

Gilka Cunha Lavorato

Prospecção de microrganismos produtores
de polihidroxicanoatos (PHAs) com ênfase em
Chromobacterium violaceum, isolados do Parque Nacional da
Serra do Cipó (MG)

Belo Horizonte
Departamento de Biologia Geral
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Gilka Cunha Lavorato

Prospecção de microrganismos produtores
de polihidroxicanoatos (PHAs) com ênfase em
Chromobacterium violaceum, isolados do Parque Nacional da
Serra do Cipó (MG)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Genética do Departamento de
Biologia Geral do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Minas
Gerais como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em genética.

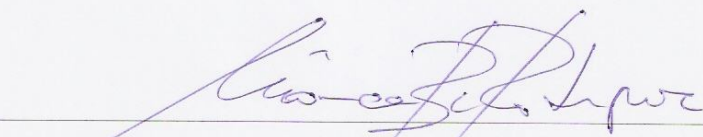
Orientadora: Prof^a Dr^a Mônica Bucciarelli
Rodriguez

Belo Horizonte
Departamento de Biologia Geral
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
2008

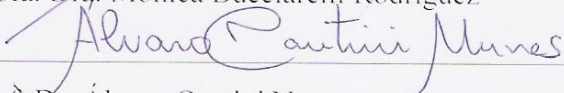


Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

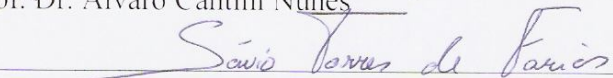
Dissertação defendida e aprovada, em 31 de julho de 2008, pela Banca Examinadora constituída pelos Professores:



Profa. Dra. Mônica Bucciarelli Rodriguez



Prof. Dr. Álvaro Cantini Nunes



Prof. Dr. Sávio Torres de Farias

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.
Apoio financeiro: CAPES

A Deus, aos meus pais e a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que esse este trabalho fosse realizado.

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof.^a Mônica Bucciarelli Rodriguez, muito mais que somente uma orientadora, uma amiga e um exemplo. Obrigada pela paciência, carinho e por todos os ensinamentos que com certeza, serão levados por toda a minha vida.

Aos professores Andréa, Chartone e Adlane, pela ajuda, convivência e sugestões, sempre oportunas.

À Renata, Raquel, Ricardo, Thiago e a todos os amigos do LGMM.

À Marina, Noeli, Paixão, Andrea e Rosa, por toda ajuda e carinho dispensados.

À Ana Raquel, Cláudia, Gleydson, Higgor, Kinulpe, Leandro, Michele e Rosana. Além da ajuda, pela amizade. Vocês foram fundamentais.

A todos os amigos dos laboratórios do Departamento de Biologia Geral, todos contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Aos professores e componentes dos laboratórios que ajudaram a realizar este trabalho, pelo tempo e conhecimento dispensados. Agroecologia, Prof. Rodrigo da Matta Machado; Biodados, Prof. Miguel Ortega; Biodiversidade e Evolução Molecular (LBEM), Prof. Fabrício R. dos Santos; Biologia Celular, Prof. Luiz Renato de França; Biologia Estrutural e Reprodução, Prof. Hélio Chiarini-Garcia; Biotecnologia e Marcadores Moleculares, Prof. Evanguedes Kalapothakis; Ivete e Olga, CEMEL; Citogenética, Prof.^a Marta Svartman; Genética Bioquímica, Prof. Sérgio Pena; Genética de Microrganismos, Prof.^a, Adlane Vilas-Boas Ferreira, Prof.^a Andréa Amaral Nascimento, Prof. Edmar Chartone de Souza; Genética Molecular e Celular, Prof. Vasco Azevedo; Genética Quantitativa e de Populações, Prof.a Maria Bernadete Lovato; Laremar, Departamento de Química, ICEX, UFMG; Limnologia, Prof. Francisco A.R. Barbosa; Neurobiologia, Prof.a Luiciana Andrade, Prof.a Patrícia Massara Martinelli; Prof. Alfredo Goes; Prof. Carlos Brandt; Prof. Dalton Luiz Ferreira Alves; Prof. Sérgio Costa Oliveira; Prof.^a Elisabete José Vicente; Química Farmacêutica, FaFar, UFMG.

À minha família, Raul e amigos pelo carinho, amor e paciência. Por me suportar nos dois sentidos da palavra, sem o apoio vocês; eu não poderia realizar trabalho algum.

À Deus, minha gratidão por tudo o que possuo em felicidade, em conhecimento, em conforto, em triunfos.

Sumário

Agradecimentos.....	4
Sumário	5
Lista de abreviaturas	8
Resumo	9
Abstract	10
1. Introdução.....	11
1.1. Plásticos e meio ambiente.....	11
1.2. Polímeros biodegradáveis.....	12
1.2.1. Polímeros biodegradáveis sintéticos.....	12
1.3. Polímeros biodegradáveis naturais.....	12
1.4. Polihidroxicarboxilatos (PHA).....	13
1.5. Histórico	13
1.1.1. Estrutura Química do PHA.....	15
1.1.2. Propriedades Físicas	18
1.1.3. Biodegradabilidade.....	19
1.1.4. Aplicações de uso.....	20
1.1.5. Síntese de PHA em Bactérias	20
1.1.5.1. Genes envolvidos na Biossíntese de PHA.....	22
1.1.5.2. PHA sintase	24
1.2. PHA em <i>Chromobacterium violaceum</i>	24
1.2.1. Potencial Biotecnológico.....	27
2. Objetivos	28
3. Justificativa	29
4. Material e Métodos.....	30
4.1. Bactérias	30
4.2. Plasmídios.....	34
4.3. Estocagem e cultivo das bactérias.....	35
4.4. Meios de Cultura.....	35
4.4.1. Meio T.I.	35
4.4.2. TSB.....	36
4.4.3. LB	36
4.4.4. Meio LB/X-GAL.....	36
4.4.5. Meio SOC	36
4.4.6. Meio Mínimo	36
4.5. Soluções e tampões.....	36
4.5.1. SET.....	37
4.5.2. Tampão de corrida TAE 1X.....	37
4.5.3. Fontes de carbono.....	37
4.5.4. Tampões de amostra.....	37
4.5.5. Soluções para extração de plasmídios (Mini-prep).....	37
4.5.6. Solução clorofórmio/ álcool isoamílico	37
4.5.7. Solução de Ampicilina	37
4.5.8. Gel de agarose 0,8%	37

4.6.	Produção e análise do PHA produzido	38
4.6.1.	Métodos de coloração para a identificação de bactérias produtoras de biopolímeros.....	38
4.6.1.1.	Coloração por “Sudan Black” (Schlegel et al., 1970).....	38
4.6.1.2.	Coloração por “Nile Blue A” (Ostle ; Holt, 1982)	38
4.6.1.3.	Coloração por “Nile Red” (Spiekermann et al., 1999).....	38
4.7.	Curva de crescimento.....	39
4.8.	Espectrofluorometria	39
4.9.	Microscopia de fluorescência	40
4.10.	Electromicroscopia de Transmissão - TEM	40
4.11.	Preparação das células bacterianas e extração de polímero.....	41
4.12.	Determinação dos grupamentos funcionais da amostra utilizando espectrômetro de IV.	41
4.13.	Determinação da composição do PHA por RMN.....	41
4.14.	Extração e purificação de DNA plasmidiano de <i>E. coli</i> por minipreparações (Mini-preps).....	42
4.15.	Amplificação do gene de RNA ribossômico 16 S.....	42
4.16.	Extração de DNA genômico.....	43
4.17.	Amplificação de fragmentos de DNA para a identificação dos genes responsáveis pela informação genética da PHA sintase.....	44
4.18.	Iniciadores	45
4.19.	Eletroforese em gel de agarose	46
4.20.	Precipitação de DNA com polietilenoglicol (PEG 8000).....	46
4.21.	Clonagem e expressão do gene de PHA sintase	47
4.22.	Transformação de células de <i>E.coli</i> por eletroporação.....	47
4.22.1.	Preparo de células competentes	47
4.22.2.	Eletroporação.....	48
4.23.	Reações de seqüenciamento	48
4.23.1.	Seqüenciamento dos produtos de PCR clonados nos vetores pGEM-T Easy (Promega) e pCR [®] 2.1- TOPO [®] (Invitrogen)	48
4.23.2.	Reação de seqüenciamento	48
4.23.3.	Precipitação da reação de seqüenciamento	49
4.23.4.	Análise das seqüências dos produtos de PCR.....	49
5.	Resultados e Discussão	50
5.1.	Identificação de bactérias produtoras de PHA.....	50
5.2.	Métodos de coloração.....	50
5.2.1.	“Sudan Black B”	50
5.2.2.	“Nile Blue A”	52
5.2.3.	“Nile Red”.....	52
5.3.	Microscopia ótica de fluorescência.....	53
	Grânulo de PHA	54
6.	Identificação da bactéria considerada produtora.....	54
7.	Capacidade de conversão de diferentes fontes de carbono em PHA , pela linhagem <i>C. violaceum</i> SC 48	56
8.	Análise do PHA produzido por <i>C. violaceum</i> SC 48	59

8.1.	Avaliação de produção de PHA	59
8.2.	Análises físico-químicas do PHA produzido	60
8.2.1.	Análise por Infravermelho (IV)	60
8.2.2.	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	63
9.	Amplificação de PHA sintase por PCR	65
9.1.	Amplificação de PHA sintase, por SN-PCR.....	65
9.2.	Amplificação de PHA sintase por oligonucleotídeos específicos.....	65
10.	Análise da seqüência da PHA sintase por seqüenciamento.....	67
12.	Conclusão	68
13.	Referências Bibliográficas	

