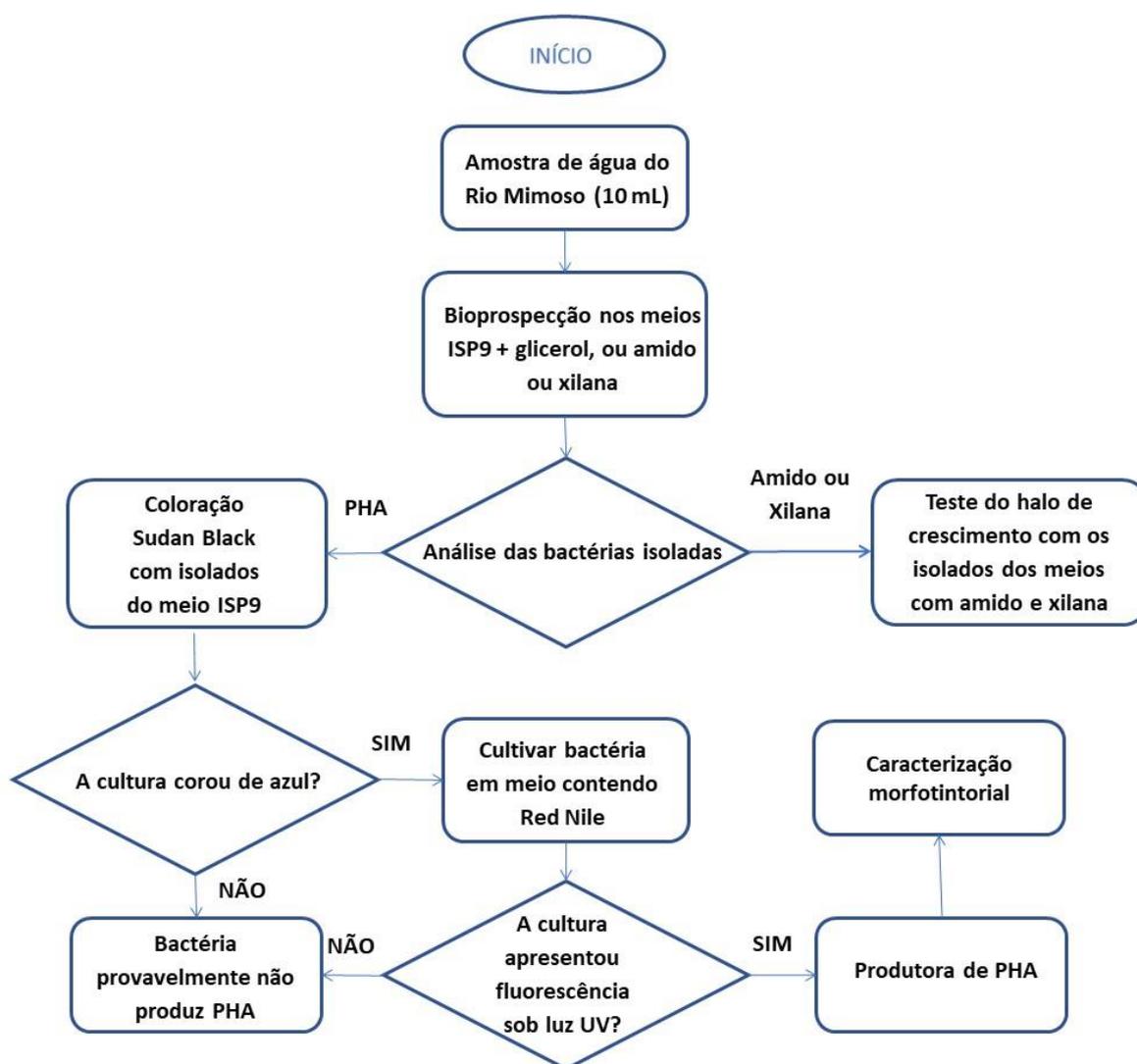
- Isolar bactérias com capacidade de produção de polihidroxialcanoatos (PHA) em meio com excesso de fonte de carbono;
- Isolar bactérias com capacidade de produção da enzima amilase;
- Isolar bactérias com capacidade de produção da enzima xilanase.

### **4. HIPÓTESE**

Existem bactérias com o potencial de produção de polihidroxialcanoatos (PHA), amilase e xilanase em amostras de água provenientes do Rio Mimoso em Bonito, MS.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

