

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

KARLA DAYANI REIS DOS SANTOS

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS EM SOLO DO CERRADO COM POTENCIAL
DE PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)**

Dourados

2019

KARLA DAYANI REIS DOS SANTOS

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS EM SOLO DO CERRADO COM
POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)**

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.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maricy Raquel Lindenbah Bonfá

Dourados

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S237b Santos, Karla Dayani Reis Dos

Bioprospecção de bactérias em solo do Cerrado com potencial de produção de polihidroxicanoatos (PHA) [recurso eletrônico] / Karla Dayani Reis Dos Santos. -- 2019.

Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Maricy Raquel Lindenbah Bonfá.

TCC (Graduação em Biotecnologia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2019.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Glicerol. 2. Biopolímeros. 3. Red Nile. 4. Sudan Black. I. Bonfá, Maricy Raquel Lindenbah. II. Título.

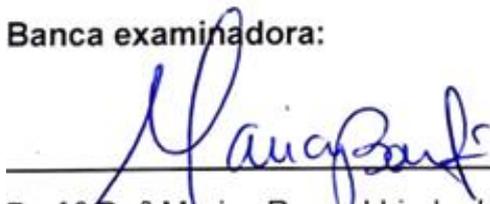
KARLA DAYANI REIS DOS SANTOS

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS EM SOLO DO CERRADO COM POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)

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.

Aprovado em 04 de Dezembro de 2019

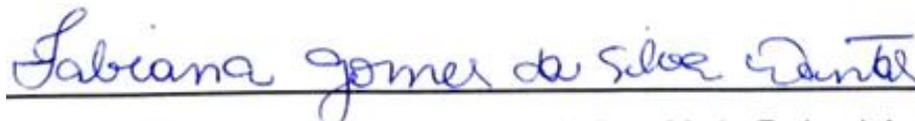
Banca examinadora:



Prof.^a Dr.^a Maricy Raquel Lindenbah Bonfá – Universidade Federal da Grande Dourados



Prof.^a Dr.^a Danielle Marques Vilela – Universidade Federal da Grande Dourados



Prof.^a Dr.^a Fabiana Gomes da Silva – Universidade Federal da Grande Dourados

Dedico este trabalho a Deus, pois tem sido minha força e motivação nos momentos difíceis e à minha família pelo apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de viver esta experiência que, posteriormente, fará toda a diferença em minha jornada profissional. Aos meus pais que tiveram paciência e cuidado me ajudando nos momentos mais difíceis, à minha irmã, Kamila, pela parceria e ao meu namorado, Luka, por me apoiar em todos os momentos.

Agradeço também a meus amigos, Luiz Guilherme, Mariana Martins, Thais Gomes, Emmanuela Marafon e Larissa Avelino, que, de alguma forma fizeram a diferença em algum momento da minha trajetória.

Expresso agradecimentos a toda a equipe da Cantina Matogrosso e da Avaleite, que me acolheram e ensinaram durante minha breve passagem pelas empresas.

Agradeço a todos os professores que passaram pela minha formação, desde o ensino fundamental, especialmente ao professor Washington Kubo, por ter me apresentado a biotecnologia e despertado em mim interesse por este curso incrível. Expresso agradecimentos também à Eleni, professora de história responsável por abrir meus olhos a causas sociais e me ensinar a pensar de uma maneira mais crítica.

Por fim agradeço a todos os membros do grupo de pesquisa “Projeto Biorremediação”, em especial à minha orientadora Maricy, pela paciência, confiança e todos os ensinamentos a mim transmitidos. E a minha parceira Flávia, minha companheira de laboratório por quem tenho muito carinho, pois sem ela meus experimentos não teriam sido concluídos.

“As grades prendem homens, não ideias.”
Djonga

RESUMO

Alternativas ambientalmente corretas à utilização de polímeros convencionais têm sido estudadas com a finalidade de diminuição de impactos ambientais. Os biopolímeros lipídicos polihidroxialcanoatos (PHA), são materiais biodegradáveis produzidos por bactérias e com ampla aplicação nas áreas médica, farmacêutica e química. Os solos, de forma geral, possuem uma grande diversidade de organismos, com a possibilidade de bioprospecção de diversas espécies, assim, o objetivo do presente estudo foi bioprospectar bactérias do solo do bioma Cerrado, a fim de avaliar o potencial de produção do biopolímero PHA utilizando o resíduo agroindustrial glicerol como fonte de carbono em meio de cultivo mínimo ISP9. Um total de 36 bactérias foram isoladas da amostra de solo. Um *screening* inicial da produção de lipídeos pelas células foi realizado através da coloração com Sudan Black, na qual 20 das bactérias apresentaram resultado positivo. Levando-se em conta a inespecificidade deste método, realizou-se a técnica de coloração com Red Nile, corante fluorescente quando exposto à luz ultravioleta, nesta avaliação 14 bactérias foram identificadas como produtoras de PHA. Desta forma, no solo amostrado foi possível o isolamento de bactérias produtoras de biopolímero, além disso, o glicerol mostrou-se uma fonte de carbono alternativa para o cultivo destas bactérias, o que melhora a viabilidade econômica do processo. Até o momento não foram descritos na literatura outros trabalhos envolvendo a bioprospecção de bactérias produtoras de PHA a partir de solos de Cerrado, mostrando o grande potencial biotecnológico deste bioma.

Palavras-chave: Biopolímeros; Glicerol; Red Nile.

ABSTRACT

Environmentally friendly alternatives to the use of conventional polymers have been studied with the purpose of reducing environmental impacts, such as polyhydroxyalkanoate (PHA) lipid biopolymers, biodegradable materials produced by bacteria and widely applied in the medical, pharmaceutical and chemical areas. Soils, in general, have a great diversity of organisms, with the possibility of bioprospection of several species, thus, the objective of the present study was to bioprospect soil bacteria from the Cerrado biome, in order to evaluate the production potential of PHA biopolymer using glycerol agroindustrial residue as carbon source. in minimum culture medium ISP9. A total of 36 bacteria were isolated from the soil sample. An initial screening of lipid production by cells was performed by staining with Sudan Black, in which 20 of the bacteria tested positive. Taking into account the nonspecificity of this method, the staining technique was performed with Red Nile, fluorescent dye when exposed to ultraviolet light. In this evaluation 14 bacteria were identified as PHA producers. Thus, in the sampled soil it was possible to isolate biopolymer-producing bacteria, and glycerol proved to be a good alternative carbon source for the cultivation of these bacteria, which improves the economic viability of the process. To date no other studies involving the biopanning of PHA-producing bacteria from Cerrado soils have been described in the literature, showing the great biotechnological potential of this biome.

Keywords: Biopolymers; Glycerol; Red Nile.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 01.** Estrutura química dos cinco principais polímeros produzidos em escala industrial, destacando a unidade repetitiva ou mero. PE: polietileno, PP: polipropileno; PVC: policloreto de vinila; PS: poliestireno; PET: politereftalato de etileno (PAOLI, 2009).....18
- Figura 02.** Microscopia de transmissão eletrônica (x 30.000) de células de *B. megaterium* com acúmulo de polímeros intracelulares em diferentes tempos de cultivo (GOUDA, 2001).....21
- Figura 03.** Estrutura química geral de polihidroxialcanoatos (SILVA et al., 2007).....22
- Figura 04.** Rotas metabólicas que fornecem monômeros para a síntese de PHA em *Ralstonia eutropha* (SUDESH et al., 2000).....23
- Figura 05.** Degradação em lodo ativado de embalagens produzidas com P(3HB-co-3HV), uma das variações de PHA, nos períodos de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 semanas (MADISON; HUISMAM, 1999).....25
- Figura 06.** *Screening* de produção de PHA, utilizando o corante Sudan Black. A) Colônias não coloridas, com resultado negativo para produção de PHA; B) Colônias azuis, com resultado positivo para produção de PHA.....38
- Figura 07.** *Screening* de produção de PHA, utilizando o corante Red Nile e exposição a luz UV. (+) Colônias fluorescentes, com resultado positivo para produção e acúmulo de PHA; (-) Colônias não fluorescentes, com resultado negativo para produção e acúmulo de PHA.....39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Acetil-CoA	Acetil Coenzima A
Acetiacetil-Coa	Acetiacetil Coenzima A
CoASH	Coenzima A
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
KOH	Hidróxido de potássio
PA	Polímero de amido
PLA	Polilactato
PHA	Polihidroxialcanoato
PhaC	Polixidroxialcanoato-sintase
PHB	Polixidroxiburato
P3(HB)	Poli-3-hidroxiburato
Rpm	Rotações por minuto
Sicol	Sistema de Informação de Coleções de Interesse Biotecnológico
XA	Xantana

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Identificação morfotintorial dos isolados e resultados para o teste de Sudan Black, que indica a formação de lipídeos pelo microrganismo, e para o teste de Red Nile, que indica a produção de biopolímeros por bactérias.....	37
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1. BIOPRODUTOS.....	16
2.2. POLÍMEROS.....	18
2.3. BIOPOLÍMERO.....	20
2.3.1. PHAs.....	21
2.4. IMPORTÂNCIA DO CERRADO NA BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO.....	26
2.5. UTILIZAÇÃO DO GLICEROL COMO MATÉRIA PRIMA PARA PRODUÇÃO DE PHA.....	29
3. OBJETIVO GERAL	30
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1. MEIO DE CULTIVO PARA BACTÉRIAS PRODUTORAS DE PHA/PHB.....	31
4.2. COLETA DE AMOSTRA DE SOLO PARA PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS.....	31
4.3. BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS.....	31
4.4. OBTENÇÃO DE COLÔNIAS PURAS.....	32
4.5. TESTES MORFOTINTORIAIS.....	32
4.5.1. Microscopia de lâmina úmida.....	32
4.5.2. Teste de Gram.....	32
4.5.3. Teste de KOH.....	33
4.5.4. Teste de catalase.....	33
4.5.5. Teste de oxidase.....	33
4.6. PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS.....	34
4.6.1. Tubos inclinados.....	34
4.6.2. Glicerol.....	34
4.7. <i>SCREENING</i> DE PRODUÇÃO DE PHA.....	34
4.7.1. Coloração de colônias com Sudan Black.....	35
4.7.2. Coloração de colônias com Red Nile.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35

6.	CONCLUSÕES.....	40
	REFERÊNCIAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

Polímeros são estruturas químicas constituídas pela sequência repetida de monômeros, sendo, o tamanho dessas sequências, um dos responsáveis por seu comportamento físico-químico e características como ponto de fusão, elasticidade e rigidez. Tais estruturas são muito versáteis, com aplicação principal na confecção de plásticos, além de que, podem ser de origem natural ou sintéticos.

A grande maioria dos plásticos produzidos em larga escala são sintéticos, com origem petroquímica, possuindo muito lenta capacidade de degradação, chegando a centenas de anos, fator que favorece a poluição ambiental quando submetidos ao descarte inadequado. O fato de a matéria-prima utilizada ser não renovável também se faz preocupante do ponto de vista ecológico, sendo, a dependência dessa fonte atrelada ao risco de seu esgotamento a longo prazo.

Tendo em vista a necessidade de alternativas produtivas ambientalmente corretas e provenientes de fontes limpas destacam-se os biopolímeros, polímeros naturais, obtidos de fontes renováveis, como vegetais, resíduos agroindustriais ou, até mesmo, produzidos naturalmente por microrganismos, quando submetidos às condições específicas de cultivo. Nesta vertente podem ser citados os polilactatos (PLA), polímeros de amido (PA), Xantana (XA) e os polihidroxicanoatos (PHA).

Os polihidroxicanoatos, ou PHAs, são biopolímeros de origem bacteriana, produzidos naturalmente por diversas espécies de bactérias, na forma de grânulos intracelulares. Sua produção é favorecida pela oferta excessiva de fonte de carbono e limitação de um dos nutrientes essenciais para seu crescimento. Para a bactéria, a produção do biopolímero tem a finalidade de reserva de energia.

A síntese destes polímeros é um processo relativamente complexo e caro, fator principal para que a aplicação de plásticos produzidos a partir dos PHAs seja, praticamente, limitada a materiais de finalidade médica, como em próteses, suturas e curativos. Não só devido aos seus custos, a área de aplicação dos polihidroxicanoatos se deve também à sua característica principal, a biocompatibilidade, propriedade que torna a taxa de rejeição pelo organismo humano praticamente inexistente.