Lista de abreviaturas

µg: micrograma
µL: microlitro
3HB: 3- hidroxibutirato
3HD: 3- hidroxidecanoato
3HDd: 3-hidroxidodecanoato
3HHX: 3- hidroxihexanoato
3HO: 3-hidroxi octanoato
ABS : absorvância
AN : Agar Nutriente
CG - ES : Cromatografia gasosa acoplada a espectômetro de massa
CN : Caldo Nutriente
CoA : coenzima A
CTAB : brometo de cetil-trimetilamônio
DNA: ácido desoxirribonucléico
g/L : gramas por litro
g: grama
Lac-Z: gene que codifica a enzima β-galactosidase
mL: mililitro
MM M9 : meio de cultura mineral mínimo M9
MSC: Massa seca celular
NADPH : Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ng: nanograma
pb: par (es) de base (s)
PCR: reação em cadeia da polimerase
PHA: polihidroxialcanoatos
phaA: gene de β-cetolase
phaB: gene de acetoacetil coA redutase
phaC : gene de PHA sintase
PHA_{MCL}: polihidroxialcanoatos de cadeia média
PHA_{SCL}: polihidroxialcanoatos de cadeia curta
phaZ: gene de despolimerização de PHA
PHB4B : poli (3-hidroxibutirato-co-4-polihidroxibutirato)
PHBHx : poli (hidroxibutirato-co- hidroxihexanoato)
PHBV : poli (hidroxibutirato-co- hidroxivalerato)
RMN: Ressonância magnética nuclear
RNA: ácido ribonucléico
Rpm: rotações por minuto
TAE: tampão Tris-Acetato-EDTA
TEM: Microscopia eletrônica de transmissão
UV: ultravioleta
X-gal: 5-bromo-4cloro-3indolil-β-D-galactosídeo
β-gal: enzima beta galactosidase

Resumo

Polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres biodegradáveis sintetizados por muitas bactérias, que por se assemelhar ao polietileno, são uma alternativa na substituição de plásticos derivados do petróleo. PHAs são acumulados intracelularmente como reserva de carbono e energia sob certas condições de depleção de alguns nutrientes e excesso de uma fonte de carbono. *Chromobacterium violaceum* é uma bactéria de água doce e solo das regiões tropicais e subtropicais, como no Parque Nacional da Serra do Cipó (PNSC), MG, e pode acumular co-polímeros de 3-hidroxicbutirato (3HB) e 3-hidroxicvalerato (3HV). Em estudo prévio, cerca de 400 isolados foram coletados durante os anos de 2004, 2005 e 2006 (Bittencourt, 2003). Empregando-se os corantes “Sudan Black B”, “Nile Blue A” e “Nile Red”, foram isoladas bactérias produtoras de PHA em diversos substratos. Foi padronizado então, o tempo e concentração de açúcar no meio ideal para o acúmulo de PHA, tendo sempre *Cupriavidus necator*, já conhecida produtora como controle, e selecionados 30 isolados com potencial produtivo. Empregando-se seqüenciamento de rDNA 16S, alguns isolados foram re-confirmados como *C. violaceum*. O gene codificador de PHA sintase (*phaC*), enzima chave que catalisa o último passo na via de produção de PHA, foi amplificado por PCR. Foi evidenciada a presença de *phaC* nos isolados. A seqüência de *phaC*, embora de baixa qualidade, indicou similaridade com *phaC* de *C. violaceum*, bem como com outras bactérias produtoras de PHA. Os isolados tidos como melhores produtores nos ensaios anteriores, foram utilizados para testes posteriores. O PHA presente nas bactérias foi evidenciado através da análise da curva de crescimento (coloração com “Nile-Red” e análise espectrofluorimétrica), microscopia de fluorescência (“Nile-Red”) e microscopia eletrônica, evidenciando-se a presença de enzimas envolvidas na síntese (PHA sintase). O isolado SC48 foi cultivado em meio mineral (M9) contendo diferentes fontes de carbono. Os PHA produzidos foram extraídos, parcialmente purificados e submetidos a diferentes análises físico-químicas: Ressonância Magnética de ^{13}C (RMN ^{13}C), Ressonância Magnética de Prótons (RMN ^1H) e Infravermelho (IV). Estas análises revelaram se tratar realmente de um polihidroxicanoato.

Palavras-chave: Polihidroxicanoatos (PHA), *Chromobacterium violaceum*, Parque Nacional da Serra do Cipó (PNSC) e PHA sintase (*phaC*).

Abstract

Polyhydroxyalkanoate (PHAs) are biodegradable polyesters synthesized by many bacteria which properties are similar to conventional plastics like polyethylene. Therefore, they can work as an alternative for petrochemical derivatives. They are found intracellularly and have function of carbon and energy reserve at nutrient depletion and abundance of carbon source. PHAs are synthesized and accumulated by several bacteria such as *Chromobacterium violaceum*. This bacterium occurs in water and soil of tropical and subtropical regions such as Parque Nacional da Serra do Cipó (PNSC), which is located in Minas Gerais, Brazil. *C. violaceum* can accumulate copolymers of 3-hydroxy-butyrate (3HB) and 3-hydroxy-valerate (3HV). In a previous study, about 400 isolates have been collected during the years of 2004, 2005 and 2006 (Bittencourt, 2003). Cultures of these isolates were spotted on plates containing media with different sugars as carbon source and PHA-producing bacteria were isolated by using “Sudan Black B”, “Nile Blue” and “Nile Red” staining. We have standardized the culture time and sugar concentration, as well as the ideal medium for the PHA accumulation, using always *Cupriavidus necator*, a well-known PHA producer, as the positive control. We selected 30 isolates by this approach that showed production potential. Sequencing rDNA 16S confirm these isolates as being *C. violaceum*. The gene coding for PHA synthase (*phaC*), the key enzyme that catalyze the last step of polymer production was amplified for PCR, indicating the presence of the gene in the isolates. Sequence analysis of *phaC* (although the sequence presented poor quality) showed similarity with *phaC* of *C. violaceum* and other PHA producer bacteria. These isolates have been used for further tests. The presence of PHA in the isolates was evidenced through the spectrofluorometry analysis of growing cells (stained by “Nile-Red”), fluorescence microscopy (staining with “Nile-Red”) and electronic microscopy. SC 48 isolate was cultivated in mineral medium (M9) containing glucose, sucrose and glycerol as carbon sources. The PHA produced was extracted, partially purified and submitted to different physical-chemical analyses: ¹³C Nuclear Magnetic Resonance (RMN ¹³C), Proton Nuclear Magnetic Resonance (RMN ¹H) and Infrared (IR). These analyses indicated that the product is actually a polyhydroxyalkanoate. **Keywords:** Polyhydroxyalkanoates (PHA), *Chromobacterium violaceum*, PHA synthase (*phaC*), biodegradable polyesters, Parque Nacional da Serra do Cipó (PNSC).

1. Introdução

1.1. Plásticos e o meio ambiente

Os plásticos são materiais sintéticos obtidos por meio de processos de polimerização ou multiplicação artificial dos átomos de carbono, derivados na sua maioria, do petróleo.

A partir do século XX, houve um aumento da população humana, seguido de um desenvolvimento acelerado da indústria, com a utilização de inúmeras técnicas de processamento e produção de novos polímeros. Isso tudo colaborou para a explosão do consumo de produtos que tem pelo menos algum plástico na sua composição. Desde então, alguns polímeros se destacaram por seu baixo preço e grande facilidade de processamento, o que incentivou seu uso em larga escala, como polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS) e o policloreto de vinila (PVC). Com inúmeras possibilidades de uso tanto doméstico quanto industrial, em pouco tempo o plástico foi popularizado e hoje, está presente em quase na totalidade dos utensílios de uso cotidiano.

Dentre os principais componentes do lixo urbano, que aumenta a cada ano, estão os polímeros usados como matéria prima na confecção de diversos produtos, como sacos de supermercados e garrafas pet, cujo excesso de uso nos saltam aos olhos. Outros produtos, de uso diário, passam despercebidos como, hastes de cotonetes®, tintas de parede, revestimentos de painéis, mamadeiras, próteses, pneus, pára-choques de veículos, tapetes, cobertores, entre outros (Rosa *et al*, 2001). Em 2000, o Brasil produziu aproximadamente 23 mil toneladas de lixo/ dia. Em média 20% desse volume, correspondente aos plásticos (Coutinho *et al.*, 2004).

Inicialmente se buscou o desenvolvimento de polímeros sintéticos, devido às suas características de relativa inércia e resistência a biodegradação, diferente de polímeros naturais como amido, celulose e proteínas (Coutinho *et al.*, 2004). A crescente alta do preço mundial do barril de petróleo, bem como a instabilidade geopolítica das regiões onde se localizam as grandes reservas mundiais, assim como as formas de descarte dos plásticos hoje utilizados, como a incineração, o aterramento e o baixo volume da reciclagem, têm despertado nas sociedades desenvolvidas e em desenvolvimento, a consciência da necessidade da criação de tecnologias limpas ou verdes e têm levado à

busca por matérias-primas como fontes renováveis para a biossíntese de produtos como os polímeros (Lee, 1996).

Os polihidroxialcanoatos bacterianos constituem uma classe de polímeros que possuem características de biodegradabilidade e de uso interessantes e, atualmente, são alvo de muitos estudos em todo o mundo (Solaiman et al., 2005).

1.2. Polímeros biodegradáveis

Não existe um consenso ao se definir polímero biodegradável. Para tal, a maior parte das definições se guia por aquela adotada pela ISO:1472:1998:

“Um plástico determinado que, sofre alterações na estrutura química, sob específicas condições ambientais, resultando na perda de algumas propriedades que devem ser mensuradas por testes com métodos padrão apropriados, em períodos de tempo pré-determinados, sendo que estas mudanças na estrutura química devem resultar da ação natural de microorganismos”.

Outras definições também são utilizadas, como a da “American Society for Testing and Materials (ASTM)” (proposta D20.96): “Plásticos biodegradáveis são plásticos que sofrem cortes nas ligações da cadeia do polímero, sejam estes cortes químicos, biológicos e/ ou por força física no meio ambiente levando a uma fragmentação ou desintegração do plástico” (www.astm.org).

Os polímeros biodegradáveis podem ser agrupados em sintéticos e naturais.

1.2.1. Polímeros biodegradáveis sintéticos

São ésteres alifáticos, considerados biodegradáveis por possuírem cadeias carbônicas hidrolisáveis. Os principais representantes são ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA), poli(ácido glicólico-ácido láctico) (PGLA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL).

1.2.2. Polímeros biodegradáveis naturais

São polímeros formados durante o ciclo de crescimento de organismos vivos. Na maioria das vezes, sua síntese envolve reações catalisadas por enzimas e reações de crescimento de cadeia a partir de monômeros formados intracelularmente por processos metabólicos complexos. Eles são os polissacarídeos (celulose, amido e carboidratos

complexos: quitosanas, quitinas e xantanas), ácidos algínicos (formados por monômeros de ácidos manurônico e gulurônico) e os poliésteres bacterianos (polihidroxicanoatos – PHAs) (Franchetti e Marconato, 2006).