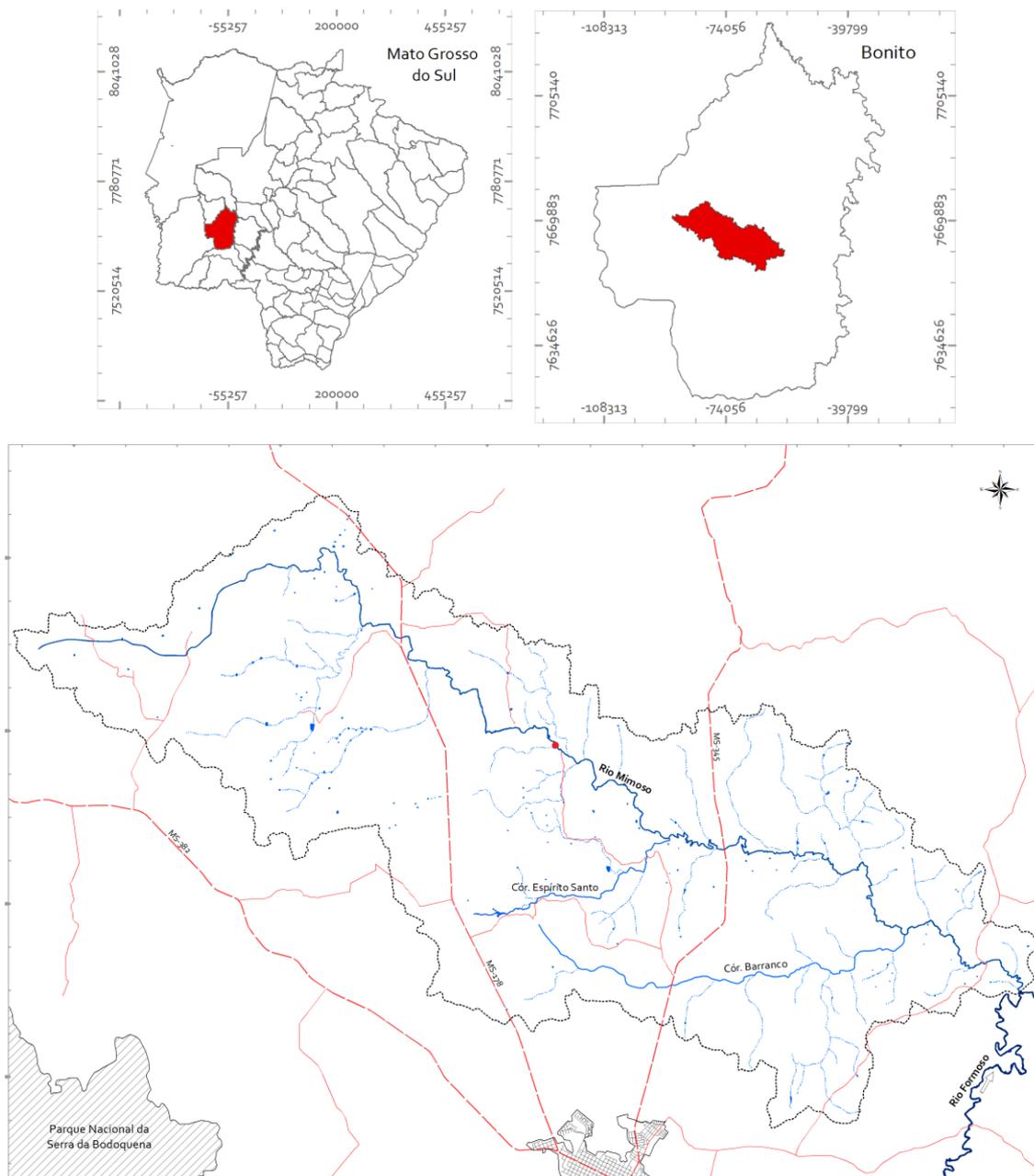
Os experimentos do presente trabalho foram realizados conforme o fluxograma abaixo (Figura 07).



**Figura 07.** Fluxograma dos experimentos.

### 5.2. Coleta da Amostra

As amostras de água utilizadas para o isolamento das bactérias nesse estudo foram coletadas no Rio Mimoso, localizado à 25 km de Bonito, MS, entre as coordenadas 20°58'23,517"S e 56°32'44,328"W (Figura 08). A coleta foi realizada em outubro de 2018.



**Figura 8.** Localização Geográfica do Rio Mimoso. **Fonte:** Adaptada de MEDEIROS; BEREZUK; SILVA, 2019.

### 5.3. Bioprospecção de Bactérias

Para a seleção de bactérias produtoras de biopolímeros, utilizou-se o meio de cultivo ISP9 na composição de:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – macronutrientes;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – micronutrientes. A fonte de carbono utilizada neste meio foi glicerol 2%.

Foram pesados 13,2 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 28,25 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e 11,9 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Cada um dos sais foi diluído, separadamente, em 200 mL de água destilada, esterilizados por autoclavagem a 121°C por 20 minutos e armazenados em geladeira.

A solução micronutriente foi composta por 0,64 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,11 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,79 g de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Os sais foram diluídos, juntos, em 100 mL de água destilada, esterilizados por autoclavagem a 121 °C por 20 minutos e devidamente armazenados.

Para o preparo de 200 mL de meio de cultivo foram utilizados: 168 mL de água estéril; 8 mL de cada sal (macronutrientes); 0,2 mL de solução micronutriente; 4,76 mL de glicerol; 1,36 g de extrato de levedura. Para meio sólido foram adicionados 4 g de ágar bacteriológico (2% do volume final de meio).

Para a seleção de bactérias produtoras de xilanase utilizou-se o meio mínimo de sais contendo xilana como única fonte de carbono: xilana beechwood Sigma 2,0 g; extrato de levedura 0,5 g;  $\text{NaNO}_3$  0,5 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,0 g;  $\text{FeSO}_4$  0,01 g; ágar bacteriológico 15 g.

Para selecionar bactérias produtoras de amilase, também se utilizou o meio mínimo de sais, acima citado, porém a fonte de carbono utilizada foi a xilana. O pH de ambos os meios foi ajustado para 7,0 antes da adição do ágar, e então foram autoclavados a 121°C por 20 minutos.