Além disso, o PHA é um material biodegradável, embalagens produzidas com este composto levam algumas semanas para que sejam completamente degradadas quando expostas a condições ambientais como chuva e luz solar.

Existem diversas bactérias produtoras naturais deste biopolímero, a principal e mais estudada espécie é a *Ralstonia eutropha*. Atualmente, tanto nesta quanto em outras espécies bacterianas, a produção do biopolímero tem sido otimizada com ferramentas de cultivo específico e até mesmo com a utilização de técnicas de engenharia genética, como a superexpressão do gene *phaC*, que codifica para a síntese dos polihidroxicanoatos, ou a expressão heteróloga deste gene em microrganismos modelo, geralmente em *Escherichia coli*. Recentemente, o cultivo destes microrganismos vem sendo aliado à utilização de fontes de carbono advindas de fontes renováveis, como componentes ou derivados de biomassa e coprodutos de processos de produção em geral, este é o caso do glicerol, o principal coproduto obtido da produção do biodiesel, produzido em grandes quantidades e muitas vezes descartado, sem nenhuma utilização.

Os solos, de maneira geral, são ambientes extremamente ricos em diversidade de espécies, tanto em fauna e flora, quanto em relação à microvida. Em cada grama de solo saudável estima-se uma comunidade biológica de cerca de 10.000 espécies diferentes. O cerrado brasileiro é um dos biomas mais extensos do território nacional, com características variáveis em toda sua extensão, grandes áreas deste bioma foram utilizadas para atividades agropecuárias, principalmente na monocultura de grãos. Por outro lado, existem reservas naturais onde o ecossistema se mantém natural e diversificado, com vegetação diversa e solo em condições de equilíbrio, com matéria orgânica abundante, garantindo a microvida.

Levando-se em conta a grande diversidade de espécies de bactérias, que podem ainda ser bioprospectadas de biomas pouco estudados como o Cerrado brasileiro, e ainda que podem existir muitas espécies de bactérias produtoras de polihidroxicanoato. O presente estudo objetivou o isolamento deste tipo de microrganismo a partir de amostras de solo do Cerrado de Mato Grosso do Sul. Pesquisas nesta área são de suma importância, uma vez que os polímeros verdes poderão no futuro substituir gradualmente os plásticos convencionais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. BIOPRODUTOS

O termo bioproduto não possui na literatura uma definição consensual, mas é utilizado quando se faz referência a produtos desenvolvidos a partir de organismos

vivos ou de suas partes constituintes, de forma a elevar a produção e, em alguns âmbitos, substituir a utilização de fontes não renováveis. Em alguns casos, são biodegradáveis, reduzindo o impacto sobre o meio ambiente e obtidos através de fontes renováveis, o que lhes confere vantagens ambientais e econômicas (ASSIS; PANIZZI, 2003).

Tendo em vista a definição de bioproduto como sendo uma alternativa às tecnologias, fontes e processos convencionais, o termo tem se estendido a qualquer produto gerado ou derivado de biomassa (COUTINHO; BOMTEMPO, 2011).

A obtenção de produtos advindos, de alguma maneira, de organismos vivos é uma realidade relativamente antiga, podendo ser observada de forma tradicional na fermentação de bebidas e alimentos, extração de óleos essenciais ou extratos naturais e na obtenção de fitoterápicos. Durante as últimas décadas, avanços científicos e tecnológicos têm proporcionado maior esclarecimento relacionado à utilização de materiais de origem microbiana como componentes celulares, as próprias células e seus derivados. A aplicação em larga escala de derivados microbianos, se deve principalmente aos avanços da biotecnologia moderna e tem se expandido para diversas áreas (TORTORA et al., 2016).

Como um dos principais fatores para o desenvolvimento de novas tecnologias para a obtenção de produtos substituintes aos convencionais, pode-se citar o crescimento demográfico e conseqüente aumento das demandas de mercado. Tendo em vista o gradativo esgotamento de fontes energéticas não renováveis, como carvão, gás natural e petróleo, a biomassa, anteriormente citada, tem sido utilizada como alternativa na obtenção de combustíveis de primeira e segunda geração, por exemplo (RUIZ-LEZA et al., 2012).

Biocombustíveis, como o biodiesel podem ser obtidos a partir de inúmeras fontes. Neste contexto, ganha destaque o biodiesel, com menores custos em relação ao diesel convencional e com impacto ambiental positivo, já que sua obtenção se dá através de fontes como óleos vegetais, lipídeos secretados por microrganismos, óleo de reuso e até mesmo gordura animal (KNOTHE; KRAHL, 2006), baseadas na transformação e digestão de biomassa.

Microalgas são um dos organismos mais utilizados, atualmente, na produção de biodiesel (RODOLFI et al., 2009; LI et al., 2007), principalmente pelo curto período de

obtenção de biomassa e sua alta produtividade (JOHNSON et al., 2009; CHISTI et al., 2007).

Outro tipo de bioproduto disponível no mercado são os biossensores, dispositivos pequenos, que através de reações biológicas detectam analitos-alvo (WANG, 2000). Dentre os componentes biológicos utilizados em sistemas de biossensores destacam-se: enzimas, com aplicações médicas e ambientais (CHAMBERS et al, 2008); anticorpos, utilizados em diagnósticos médicos (SONG et al, 2006; CHAMBERS et al, 2008). Em suma, a utilização de componentes ou derivados biológicos em biossensores têm sofrido constante expansão, se destacando principalmente devido a sua especificidade e vasta gama de aplicações (VESTERGAARD et al, 2007; CHIU; HUANG, 2006).

Uma linha de bioproduto com grande importância econômica e ambiental atualmente, têm sido os biopolímeros, definidos pela ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) como polímeros obtidos a partir de matérias-primas de fontes renováveis, como material advindo da agroindústria, biomassa em geral, polímeros produzidos intracelularmente ou extracelularmente por microrganismos, entre outras fontes. Esse tipo de polímero surge como alternativa à utilização de polímeros convencionais na fabricação de artigos de plástico, tendo em vista a utilização de fontes limpas e renováveis, além de características como a biodegradação, biocompatibilidade com o organismo humano e, principalmente, uma redução considerável nos impactos ambientais promovidos pela sua produção e utilização (BRITO et al., 2011).

Existem diversas fontes para obtenção e vários tipos de biopolímeros, entre os principais e mais comumente estudados e utilizados estão: Amidos; PLA – polilactato; PHA e PHB - polihidroxialcanoato e polihidroxibutirato (MOHANTY et al, 2005). Todos esses biopolímeros provêm de fontes limpas e renováveis e possuem positivo aspecto ambiental relacionado ao seu uso, porém os processos para sua obtenção e extração tornam sua utilização restrita e, em alguns casos, com custo elevado em comparação à obtenção de plásticos convencionais (BELGACEM; GANDINI, 2008).

Na vertente de produção de biopolímeros ganham destaque os polímeros de origem microbiana, podendo ser obtidos de diversos tipos de leveduras e bactérias, com base na formação intracelular ou extracelular do composto. Além dos biopolímeros, alguns organismos, possuem a capacidade de formação celular de

lipídeos, muito utilizados na produção de biodiesel. Essa produção, muitas das vezes, pode ser associada à degradação de resíduos agroindustriais, proporcionando uma degradação total, ou parcial, de tal (PAPANIKOLAOU et. al., 2000; ZHANG et. al., 2007; ZHANG e YANG, 2009; DA SILVA et. al., 2007; CHATZIFRAGKOU et. al., 2011; HU et. al., 2011).

2.2. POLÍMEROS

Polímeros são macromoléculas formadas pela repetição de muitas unidades químicas iguais, possuindo uma grande variedade estrutural. Sua nomenclatura se faz utilizando o nome do monômero usado em sua síntese (Figura 01). Os principais tipos de polímero utilizados na indústria para confecção de materiais são o polietileno, o polipropileno, o policloreto de vinila, o poliestireno e o politereftalato de etileno (PAOLI, 2009).

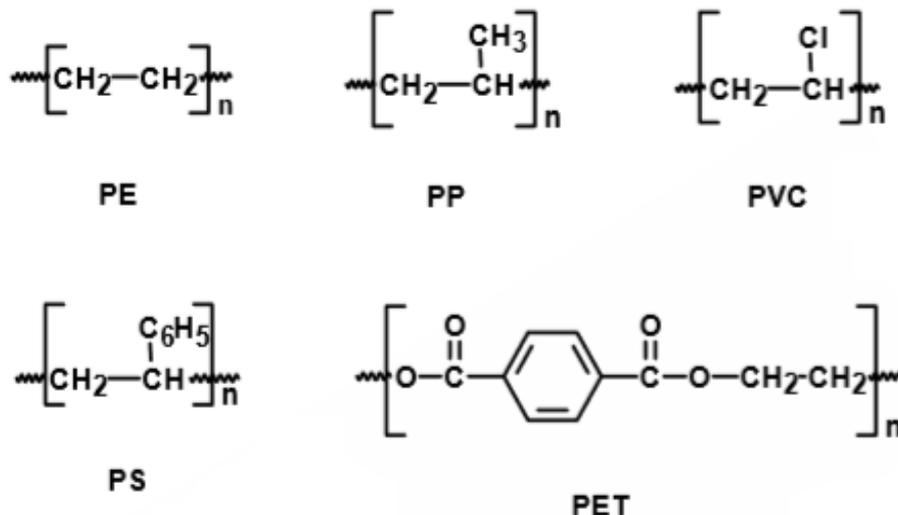


Figura 01 – Estrutura química dos cinco principais polímeros produzidos em escala industrial, destacando a unidade repetitiva ou mero. PE: polietileno, PP: polipropileno; PVC: policloreto de vinila; PS: poliestireno; PET: politereftalato de etileno (PAOLI, 2009).

A utilização de polímeros em larga escala data de 1844, com a descoberta do processo de vulcanização da borracha natural, por Thomas Hancock, na Inglaterra. O impacto dessa descoberta foi tal que o consumo anual de borracha natural no país subiu de 25 toneladas em 1830, quando a processo ainda não existia, para 6000 toneladas em 1860 (HAGE, 1998).

Esse aumento serve como parâmetro para percepção da importância econômica relacionada aos polímeros de modo geral, tendo em vista que os mesmos são uma das classes de materiais mais versáteis, utilizados na confecção dos mais variados tipos de produtos, tendo grande influência na economia há várias décadas (PILLAI; PANCHAGNULA, 2001). Vale apontar que contam com importantes aplicações na agricultura e medicina (CHANDRA; RUSTGI, 1998) além da engenharia de materiais (LANGER; PEPPAS, 2003).

Existem vários tipos de polímeros, de forma geral, caracterizados como naturais ou sintéticos. Os polímeros naturais são aqueles encontrados na natureza, como amidos e celulose, já os polímeros utilizados de forma mais ampla provêm de fontes não renováveis, são os chamados polímeros sintéticos, esses são produzidos a partir de derivados do petróleo (PITT, 2011).

A utilização do petróleo na obtenção de polímeros se dá de forma primária, sendo considerado um processo de primeira geração, uma vez que o produto obtido na indústria petrolífera são os monômeros, insumo que posteriormente será transformado no polímero em si por processos de segunda geração. Durante os processos de terceira geração há o tratamento do material e obtenção do produto final (ANTUNES, 2007).

O principal motivo para a utilização de insumos de petróleo na obtenção de polímeros se trata do baixo custo do processo e a possibilidade de produção em larga escala (a nível de terceira geração), uma vez que dentre as variedades mais utilizadas pela indústria (Figura 1) cada polímero é utilizado para uma finalidade específica, havendo a possibilidade de obtenção de diversos tipos de plásticos.

Em contrapartida, a produção massiva de plásticos convencionais (produzidos a partir de derivados de petróleo) tem causado diversos problemas ambientais, como a contaminação de rios e nascentes de água, formação gradativa de “lixões” a céu aberto, descarte indevido e acúmulo de embalagens de plástico, entre outros. Problemas esses que se devem, entre demais fatores, a características dos polímeros convencionais como sua degradação lenta, ou inexistente, o que os torna contaminantes ambientais por longos períodos (BIBY, 2002).

O fator ambiental aliado à perspectiva de esgotamento das reservas de petróleo tem levado à necessidade de adoção de alternativas limpas e de fontes renováveis

para a produção de polímeros, visando uma diminuição da utilização de insumos petroquímicos (PITT, 2011).