1.3. Polihidroxicanoatos (PHA)

São poliésteres biodegradáveis, sintetizados e acumulados por pelo menos 300 microrganismos diferentes já descritos. São sintetizados quando no meio, há excesso de fonte de carbono e falta ou limitação de algum outro nutriente necessário para o crescimento celular: pode ser nitrogênio, oxigênio (para aeróbicos estritos), enxofre, fósforo e magnésio entre outros e acumulados em corpos de inclusão (usualmente chamados de grânulos) de estocagem de carbono e energia para as bactérias que os produzem. Uma célula pode conter vários grânulos de PHA (<http://www.clt.astate.edu/dqilmore/Research%20students/phas.htm>). Quando o nutriente em falta reaparece, o PHA dos grânulos é quebrado e o carbono é utilizado para a biossíntese celular (Anderson, Dawes, 1990).

1.3.1. Histórico

Em 1923 Lemoigne relatou que quando culturas de *Bacillus megaterium* sofriam autólise em água destilada, tinham seu pH diminuído devido à liberação de algum tipo de ácido. Lemoigne descobriu que se tratava do ácido 3-hidróxido butírico acumulado no interior das células bacterianas. Em 1925, Lemoigne descreveu a presença de grânulos de lipídio no citoplasma de células bacterianas de *Bacillus megaterium* e os identificou como polímeros de ácido hidroxibutírico (PHB) (Gomes e Bueno Netto, 2001). Em 1958 foi observado por Macrae e Wilkinson que a produção de PHB só ocorria em *B. megaterium* em abundância de glicose e restrição de nitrogênio e que o polímero era rapidamente degradado quando a fonte de carbono se tornava escassa. Essa observação os levou a conclusão de que este polímero produzido se tratava de reserva de carbono e energia para a célula. Na década de 60, foi descoberta a existência de outros polímeros, que não eram somente PHB produzidos e acumulados em corpos de inclusão por diversas bactérias, tanto gram negativas quanto positivas, e Archaea. Foi

empregado, então, o termo polihidroxicarboxilato (PHA) para se denominar essa família (Anderson e Dawes, 1990).

Os PHAs foram, a partir disso, objeto de estudos, mas o grande interesse por eles se deu não por ser um material natural, e sim após a descoberta de que, além da sua similaridade aos termoplásticos como o PP, poderia ser completamente degradado por microrganismos .

O aumento das pesquisas revelou a diversidade de estruturas moleculares que pode ser biossintetizada (Tabela 1) de acordo com o organismo e substratos utilizados (Anderson, Dawes, 1990).

Tabela 1: Síntese Bacteriana de PHAs

Linhagens bacterianas	Fonte de carbono	Polímeros produzidos	Referência
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Ácido Láurico, ácido oléico	mcl-PHAs	Lee et al. 2000; Han et al. 2004
<i>Alcaligenes latus</i>	Malte, óleo de gergelim, rejeito da produção de soja, leite, e vinagre	PHB	Wong et al. 2004, 2005
<i>Bacillus cereus</i>	Glicose, e-caprolactona, melão de açúcar de beterraba	PHB	Labuzek e Radecka 2001; Yilmaz e Beyatli 2005; Valappil et al. 2007
<i>Bacillus spp</i>	Caldo nutriente, glicose, alcenoatos, e-caprolactona, melão de soja	PHB, PHBV, co-polímeros	Katircioglu et al. 2003; Shamala et al., 2003; Tajima et al. 2003; Yilmaz et al.,2005; Full et al. ,2006
<i>Burkholderia sacchari sp. nov.</i>	Adonitol, arabinose, arabitol, celobiose, frutose, fucose, lactose, maltose, melibiose, rafinose, ramnose, sorbitol, sacarose, trealose, xilitol	PHB, PHBV	Bramer et al. 2001
<i>Burkholderia cepacia</i>	Óleo plamítico, estearina, óleo de palma cru, óleo de semente de palma , ácido oléico, xilose, ácido levulíinico , melão de açúcar de beterraba	PHB, PHBV	Keenan et al. 2004; Nakas et al. 2004; Alias e Tan 2005; C, elik et al. 2005
<i>Caulobacter crescentus</i>	Meio para Caulobacter, glicose	PHB	Qi e Rehm, 2001
<i>Escherichia coli mutantes</i>	Glicose, glicerol, óleo palmítico, etanol, sacarose, melão (UHMW)	PHB	Mahishi et al. 2003; Kahar et al. 2005; Park et al. 2005a; Nikel et al. 2006; Sujatha e Shenbagarathai 2006
<i>Halomonas boliviensis</i>	Amido hidrolizado, maltose, maltotetraose e maltohexaose	PHB	Quillaguaman et al. 2005, 2006
<i>Legionella pneumophila</i>	Caldo nutriente	PHB	James et al. 1999
<i>Methylocystis sp</i>	Metano	PHB	Wendlandt et al. 2005

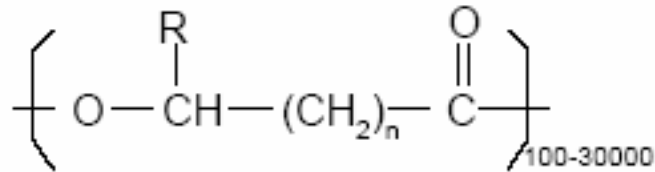
<i>Microlunatus phosphovor</i>	Glicose, acetato	PHB	Akar et al. 2006
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Glicose, ácido oléico, rejeito de ácidos graxos, resto de óleo de fritura.	mcl-PHAs	Hoffmann e Rehm 2004; Fernandez et al. 2005
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Ácido octanóico	mcl-PHAs	Durner et al. 2000; Foster et al. 2005
<i>Pseudomonas putida</i>	Glicose, ácido octanóico e ácido undecanóico	mcl-PHAs	Tobin e O'Connor 2005; Hartmann et al. 2006
<i>Pseudomonas putida, P. fluorescens, P. jessenii</i>	Glicose, monômeros aromáticos	Polímeros aromáticos	Tobin e O'Connor 2005; Ward e O'Connor 2005; Ward et al. 2005
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Glicose, óleo de soja, alcóois, alcanos	mcl-PHAs	Xu et al. 2005
<i>Rhizobium melilot, R. viciae, Bradyrhizobium japonicum</i>	Glicose, sacarose, galactose, manitol, trealose, xilose, rafinose, maltose, dextrose, lactose, piruvato	PHB	Mercan e Beyatli 2005
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Acetato, malato, fumarato, succinato, propionato, malonato, gluconato, butirato, glicerol, citrato	PHB, PHBV	Mukhopadhyay et al. 2005
<i>Spirulina platensis (cyanobacterium)</i>	Dióxido de carbono	PHB	Jau et al. 2005
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Malte, rejeito da produção de soja, leite, vinagre e óleo de gergelim	PHB	Wong et al. 2004, 2005
<i>Cupriavidus necator</i>	Glicose, sacarose, frutose, valerato, Octanoato, ácido láctico, óleo de soja	PHB, co - polímeros	Kim et al. 1995; Kichise et al. 1999; Taguchi et al. 2003; Kahar et al. 2004; Khanna e Srivastava 2005a; Volova e Kalacheva 2005; Volova et al. 2005
<i>Cupriavidus necator 16</i>	Hidrogênio, dióxido de carbono	PHB	Pohlmann et al. 2006

Adaptado de Verlinden *et al.*, 2007.

1.3.2. Estrutura Química do PHA

Como todos os plásticos, PHAs são polímeros, ou seja, longas moléculas feitas de pequenas subunidades (monômeros) que se encontram ligados. Os monômeros de PHAs são 3-hidroxicanoatos (figura 1). Um canoato é um ácido graxo simples, uma molécula linear contendo somente carbono e hidrogênio (um cano) com um grupo carboxila em uma das pontas (compondo um canoato). Além disso, esses monômeros têm um grupo hidroxila (OH) no carbono três (posição beta), sendo assim beta ou 3-

hidroxialcanoatos. O grupo hidroxila de um monômero é atacado pela carboxila do outro por uma ligação éster, então esses plásticos são poliésteres (*Rhem et al., 2003*).



n = 1	R=	hidrogênio	poli (-3-hidroxiacetato)
		metil	poli (-3-hidroxiacetato)
		etil	poli (-3-hidroxiacetato)
		propil	poli (-3-hidroxiacetato)
		pentil	poli (-3-hidroxiacetato)
n = 2	R=	hidrogênio	poli (-4-hidroxiacetato)
		hidrogênio	poli (-4-hidroxiacetato)
n = 3	R=	hidrogênio	poli (-5-hidroxiacetato)

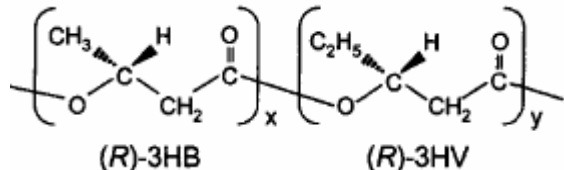
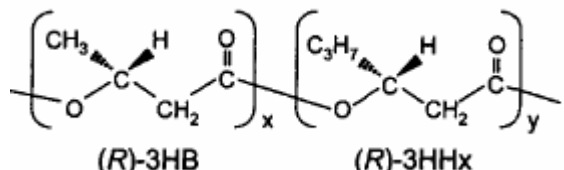
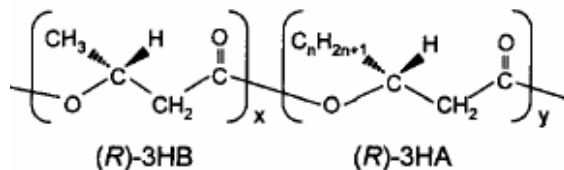
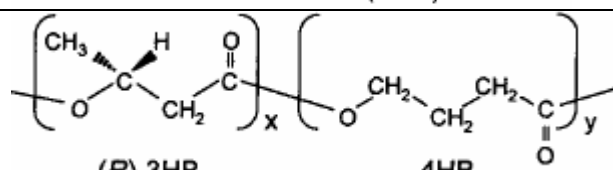
Figura 1: Estrutura geral dos polihidroxiacetatos. Ojumu *et al*, 2004.