#### **5.4. Isolamento e Seleção de Bactérias**

Para o isolamento das bactérias, 10 mL da amostra de água foram adicionadas em frascos Erlenmeyer contendo 90 mL de solução salina ( $\text{NaCl}$ , 0,9%) esterilizada, os frascos foram agitados em agitador orbital *shaker* a 300 rpm durante 30 minutos. Realizou-se diluições seriadas da suspensão da amostra e 100  $\mu\text{L}$  das diluições  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  foram inoculadas pelo método de espalhamento em superfície em placas de Petri com os meios ISP9 com 2% de glicerina como fonte de carbono, e em placas de Petri com meio mínimo e contendo amido ou xilana como fontes de carbono.

A cada 1 litro de meio seletivo foram adicionados 3 mL de solução fluconazol 0,01g/mL para evitar o crescimento de outros microrganismos indesejados como os fungos.

As placas foram incubadas pelo período de 48 horas em incubadora BOD à temperatura de 30 °C. Após o crescimento, as colônias foram estriadas por esgotamento para a obtenção de colônia isoladas puras.

### 5.5. Teste de Halo de Crescimento: Xilanase e Amilase

A determinação do potencial enzimático das bactérias isoladas dos meios mínimos de amido e xilana, respectivamente, ocorreu pelo método qualitativo *cup plate* (DINGLE et. al, 1953). Nessa técnica, com o auxílio de uma alça estéril, uma colônia isolada é aplicada no centro da placa de petri contendo o meio específico. Desse modo, a colônia crescerá em apenas um ponto específico da placa.

Os isolados foram repicados nos meios mínimos com amido e xilana, respectivamente, e incubados em BOD à 30 °C por 24, 48, 72 horas. Recobriu-se as placas com solução lugol (2,0 g KI e 1,0 g de iodo em 300 ml de água) por 10 segundos até os halos de degradação ao redor das colônias se evidenciarem. O teste foi realizado em triplicata.

A determinação do potencial enzimático foi encontrada através do cálculo do Índice Enzimático (IE) que mede a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia.

$$IE = \frac{\text{Diâmetro halo}}{\text{Diâmetro colônia}}$$

Segundo este método os isolados que obtiverem maior IE nos meios de cultivo, são os que possuem maior atividade enzimática. A colônia que apresentar um índice maior que 2,0 mm pode ser considerada como uma boa produtora enzimática (OLIVEIRA et al., 2006).

### 5.6. Screening de Produção de PHA

#### 5.6.1. Coloração com Sudan Black

Para verificar o acúmulo de lipídeos utilizou-se a metodologia de Schlegel e colaboradores (1970) modificada. Corou-se as colônias isoladas com uma solução do corante 0,02% “Sudan Black B” dissolvido em etanol 96%. Recobriu-se a placa com a solução de “Sudan Black B” por 15 min. O corante foi despejado da placa até o completo esgotamento da solução. Em seguida recobriu-se a placa com a solução descorante etanol 96% por 5 min. Por fim, retirou-se a solução da placa. A bactéria

positiva para o acúmulo de polímeros permanece azul pois não é descorada pela solução de etanol.

### **5.6.2. Coloração com Nile Red**

Foi adicionado 1 µl de Nile Red (25 µg.ml<sup>-1</sup>) a cada mL de meio de cultura. A avaliação da produção e do acúmulo de PHA foi feita pela detecção de fluorescência sob luz U.V. em fotodocumentador (Loccus). As placas de ágar foram expostas à luz ultravioleta após períodos de cultivo apropriados para detectar o acúmulo de PHAs (SPIEKERMANN et al., 1999).

### **5.6.3. Caracterização Morfotintorial e Bioquímica**

Após o crescimento de colônias puras, foi realizada a caracterização morfotintorial e bioquímica das bactérias, através de coloração de Gram, testes de KOH, catalase e/ou oxidase.

#### **5.5.3.1 Teste de Gram**

Esse teste teve por objetivo a identificação morfológica inicial das bactérias. O método de coloração de Gram constitui na fixação de corantes nas bactérias para classificá-las em Gram-positivos e Gram-negativos (TORTORA, 2012). Diferenças nas estruturas da parede celular das bactérias afetam a retenção ou a liberação do complexo formado pelo corante cristal violeta e iodo.

As bactérias Gram-positivas possuem uma parede celular de peptidoglicano (dissacarídeos e aminoácidos) mais espessa que as bactérias Gram-negativas, por isso, retêm o corante permanecendo da cor purpura. Já as bactérias Gram-negativas contêm uma camada de lipopolissacarídeo (lipídeos e polissacarídeos) como componentes de sua parede celular, que é removida durante a lavagem com álcool, perdendo a coloração inicialmente conferida pelo complexo cristal violeta e iodo ficando incolor até serem novamente coradas de rosa pelo corante safranina. (TORTORA, 2012).

A coloração de Gram foi realizada em bactérias com crescimento máximo de 48 horas conforme a indicação do fabricante do kit utilizado (Laborclin), sendo realizado esfregaço das bactérias estudadas, uma a uma. O esfregaço foi coberto por

crystal violet por de 30 a 60 segundos, logo após foi aplicada à lâmina solução de lugol pelo período de 60 segundos. Após, a lâmina foi lavada com solução descolorante composta por etanol e acetona, por aproximadamente 15 segundos ou até que o corante parasse de desprender-se. A lâmina foi lavada com água destilada e por último foi aplicada fucsina, que agiu por 30 segundos, em seguida foi lavada com água destilada até que o excesso fosse retirado, e lâmina foi avaliada após secagem. A visualização foi feita em microscópio óptico, utilizando a lente objetiva de 100 vezes, para isso foi necessário a aplicação de uma gota de óleo de imersão sobre o esfregaço. As colônias que apresentavam coloração rosa ou avermelhada foram consideradas bactérias Gram negativas, e as que apresentaram coloração roxa ou azulada, Gram positivas (figura 09).