2.3. BIOPOLÍMERO

A partir da necessidade acima descrita os biopolímeros, são definidos como polímeros obtidos a partir de matérias primas de fontes renováveis, como material advindo da agroindústria, biomassa em geral. Polímeros produzidos intracelularmente ou extracelularmente por microrganismos, entre outras fontes, tendo como principal característica sua biodegradação (ABNT NBR 15448-1), se mostram uma opção frente aos polímeros utilizados atualmente.

Polímeros naturais surgem como uma alternativa promissora para uma substituição progressiva dos polímeros convencionais, possuindo propriedades químicas e físicas muito parecidas com os mesmos. No mercado existe uma diversidade considerável destes, tais como o polilactato (PLA), os polímeros de amido (PA), xantana (XAN) e os polihidroxialcanoatos (PHA), apontados como os polímeros biodegradáveis com maior importância para a sustentabilidade (PRADELLA, 2006).

Alguns possuem um custo muito parecido com o dos plásticos convencionais, como no caso do polilactato, por contrapartida existem biopolímeros que, se comparado aos polímeros derivados do petróleo, podem chegar a custar nove vezes o valor de produção (BIBY, 2002).

O ácido poliláctico ou polilactato (PLA) é um poliéster composto por cadeias orgânicas acíclicas, produzido a partir de ácido láctico, sendo sua obtenção baseada na fermentação de açúcares ou amido, purificação do produto de fermentação e, por último, sua polimerização (PRADELLA, 2006). Já a obtenção de polímeros de amido (PA) baseia-se na formação de amilose ou de amilopectina, dois tipos de glicose com características estruturais e funcionais diferentes, sua proporção está relacionada principalmente a propriedades físicas do material, que será obtido, tais características determinam as aplicações industriais dos polilactatos (ELLIS et al., 1998; MALI et al., 2010). Em relação aos polihidroxialcanoatos (PHA) e polihidroxibutiratos (PHB) sua produção ocorre intracelularmente em bactérias de diversos gêneros, como ferramenta para reserva energética, quando o excesso de fonte de carbono é aliado a limitação de um nutriente essencial como nitrogênio, fósforo, oxigênio ou enxofre (FONSECA, 2003).

2.3.1. PHAs

Polihidroxialcanoatos ou PHAs são componentes intracelulares acumulados por microrganismos (Figura 02), em especial bactérias, sendo sua síntese vinculada à limitação de um dos nutrientes essenciais para o crescimento celular bacteriano, como o fósforo, nitrogênio ou o oxigênio e a uma oferta elevada de fonte de carbono no meio de cultivo do microrganismo (FONSECA, 2003).

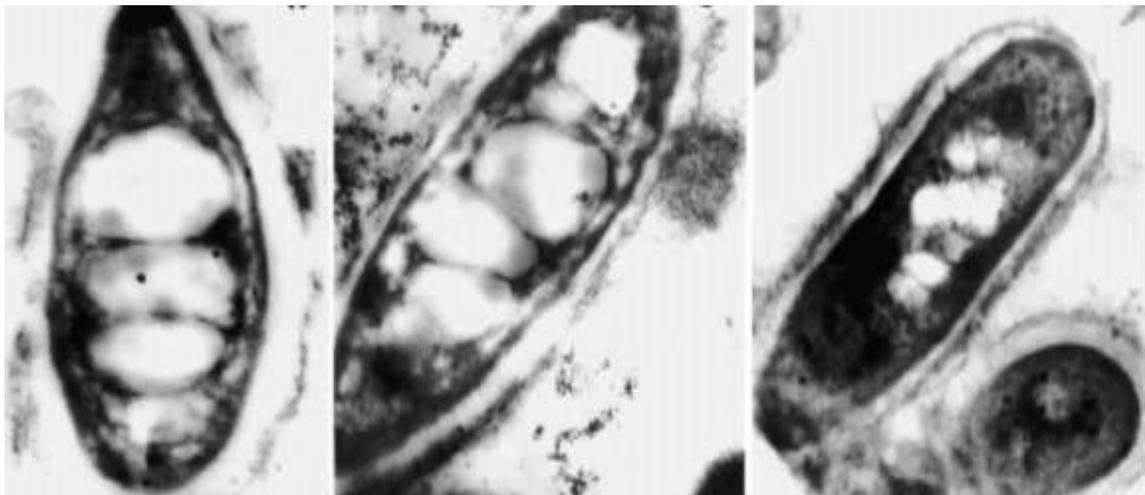


Figura 02 – Microscopia de transmissão eletrônica (x 30.000) de células de *B. megaterium* com acúmulo de polímeros intracelulares em diferentes tempos de cultivo (GOUDA, 2001).

Este biopolímero possui propriedades termoplásticas, além de comportamento como elastômero, dependendo de suas fontes de cultivo e tamanho da cadeia, essas características promovem aos PHA a possibilidade de processamento em equipamentos utilizados na produção de plásticos convencionais. Quanto a seus aspectos químicos, um dos mais notáveis é seu caráter como enantiômero puro de caráter D, devido à eletroespecificidade da enzima PHA sintase (Figura 03) (VALAPPIL, 2007; REDDY et al., 2003; MADSON e HUISMAN, 1999; SUDESH et al., 2000; STEINBUCHER, 2001).

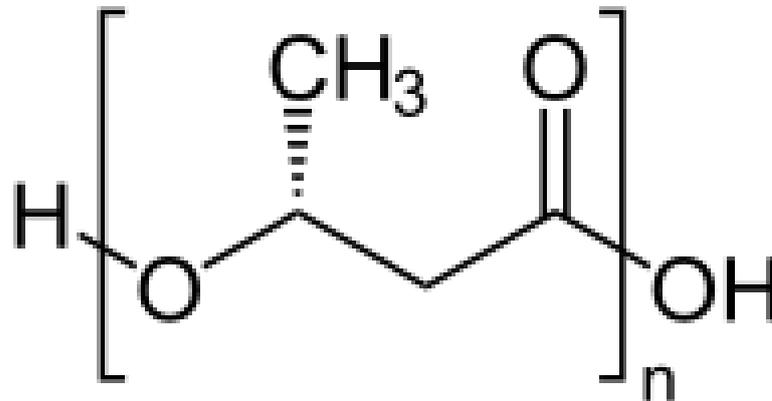


Figura 03 – Estrutura química geral de polihidroxialcanoatos (SILVA et al., 2007).

A biossíntese do biopolímero se deve a catálise pelas enzimas β -cetotiolase, acetoacetil-CoA redutase e PHA sintase (Figura 04) (MADISON e HUISMAN, 1999; DIMITROV, 2009).

Na primeira reação duas moléculas de Acetil-CoA se condensam reversivelmente em uma molécula de acetoacetil-CoA e CoASH livre, nesse processo a condensação das enzimas depende da concentração da coenzima A, em condições normais de crescimento bacteriano a concentração da coenzima A é elevada, devido à demanda por grupos acetil para o Ciclo de Krebs. As altas taxas de coenzima A causam a inibição da síntese de polihidroxialcanoatos pela enzima β -cetotiolase. Na restrição de algum nutriente essencial e abundância de fonte de carbono a multiplicação bacteriana diminui e, por consequência, a demanda por acetil também diminui, reduz a concentração de coenzima A e a enzima β -cetotiolase livre sintetiza uma maior quantidade do biopolímero (GOMEZ e NETO, 2000; DIMITROV, 2009).

Em uma segunda reação a enzima acetil-CoA redutase, codificada pelo gene *phaB*, reduz a molécula de acetoacetil-CoA a (R)-3-hidroxiacil-CoA, esta reação só ocorre com a disponibilidade de NAPH (DIMITROV, 2009).

Já na reação regida pela PHA sintase há a polimerização de unidades de (R)-3-hidroxiacil-CoA. Sobre esta enzima, é importante citar que a mesma é codificada pelo gene *phaC* (REHM, 2003) e que tentativas de identificação de novas PHA sintase estão em andamento e já retornaram resultados positivos (SHEU et al., 2000; SOLAIMAN et al., 2002; SHAMALA et al., 2003).

Foram caracterizados cerca de 38 genes codificadores das enzimas PHA sintase, provenientes de 31 espécies bacterianas distintas (REHM e STEINBUCHER, 1999). A

diversidade de microrganismos produtores de polihidroxicanoatos e suas condições de cultivo, principalmente com relação às fontes de carbono ofertadas, levam à variações quanto ao comportamento da PHA sintase, enzimas que podem ser classificadas em quatro tipos, diferenciadas quanto a especificidade pelo substrato e sua estrutura primária (REHM, 2003; DIMITROV, 2009).

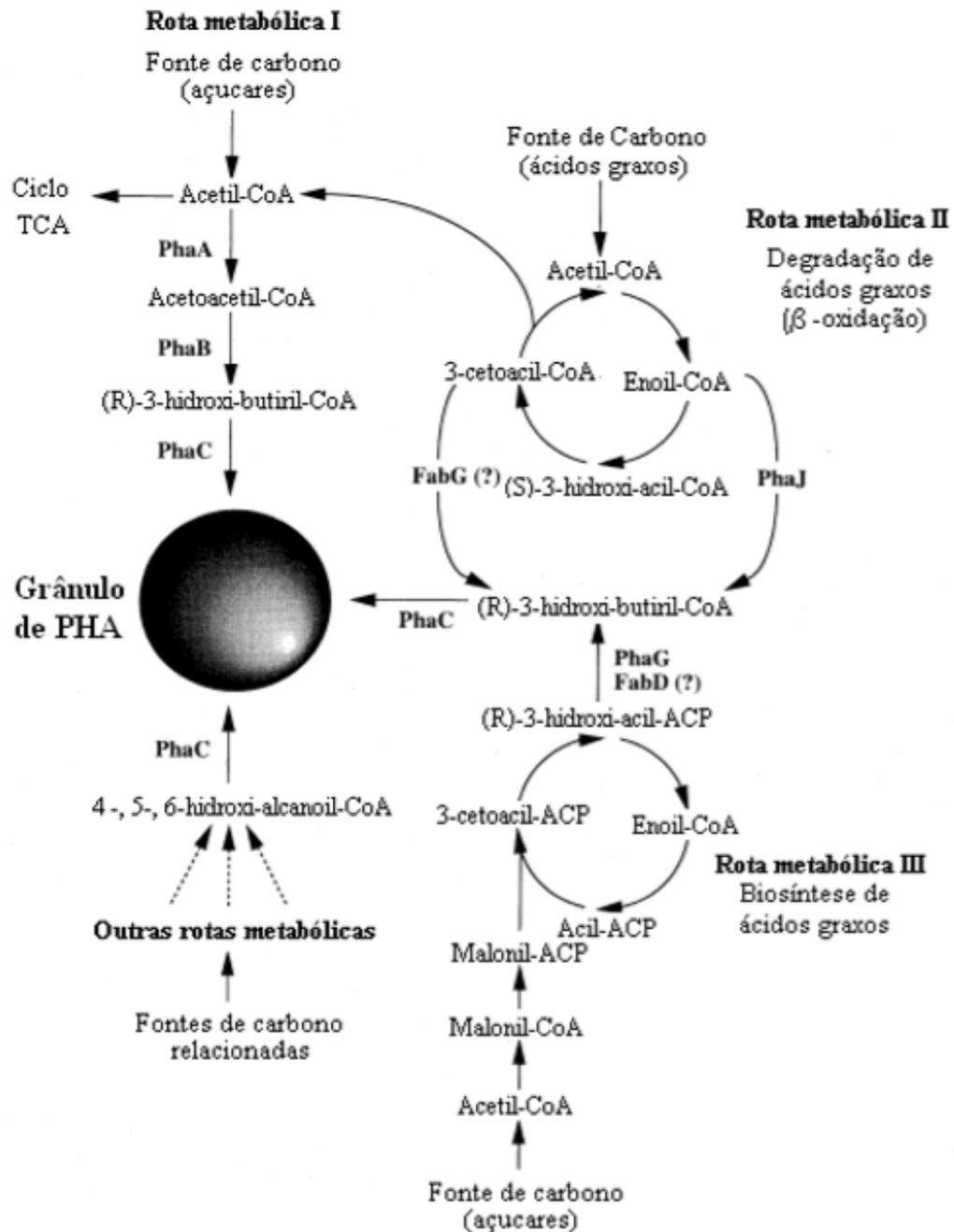


Figura 04 – Rotas metabólicas que fornecem monômeros para a síntese de PHA em *Ralstonia eutropha* (SUDESH et al., 2000).