Os PHAs podem ser homopolímeros, formados por unidades de um só tipo ou copolímeros, formados por repetições tipos de unidades diferentes (Tabela 2).

Os copolímeros possuem propriedades materiais interessantes para sua utilização pela indústria.

PHAs são normalmente agrupados em duas grandes categorias de acordo com o número de repetição dos monômeros. A maioria das bactérias sintetizam PHAs denominados de cadeia curta (small chain length - PHA_{SCL}) com cadeias laterais formadas de 3 a 5 átomos de carbono (x, figura 2) e, os de cadeia média (medium chain length - PHA_{MCL}) que contém acima de 6 átomos de carbono nas unidades repetidas (n, figura 2). Estes PHAs tem características gomosas e elásticas e são sintetizados a partir de substratos de ácidos graxos longos, bem como de solventes como octano (conhecido componente da gasolina), outros óleos e produtos derivados do petróleo. (<http://www.clt.astate.edu/dgillmore/Research%20students/phas.htm>).

Tabela 2. Estrutura de co-polímeros de PHA contendo (R)-3HB como constituintes.

Linagem Bacteriana	Substrato de carbono	Co-polímero
<i>Cupriavidus necator</i>	Ácido propiônico, ácido pentanóico	 <p>(R)-3HB (x) (R)-3HV (y)</p>
<i>Aeromonas caviae</i>	Óleo de plantas, ácidos graxos	 <p>(R)-3HB (x) (R)-3HHx (y)</p>
<i>Pseudomonas</i> sp. 6 I-3	Açúcar	 <p>(R)-3HB (x) (R)-3HA (y, n=3~9)</p>
<i>Cupriavidus necator</i> <i>Alcaligenes latus</i> <i>Comamonas acidovorans</i>	4-ácido hidroxibutírico γ-Butirolactona 1,4-Butanodiol 1,6-Hexanodiol	 <p>(R)-3HB (x) 4HB (y)</p>

Tsuge *et al.*, 2002.

3HB: 3-hidroxibutirato, 3HV: 3-hidroxivalerato, 3HHX: 3- hidroxihexanoato, 3HA: 3- hidroxialcanoato, 4HB: 4- hidroxibutirato.

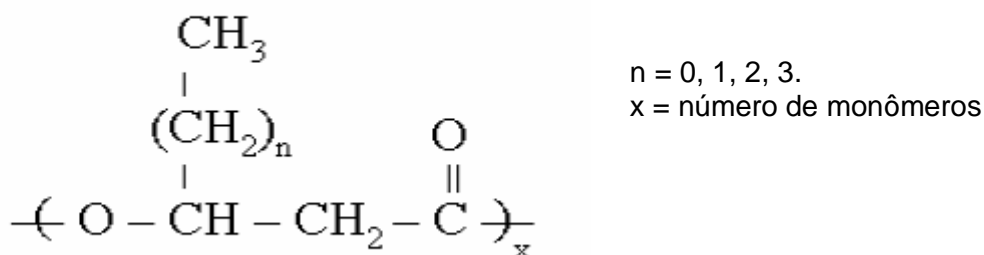






Figura 2. Forma estrutural dos monômeros que compõe as unidades do PHA. *Berlanga et al.*, 2006.

Essa composição monomérica, por sua vez depende da especificidade da linhagem pelo substrato determinada pelo tipo de PHA sintase do organismo (Tabela 3).

Tabela 3: PHA sintases são divididas em quatro classes.

Classe	Subunidade	Espécies	Substratos
I	 ~60-73 kDa	<i>Cupriavidus necator</i>	3HA _{SCL} -CoA (~C3-C5) 4HA _{SCL} -CoA, 5HA _{SCL} -CoA, 3MA _{SCL} -CoA
II	 ~60-65 kDa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3HA _{MCL} -CoA (~≥C5)
III	 ~40 kDa ~40 kDa	<i>Allochromatium vinosum</i>	3HA _{MCL} -CoA (3HA _{MCL} -CoA [~C6-C8], 4HA-CoA, 5HA-CoA)
IV	 ~40 kDa ~22 kDa	<i>Bacillus megaterium</i>	3HA _{SCL} -CoA

Rehm, 2006.

1.3.3. Propriedades Físicas

Os PHAs possuem propriedades termoplásticas, ou seja, podem ser reprocessados diversas vezes pelo mesmo ou por outro processo de transformação, são também termoplásticos, quando aquecidos a certas temperaturas, amolecem, fundem e podem ser moldados novamente (*Steinbüchel, 2001*). Essas características são similares a dos plásticos convencionais como o PP. O homopolímero PHB, os scl-copolímeros PHBV, PHB4B e os mcl-copolímeros PHBHx, possuem estas propriedades comuns, cada um tem apesar disso, características próprias de acordo com sua composição monomérica. PHB tem uma limitação na sua aplicação na indústria devido a sua alta cristalinidade, baixa elasticidade e fragilidade, o que o torna quebradiço (*Dóí, 2000; Sudesh et al., 2000*). Isso dificulta seu uso, na medida em que é facilmente quebrável e a sua temperatura de fusão é muito próxima à de decomposição. O PHA utilizado comercialmente é o PHBV com o nome de Biopol, é um copolímero de hidroxibutirato e hidroxivalerato (5 carbonos) que cristaliza, mas é mais “plástico” e funde-se a uma temperatura mais baixa. A flexibilidade dos polímeros aumenta, devido à perda de cristalinidade. Polímeros compostos majoritariamente por hidroxi octanoatos são elásticos. Quanto mais longa é a cadeia lateral dos polímeros, mais macia é. Os polímeros se tornam gomosos ou tipo cola. Essas características representam o grande

potencial dos PHAs, já que podem ter propriedades materiais desejáveis dependendo dos microrganismos produtores, cada qual com sua via específica, e das fontes de carbono utilizadas como substrato para a síntese destes polímeros (<http://www.clt.astate.edu/dgilmore/Research%20students/phas.htm>).

1.3.4. Biodegradabilidade

Biodegradação é o processo em que substâncias químicas orgânicas contidas no meio são convertidas a componentes simples, como carbono e nitrogênio, e depois mineralizados e redistribuídos através de ciclos elementares. A degradação interna do polímero é um processo onde microrganismos utilizam suas enzimas para degradar suas próprias reservas armazenadas em grânulos e utilizam o produto obtido como fonte de energia. De outro modo, estes microrganismos podem degradar polímeros presentes no ambiente utilizando suas enzimas e absorvendo os produtos dessa degradação (*Rosa et al.,2002*).

Uma das características que tornam os PHAs mais atrativos como substitutos dos plásticos convencionais é a sua biodegradabilidade. Na natureza, diversos microrganismos são capazes de degradar PHA através de PHA hidrolases e PHA despolimerases (Jendrossek and Handrick 2002; Choi et al. 2004).

A atividade dessas enzimas de degradação varia de acordo com a composição do polímero e com as condições do meio ambiente e pode durar de alguns meses (em condições anaeróbicas) a anos (no mar) (Madison e Huisman 1999). A composição dos polímeros, bem como suas características físicas, tem grande influência no processo de degradação. A quantidade de unidades repetitivas ao longo da cadeia química, massa molar, a hidrofobicidade, interferem na biodegradação das cadeias de carbono (*Brandlet al., 1990*). Além das condições ambientais, fatores como a luz UV ou raios X podem acelerar a degradação dos polímeros. Os PHAs são considerados biocompatíveis, o que significa que não são tóxicos a organismos vivos e dentro de mamíferos são hidrolizados vagarosamente. Um implante realizado por 6 meses tem uma perda de menos de 6% (p/p) (*Brandlet al., 1990*).

1.3.5. Aplicações de uso

O PHBV, utilizado na fabricação de recipientes, foi distribuído pela Europa e uma série de países pelo British Chemical Conglomerate (ICI). Nos anos 90, os direitos foram vendidos para a Monsanto que o comercializou com o nome de Biopol. Em 2001 a Metabolix comprou os direitos de produção deste polímero (www.metabolix.com).

PHAs sozinhos ou associados podem ser destinados à fabricação de uma série de objetos, com utilizações em áreas bastante diversas; em embalagens (Bucci e Tavares 2005), na fabricação de tecidos, tonalizadores para tintas, adesivos para revestimentos (Madison e Huisman 1999), em produtos eletrônicos, como telefones móveis, na agricultura para encapsulação de sementes ou fertilizantes de liberação lenta, filmes para proteção de colheita e recipientes para estufas. Também tem aplicações médicas como suturas, pinos ortopédicos, reposição de tecido, implantes com encapsulação de drogas direcionadas (Zu e Chen, 2007).

As perspectivas de novas utilizações só crescem; a barreira, por enquanto, se encontra no alto valor da produção dos biodegradáveis, quando comparados aos plásticos tradicionais.