**Figura 9.** Diferenças de coloração das bactérias. **Fonte:** Mariana Bulhões

A imagem da esquerda corresponde a Gram-negativas e a da direita corresponde as bactérias Gram-positivas.

#### 5.6.3.2. Teste de KOH

Para a confirmação do teste de Gram, quando o resultado foi inconclusivo, realizou-se o teste de KOH. Com auxílio de uma alça bacteriológica foi realizado um esfregaço das bactérias isolados em lâmina de vidro, e uma gota da solução de KOH na concentração de 3 M foi adicionada sobre a lâmina. Ainda com o auxílio da alça, a solução foi homogeneizada e, no caso de surgimento de uma mistura viscosa e pegajosa, o resultado foi interpretado como Gram-negativo

#### 5.6.3.3. Teste de Catalase

Com o auxílio da alça bacteriológica foi realizado um esfregaço de uma colônia isolada em uma lâmina de vidro até sua fixação. Então, sobre o esfregaço, uma gota

de água oxigenada ( $H_2O_2$  3%) foi adicionada e observou-se a formação de bolhas provenientes da reação de oxidação da água em  $H_2O + O_2$ . (ANVISA, 2016). O surgimento de bolhas significa resultado positivo e o não surgimento, resultado negativo. Esse teste é utilizado para a distinção dentre as bactérias Gram-positivas.

#### **5.6.3.4. Teste de Oxidase**

Essa etapa auxilia o processo de identificação de bactérias Gram-negativas. Usando uma alça bacteriológica em platina, uma ou duas colônias da bactéria são transferidas e emulsionadas sobre a superfície da tira de oxidase (Laborclin). Observar o resultado em até 2 minutos: o desenvolvimento de uma coloração violeta caracteriza a prova da oxidase positiva.

### **5.7. Preservação dos isolados**

As bactérias isoladas e caracterizadas foram preservadas em microtubos criogênicos em glicerol estéril 20% (BAATI, 2000). As bactérias foram, anteriormente, inoculadas com auxílio de alça de platina e cultivadas em frascos Erlenmeyers de 125 ml contendo meio líquido e incubadas agitador orbital tipo *shaker* 100 rpm (Nova Técnica) por 24 horas à 30 °C. Após crescimento da biomassa, alíquotas de 0,8 ml do meio líquido foram adicionadas ao tubo criogênico contendo 0,8 ml de glicerol 20% e armazenadas em freezer -20 °C.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1. Bioprospecção de Bactérias

Os seguintes isolados foram obtidos por meio do plaqueamento da amostra de água nos meios seletivos. Do meio seletivo ISP9 + glicerol 2%, específico para crescimento de bactérias produtoras de PHA, foi possível obter 10 isolados. Dos meios de cultivo seletivos contendo amido como fonte de carbono foram obtidos 10 isolados bacterianos e do meio contendo xilana como fonte de carbono foram obtidos 10 isolados bacterianos.

A escolha das colônias seguiu os seguintes parâmetros: diferença morfológica a olho nu (quanto a cor, textura, brilho), colônias isoladas (evitando a chance de que a colônia escolhida não esteja contaminada por colônias vizinhas. As bactérias escolhidas foram repicadas por esgotamento até obtenção de colônias puras e então cultivadas em tubo inclinado para sua preservação e uso posterior.

### 5.2. Índice enzimático

O teste de halo de crescimento foi realizado com as bactérias isoladas dos meios com amido e xilana como fonte de carbono, respectivamente, após 48 horas de crescimento. A atividade enzimática foi calculada a partir da razão entre os diâmetros dos halos e das colônias. A tabela 1 corresponde aos diâmetros dos halos e das colônias dos isolados do meio contendo amido como única fonte de carbono.

Das dez bactérias isoladas dos meios contendo amido como única fonte de carbono, sete apresentaram boas atividades enzimáticas e uma (Bnt.AM-04) obteve o índice enzimático inferior a 2,0 mm e, portanto, não deve ser considerada como potencial produtora enzimática, assim como os isolados Bnt.AM-05 e Bnt.AM-07, que não apresentaram atividade enzimática.

Conforme Oliveira e colaboradores (2006) e Lealem e Gashe (1994) os índices enzimáticos superiores a 2,0 mm são considerados bons valores para a produção enzimática daquela colônia.

**Tabela 01.** Atividade de amilase produzidos pelos isolados calculados a partir do diâmetro dos halos.

Isolados	Diâmetro do halo de degradação (mm)	Diâmetro do halo da colônia (mm)	IE
Bnt.AM-01	17,00	6,67	2,55
Bnt.AM-02	21,33	8,67	2,46
Bnt.AM-03	13,67	5,33	2,56
Bnt.AM-04	9,67	5,67	1,71
Bnt.AM-05	-	-	-
Bnt.AM-06	21,67	7,67	2,83
Bnt.AM-07	-	-	-
Bnt.AM-08	19,00	7,33	2,59
Bnt.AM-09	21,00	7,67	2,74
Bnt.AM-12	20,00	9,67	2,07

Os valores dos índices enzimáticos (IE) representam a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia.