Enzimas PHA sintase tipo I apresentam apenas uma subunidade, sintetizada pelo gene *phaC* (QI; REHM, 2001). Correspondem aos monômeros de cadeia curta, de três a cinco carbonos (DIMITROV, 2009). As PHA sintase do tipo II correspondem aos polímeros de cadeia média, de seis a dezesseis carbonos, essas enzimas também são codificadas pelos genes *phaC*, mas diferente do tipo I, podem ser encontrados dois genes diferentes em um mesmo gênero de microrganismo produtor (MADISON; HUISMAN, 1999; DIMITROV, 2009).

As PHA sintase tipo III são formadas por duas subunidades, codificadas pelos genes *phaC* e *phaE*, sendo que, as enzimas codificadas pelo gene *phaC* possuem similaridade com as enzimas do tipo I e tipo II. Estas enzimas apresentam maior velocidade no tempo de polimerização, com cadeias de três a cinco carbonos (REHM, 2003; DIMITROV, 2009).

Já as PHA sintase do tipo IV, assim como as do tipo III são formadas por duas subunidades, codificadas pelos genes *phaC* e *phaR* (REHM, 2003), o gene *phaR* não possui taxas razoáveis de similaridade com nenhum dos outros genes para PHA sintase (SATO et al., 2002).

O biopolímero, enquanto matéria prima, possui propriedades físico-químicas muito semelhantes ao polipropileno, um dos principais termoplásticos produzidos em grande escala a partir de derivados de petróleo. Sua degradação sob condições aeróbias gera como produto água e dióxido de carbono e, quando exposto a anaerobiose é reduzido a metano (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998; LEE et al., 1999; REDDY et al., 2003).

Uma das principais, e mais importantes, características dos PHAs é sua biodegradação, que ocorre em pouco tempo, se comparada a degradação de plásticos convencionais (BRITO et al., 2011). A degradação de peças produzidas a partir do PHAs em condições aeróbias leva alguns meses, já em condições marinhas pode levar alguns anos (Figura 05) (LUVIZETTO, 2007).

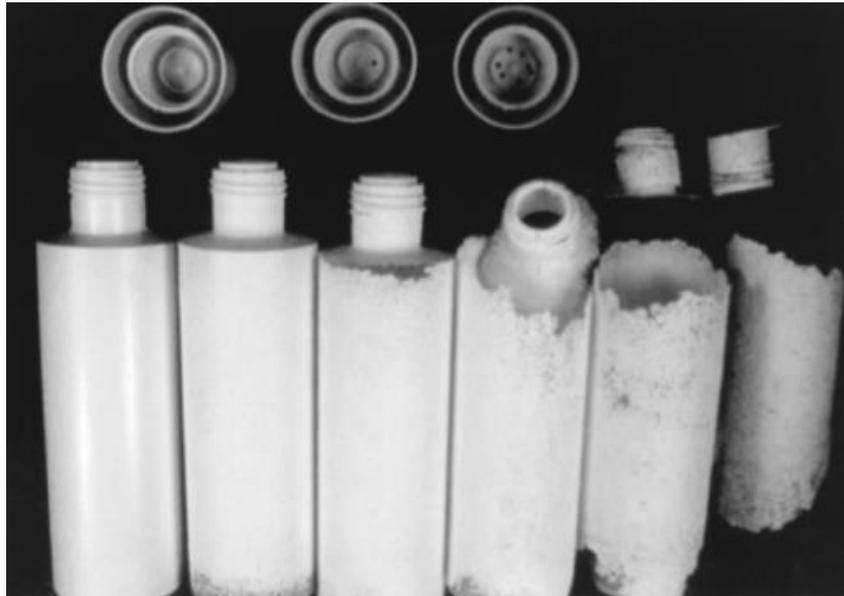


Figura 05 – Degradação em lodo ativado de embalagens produzidas com P(3HB-co-3HV), uma das variações de PHA, nos períodos de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 semanas (MADISON; HUISMAM, 1999).

Os grânulos de PHA são estruturas revestidas por camada fosfolipídica e, principalmente, por proteínas, sendo essas as responsáveis por determinar a quantidade e o tamanho dos grânulos em si (PÖTTER et al., 2002; LOCATELLI, 2012). Em relação à versatilidade dos polihidroxicanoatos, são conhecidos, atualmente, cerca de 150 tipos de ácidos hidroxialcanóicos, com formação dependente do tipo de substrato, ou fonte de carbono, com o qual o microrganismo produtor é cultivado (REHM, 2003; SILVA et al., 2007; LOCATELLI, 2012).

Dentre os microrganismos produtores de PHA destacam-se: *Cupriavitus necator*, que utilizam grande diversidade de substâncias como fonte de carbono (BYROM, 1987); *Alcaligenes latus*, que utiliza sacarose como substrato (LEE, 1996b); *Azotobacter vinelandii*, utilizando glicose como fonte de carbono; *Methylobacterium extorquens* e *Methylobacterium organophylum*, que utilizam metanol como substrato (LEE, 1996b); Bactérias do gênero *Pseudomonas*, que podem utilizar desde a glicose até álcoois, alcanos e alcenos como substrato; Bactérias do gênero *Burkholderia*, que produzem polihidroxicanoatos a partir de fontes simples de carbono, como sacarose e glucanato. (ANDRADE RODRIGUES et al., 2000). Além disso, técnicas da biotecnologia possibilitaram a clonagem de genes para síntese de polihidroxicanoatos, sendo um exemplo as *E. coli* recombinantes, adaptadas para a

produção em larga escala do biopolímero, utilizando diversos tipos de fontes de carbono (ASTAR e GRUYS, 2002).

2.4. IMPORTÂNCIA DO CERRADO PARA BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO

Um bioma corresponde não só à formação vegetal de dada região, mas à associação característica entre fauna, vegetação e formas de vida microscópica naturais em determinado ambiente (BOX; FUJIAWARA, 2005; BATALHA, 2011).

Quanto à vegetação, cada bioma possui características predominantes desde altura, tamanho, textura foliar, hábito e ritmos de crescimento e reprodução, até sua diversidade taxonômica. Estas características fenotípicas, ditam a fisionomia vegetal em amplas extensões, com a ocorrência de pequenas variações, mas que, de forma geral possuem as mesmas características (TALLIS, 1991; BATALHA, 2011).

O bioma Cerrado é composto por três tipos fundamentais de vegetações: florestais, campestres e savanas, sendo o tipo mais comum as savanas, que podem ser caracterizadas como sendo de mata densa, típica, rupestre ou rala (RIBEIRO; WALTER, 2008).

Os cerrados de savana densa, típica e rala diferenciam-se entre si de acordo com a densidade lenhosa das árvores, já o cerrado rupestre, possui como principal característica a ocorrência de áreas rochosas, com formação de fendas no solo, onde a vegetação se estabelece (RIBEIRO; WALTER, 2008; GIULIETTI et. al., 2000).

No ano de 2004, o bioma correspondia a 21% do território nacional, sendo o segundo maior do território brasileiro, abrigando grande parte da diversidade biológica do país (AGUIAR et. al.; 2004). Estimativas apontam que as áreas de vegetação nativa, sem nenhum tipo de exploração do bioma correspondiam a cerca de 46,74% em 2002 (MMA, 2007).

A vegetação natural permanente em solos inexplorados é responsável pela manutenção das quantidades de nutrientes no mesmo, principalmente através da camada formada a partir de folhas caídas das árvores que constitui a matéria orgânica do solo, além disso, fornecem proteção contínua em relação à erosão e desgastes naturais. Quanto às comunidades de microrganismos, condições relacionadas a ocorrência ou não de chuvas e variações de temperaturas são fatores determinantes

para o crescimento dessas populações, suas atividades metabólicas e bioquímicas (TSAI et. al., 1992).

O Cerrado possui grande interesse econômico aliado a seus solos, tendo uma extensão de cerca de 112 milhões de hectares de terra com potencial para cultivo de grãos, levando em conta condições de relevo, localização geográfica e clima favoráveis (PERES et. al, 1992).

A utilização de grandes áreas nativas como monoculturas de grãos e pastagens durante décadas fez com que o Cerrado viesse a ser um dos biomas mais ameaçados a nível mundial (KLINK; MACHADO, 2005), fator que, associado a seu alto grau de endemismo, diversidade taxonômica e riqueza biológica, fez do bioma uma das áreas prioritárias à conservação da biodiversidade (MITTERMEIER et. al., 2005; RAMOS et. al., 2012).

A substituição de vegetação natural por grandes culturas de grãos gera sérias modificações ambientais e flutuação estacional de condições climáticas, que acabam por afetar a ocorrência e comportamento de comunidades microbianas originais (WARDLE; PARKINSON, 1990).

A microbiota natural dos solos do Cerrado torna-o um ambiente com rica diversidade de espécies vegetais, levando em conta que os microrganismos contribuem com a gradativa liberação de matéria orgânica e nutrientes, que são utilizados pelas plantas (TURNER et al., 2003). Em contrapartida, o tipo de cobertura vegetal e de solo afetam a atividade e ocorrência de microrganismos naturais (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Pode-se considerar que a diversidade de microrganismos do solo é muito maior que a de plantas e animais, levando em conta sua alta diversidade metabólica e versatilidade (PROSSER, 2007).

Relacionada à vastidão de espécies microbiológicas está a necessidade de bioprospecção das mesmas, tanto com o objetivo de aprofundamento sobre as relações entre estes organismos, solo, fauna e flora do ambiente no qual estão inseridos, quanto para finalidade biotecnológica na obtenção de bens e produtos (ASSUMPÇÃO et al., 2009; COMPANT et al., 2013; BRADER et al., 2014).

No Brasil o registro de organismos com potencial biotecnológico pode ser acompanhado através do Sistema de Informação de Coleções de Interesse

Biotecnológico (SiCol), ferramenta virtual para catálogo de microrganismos (DO CARMO, 2015).

O SiCol foi fundado em 2004 e é fruto do Programa de Biotecnologia e Recursos Genéticos do Ministério da Ciência e Tecnologia, com o objetivo de disseminar informações sobre os Centros de Recursos Biológicos do país, além de integrar coleções de interesse biotecnológico, econômico e de aplicações industriais. A plataforma é constituída por 34.715 registros, sendo desses 18.910 georreferenciados. Na região centro oeste, onde o bioma predominante é o Cerrado, há o total de 2.079 espécies registradas (SICOL, 2019).

Estudos relacionados à bioprospecção de microrganismos no Brasil possuem investimento relativamente baixo, principalmente na Amazônia e Cerrado, regiões que possuem biodiversidade conhecidamente rica (SICOL, 2019).

A bioprospecção de microrganismos pode ser explicada como o isolamento e armazenamento de microrganismos de interesse através de métodos de cultivo específicos. A especificidade no cultivo de um organismo possibilita que ele tenha aplicação em larga escala e com produção celular máxima quando utilizado com finalidade industrial ou médica (DIAS et al., 2009).

Durante as últimas décadas, pesquisas científicas vêm tendo como enfoque a bioprospecção de microrganismos para a implantação de tecnologias alternativas, muitas das vezes com viés sustentável, visando a diminuição da emissão de poluentes, ou até mesmo o tratamento de poluentes já existentes (MA et al., 2013).

Existem pesquisas envolvendo a comunidade bacteriana do solo do Cerrado e seu potencial biotecnológico sob sistemas integrados (DO CARMO, 2015), comparação da diversidade bacteriana nas variações vegetais do bioma e suas perspectivas biotecnológicas (ARAÚJO, 2011), investimento em bioprospecção de microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial (LUZ, 2016). Estudos envolvendo a bioprospecção de fungos produtores de compostos bioativos isolados do solo do Cerrado (DO COUTO, 2013), a bioprospecção de espécies de fungos com potencial farmacêutico do solo do bioma (MOREIRA, 2009) e bioprospecção de bactérias provenientes de solo com potencial de degradação de contaminantes (DOURADO, 2017).

Além disso, bioprospecção de fungos celulolíticos do cerrado brasileiro para hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar (LOPES, 2015) e bioprospecção

de leveduras para produção de carotenoides microbianos (MACHADO, 2018). Avaliação de atividades amilolíticas identificadas em bibliotecas metagenômicas da microbiota do solo do cerrado (PY-DANIEL, 2010), avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais de plantas encontradas no cerrado do sul de minas gerais (CHAVASCO, 2013) e bioprospecção de microrganismo com potencial para produção de enzimas específicas (ALMEIDA, 2014).