1.3.6. Síntese de PHA em Bactérias

A síntese de PHAs está associada a capacidade da bactéria sintetizar hidroxiacil-CoA e da presença da enzima PHA sintase, que é responsável na união dos monômeros ao poliéster. Desde a descoberta por Lemoigne em 1923, foi revelado que a produção de PHA se dava por uma via biossintética (figura 3) modelo entre os organismos, guardadas as particularidades de cada um, que podia ser virtualmente separada em três passos, com três reações enzimáticas catalisadas por três enzimas distintas. Posteriormente foram descritos também os genes que determinavam essas enzimas. A primeira reação é a condensação de duas moléculas de acetil coenzima A (acetil-CoA) em acetoacetil-CoA pela β -cetoacetil CoA tiolase (codificada por *phaA*). A segunda reação é a redução de acetoacetil-CoA em R-3-hidroxitributiril-CoA por uma desidrogenase dependente de NADPH a acetoacetil CoA (codificada por *phaB*). Por

último os monômeros de R-3-hidroxiacetil-CoA são polimerizados em poli (3-hidroxiacetato) por uma polimerase (codificada por *phaC*) (Rhem, 2006)

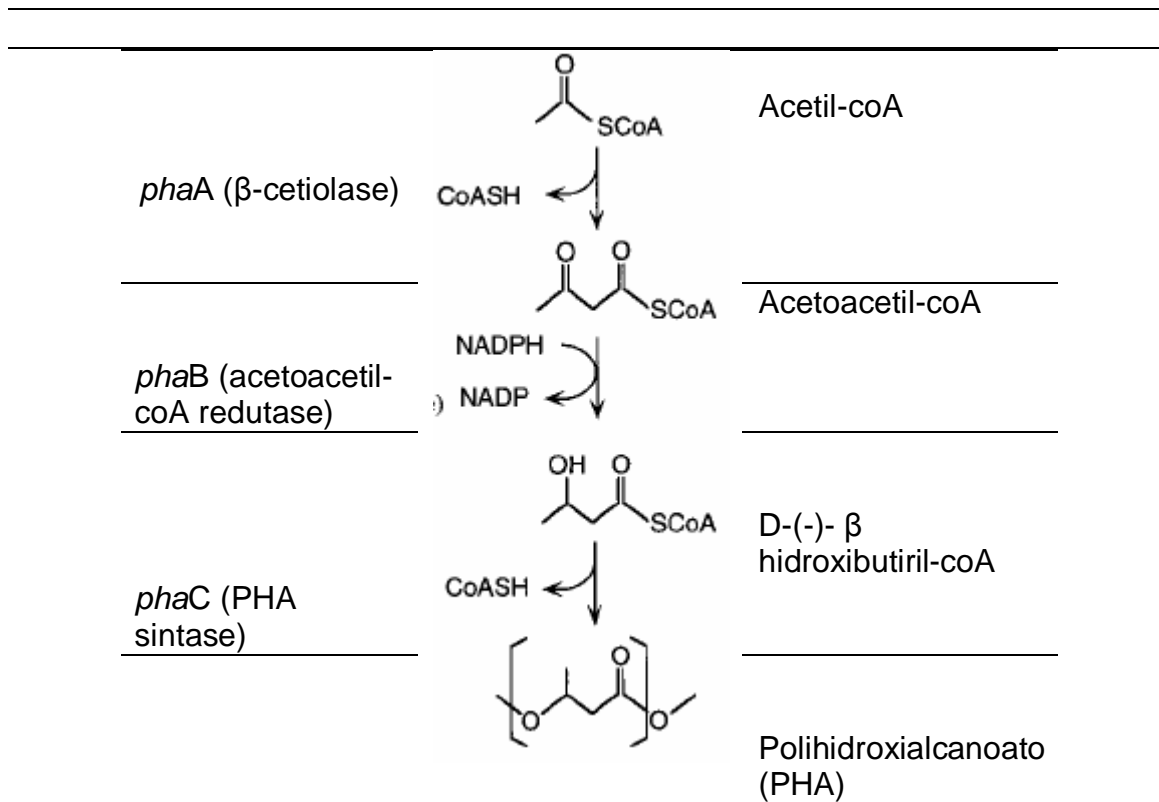


Figura 3. Via de síntese de PHA por *Cupriavidus necator* (Kranz et al., 1997).

A enzima que regula esta via metabólica é a β -cetotiolase. Em condições normais de crescimento bacteriano, onde todos os nutrientes necessários à multiplicação celular estão disponíveis, tem-se altos níveis de coenzima A (CoA) livres, isto graças à grande demanda por grupos acetil pelo ciclo de Krebs para formação de esqueletos carbônicos e a geração de energia. Supõe-se que as altas taxas de CoA tem efeito inibitório sobre a enzima β -cetotiolase, impedindo a síntese de PHB. Em excesso de fonte de carbono e energia e limitação de alguns nutrientes como: nitrogênio, ferro, fósforo, magnésio, impedem a multiplicação da bactéria, a demanda por acetil diminui, e com isso os níveis de CoA livre se tornam reduzidos, diminuindo a inibição sobre β -cetotiolase e desencadeando a síntese de PHB (Gómez e Bueno Neto, 2000).

1.3.6.1. Genes envolvidos na Biossíntese de PHA

Os genes mais bem estudados e um dos primeiros a serem descritos são os de *C. necator*. Neste organismo os genes *phaBAC* que codificam as enzimas da via de três passos de síntese de PHA estão dispostos em tandem, com um promotor a montante que transcreve o operon inteiro (figura 4).

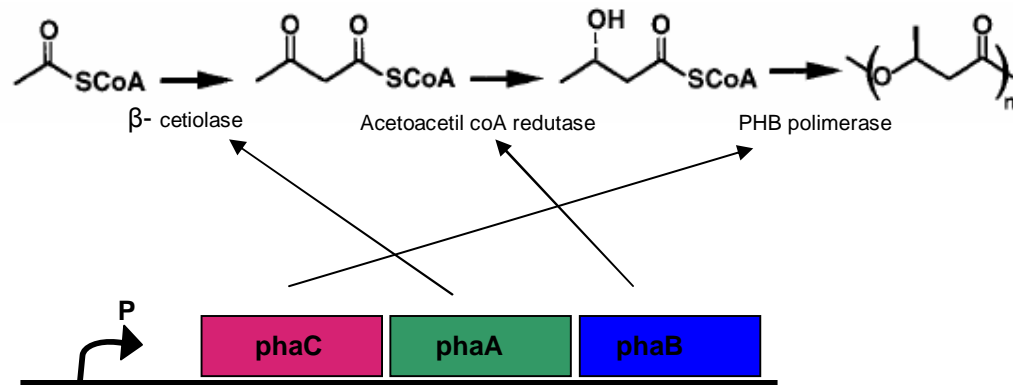


Figura 4. Operon da via de biossíntese de P(3HB) em *Cupriavidus necator*. Modificado de Madison e Huisman, 1999.

Após essa primeira descoberta, muitos genes codificadores de enzimas para a via de PHA em diversos organismos foram caracterizados (Kranz *et al.*, 1997). Pela diversidade de vias que já haviam sido descritas entre os produtores de PHA, não foi surpresa verificar que existem vários loci de PHA diferentes, distribuídos entre os mais diversos organismos (figura 5).

A organização dos genes de síntese de PHA varia entre os organismos que os produzem.

As quatro principais classes de genes para biossíntese de PHA (figura 5) foram descritas por Madison e Huisman, (1999) e Steinbuchel, (2001):

- Classe I: O gene que codifica PHA sintase (*phaC*) é adjacente a *phaB* e *phaA*
- Classe II: Consiste em dois genes de PHA sintase (*phaC1* e *phaC2*) separados por um gene de despolimerização de PHA (*phaZ*).
- Classe III: A enzima PHA sintase é composta por duas subunidades codificadas pelos genes *phaE* e *phaC*.
- Classe IV: Os genes *phaR* e *phaC* são separados por *phaB*.

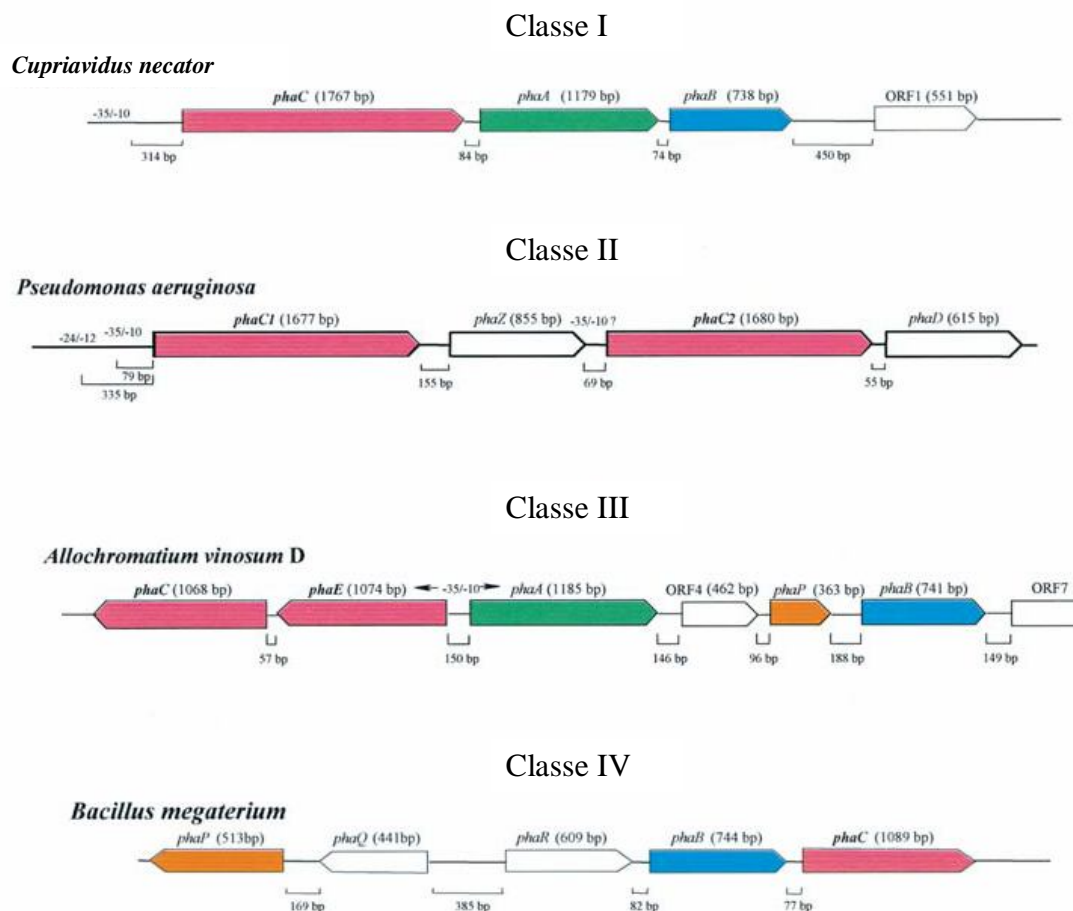


Figura 5. Organização molecular dos genes envolvidos na síntese de PHA em bactérias representativas de cada classe. Modificada de Rehm, 2003.

Muitas seqüências de PHAs sintases já se encontram depositadas nos bancos de dados. Com elas é possível deduzir estrutura primária, especificidade por substrato das enzimas e composição de suas subunidades. A filogenia traçada a partir da seqüência de PHA sintase (Rehm, 2003) mostra agrupamentos de bactéria que apresentam enzimas de mesma classe (figura 6).