A tabela 2 corresponde aos diâmetros dos halos e das colônias e ao Índice Enzimático dos isolados do meio contendo xilana como única fonte de carbono.

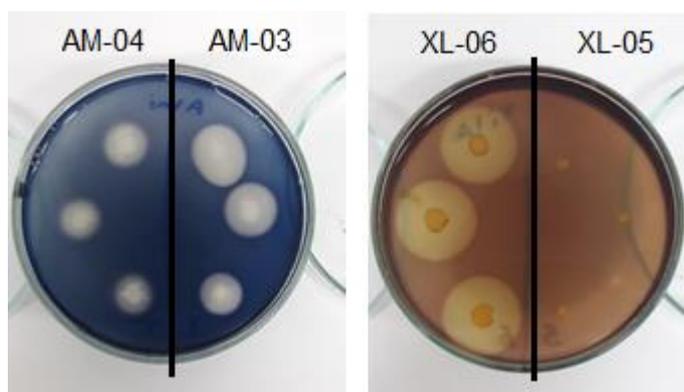
**Tabela 2.** Atividades de xilanase produzidos pelos isolados calculados a partir do diâmetro dos halos.

Isolados	Diâmetro do halo de degradação (mm)	Diâmetro do halo da colônia (mm)	IE
Bnt.XL-01	27,33	5,00	5,47
Bnt.XL-02	19,67	4,00	4,92
Bnt.XL-03	17,33	5,00	3,47
Bnt.XL-04	15,00	7,33	2,05
Bnt.XL-05	-	-	-
Bnt.XL-06	22,00	5,67	3,88
Bnt.XL-07	-	-	-
Bnt.XL-08	27,00	7,67	3,52
Bnt.XL-09	23,67	7,33	3,23
Bnt.XL-13	19,67	6,33	3,11

Os valores dos índices enzimáticos (IE) representam a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia.

Fernandes (2009), considerou como melhores potenciais para produção enzimática os isolados que obtiveram  $(IE) > 2,0$ , destacando *Penicillium verrucosum*  $IE=4,25$  mm e *Penicillium roqueforti*  $IE=2,83$  mm. Desse modo, os isolados Bnt.XL-01 e Bnt.XL-02 possuem excelentes desempenhos de produção pois apresentaram índices enzimáticos iguais a  $IE=5,47$  e  $IE=4,97$ , valores esses superiores aos índices considerados bons.

A figura 10 corresponde as fotos dos halos de amilase e xilanase obtidos após a adição do corante lugol.



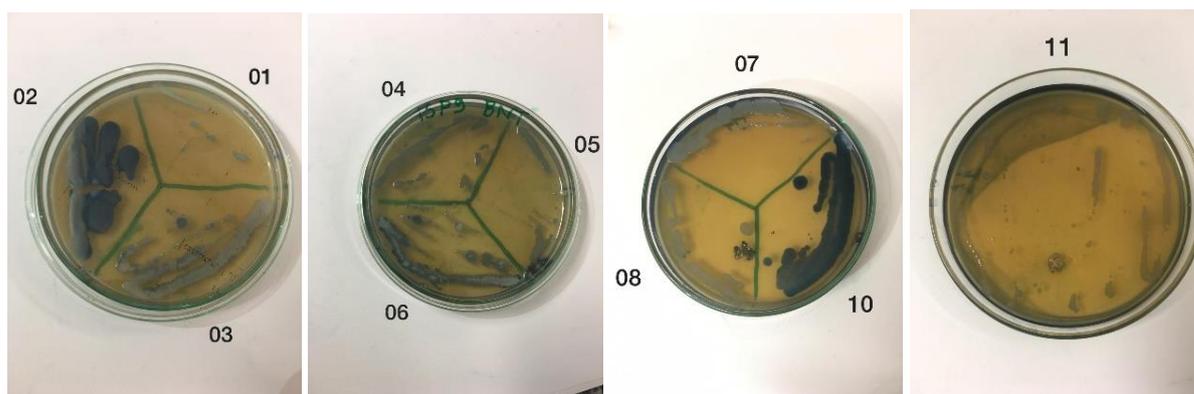
**Figura 10.** Teste de halo. **Fonte:** Mariana Bulhões  
A direita está o meio contendo xilana e a esquerda o meio com amido.

O índice de atividade enzimática (IE) é um dos parâmetros semiquantitativos mais usados para se avaliar a capacidade de produção de enzimas pelos microrganismos em meio sólido (OLIVEIRA et al, 2006).

## 6.2. Coloração com Sudan Black B

O *screening* inicial para o potencial de produção de PHA nas bactérias isoladas ocorreu pela adição do corante Sudan Black B 0,02%. Como resultado, todas as 10 colônias foram coradas de azul, indicando o potencial de acumulação de PHA, pelo fato dessa técnica não ser tão precisa para a detecção (LÍCIO, 2011) qualquer tom azulado foi considerado como resultado positivo (Figura 11).

Lício (2011) utilizou a técnica de detecção com Sudan Black B em 1520 isolados em meio sólido e obteve resultado positivo em 154 deles. Mesquita et al. (2015) compara a metodologia de Sudan Black B com a metodologia Nile Blue A e conclui que esse método é valioso para prever inclusões de armazenamento intracelular de PHA em bactérias.