Levando em conta a vastidão de aplicações biotecnológicas relacionadas à bioprospecção de microrganismos do solo do Cerrado brasileiro, a problemática quanto ao conhecimento limitado em relação a microbiota dos solos pode ser solucionada com o emprego de políticas que visem a associação de instituições públicas e privadas de pesquisa para o desenvolvimento científico (DO CARMO, 2015).

2.5. UTILIZAÇÃO DO GLICEROL COMO MATÉRIA PRIMA PARA PRODUÇÃO DE PHA

Na vertente de utilização de combustíveis obtidos de fontes renováveis destaca-se o biodiesel, combustível alternativo ambientalmente aos produzidos a partir de fonte fóssil, sintetizado a partir da reação entre um óleo ou gordura (ácidos graxos) e álcool, através de um processo denominado como transesterificação (ZHOL, 2008; KING, 2007). No Brasil, a produção de biodiesel se dá pela utilização de diversas matérias primas como a mamona, girassol, soja, cana-de-açúcar e até mesmo o sebo bovino, entre outros (PINTO, 2005; SANTOS, 2009).

Durante o processo de produção são formados o biodiesel e cerca de 10 % do total obtido é o glicerol (ZHOL, 2008; UMPIERRE, 2012). Atualmente, a produção de glicerol no Brasil beira a margem de 250 mil toneladas por ano, volume que excede a demanda do mercado pelo material, que se baseia na utilização em cosméticos, farmacêutica e produtos alimentícios (UMPIERRE, 2012).

A grande quantidade produzida de glicerol representa um dos grandes desafios para a indústria química brasileira, nesse cenário têm sido desenvolvidas tecnologias que convertem o coproduto em insumos utilizados em outros setores da indústria química, com maior valor agregado, estes processos baseiam-se na polimerização ou sua oxidação catalítica, podendo ser associadas ao processo de produção do biodiesel. Mesmo com o surgimento destas alternativas, na maioria das vezes o

material é sujeito a estocagem por longos períodos, ocasionando em sua degradação, principalmente pela ação de microrganismos, que utilizam o glicerol como fonte de carbono. (UMPIERRE, 2012).

Atualmente, na literatura, existem estudos relacionados à utilização do glicerol em diversas áreas: como plastificante e antiplastificante (SCHELEMMER, 2010; SHIMAZU, 2007); na alimentação animal (MENTEN, 2009); criopreservação e impermeabilização de materiais (SILVA, 2006; ZOCCHI, 2013); produção de biogás (VIANA, 2011); produção e síntese de materiais utilizando o coproduto como fonte de carbono (SARGO, 2011; ALMEIDA, 2010; TABOSA, 2009; ROMIO et al., 2014; SANTOS, 2010; CARON, 2006; LACERDA, 2013; SANTOS, 2008).

Em relação ao cultivo de microrganismos, o glicerol tem sido utilizado como fonte de carbono na produção bacteriana de polihidroxialcanoatos, possibilitando o rápido crescimento dessas bactérias, ocasionando um aumento na produção e acúmulo celular do polímero e, principalmente, barateando o processo, já que esta fonte de carbono é acessível e possui custos relativamente baixos (APATI, 2015; CARVALHO, 2011; SILVA, 2009).

3. OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo a bioprospecção de bactérias de amostra de solo Cerrado provenientes de Nova Andradina-MS, a fim de avaliar o potencial de produção do biopolímero polihidroxialcanoato por bactérias encontradas neste ambiente.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Bioprospecção de bactérias do solo de Cerrado;
- b) *Screening* da produção de polihidroxialcanoatos por bactérias do solo do Cerrado, através de métodos de coloração;
- c) Utilização do resíduo agroindustrial glicerol, como fonte de carbono em meio específico para bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. COLETA DE AMOSTRAS DE SOLO PARA PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS

Foram coletadas amostras de solo advindas do bioma Cerrado, numa área preservada de 5.000 hectares, localizada no assentamento Teijin, no distrito de Nova Casa Verde, pertencente ao município de Nova Andradina, no estado de Mato Grosso do Sul, entre as coordenadas geográficas 21°49'36.1"S e 53°13'07.1"W. A profundidade do solo coletado foi de zero a dez centímetros. Tais amostras foram levadas até o laboratório de Metagenômica da Universidade Federal da Grande Dourados, onde foram armazenadas em tubos de plástico e mantidas em geladeira convencional a 4°C.

4.2. MEIO DE CULTIVO PARA BACTÉRIAS PRODUTORAS DE PHA/PHB

Foi utilizado para o cultivo e isolamento dos microrganismos o meio ISP9, descrito por Matias et al. (2009), adaptado para a composição de: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 e KH_2PO_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.

Foram pesados 13,2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 28,25 g de K_2HPO_4 e 11,9 g de KH_2PO_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 0,31 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. 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).

4.3. BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS

Para a bioprospecção dos microrganismos, foram pesados 10 g da amostra, que posteriormente, foi diluída em 90 mL de solução salina a concentração de 0,9% em frasco Erlenmeyer. O material foi incubado em agitador orbital tipo shaker, a 130 rpm, 30°C, pelo período de 60 minutos.

Em seguida foi realizada diluição seriada da amostra até 10^{-6} , sendo então inoculados 100 μ L em placas de Petri contendo meio ISP9. A diluição foi feita em duplicata para as diluições de 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} , as placas foram incubadas em BOD a 30°C pelo período de 48 horas, para avaliação de crescimento bacteriano.

4.4. OBTENÇÃO DE COLÔNIAS PURAS

Após o período de 48 horas de crescimento bacteriano, foram selecionadas, com base no fenótipo, colônias morfologicamente diferentes, a fim de se obter isolados diferentes. A partir desta seleção foi realizada técnica de esgotamento em placas de Petri contendo o meio de cultura ISP9, para obtenção de colônias puras. O procedimento foi realizado repetidas vezes, até a comprovação da pureza das colônias.

4.5. TESTES MORFOTINTORIAIS

4.5.1. Microscopia de lâmina úmida

Para determinar a morfologia dos microrganismos estudados e diferenciá-los como bactérias, fungos ou leveduras, foi realizada observação em lâmina úmida. Para tal, realizou-se esfregão dos isolados obtidos, um a um, com a adição de uma gota de água destilada à lâmina. O material foi coberto com lamínula e ainda fresco, avaliado em microscópio óptico, utilizando a lente objetiva de 100 vezes, para isso foi necessária a aplicação de uma gota de óleo de imersão sobre a lamínula. Características como forma e tamanho celular, foram utilizadas como parâmetro na diferenciação dos microrganismos isolados.

4.5.2. Teste de Gram

A fim de determinar, além da morfologia das bactérias isoladas, seu tipo de parede celular, foi realizado teste de coloração de Gram. O procedimento foi realizado conforme a indicação do fabricante do kit utilizado (Laborclin), sendo realizado

esfregação das bactérias estudadas, uma a uma. O esfregação foi coberto por cristal violeta 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 esfregação. As colônias que apresentavam coloração rosa ou avermelhada foram consideradas bactérias Gram negativas, e as que apresentaram coloração roxa ou azulada, Gram positivas.

4.5.3. Teste de KOH

Com finalidade de confirmação dos resultados obtidos através do teste de Gram, foi realizado teste de KOH. Em uma lâmina de microscopia, com o auxílio de uma alça de platina, foi colocada uma pequena amostra da colônia isolada, e adicionadas duas gotas de solução de KOH a 3%, o material foi homogeneizado em movimentos circulares por aproximadamente 30 segundos. Durante a mistura, os movimentos de erguer o material com a alça devem indicar ou não se há viscosidade da amostra. Caso a bactéria analisada seja uma gram negativa, o KOH irá romper sua parede celular e expor o DNA, que poderá ser visualizado como um visco, caso a bactéria tenha sido erroneamente classificada como Gram negativa, o visco não existirá, por tratar-se de uma bactéria Gram positiva, cuja parede celular não é rompida pela solução de KOH a 3%.

4.5.4. Teste de catalase

Com o auxílio de uma alça de platina, foi recolhido uma quantidade considerável da bactéria de interesse e feito um esfregação em uma lâmina, em seguida foi adicionado uma gota de peróxido de hidrogênio 3% sobre as bactérias depositadas na lâmina. As amostras que apresentaram surgimento imediato de bolhas (a produção de efervescência indica a conversão do H_2O_2 em água e oxigênio gasoso) foram consideradas como resultado positivo, as que não apresentaram nenhuma

atividade como surgimento de bolhas ou efervescência são consideradas como resultado negativo. Este teste foi realizado apenas nas bactérias previamente identificadas como Gram-positivas.

4.5.5. Teste de oxidase

Este teste foi realizado somente para os isolados que foram classificadas anteriormente como Gram-negativas. Para que ocorresse, foram utilizadas fitas para determinação de oxidase NEWPROV e os procedimentos foram seguidos de acordo com as indicações do fabricante. Com a utilização de uma alça de platina, foi feito um pequeno esfregaço de bactérias direto da placa, no lugar indicado da fita. Foram considerados oxidase positiva aquelas que apresentaram uma mudança de cor para o roxo quase azulado na ponta da fita onde foi feito o esfregaço, e oxidase negativa para as que não apresentaram alterações.

4.6. PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS

4.6.1. Tubos inclinados

Os procedimentos para a preservação dos isolados, consistiram na realização de repiques contínuos em placas de Petri contendo o mesmo meio de isolamento, meio ISP9, incubadas a 30°C por de 48 a no máximo 72 horas e armazenados em tubos inclinados, também contendo meio de isolamento. Após inoculação dos tubos, estes foram deixados na BOD a 30°C no período de 48 horas para crescimento, e, posteriormente, armazenados em geladeira convencional. Os tubos foram renovados periodicamente, para manutenção e conservação dos isolados.

4.6.2. Glicerol

Para a preservação dos isolados também em freezer, foi preparada solução de glicerol a 40%, com a mistura de 80 mL de glicerina bidestilada em 120 mL de água destilada, como solução estoque. Os microrganismos foram cultivados em meio líquido rico com glicose e nitrato de amônio, para que houvesse crescimento considerável no período de 24 horas. Após esse período, 0,9 mL de meio líquido contendo os isolados e 0,9 mL de glicerol 40% foram colocados em tubos criogênicos e armazenados em freezer a -20°C.

4.7. SCREENING DA PRODUÇÃO DE PHA

4.7.1. Coloração das colônias com Sudan Black

O corante em pó Sudan Black foi diluído em etanol 96% a uma concentração de 0,02%, a diluição foi utilizada para colorir colônias isoladas crescidas em meio ISP9 pelo período de 48 horas. As placas com as bactérias foram recobertas totalmente com a solução por dez minutos, em seguida o corante foi retirado totalmente da placa. Por fim, a placa foi recoberta com etanol 96% por 10 minutos, o excesso de solução foi retirado e procedeu-se a análise. Considera-se um possível produtor de biopolímeros as placas cujas colônias foram coradas em azul, placas com resultado negativo apresentaram coloração branca ou rósea (SCHLEGEL et al., 1970). Como o corante sudan black não é específico para biopolímeros e sim para acúmulo de lipídeos, a coloração de colônias com corante fluorescente red Nile foi realizada conforme descrição abaixo.

4.7.2. Coloração das colônias com Red Nile

A cada 1 mL de meio de cultivo foi adicionado 1µL de solução estoque de corante Red Nile, na concentração de 25 µg.mL⁻¹ em DMSO. As bactérias foram inoculadas nas placas por estriamento e cultivadas a 30 °C pelo período de 24 a 48 horas, dependendo da velocidade de crescimento do isolado. A avaliação da produção de PHA foi feita com a exposição das bactérias cultivadas a luz ultravioleta em fotodocumentador (Loccus) , colônias de bactérias produtoras de PHA apresentaram aspecto fluorescente quando expostas a esta condição (SPIEKERMANN et al., 1999).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isolados, no total, 36 microrganismos do solo analisado, como descrito na tabela 01, todos os isolados foram classificados como bactérias, de acordo com os testes de lâmina úmida.

A morfologia bacteriana foi confirmada e os isolados foram caracterizados como sendo Gram negativos ou Gram positivos através do Teste de Gram, o teste de KOH foi confirmatório, assegurando os resultados para morfologia dos microrganismos.

Com o teste de KOH, 75% das bactérias (27 bactérias) foram identificadas como Gram positivas e 25% (09 bactérias) como Gram negativas. Procedeu-se teste de oxidase para os isolados Gram negativos e teste de catalase para os Gram positivos.