As PHA sintases de classe I, utilizam como substrato a 3-hidroxiacil-coenzima A (3HA-Coa) de cadeia curta (contendo de 3 a 5 átomos de carbono), sendo a PHA sintase de *C. necator*, a enzima mais estudada deste grupo, produzem o homopolímero PHB (Polihidroxi-butirato) ou o co-polímero PHB-co-HV (polihidroxi-butirato-co-valerato). As PHA sintases de classe II, utilizam como substrato 3- HA-CoA de 6 a 14 átomos de carbono, *Pseudomonas aeruginosa* que representa esse grupo, produzindo mclPHA (PHA de cadeia média). As PHA sintases de classe III, utilizam como substrato átomos

de cadeia longa, maiores de 14 carbonos, como em *Chromatium vinosum*; e PHA sintases de classe IV que utilizam como substrato átomos de cadeia média ou longa tendo como exemplo *Bacillus megaterium* (Rhem *et al.*, 2003 e Maehara *et al.*, 2001).

1.3.6.2. PHA sintase

O produto do gene *phaC*, a PHA sintase é uma das enzimas principais na produção dos polímeros e, principalmente na geração da diversidade dos polímeros. A performance dessa enzima é intimamente relacionada ao nível de produção de PHA, peso molecular, polidispersão do plástico gerado e a variação dos co-poliésteres no processo de copolimerização. Já foram identificados, mais de 40 genes de PHA polimerase e importantes resíduos de aminoácidos responsáveis pela polimerização e estruturação da proteína foram determinados (Tagushi *et al.*, 2001, Susuki *et al.*, 2001).

1.4. PHA em *Chromobacterium violaceum*

Chromobacterium violaceum é uma beta-proteobactéria, Gram-negativa e anaeróbica facultativa, com formato de bastonete (Holt *et al.*, 1994) encontrada em amostras de solo e água de regiões tropicais e subtropicais em diversos continentes. Pode atuar também, como patógeno oportunista de animais e homens, causando septicemia fatal, com lesões na pele e/ ou abscesso no fígado e no pulmão (Midani e Rathore, 1998).

C. violaceum produz uma série de metabólitos secundários com potencial biotecnológico (Vasconcelos *et al.*, 2003). Apesar disso, existem poucos relatos sobre a produção de polihidroxicanoatos em *C. violaceum*. É sabido que esta bactéria de solo e água acumula polímeros compostos primariamente de 3HB e 3HV e pode produzir também homopolímero de 3HV quando crescida em valerato (Tim e Steinbüchel, 1993), possui também a capacidade aumentada de incorporar monômeros de hidrocarbonetos (HC).

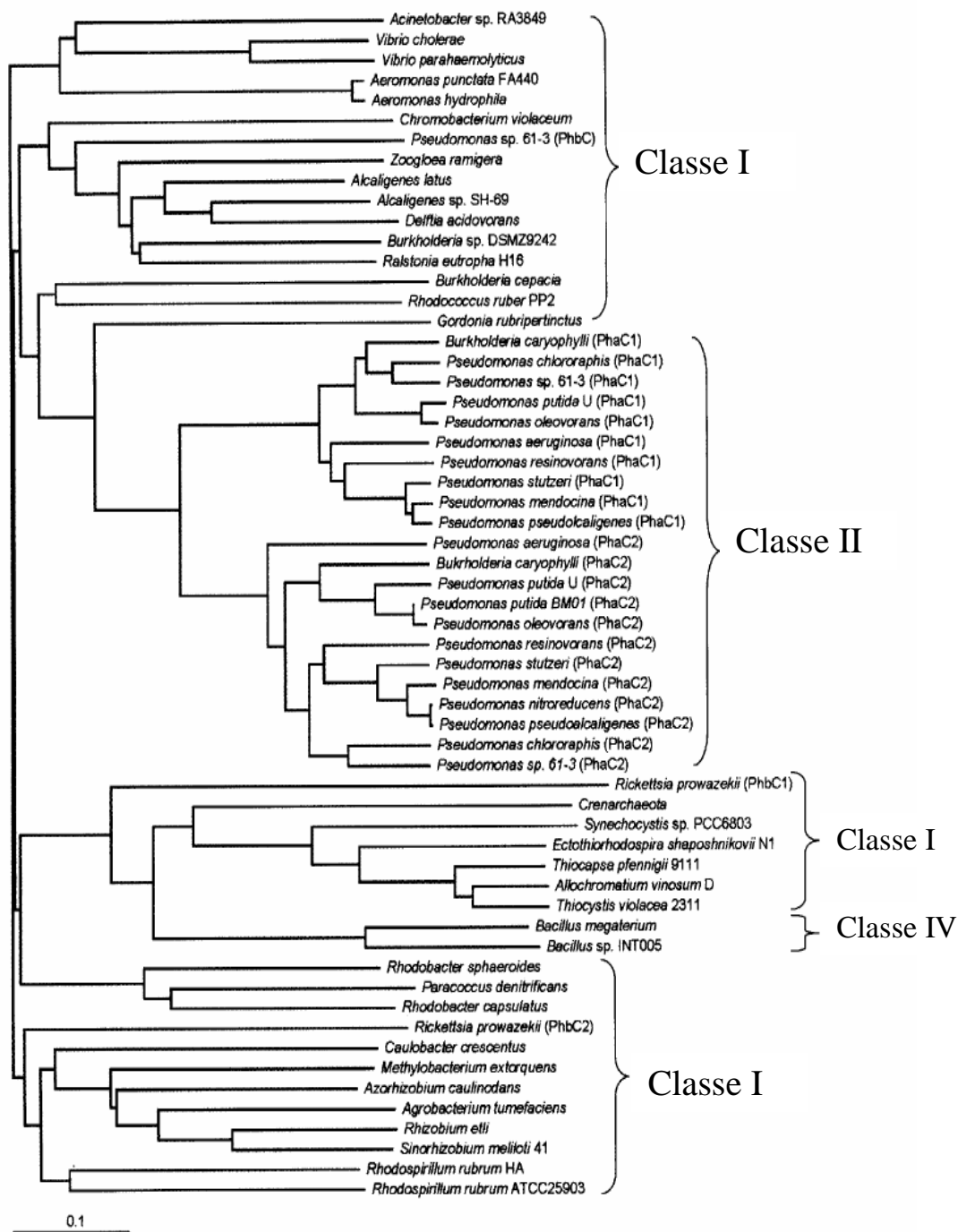


Figura 6. Filogenia baseada na seqüência do gene *phaC* sintase (*phaC*) em diversas bactérias produtoras de PHA. As ramificações e distâncias foram calculadas pelo programa TREE. A barra indica distância correspondente a uma troca de aminoácidos a cada dez posições de aminoácidos. Rehm, 2003.

Enquanto *C. violaceum* crescida em ácidos graxos como fonte de carbono acumula PHB ou PHB-co-PHV, *Klebsiella aerogenes* e *C. necator recombinantes*, carregando o gene de PHA sintase de *C. violaceum* (*phaC_{Cv}*), acumulam os polímeros mencionados mais poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-hexanoato). Isso mostra que além do gene *phaC* e os genes do operon de PHA, o metabolismo desses organismos é capaz de alterar o produto da PHA sintase de *C. violaceum*. Mais um exemplo disso temos na tabela 4, onde *E. coli* e *Pseudomonas putida* recombinantes carregando o mesmo gene *phaC_{Cv}* produzem PHAs diferentes e em quantidades também diferenciadas. A análise da seqüência da enzima PHA sintase, produto do gene *phaC_{Cv}* mostra homologia com várias PHA sintases, mais notadamente com 48% de similaridade com *Alcaligenes latus* (GenBank nº. AAD10274)(Kolibachuk *et al.*, 1999).

Tabela 4: Acúmulo de PHA *E. coli* e *Pseudomonas putida*, expressando o gene *phaC* clonado de *C. violaceum*

Fonte de Carbono	% PHA ^a	Composição Polimérica (mol%)				
		3HB	3HV	3HC	3HH	3HO
Glicose	38	98	2	Tr ^b		
Frutose	26	92	8	Tr		
Gluconato	2	100				
Ácido Butírico	Tr	100				
Ácido Valérico	28	12	88			
Ácido Hexanóico	9	68	32	Tr		
Ácido Heptanóico	15	5	95	Tr		
Ácido Octanóico	4	78	22			
Ácido Nonanóico	22	10	90			
Ácido Decanóico	14	90	9	Tr		
Ácido Mirístico	41	97	3	Tr		
Ácido Palmítico	41	99	Tr	Tr		
Ácido Esteárico	50	99	1	Tr		

Kolibachuk *et al.*, 1999.

a Rendimento % PHA peso/peso seco celular .

b Tr, traço; menos que 0.45 mol%.

1.4.1. Potencial Biotecnológico

O alto custo de produção dos bioplásticos, junto à disponibilidade de plásticos derivados de petróleo a baixo custo, relegam o uso dos plásticos biodegradáveis para segundo plano. Para que essa situação mude, várias estratégias para diminuição dos custos empregados na produção tem sido desenvolvidas, como linhagens novas, selvagens ou recombinantes, que utilizam vários substratos simultaneamente e que produzam plástico em alta concentração (*Taguchi et al. 2001*), bem como uma fermentação mais eficiente, melhor extração e purificação (*Jung et al. 2005*) e uso de substratos de menor custo (*Lemos et al. 2006*). Já existem no mercado biopolímeros de PHA, que se presta à fabricação dos mais diversos produtos. O Brasil se destaca por ter matérias-primas renováveis a baixo custo (substratos), por possuir pesquisas envolvendo biodiversidade microbiana com possibilidade de exploração de uma gama imensa de organismos ainda inexplorados e por possuir mão-de-obra qualificada formada por grupos de pesquisa nessa área. Com tudo o nosso país tem grande potencial para a fabricação em larga escala e baixo custo de biopolímeros, isso poderia se tornar realidade com ações de financiamento e de organização das atividades de pesquisa e desenvolvimento pelos órgãos públicos junto aos setores produtivos.

2. Objetivos

O presente projeto de pesquisa teve como objetivo identificar entre os isolados bacterianos coletados do Parque Nacional da Serra do Cipó (PNSC), organismos produtores e acumuladores de biopolímeros (PHA) com ênfase em *Chromobacterium violaceum*. Integrar áreas da biologia molecular e bioquímica para análise e exploração do potencial biotecnológico na produção de PHA, definir condições experimentais ótimas para a produção deste polímero, bem como métodos de identificação e de avaliação dessa produção de PHA em diversos substratos, realizando também, a visualização do grânulo de acúmulo e identificação da PHA sintase, gene chave no processo de polimerização.