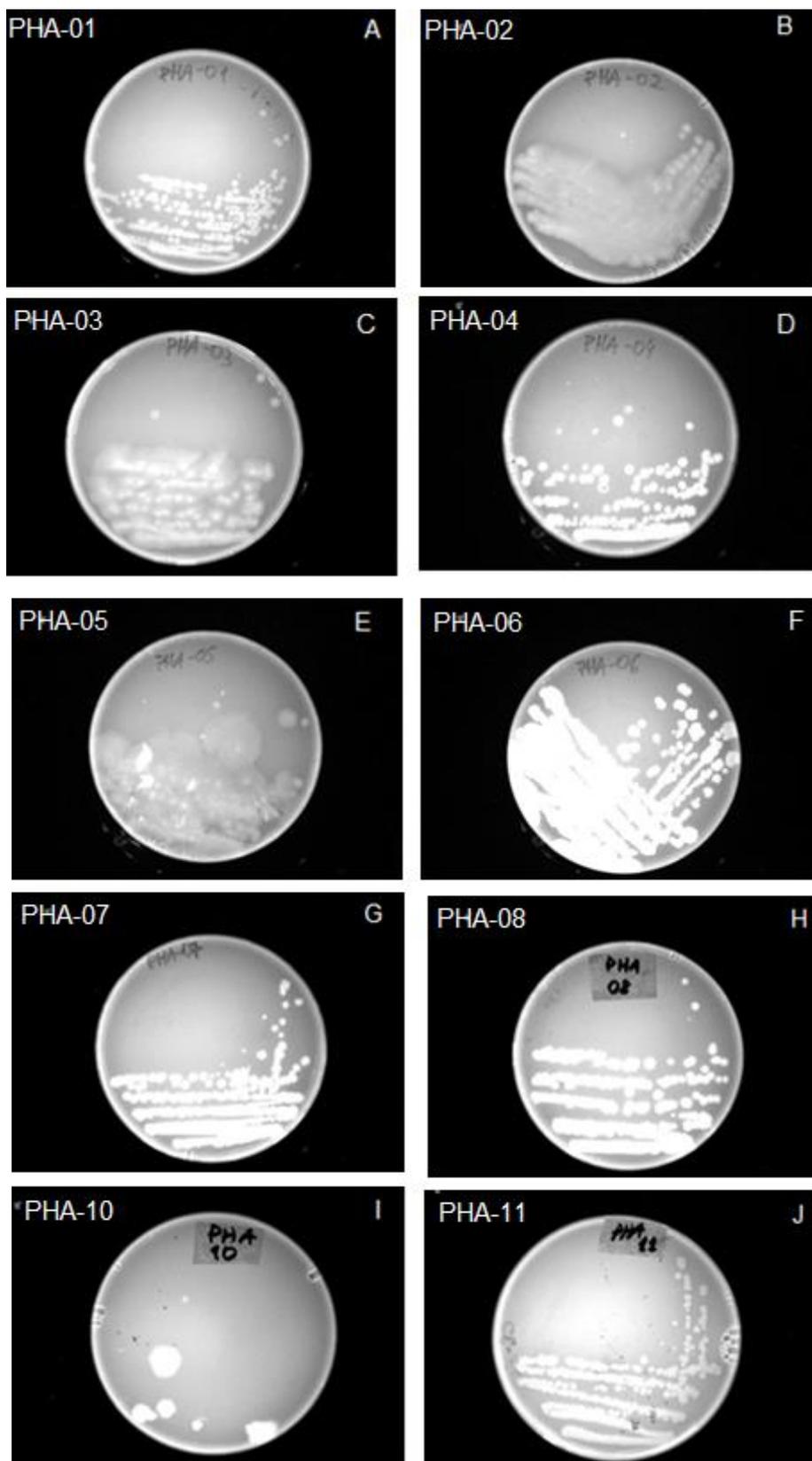
**Figura 11.** Cultivos após coloração com corante Sudan Black

#### 5.4. Coloração com Red Nile

Nesta técnica, o corante aplicado ao meio de cultivo se difunde no citoplasma bacteriano durante o crescimento celular e, conseqüentemente, cora as inclusões de PHA. Os isolados PHA-01, PHA-04, PHA-06, PHA-07, PHA-08, PHA-10 e PHA-11 exibiram forte fluorescência e o PHA-03 apresentou fraca fluorescência (Figura 12). Os isolados PHA-02 e PHA-05 não exibiram fluorescência. As fluorescências foram medidas e 24 e 48 horas de crescimento, mas não apresentaram diferenças na intensidade.

Nos ensaios realizados por Spiekermann e colaboradores colônias de cepas *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas putida* e *Azotobacter vinelandii* positivas para produção de PHA exibiram uma forte fluorescência (Spiekermann et al., 1998)

Zuriani et al. (2012) mostrou a correlação da concentração de PHA e fluorescência em cepa *Cupriavidus* sp., onde quanto maior a concentração ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de PHA maior a intensidade da fluorescência. Desse modo, é possível interpretar que a colônia PHA-03 tem uma menor produção de PHA que os outros isolados positivos para a produção, pois apresentou menor intensidade de fluorescência. Zuriani et al. (2012) também em seu trabalho, concluiu que a técnica de Red Nile é uma ótima ferramenta para estimar o PHA durante a fase de crescimento.



**Figura 12.** Coloração Fluorescente do corante Red Nile. **Fonte:** Mariana Bulhões

As letras correspondem aos seguintes isolados: A: PHA-01; B: PHA-02; C: PHA-03; D: PHA-04; E: PHA-05; F: PHA-06; G: PHA: 07; H: PHA-08; I: PHA-10; J: PHA-11. As imagens B e E representam os isolados negativos para produção de PHA. A figura C apresentou fraca fluorescência.