Tabela 01. Identificação morfotintorial dos isolados e resultados para o teste de Sudan Black, que indica a formação de lipídeos pelo microrganismo, e para o teste de Red Nile, que indica a produção de biopolímeros por bactérias.

Código da cepa	Morfologia	Gram	Catalase	Oxidase	KOH	Sudan Black	Red Nile
CNA1	Bastonete	+	-	NR	-	+	-
CNA2	Bastonete	+	-	NR	-	+	+
CNA3	Bastonete	-	NR	-	+	-	NR
CNA4	Cocus	+	-	NR	-	-	NR
CNA5	Bastonete	+	-	NR	-	+	+
CNA6	Bastonete	+	-	NR	-	+	-
CNA7	Cocus	-	NR	-	+	+	+
CNA8	Cocus	+	+	NR	-	-	NR
CNA9	Bastonete	-	NR	-	+	-	NR
CNA10	Cocus	+	-	NR	-	+	+
CNA11	Bastonete	+	+	NR	-	-	NR
CNA12	Bastonete	+	-	NR	-	+	+
CNA13	Bastonete	-	NR	-	+	+	+
CNA14	Bastonete	-	NR	-	+	+	+
CNA15	Bastonete	-	NR	-	+	+	-
CNA16	Cocus	+	-	NR	-	-	NR
CNA17	Cocus	+	+	NR	-	+	+
CNA18	Cocus	+	+	NR	-	-	NR
CNA19	Bastonete	+	+	NR	-	+	+
CNA20	Bastonete	+	-	NR	-	-	NR
CNA21	Cocus	-	NR	-	+	+	-
CNA22	Bastonete	+	-	NR	-	+	-
CNA23	Cocus	+	-	NR	-	-	NR
CNA24	Bastonete	+	+	NR	-	-	NR
CNA25	Cocus	-	NR	-	+	+	+
CNA26	Cocus	+	+	NR	-	-	NR
CNA27	Cocus	+	+	NR	-	+	+
CNA28	Cocus	+	+	NR	-	-	NR
CNA29	Cocus	+	-	NR	-	+	-
CNA30	Bastonete	+	-	NR	-	+	+
CNA31	Bastonete	+	-	NR	-	+	+
CNA32	Cocus	-	NR	-	+	+	+
CNA33	Cocus	+	+	NR	-	-	NR
CNA34	Bastonete	+	-	NR	-	-	NR
CNA35	Bastonete	+	-	NR	-	-	NR
CNA36	Bastonete	+	-	NR	-	-	NR

(+): positivo; (-): negativo; NR: não realizado

No teste utilizando o corante Sudan Black, 20 isolados apresentaram resultado positivo para a produção de lipídeos intracelulares, os resultados estão detalhados na tabela 01. O resultado positivo para o teste de Sudan Black (figura 06) serve como indício do possível acúmulo de polihidroxialcanoatos.

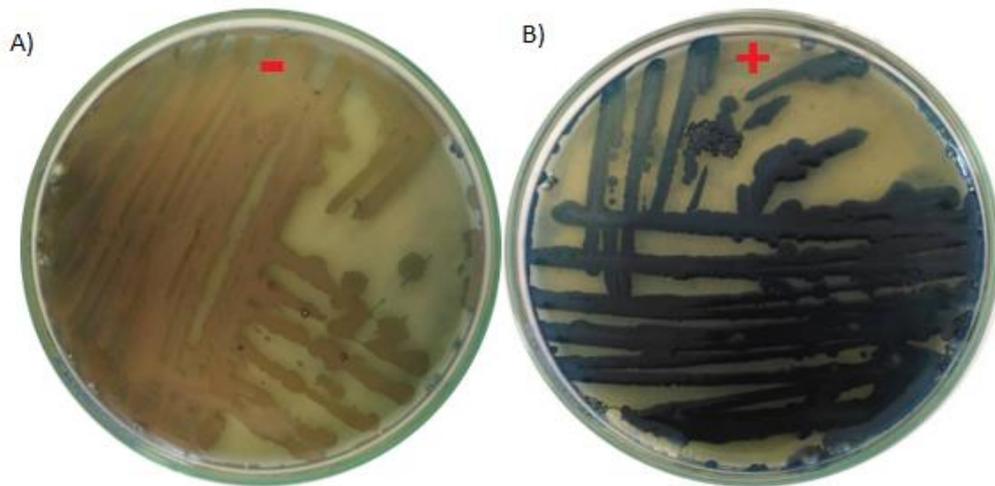


Figura 06 – *Screening* de produção de PHA, utilizando o corante Sudan Black. A) Colônias não coloridas, com resultado negativo para produção de PHA; B) Colônias azuis, com resultado positivo para produção de PHA.

Devido à inespecificidade do corante sudan black foi necessário o uso de outro método para a obtenção de resultados mais confiáveis, como a coloração fluorescente Red Nile (LAVORATO, 2008). Apesar dessa especificidade esta coloração mostra-se viável economicamente quando se tem um grande número de isolados para avaliar, frente à coloração com Red Nile que é um corante fluorescente muito mais caro.

Sendo assim, os 20 isolados que apresentaram acúmulo de lipídeos intracelulares foram submetidos à coloração com o corante Red Nile, teste específico para o *screening* de acúmulo de polihidroxialcanoatos. Das 20 bactérias analisadas, 70% (14 bactérias) apresentaram resultado positivo para a produção e acúmulo intracelular de PHA, como descrito na figura 07 e tabela 01.

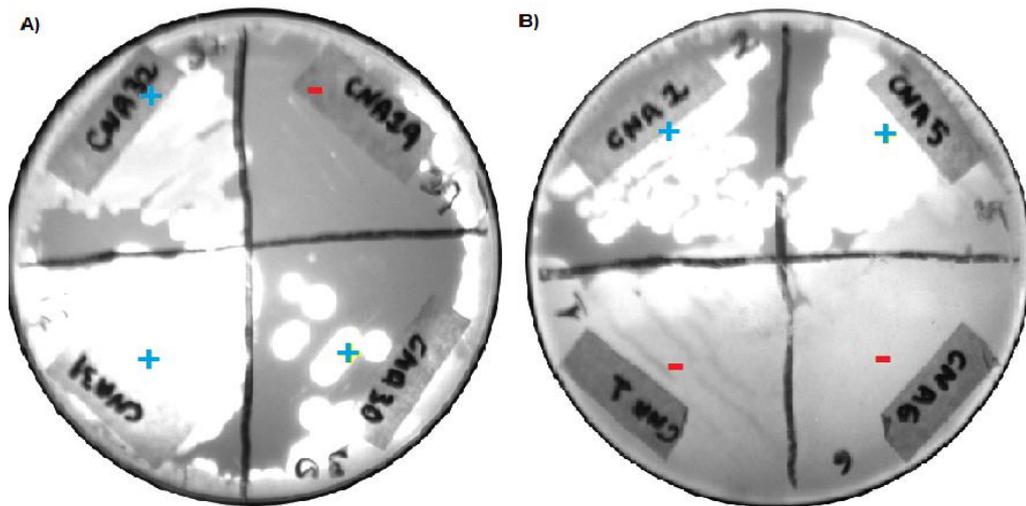


Figura 07 – *Screening* de produção de PHA, utilizando o corante Red Nile e exposição a luz UV. (+) Colônias fluorescentes, com resultado positivo para produção e acúmulo de PHA; (-) Colônias não fluorescentes, com resultado negativo para produção e acúmulo de PHA.

O teste de coloração por Red Nile é uma técnica relativamente acessível e confiável para a identificação de linhagens bacterianas produtoras de PHA (BERLANGA et al., 2006). Há na literatura a estimativa de que cerca de 250 espécies diferentes de bactérias já foram descritas como capazes de produzir e armazenar intracelularmente polihidroxialcanoatos como material de reserva (STEINBÜCHEL et al., 1991).

É interessante notar que esta técnica de coloração apresentou resultados positivos tanto para bactérias Gram positivas quanto Gram negativas (tabela 01).

Spikerman e colaboradores (1999) descreveram técnicas de coloração de colônias com meios corados com Red Nile como sendo um método bastante sensível e que ainda pode indicar diferentes intensidades de acúmulo de PHA, já que em seu trabalho foi notado que quanto maior a produção de PHA, maior a intensidade da fluorescência.

Outro ponto interessante foi o uso de glicerol no meio de cultivo como fonte de carbono, apontado por diversos autores como uma alternativa viável e interessante economicamente a ser utilizado em meios de cultura. Carvalho et al. (2011) destaca em seus estudos as vantagens deste tipo de cultivo.

O glicerol é o principal subproduto obtido da produção do biodiesel, possuindo um custo baixo de produção, segundo Silva (2009), para cada 90 m³ de biodiesel produzidos são obtidos 10 m³ de glicerol, fator que leva à necessidade de uma aplicação para o coproduto (MOTA et al., 2009).

Sargo (2011) aponta, em cultivos de *E. coli* utilizando glicerol, a possibilidade de se atingir uma elevada velocidade específica de crescimento celular, muito próxima à velocidade máxima de crescimento durante todo o processo de cultivo da bactéria. Outro aspecto apontado pelo autor é a adaptação do cultivo a temperaturas elevadas, em torno de 37°C, com níveis elevados de biomassa, sem que houvesse metabolismo “overflow”.

Segundo descrito por Apati et al. (2015), a adição de glicerol em meio de cultivo, na produção de P(3HB), levou a um aumento expressivo de acúmulo do biopolímero, mais de 70%, sendo a produção do polímero de 6,9 g/L, enquanto que, sem o glicerol a concentração obtida foi de 5,3 g/L.

Morcelli (2011) aponta que o crescimento bacteriano com a utilização desta fonte de carbono possui relação com a temperatura de cultivo e fonte de nitrogênio disponibilizados ao microrganismo.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados verificou-se que o solo de Cerrado estudado possibilitou o isolamento de 14 bactérias produtoras de PHA. Além disso, os dois métodos de coloração utilizados como *screening* de produção de PHA mostram-se complementares, porém o método fluorescente é mais sensível e específico.

Observa-se, ainda, a possibilidade de utilização do glicerol como fonte de carbono para a obtenção do biopolímero, levando em conta o custo acessível e viabilidade na aplicação deste coproduto.

Até o momento não foram descritos na literatura a bioprospecção de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos a partir de solos de Cerrado, mostrando um grande potencial biotecnológico deste bioma.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L.M.S., MACHADO, B.M. & MARINHO-FILHO, J. **A Diversidade Biológica do Cerrado. In Cerrado: ecologia e caracterização (L.M.S. Aguiar & A.J.A Camargo, eds.)**. Embrapa Cerrados, Planaltina, p.17-40, 2004.
- ALMEIDA, L. S. **Bioprospecção de micro-organismo com potencial para produção da enzima Tanase**, 2014.