3. Justificativa

Em 2003, foram finalizados os trabalhos de seqüenciamento e anotação do genoma da bactéria *Chromobacterium violaceum*, realizados por um consórcio nacional de sequenciamento de DNA, composto de 27 grupos de pesquisa de todo o Brasil. Uma das várias motivações para o sequenciamento do genoma desta bactéria é a sua capacidade de sintetizar e acumular poliésteres de ácidos hidroxialcanóicos, biodegradáveis, com propriedades plásticas muito similares às dos plásticos de origem petroquímica. Este trabalho foi desenvolvido utilizando-se *C. violaceum* ATCC 12472, uma linhagem tipo, vinda da Malásia (Vasconcelos et al., 2003). No mesmo ano foi registrada a ocorrência de *C. violaceum* nas águas e solo do Parque Nacional da Serra do Cipó (PNSC) (Bittencourt, 2003). Até 2006 foram coletados cerca de 400 organismos sendo destes 100 confirmados como sendo *C. violaceum*, conseguindo-se manter em laboratório 71 isolados.

Levando em consideração o potencial de uso biotecnológico envolvido, já que os polímeros biodegradáveis vêm ganhando campo e sendo utilizados em diversos segmentos da indústria, viu-se então, a oportunidade de identificar e analisar a produção de PHA desses isolados nunca antes estudados para esse fim.

4. Material e Métodos

4.1. Bactérias

Foram utilizados para esse estudo os microrganismos isolados de solo e água, obtidos no Parque Nacional da Serra do Cipó (PNSC), que possui 33.733 hectares e perímetro de 85 Km e se localiza no centro de Minas Gerais (19-20°S; 43-44°W), dividindo as águas das bacias dos rios São Francisco e Doce (figura 7). Os sítios de coleta no PNSC foram nos trechos de 1^a, 2^a, 3^a, 4^a e 5^a ordens do córrego Indaiá, a 1275 m de altitude (Vieira et al., 2005), que são considerados adequados para o isolamento de *C. violaceum* com base na temperatura, coloração, pH e elementos como sais e nutrientes, presentes na água. As coletas ocorreram durante os anos de 2004, 2005 e 2006 e foram realizadas por Claudia Bittencourt, Departamento de Biologia Geral da UFMG. Todos os isolados bacterianos utilizados para esse estudo foram cedidos pela mesma, com três exceções: a linhagem de *Cupriavidus necator* H16 DSMZ 428, que é uma linhagem selvagem padrão produtora de PHA; cedida pela Prof.^a Dra. Elisabete José Vicente da USP, utilizada como controle positivo de produção de PHA, o outro controle positivo *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, bactéria utilizada pelo Consorcio Nacional de Genoma da *Chromobacterium violaceum* cedida pelo Prof. Dr. Fabrício Santos, e a linhagem *Escherichia coli* MC1061 (Stratagene) utilizada como controle negativo para a produção de PHA. A coleta e o isolamento dos isolados utilizados neste trabalho foram realizados conforme descrito em Bittencourt, 2005 e a tabela 5 mostra os parâmetros usados para identificação. Esses isolados também tiveram o gene RNA 16S seqüenciado (Bittencourt, 2005).

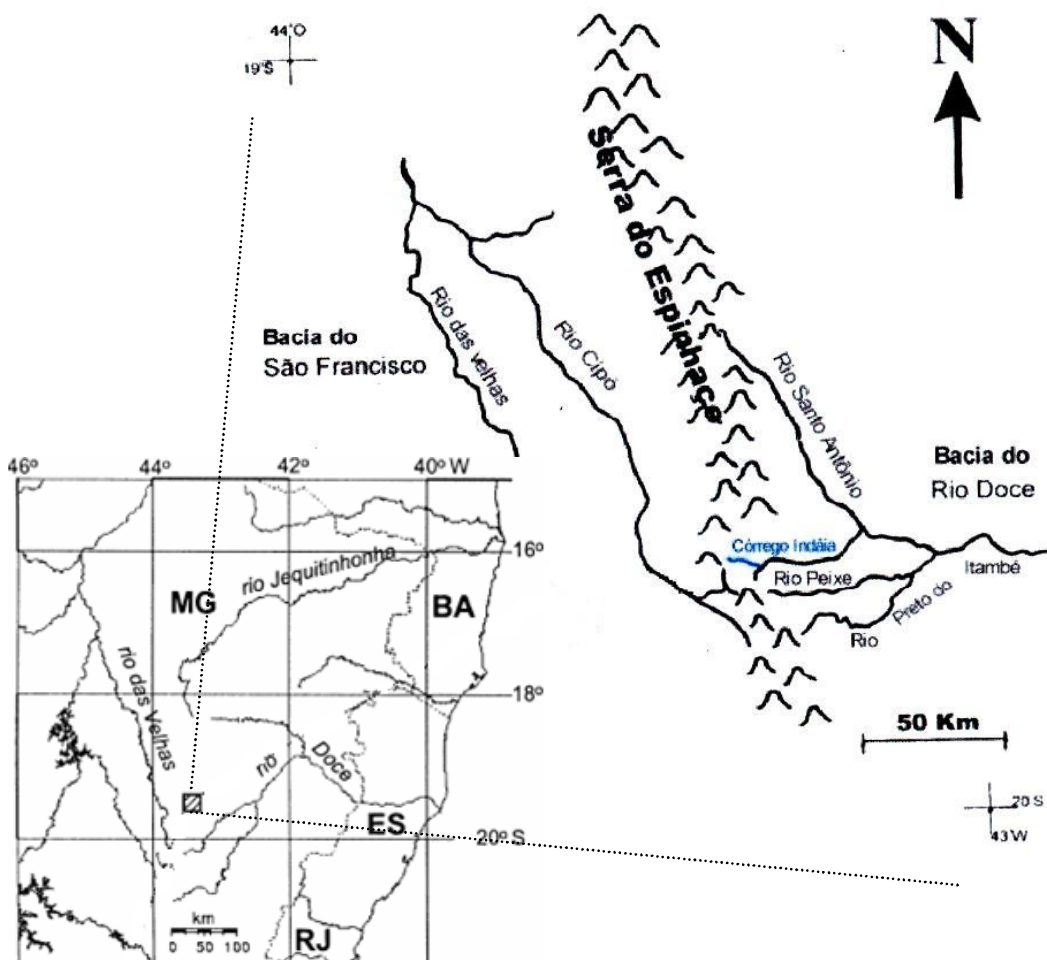


Figura 7: Parque nacional da Serra do Cipó, em evidência as áreas de coleta. Modificado de Bittencourt, 2005 e Vieira et al., 2005.

Tabela 5. Relação de isolados coletados na Serra do Cipó nos anos 2001, 2004 e 2006.

Isolado/ 2001, 1 ^a ordem	Presença de violaceína	Identificação fenotípica	Isolado/ 2004, 3 ^a ordem	Presença de violaceína	Identificação fenotípica
11(1)	+	+	1 -4 - 404	+	+
28 (1)	+	+	2-4 - 404	+	+
43(1)	+	+	3-4 - 404	+	+
55(1)	+	+	4-4 - 404	+	+
81(1)	+	+	6-4 - 404	+	+
85(1)	+	+	7-4 - 404	+	+
86(1)	+	+	8-4 - 404	+	+
95(1)	+	+	9-4 - 404	+	+
177(1)	+	+	11-4 - 404	+	+
178(1)	+	+	13-4 - 404	+	+
239(1)	+	+	14-4 - 404	+	+
295(1)	+	+	15-4 - 404	+	+

Isolado/ 2001, 2ª ordem	Presença de violaceína	Identificação fenotípica	16-4 - 404	+	+
11(2)	+	+	18-4 - 404	+	+
12 (2)	+	+	19-4 - 404	+	+
72(2)	+	+	21-4 - 404	+	+
77(2)	+	+	22-4 - 404	+	+
80(2)	+	+	24-4 - 404	+	+
84(2)	+	+	26-4 - 404	+	+
92(2)	+	+	27-4 - 404	+	+
335(2)	+	+	29-4 - 404	+	+
Isolado/ 2006	Presença de violaceína	Identificação fenotípica	30-4 - 404	+	+
SC01	-	+	31-4 - 404	+	+
SC02	+	+	32-4 - 404	+	+
SC03	-	+	33-4 - 404	+	+
SC04	+	+	34-4 - 404	+	+
SC05	-	+	36-4 - 404	+	+
SC06	+	+	38-4 - 404	+	+
SC08	-	+	39-4 - 404	+	+
SC09	+	+	40-4 - 404	+	+
SC10	+	+	41-4 - 404	+	+
SC11	-	+	42-4 - 404	+	+
SC12	-	+	44-4 - 404	+	+
SC13	+	+	45-4 - 404	+	+
SC14	-	+	46-4 - 404	+	+
SC15	-	+	48-4 - 404	+	+
SC16	+	+	49-4 - 404	+	+
SC17	-	+	50-4 - 404	+	+
SC19	+	+	51-4 - 404	+	+
SC20	+	+	52-4 - 404	+	+
SC21	+	+	53-4 - 404	+	+
SC22	+	+	54-4 - 404	+	+
SC23	+	+	55-4 - 404	+	+
SC24	+	+	56-4 - 404	+	+
SC25	+	+	57-4 - 404	+	+
SC26	+	+	58-4 - 404	+	+
SC27	-	+	59-4 - 404	+	+
SC28	+	+	60-4 - 404	+	+
S29	+	+	61-4 - 404	+	+
SC30	+	+	63-4 - 404	+	+
SC31	-	+	64-4 - 404	+	+
SC32	+	+	65-4 - 404	+	+
SC33	-	+	66-4 - 404	+	+
SC34	+	+	67-4 - 404	+	+
SC35	+	+	68-4 - 404	+	+
SC36	+	+	69-4 - 404	+	+
SC37	-	+	70-4 - 404	+	+
SC38	+	+	72-4 - 404	+	+
SC39	+	+	74-4 - 404	+	+
SC40	-	+	75-4 - 404	+	+
SC41	+	+	76-4 - 404	+	+
SC42	-	+	77-4 - 404	+	+
SC44	+	+	78-4 - 404	+	+