### 5.5. Caracterização Morfotintorial e Bioquímica das bactérias produtoras de PHA

Após a obtenção dos isolados em meio ISP9, procedeu-se sua identificação por ensaios morfotintoriais. A técnica de Gram serviu para a diferenciação dos isolados em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Dos dez isolados obtidos, oito foram classificados como bactérias bastonetes Gram-positivas e catalase positivo, e dois como bastonetes Gram-negativas positivos para o teste de KOH. Todos os isolados Gram negativos foram negativos para o teste de oxidase (Tabela 03). Desta forma, caso seja necessário optar por algum dos grupos para uma futura produção de PHA, seria dado preferência ao grupo de bactérias Gram positivas, já que bactérias Gram negativas e oxidases negativa pertencem à família das Enterobacteriaceae e algumas são descritas como patogênicas (Octavia; Lan, 2014).

**Tabela 03.** Caracterização morfotintorial das bactérias produtoras de PHA.

ISOLADO	MORFOLOGIA EXTERNA	GRAM	KOH	CATALASE	OXIDASE
PHA-01	Bastonetes	-	+	NR	-
PHA-02	Bastonetes	+	-	+	NR
PHA-03	Bastonetes	+	-	+	NR
PHA-04	Bastonetes	-	+	NR	-
PHA-05	Bastonetes	+	-	+	NR
PHA-06	Bastonetes	+	-	+	NR
PHA-07	Bastonetes	+	-	+	NR
PHA-08	Bastonetes	+	-	+	NR
PHA-10	Bastonetes	+	-	+	NR
PHA-11	Bastonetes	+	-	+	NR

NR: não realizado

## 7. CONCLUSÕES

A partir da amostra de água do Rio Mimoso (Bonito, MS) isolou-se microrganismos com potencial biotecnológico;

- Dez bactérias com potencial de produção de amilase;
- Dez bactérias com potencial de produção de xilanase;
- Oito bactérias com potencial de produção de PHA.

Poucos estudos exploram o potencial de bioprospecção da água doce para obtenção de microrganismos com potencial biotecnológico, desse modo, este trabalho explora um novo potencial da região do cerrado,

## 8. REFERÊNCIAS

- ABIPLAST. Perfil 2018. Indústria Brasileira de Transformação e Reciclagem de Material Plástico. Associação Brasileira da Indústria de Plástico. Disponível em: <http://www.abiplast.org.br/publicacoes/>. Acesso em 20/11/2019. 2018.
- ANDRADY, A. L. The plastic in microplastics: A review. **Marine Pollution Bulletin**, 2017, v. 119, ed. 1, p. 12-22, 15 jul. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0025326X1730111X>. Acesso em: 7 out. 2019.
- ANVISA. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica. Gram-positivos: módulo V. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod\\_5\\_2004.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_5_2004.pdf). Acesso em: 7 out. 2019.
- ARAÚJO, M. C. B.; SILVA-CAVALCANTI J. S. Dieta indigesta: milhares de animais marinhos estão consumindo plásticos. **Jornal Meio Ambiente e Sustentabilidade**. ano 2016, v. 10, ed. 5, 16 maio 2016. Disponível em: <https://www.uninter.com/revistameioambiente/index.php/meioAmbiente/article/view/511>. Acesso em: 2 out. 2019.
- BAATI, L; FABRE-GEA, C.; AURIOL, D. Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus*: effect of culture and freezing conditions on the viability and cellular protein levels. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 59, n. 3, p. 241-247, 2000.
- BECKER, N. B.; BARATTO, C. M.; GELINSKI, J. M. L. N. Propriedades das enzimas  $\alpha$ -amilase e xilanase comerciais e sua influência na reologia da massa e na qualidade do pão de forma. **Evidência**. v. 9, n. 1-2, p. 67-82, 2009.
- BRITO, G. F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E. M.; MÉLO, T. J. A. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.6.2. p. 127-139. Campina Grande. 2011.
- BURLACU, A.; CORNEA, C. P.; ISRAEL-ROMING, F. Microbial Xylanase: A Review. **Scientific Bulletin**. Series F. Biotechnologies, Vol. XX, 2016 ISSN 2285-1364. 2016.
- CHEN, G. Q. Polyhydroxyalkanoates, in *Biodegradable Polymers for Industrial Applications*, ed. Smith R. CRC, FL, USA. p. 32–56. 2005.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- DEBROAS, D., HUMBERT, J.-F., ENAULT, F., BRONNER, G., FAUBLADIER, M., & CORNILLOT, E. Metagenomic approach studying the taxonomic and functional diversity of the bacterial community in a mesotrophic lake (Lac du Bourget - France). **Environmental Microbiology**. 11(9), p. 2412–2424. 2009.
- DELGADO, A C. L.; CORDOBA, A. M. Polyhydroxyalkanoates (PHA's) produced by bacteria and its potential application to industrial level. **Informador Técnico (Colombia)**. v. 79. 2015.
- DINGLE, J; REID, W.W; SOLOMONS G. L. The enzymic degradation of pectin and other polysaccharides. Application of the 'Cup-plate' assay to the estimation of enzymes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 4. n. 3. 1953.