- ALMEIDA, M.S. **Avaliação e caracterização de goma xantana sintetizada a partir de resíduos aquícolas e de glicerol como fonte de carbono.** Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em saúde e ambiente. Universidade Tiradentes. Aracaju. 2010.
- ANDRADE RORIGUES, M. F.; VALENTIN, H. E.; BERGER, P. A.; TRAN, M.; ASRAR, J.; GRUYS, K. J.; STEINBUCHER, A. **Polyhydroxyalkanoate accumulation in Burkholderia sp.: a molecular approach to elucidate the genes involved in the formation of two homopolymers consisting of short-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids.** *Applies Microbiology and Biotechnology*, v.53, p.453-460, 2000.
- ANTUNES, A. M. S. **Setores da indústria química orgânica.** Editora E-papers, 2007.
- APATI, G. P.; KELBERTH, M.; GARCIA, M. C.; SCHNEIDER, A. L.; JUNIOR, A. F.; PEZZIN, A. P. T. **Uso de glicerol como fonte de carbono adicional na produção de P(3HB),** 2015.
- ARAÚJO, J. F. **Diversidade bacteriana do solo em diferentes fitofisionomias do bioma cerrado e perspectivas biotecnológica,** 2011.
- ASSIS, A.; PANIZZI, M. **Biologicamente corretos.** *AgroANALYSIS*, v.23(4), p.32-34, 2003
- ASSUMPÇÃO, L.D.C.; LACAVA, P.T.; DIAS, A.C.F.; et al. **Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.44, n.5, p.503–510, 2009.
- ASTAR, J.; GRUYS, K. J. **Biodegradable polymer: Biopol.** In: STEIN, B. A.; DOI, Y. *Biopolymers*, v.4. Weinheim: WILEY- VCH, 2002.
- B. JOHNSON, M.; WEN, Z. **Production of Biodiesel Fuel from the Microalga Schizochytrium limacinum by Direct Transesterification of Algal Biomass.** *Energy & Fuels*, v. 23, n. 10, p. 5179–5183, 2009.
- BATALHA, M. A. **O cerrado não é um bioma.** *Biota Neotrópica*. 2009. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199119839002> ISSN 1676-0611. Acesso em: 20/082019.
- BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. **Lignins as Components of Macromolecular Materials, in Monomers Polymers and Composites.** *Renewable Resources*, eds M.N. Belgacem e A. Gandini. c.11, p.562, 2008.
- BIBY, G.D. **Degradable plastics,** 2002.
- BOX, E.O.; FUJIAWARA, K. **Vegetation types and their broad-scale distribution. In Vegetation ecology.** Blackwell, Oxford, p.106-128, 2005.
- BRADER, G.; COMPANT, S.; MITTER, B. et al. **Metabolic potential of endophytic bacteria.** *Current Opinion in Biotechnology*, v.27, p.30–37, 2014.
- BRITO, G F; AGRAWAL, P; ARAÚJO, E. M.; et al. **Embryo Preservation and in Vitro Production of Embryos.** *Materiais e Processo*, v. 2, p. 127–139, 2011.
- BYROM, D. **Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics.** *Trends Biotechnology*, v.5, p.246-250, 1987.
- CARON, D.; VOLPATO, G.; RECH, R. **Seleção de microrganismos produtores de lipase e avaliação da utilização de glicerol como fonte de carbono.** *Salão de*

Iniciação Científica (18.: 2006: Porto Alegre). Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2006.

CARVALHO, R. J.; CABRERA, C. J., GONÇALVES V. M.; **Development of production and purification processes of recombinant fragment of pneumococcal surface protein A in *E. coli* using different carbon sources.** Applied Microbiology and Biotechnology, 2011.

CHAMBERS, J. P. et al. **Biosensor Recognition Elements.** Curr. Issues Mol. Biol. v.10, p.1-12, 2008.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. **Biodegradable Polymers.** Progress in Polymer Science, v.23, p.1273-1335. 1998. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6700\(97\)00039-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6700(97)00039-7). Acesso em: 17/08/2019.

CHAVASCO, J. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais de plantas encontradas no cerrado do sul de minas gerais,** 2013.

CHATZIFRAGKOU, A.; MAKRI, A.; BELKA, A.; *et al.* **Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species.** Energy. v. 36, n. 2, p. 1097–1108, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0360544210006882>. Acesso em: 01/06/2019.

CHISTI, Y.; *Biotechnol. Adv.* **2007.**

CHIU, T. C.; HUANG, C. C. **Aptamer-Functionalized Nano-Biosensors.** Sensors, v.9, p.1356-1388, 2009.

COMPANT, S.; BRADER, G.; MUZAMMIL, S.; *et al.* **Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases.** BioControl, v.58, n.4, p.435–455, 2013.

COUTINHO, P.; BOMTEMPO J. V. **Roadmap tecnológico em matérias-primas renováveis: uma base para a construção de políticas e estratégias no Brasil.** Química Nova, v.34 c.5 p. 910-916, 2011.

DA SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; ROCHA, R. C. S.; *et al.* **Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil.** Química Nova, v. 30, n. 7, p. 1732–1743, 2007.

DO CARMO, K.B., **Comunidade bacteriana do solo e seu potencial biotecnológico sob sistemas integrados no ecótono cerrado Amazônia,** 2015.

DO COUTO, E. A.; ARAÚJO, F. O.; ANDRADE, T. H.; NAVES, P. L.; OLIVEIRA, M. S.; DIDONET, C. C.; MONTEIRO, V. N.; SANTILLO-UEG, T. H. **Bioprospecção de fungos isolados do solo do Cerrado goiano produtores de compostos bioativos,** 2013.

DOURADO, A. C. F. **Bioprospecção de bactérias provenientes de solo de floresta semidecidual com potencial de degradação do fenol e do xileno,** 2017.

DIMITROV, M. R. **Construção de biblioteca metagenômica e prospecção de genes para a síntese de polihidroxialcanoatos.** Dissertação de doutorado. Universidade de São Paulo, 2009.

ELLIS, R.P.; COCHRANE, M. P.; DALE, M. F. B.; DUFFUS, C. M.; LYNN, A.; MORRISON, I. M.; PRENTICE, R. D. M.; SWANSTON, J. S.; TILLER, S. A. **Starch**

production and industrial use (Review). Journal of Science Food and Agriculture, London, v.77, n. 3, p.289-311, 1998.

FONSECA, G. G. **Produção de polihidroxicanoatos por Escherichia coli recombinante**, 2003.

GANDINI, A. **Monomers, Polymers and Composites**. [s.l.: s.n.], 2008.

GIULIETTI, A.M., HARLEY, R.M., QUEIROZ, L.P., WANDERLEY, M.G.L. & PIRANI, J.R. **Caracterização e endemismos nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço**. In **Tópicos Atuais em Botânica (T.B. Cavalcanti & B.M.T. Walter, eds.)**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN, Brasília, DF, p. 311-318, 2000.

GOUDA, M. K.; SWELLAM, A. E.; OMAR, S. H. **Production of PHB by a Bacillus megaterium strain using sugarcane molasses and corn streep liquor as sole carbon and nitrogen sources**. Microbiological Research, v. 156, n. 3, p. 201-207, 2001.

GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C.; CONGESTRI, R.; *et al.* Biodiesel from microalgae. **Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products**, v. 25, p. 235–258, 2017.

GOMEZ, J. G. C.; NETTO, C. L. B. **Produções de poliésteres bacterianos**. In LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Ed.) **Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. ed.1, v.3, p.219-248, 2002.

HAGE JR, E., 1998. **Aspectos Históricos sobre o Desenvolvimento da Ciência e da Tecnologia de Polímeros**. Polímeros, v.8, c.2, p. 6-9, 1998.

HU, Z.; ZHENG, Y.; SHEN, Y. **Use of glycerol for producing 1,3-dihydroxyacetone by Gluconobacter oxydans in an airlift bioreactor**. Bioresource Technology, v. 102, n. 14, p. 7177–7182, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852411005967?via%3Dihub>. Acesso em: 01/06/2019.

HUANG, Y.; WU, F. **Plant Tissue-based Chemiluminescence Biosensor for Ethanol**. Analytical Sciences, v.22, p.965-969, 2006.

JOHNSON, M. B.; WEN, Z.; Energy Fuels, 2009.

KESSLER, B.; WITHOLT, B. **Poly(3-hydroxyalkanoates)**. Encyclopedia of bioprocess technology – fermentation, biocatalysis and bioseparation: New York. p. 2024-2040, 1999.

KING, A. G.; WRIGHT, M. W.; J. Chemmical Education. p.84-202, 2007;

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. **A conservação do cerrado brasileiro. Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 1, p. 147-155, 2005.

KNOTHE, G.; VAN GERPEN, J.; KRAHL, J.; **Manual de Biodiesel**. Edgard Blucher: São Paulo, 2006.

LANGER, R.; PEPPAS, N.A. **Advances in Biomaterials, Drug Delivery, and Bionanotechnology**. AIChE J., New York, v. 49, n. 12, p. 2990-3006, 2003.

LACERDA, C. E. O. **Avaliação do crescimento do Clostridium Acetobutylicum ATCC 4259 utilizando glicerol PA como substrato**. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

- LEE, S. Y. **Plastic bacteria- Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria.** Trends Biotechnology, v.14. p.431-428, 1996b.
- LEE, S.Y.; CHOI, J.; WONG, H.H. **Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: minireview.** International Journal of Biological Macromolecules. v.25, p. 31-36, 1999.
- LI X. F.; XU H.; WU Q. Y. **Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through hetero trophic cultivation in bioreactors.** Biotechnology and Bioengineering, 2007.
- LOCATELLI, G. O. **Estudo das condições de hidrólise da pectina para uso como substrato na produção de polihidroxialcanoatos,** 2012.
- LOPES, A. M. **Bioprospecção de fungos celulolíticos do cerrado brasileiro para hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar,** 2015.
- LUZ, B. D. S.; JULIANO, L. B.; BOUTROS, S.; RENATA, C. Z. L. **Bioprospecção de microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial realizada no Parque Estadual Serra do Ouro Branco, Brasil.** Interbio 10, v.1, p.13-14, 2016.
- LUVIZETTO, D. J. **Cultivo da bactéria *Bacillus megaterium* para a produção do biopolímero poli (2-hidroxibutirato) e modelagem matemática do bioprocesso.** Dissertação de doutorado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.
- MA, L.; CAO, Y. H.; CHENG, M. H. et al. **Phylogenetic diversity of bacterial endophytes of *Panax notoginseng* with antagonistic characteristics towards pathogens of root-rot disease complex.** Antonie Van Leeuwenhoek, v.103, n.2, p.299–312, 2013.
- MACHADO, W. R. C. **Bioprospecção de leveduras para produção de carotenoides microbianos,** 2018.
- MADISON, L. I.; HUISMAN, G. W. **Metabolic Engeneering of Poly(3-Hydroxyalkanoates) from DNA to Plastic.** Microbiology and Molecular Biology Rewiews, v. 63, n. 1, p.21-53, 1999.
- MALI, S. E.; GROSSMANN, M. V.; YAMASHITA, F. **Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização.** Semina: Ciências Agrárias. 2010. v.31, n.1, p.137-156. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445744095013>. Acesso em: 30/05/2019.
- MATIAS, F.; BONATTO, D.; PADILLA, G.; RODRIGUES, M. F. A.; HENRIQUES, J. A. P. **Polyhydroxyalkanoates production by actinobacteria isolated from soil,** 2009.
- MENTEN, J. F.; MIYADA, V.S.; BERENCHTEIN, B. E. **Glicerol na alimentação animal,** 2011.
- MICHELIN, M.; POLIZELI, M.L.T.M.; RUZENE, D.S.; SILVA, D.P.; VICENTE, A.A.; JORGE, J.A.; TERENCEZI, H.F.; TEIXEIRA, J.A. **Xylanase and -Xylosidase Production by *Aspergillus ochraceus*: New Perspectives for the Application of Wheat Straw Autohydrolysis Liquor.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 166, p. 336-347, 2012.
- MITTERMEIER, R.A., ROBLES, P., HOFFMANN, M., PILGRIM, J., BROOKS, T., MITTERMEIER, C.G.; LAMOREUX, J.; FONSECA, G.B. **Hotspots Revisited: earth's**

biologically richest and most endangered ecoregions. Conservation International, Cidade do México, 2005.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. **Mapas de Cobertura dos Biomas Brasileiros.** Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Nacional de Biodiversidade e Florestas, Brasília, DF, 2007.

MOHANTY, A. K.; MISRA, M.; DRZAL, L. T.; SELKE, S. E.; HARTE, B. R.; HINRICHSSEN, G. **Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites: An Introduction.** Boca Raton: Taylor & Francis, 2005.

MOREIRA, B. T. **Bioprospecção do potencial farmacêutico de duas espécies de fungos do solo do cerrado mineiro,** 2009.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** UFLA, Lavras. v.2, p.625, 2006.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. **Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da Glicerina de produção de biodiesel.** *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 639-648, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000300008>. Acesso em: 08/11/2019.

NEVES, A. L. D. P. **Uso de enzimas na extração de polihidroxicanoatos sintetizados por *Cupriavidus necator*.** 2009.

NORMA ABNT NBR 15448-1. **Embalagens plásticas degradáveis e/ou de fontes renováveis.** Parte1: Terminologia. Disponível em: <https://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=1124>. Acesso em: 14/06/2019.

PAOLI, M.A. **Degradação e estabilização de polímeros,** 2009.

PAPANIKOLAOU, S.; RUIZ-SANCHEZ, P.; PARISSET, B.; BLANCHARD, F.; FICK, M. **High production of 1,3-propanediol from industrial by glycerol a newly isolated *Clostridium butyricum* strain.** *J. Biotechnol.* v.77, p.191-208, 2000.

PERES, J.R.R.; SUHET, A.R.; VARGAS, M.A.T. **Fixação do N₂ em leguminosas cultivadas em solos de cerrados.** In: **CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Eds.).** *Microbiologia do solo.* Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. p.213-218, 1992.

PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. **Polymers in drug delivery.** *Current Opinion in Chemical Biology,* London, v. 5, p. 447-451, 2001.

PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. N.; REZENDE, M. J.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.; J. *Sociedade Brasileira de Química.* v.16, p.1313.

PITT, F.D.; BOING, D.; BARROS, A.A.C. **Desenvolvimento histórico, científico e tecnológico de polímeros sintéticos e de fontes renováveis.** *Revista da UNIFEBE.* v.1, p.9, 2011.

POLI, J. S.; DALLÉ, P.; SENTER, L.; MENDES, S.; RAMIREZ, M.; VAINSTEIN, M.; VALENTE, P. **Fatty acid methyl ester produced by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* QU21: an alternative for vegetable oils.** *Revista Brasileira de Biociências,* v. 11, n. 2, p. 203-208, 2013.

PÖTTER, M.; MADKOUR, M.; MAYER, F.; STEINBÜCHEL, A. **Regulation of phasing expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H 16.** *Microbiology,* v.148, p.2413-2426, 2002.

PRADELLA, J, G. C. **Biopolímeros e intermediários químicos**. Relatório técnico 84396-205, 2006,

PROSSER J.I. **Microrganisms cycling soil nutrientes and their diversity**. In: elsas JDv, Jansson JK, Trevors JT (eds). *Modern soil microbiology*. Boca Raton. p.237-261.

PY-DANIEL; KAREN, R. **Atividades amilolíticas identificadas em bibliotecas metagenômicas da microbiota do solo do cerrado**, 2010.

QI, Q.; REHM, B. M. A. **Polyhydroxybutirate biosynthesis in *Caulobacter crescentus*: molecular characterization of the polyhydroxybutirate synthase**. *Microbiology*, v.147, p.3353-3358, 2001.

RAMOS, M. L.; MENEGHIN, M.F.; PEDROSO C.; GUIMARÃES, C.M.; KONRAD M.D. **Efeito dos sistemas de manejo e plantio sobre a densidade de grupos funcionais de microrganismos, em solo de cerrado**. Embrapa Arroz e Feijão, 2012.

REDDY, C.S.K.; GHAI, R.; RASHMI, T.; KALIA, V.C. **Polyhydroxyalkanoates: an overview**. *Bioresource Technology*, v. 87, p. 137-146, 2003.

REHM, B. H. **Polyester synthases: natural catalyst for plastics**. *Journal of Biochemical*. v.376, p. 15-58, 2003. Disponível em: http://www.biochemj.org/bj/imps_x/pdf/BJ20031254.pdf. Acesso em: 31/05/2019.

REHM, B. H.; STEINBUCHER, A. **Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis**. *Biology. Macromol.* v.25, p.3-19, 1999.

RIBEIRO, J.F. & WALTER, B.M.T. **As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado**. In **Cerrado: ecologia e flora (S.M. Sano, S.P. Almeida & J.F. Ribeiro, eds.)**. Embrapa Cerrados, Planaltina. p.151 -212, 2008.

RODOLFI, L.; ZITTELLI, G. C.; BASSI, N.; *et al.* **Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor**. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 102, n. 1, p. 100–112, 2009.

ROMIO, T.; HARTMANN, C.; VIAPIANA, F.; MENEGHEL, L.; CARRA, S.; TORRES, A.P.; SOUSA, M.P.; BEAL, L.L.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M.D. **Cultivo de *Klebsiella oxytoca* em glicerol para a produção de 2, 3-butanodiol em biorreator de bancada**. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Florianópolis. p.1-7, 2014.

RUIZ-LEZA, H.A.; SILVA, D.P.; RUZENE, D.S.; LIMA, L.F.; VICENTE, A.A.; TEIXEIRA, J.A. **Bioethanol production from hydrothermal pretreated wheat straw Effect of process conditions**. *Fuel (Guildford)*, v. 95, p. 528-536, 2012

SANTOS, J.R.; OLIVEIRA, C. G.; SIQUEIRA, A. K. P. B.; SILVA, G. F.; FERREIRA, A. L. O. **Utilização de glicerol como fonte de carbono para obtenção de carotenóides de *Rhodotorula glutinis***, 2010.

SANTOS, E. O. M.; MICHELON, J. A.; GALLAS, J. F. M. B.; C. A. V. B. **Seleção de linhagens de leveduras para produção de biomassa usando glicerol como fonte de carbono**. In: III Congresso de Ciências Farmacêuticas/III Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Mercosul, Cascavel, PR, 2008.

SANTOS, A. P.; PINTO, A. C.; *Quimica Nova na Escola*. p.31-58, 2009.

- SARGO, C. R. **Aperfeiçoamento de cultivos de alta densidade celular de *E. coli* utilizando glicerol como fonte de carbono**, 2011.
- SATOH, Y.; MINAMOTO, N.; TAJIMA, K.; MUNEKATA, M.; **Polyhydroxyalkanoate synthase from *Bacillus* sp. INT005 is composed of phaC and PHAR**. Journal of Bioscience and Bioengineering, v.94, p.343-350, 2002.
- SAWANGKEAW, R.; NGAMPRASERTSITH, S. **A review of lipid-based biomasses as feedstocks for biofuels production**. Renewable & Sustainable Energy Reviews, v. 25, n. 1, p. 97-108, 2013.
- SHAMALA, T. R.; CHANDRASHEKAR, A.; VIJAYENDRA, S. V. N.; KSHAMA, L. **Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing *Bacillus* spp. using the polymerase chain reaction (PCR)**. Journal of Applied Microbiology. v.94, p.364-374, 2003.
- SHEU, D. S.; WANG, Y. T.; LEE, C. Y. **Rapid detection of polyhydroxyalkanoates accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR**. Microbiology. v.146, p.2019-2055, 2000.
- SHIMAZU, A. A.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. **Efeitos plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca**. Semina: Ciências Agrárias, v.28, p.79-88, 2007.
- SCHLEMMER, D.; SALLES, M. J.; RESCK, I. S. **Preparação, caracterização e degradação de blendas PS/TPS usando glicerol e óleo de buriti como plastificantes**. Polímeros: Ciência e Tecnologia, v.20, p.6-13, 2010.
- SICOL - **Sistema de Informação de Coleções de Interesse Biotecnológico**. Disponível em: <http://sicol.cria.org.br/>. Acesso em: 20/08/2019.
- SITEPU, I. R.; GARAY, L. A.; SESTRIC, R.; LEVIN, D.; BLOCK, D. E.; GERMAN, J. B.; BOUNDY-MILLS, K. L. **Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production**. Biotechnology Advances, v. 32, n. 7, p. 1336-1360, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.08.003>. Acesso em: 15/05/2019.
- SILVA, L.F.; GOMEZ, J.G.C.; ROCHA, R.C.S.; TACIRO, M.K.; PRADELLA, J.G.C. **Revisão - Produção Biotecnológica de Poli-hidroxiálcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil**. Química Nova, v.30, n.7, p.1732-1743, 2007.
- SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. **Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology**. Biotechnology Advances, v.27, n1, p. 30-39, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.006>. Acesso em 09/11/2019.
- SILVA, A.F.; DA COSTA, E.P.; OLIVEIRA, F.A.; TORRES, C.A.A.; DA SILVA, H. G.T.; NASCIMENTO, V.A. **Uso de dimetil-formamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de sêmen caprino**. Revista. Brasileira de Zootecnia. v.35, p.452-456, 2006.
- SOLAIMAN, D. K. Y. **Polymerase-chain-reaction-reaction-based detection of individual polyhydroxyalkanoate synthase phaC1 and phaC2 genes**. Biotechnology Letters, v.24, p.245-250, 2002.
- SOMBRIÓ, B, R, et al . **Produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator* em batelada alimentada usando glicerol**. Polímeros, São Carlos , v. 27, n.

- spe, p. 110-115, 2017. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282017000700110&lng=en&nrm=iso. Acesso em 09/11/2019.
- SONG, S.; XU, H.; FAN, C. **Potential Diagnostic Applications of Biosensors: Current and Future Directions**. International Journal of Nanomedicine, v.1, n.4, p.433-440, 2006.
- SPIEKERMANN, P.; REHM, B. H.; KALSCHUEER, R.; BAUMEISTER, D; 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**. Archives of Microbiology, v. 171, p. 73-80.
- STEINBÜCHER, A.; FÜCHTENBUSCH, B. **Bacterial and other biological systems for polyester production**. Tibtech, v.16, p. 419-427, 1998.
- STEINBÜCHER, A.; **Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: Metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example**. Macromolecular bioscience, v. 1, n.1, p. 1-23, 2001.
- SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. **Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters**. Progress in Polymer Science, v. 25, p. 1503-1555, 2000.
- TABOSA, M.; SOARES, L.; PINTO, G. **Utilização do glicerol como fonte de carbono em fermentação submersa**. In Embrapa Agroindústria Tropical-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, p.17., 2009, Natal. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2009.
- TALLIS, G.H. **Plant community history: long-term changes in plant distribution and diversity**. Chapman and Hall, London, 1991.
- TEODORO, M. S.; COMAR, V. **Introdução à Agroecologia: Módulo do curso de agroecologia UEMS, Unidade Glória de Dourados**, 2019.
- THIRU, M.; SANKH, S.; RANGASWAMY, V. **Process for biodiesel production from *Cryptococcus curvatus***. Bioresource Technology, v. 102, n. 22, p. 10436-10440, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.102>. Acesso em: 19/08/2019.
- TORTORA, G. J., CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. Artmed Editora, v.12, 2016.
- TSAI, S.M.; BARAIBAR, A.V.L.; ROMANI, V.L.M. **Efeito de fatores do solo**. Microbiologia do solo. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. p.59-72, 1992.
- TURNER, B. L.; DRIESSEN, J. P.; HAYGARTH, P. M.; MCKELVIE, I. D. **Potential contribution of lysed bacterial cells to phosphorus solubilisation in two rewetted Australian pasture soils**. Soil Biology & Biochemistry, Oxford, v. 35, p. 187-189, 2003.
- UMPIERRE, A. P.; MACHADO, F. **Gliceroquímica e Valorização do Glicerol**. Revista. Virtual de Química., 2013, 5 (1), 106-116, 2013.

- VALAPPIL, S. P.; BOCCACCINI, A. R.; BUCKE, C.; ROY, I. **Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces***. *Antonie van Leeuwenhoek*, n. 91, p. 1-17, 2007.
- VERLINDEN, R. A. J.; HILL, D. J.; KENWARD, M. A.; *et al.* **Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates**. *Journal of Applied Microbiology*, v. 102, n. 6, p. 1437–1449, 2007.
- VESTERGAARD, M.; KERMAN, K.; TAMIYA, E. **Overview of Label-free Electrochemical Protein Sensors**. *Sensors*, v.7, p.3442-3458, 2007.
- VIANA, M.B. **Produção de biogás a partir de glicerol oriundo de biodiesel**. Dissertação de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2011.
- VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J.A. **Bioethanol production from hydrothermal pretreated wheat straw effect of process conditions**. *Fuel (Guildford)*, v. 95, p. 528-536, 2012.
- VICENTE, G.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J.; **Bioresour. Technol**, 2004.
- WANG, J. **From DNA Biosensors to Gene Chips**. *Nucleic Acids Research*, v.28, n.16, p.3011-3016, 2000.
- WARDLE, D. A.; PARKINSON, D. **Interactions between microclimatic variables and the soil microbial biomass**. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v.9, n.3, p.273-280, 1990.
- ZHANG, A.; YANG, S. **Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered *Propionibacterium acidipropionici***. *Biochemistry*, v. 44, p.1346-1351, 2009.
- ZHANG, G.; MA, B.; XU, X.; LI, C.; WANG, L. **Fast conversion of glycerol to 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae***. *Biochemical Engineering Journal*, 37, 256-260, 2007.
- ZHAO, X.; KONG, X.; HUA, Y.; FENG, B.; ZHAO, Z. K. **Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkey***. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 110, n. 5, p. 405-412, 2008.
- ZHOU, C. H.; BELTRAMINI, J. N.; FAN, Y. X.; LU, G. Q.; *Chemical Society. Revista*. v.37, p.527, 2008.
- ZOCCHI, S. S.; SARANTÓPOULOS, C. I.; SARMENTO, S; MATTA, M. D. D. **Propriedades de barreira e solubilidade de filmes de amido de ervilha associado com goma xantana e glicerol**. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.21, p.67-72, 2013.