- FERNANDES, A. P. Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes. Tese Mestrado. Universidade Federal de Lavras. 2009.
- GIRIO, F.M., FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775–4800, 2010.
- GONÇALVES, L. P. *Produção e caracterização de amilase secretada por Rhizoctonia solani AG-IIA*. Dissertação Mestrado. Universidade Estadual Paulista. 2019.
- GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**. Volume 38, Issue 11, p. 1599-1616. 2003.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), p. 235–251. 2005.
- JENDROSSEK, D. AND HANDRICK, R. Microbial degradation of polyhydroxy alkananoates. **Annual Review of Microbiology**, 56. p. 403-432. 2002.
- LAUZIER, C. A.; MONASTERIOS, C. J.; SARACOVAN, I.; MARCHESSAULT, R. H.; RAMSAY, B. A. Film formation and paper coating with poly( $\beta$ -hydroxyalkanoate), a biodegradable latex. **Tappi Journal**. 1993.
- LEALEM, F; GASHE, B. A. Amylase production by a Gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eragrostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology** 1994, 77. p. 348-352. 1994.
- LÍCIO, D. C. P. *Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxiálcanoatos e caracterização molecular de sua PHA sintase*. 2011. 105f. Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- MEDEIROS, R. B.; BEREZUK, A. G.; SILVA, C A. A morfometria da bacia hidrográfica do rio Mimoso, um sistema cárstico do Mato Grosso do Sul/ Brasil. 2019. Disponível em: <DOI : 10.4000/confins.19845>. Acesso em: 20 nov. 2019.
- MESQUITA, D. P.; AMARAL L. A.; LEAL C; OEHMEN, A.; REIS, M. A. M.; FERREIRA, E. C. F. Polyhydroxyalkanoate granules quantification in mixed microbial cultures using image analysis: Sudan Black B versus Nile Blue A staining. **Analytica Chimica Acta** 865. p. 8–15. 2015.
- MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, 3 (5). p. 9-23. 2009.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- OCTAVIA S., LAN R. (2014) The Family *Enterobacteriaceae*. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JUNIOR, A. F. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Ciência. Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 26, n. 4, p. 853-860. 2006.

- PALMEIRAS, L. P. S; MAGATON, A. S; COLODETTE, J. L; CARVALHO, A. M. L. C. Análise Comparativa Entre Vários Métodos De Quantificação De Hemiceluloses Da Madeira De Eucalipto. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 7, 1569-1571, 2010
- PHILIP, S; KESHAVARZ, T; ROY, I. Review: Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** n. 82:233–247. 2007.
- POLI, A.; DI-DONATO, P. ABBAMONDI, G. R. NICOLAUS, B. Synthesis, Production, and Biotechnological Applications of Exopolysaccharides and Polyhydroxyalkanoates by Archaea. Review Article **Hindawi Publishing Corporation Archaea** Volume 2011. 2011.
- RATANAKHANOKCHAI, K.; WAEONUKUL, R.; PASON, P.; TACHAAPAIKOON, C.; LAY, K.; SAKKA, K.; MORI, Y. (2013). Paenibacillus curdlanolyticus Strain B-6 Multienzyme Complex: A Novel System for Biomass Utilization. **Biomass Now - Cultivation and Utilization**. < doi:10.5772/51820 > 2013.
- RAZA Z. A; ABIDA, S; BANAT, I. M. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. Review. **International Biodeterioration & Biodegradation** 126 (2018). P. 45–56. 2018.
- SCHLEGEL, H.G.; LAFFERTY, R.; KRAUSS, I. **Archiv. Mikrobiol.** (1970) 71: 283. < doi.org/10.1007/BF00410161. 1970> 1970.
- SILVA, A. A.; FONSECA, G. G. Bioprospection of freshwater microalgae from Bonito, MS, Brazil. **International Journal of Biodiversity and Conservation**. Vol. 10(3), pp. 117-121, março 2018.
- SILVA, J. M. C.; BATES, J. M. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical Savanna hotspot. **BioScience** 52, 225–233. 2002
- SPIEKERMANN, P.; REHM, B. H. A.; KALSCHUEUR, R.; BAUMEISTER, D.; STEINBÜCHEL, A. 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**. 171 :73–80. 1999.
- SUDESH, K; ABE, H; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Prog. Polym. Sci.** 25 (2000) p. 1503-1555. 2000.
- TIAN, J.; SINSKEY, A. J; STUBBE, J. Kinetic Studies of Polyhydroxybutyrate Granule Formation in *Wautersia eutropha* H16 by Transmission Electron Microscopy. **American Society for Microbiology Journals**. Vol. 187, No. 11, p. 3814–3824. 2005.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 10. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2012.
- ZIMMER, K. R.; BORRÉ, G. L.; TRENTIN, D. S.; JÚNIOR, C. W.; FRASSON, A. P.; GRAEFF, A. A.; et al. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, v.10, n.14, p. 123-137, jul/dez. 2009.
- ZOTHANPUAIA, PASSARI, A. K., LEO, V. V., CHANDRA, P., KUMAR, B., NAYAK, C. SINGH, B. P. Bioprospection of actinobacteria derived from freshwater sediments for their potential to produce antimicrobial compounds. **Microbial Cell Factories**, 17(1). 2018.
- ZURIANI R.; VIGNESWARI S.; AZIZAN M. N. M.; MAJID M. I. A.; AMIRUL A. A. A High Throughput Nile Red Fluorescence Method for Rapid Quantification of

Intracellular Bacterial Polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. 2012.