SC45	+	+	79-4 - 404	+	+
SC46	-	+	80-4 - 404	+	+
SC47	+	+	81-4 - 404	+	+
SC48	-	+	82-4 - 404	+	+
SC49	+	+	83-4 - 404	+	+
SC51	-	+	84-4 - 404	+	+
SC52	-	+	86-4 - 404	+	+
SC53	-	+	87-4 - 404	+	+
SC54	-	+	88-4 - 404	+	+
SC55	-	+	90-4 - 404	+	+
SC56	+	+	91-4 - 404	+	+
SC57	+	+	93-4 - 404	+	+
SC58	+	+	95-4 - 404	+	+
SC59	-	+	96-4 - 404	+	+
SC60	+	+	97-4 - 404	+	+
SC61	-	+	98-4 - 404	+	+
SC62	+	+	99-4 - 404	+	+
SC63	-	+	100-4 - 404	+	+
SC64	+	+	101-4 - 404	+	+
SC65	+	+	102-4 - 404	+	+
SC66	+	+	103-4 - 404	+	+
SC67	+	+	109-4 - 404	+	+
SC69	+	+	110-4 - 404	+	+
SC71	-	+	111-4 - 404	+	+
SC72	-	+	112-4 - 404	+	+
SC73	-	+	113-4 - 404	+	+
SC74	+	+	114-4 - 404	+	+
SC75	+	+	115-4 - 404	+	+
SC77	-	+	116-4 - 404	+	+
SC78	+	+	117-4 - 404	+	+
SC79	-	+	118-4 - 404	+	+
SC80	+	+	120-4 - 404	+	+
SC81	-	+	122-4 - 404	+	+
SC83	+	+	124-4 - 404	+	+
SC84	-	+	128-4 - 404	+	+
SC85	+	+	130-4 - 404	+	+
SC86	+	+	133-4 - 404	+	+
SC8	+	+	137-4 - 404	+	+
SC87	-	+	138-4 - 404	+	+
SC88	+	+	143-4 - 404	+	+
SC89	+	+	148-4 - 404	+	+
SC90	+	+	150-4 - 404	+	+
SC91	-	+	153-4 - 404	+	+
SC92	+	+	155-4 - 404	+	+
SC93	-	+	156-4 - 404	+	+
SC94	+	+	159-4 - 404	+	+
SC95	+	+			

(+) Resultados positivos, (-) Resultados negativos

4.2. Plasmídios

Os plasmídios empregados na clonagem do gene pha sintase de *C. violaceum* foi o pGEM-T Easy (Promega) (Figura 8) e o pCR[®]2.1- TOPO[®] (Invitrogen) (Figura 9)

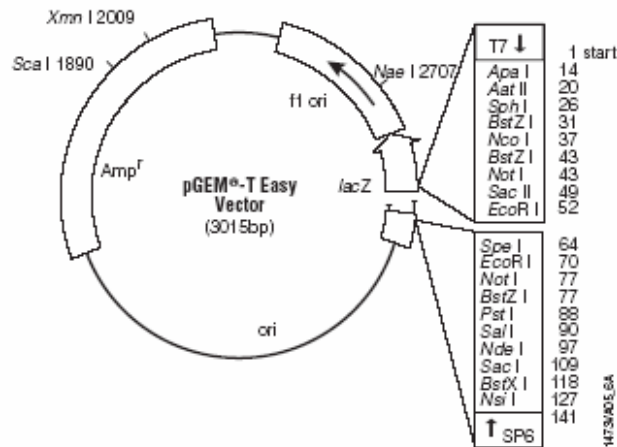


Figura 8 - Esquema do vetor pGEM-T Easy (Promega).

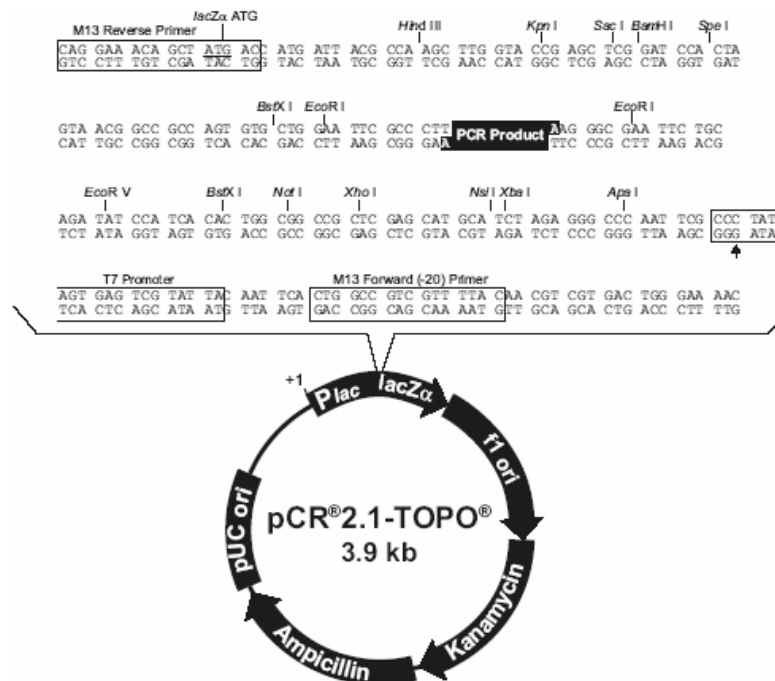


Figura 9 - Esquema do vetor pCR[®]2.1- TOPO[®] (Invitrogen).

4.3. Estocagem e cultivo das bactérias

Os isolados bacterianos foram repicados em tubos com Caldo Nutriente (CN) e incubados por 15 horas a 25°C. Após esse período foram utilizados dois métodos para estocagem das bactérias: uma alíquota de cada cultura foi misturada, separadamente, com glicerol a 15%, armazenados à temperatura de -20 °C por 24 horas e, em seguida, estocados em um *ultrafreezer* a -80°C; uma alíquota de cada cultura foi inoculada em meio Lignéres permanecendo em temperatura ambiente.

4.4. Meios de Cultura

Os meios de cultura descritos a seguir devem ser esterilizados em autoclave (20kgf/cm²) por 15 minutos antes de serem utilizados. E as quantidades indicadas são para 1 litro de meio. Para meios sólidos acrescentar ágar 2,0%.

4.4.1. Meio de Lignéres (Sambrook et al., 2001)

Caldo nutriente (Difco)	50g	Fundir antes de distribuir nos tubos
Gelatina (Difco)	50g	
Ágar (HIMEDIA)	70g	
Água q.s.p.	1000ml	

4.4.2. Meio T.I. (Mahishi et al., 2002)

Peptona (bioBRAS)	5g	pH =7,0
Extrato de levedura (HIMEDIA)	5g	
Na ₂ HPO ₄ (Merck)	1g	
MgSO ₄ (BERZOG)	0, 2g	
Glicerol (VETEC)	10g	
Água q.s.p.	1000ml	

4.4.3. TSB (Tryptic Soy Broth) instruções conforme o fabricante(Merck)

4.4.4. LB (“Luria Bertani”) (*Sambrook et al*, 2001)

4.4.5. Meio LB/X-GAL (*Sambrook et al*, 2001)

4.4.6. Meio SOC (*Sambrook et al*, 2001)

4.4.7. Meio Mínimo M9 (*Sambrook et al*, 2001) :

KH ₂ PO ₄ (Merck)	3g	
Na ₂ HPO ₄ . 7H ₂ O (Merck)	10,87g ou	
Na ₂ HPO ₄ (Merck)	6g	pH =7,4
NaCl (VETEC)	0,5g	
NH ₄ Cl (J.T. BACKER)	1g	

Após autoclavar meio mínimo M9, adicionar as seguintes soluções de sais traços previamente autoclavadas:

MgSO ₄ . 7 H ₂ O (BERZOG)	1M	2 ml
Glicose (ISOFAR)	20%	10 ml
CaCl ₂ (Merck)	1M	0,5 ml

Obs: Como a glicose é fonte de carbono para produção de PHA, foi suprimida do meio mínimo original sendo somente utilizada quando necessário.

4.5. Soluções e tampões

As soluções foram esterilizadas a 120°C, durante 15 minutos. Quando termosensíveis, foram filtradas em membrana filtrante do tipo Millipore de poro 0.22 µM.

A composição e o modo de elaboração de todas as soluções, descritas a seguir, foram retiradas do manual de Sambrook *et al.*, 2001.

4.5.1. SET

4.5.2. Tampão de corrida TAE 1X

4.5.3. Tampão de amostra 10X:

4.5.4. Fontes de carbono

O meio T.I. apresenta o glicerol como fonte de carbono. Já os demais meios foram acrescidos de uma solução de glicose, glicerol ou sacarose de forma que estas estivessem na concentração de 2% (p/ v) na placa ou no meio líquido. Todas as soluções-estoque foram feitas a 20% em água destilada

4.5.5. Soluções para extração de plasmídios (Mini-prep) (Sambrook *et al.*, 2001) :

4.5.6. Solução clorofórmio/ álcool isoamílico (24:1):

4.5.7. Solução de Ampicilina:

Solução estoque a 100 mg por ml de água destilada estéril. Concentração final para uso: 100 µg para cada ml de meio ou seja 1 µl para cada 1 ml de meio.

4.5.8. Gel de agarose 0,8% em TAE e solução de Brometo de Etídio (Sambrook *et al.*, 2001).

4.6. Produção e análise do PHA produzido

4.6.1. Métodos de coloração para a identificação de bactérias produtoras de biopolímeros

4.6.1.1. Coloração por “Sudan Black” (Schlegel *et al.*, 1970)

Utilizou-se uma solução do corante em pó 0,02% “Sudan Black” dissolvido em etanol 96% para corar colônias crescidas em meio sólido. Recobriu-se a placa onde estavam as bactérias com a solução de “Sudan Black” 0,02% 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. Retirou-se a solução da placa e procedeu-se a análise. A bactéria que acumula o polímero cora-se em azul escuro e não é descorada pela solução de etanol a 96%.

4.6.1.2. Coloração por “Nile Blue A” (Ostle ; Holt, 1982)

Para corar as colônias com o corante “Nile Blue A”, recobriu-se as colônias bacterianas crescidas em meio sólido com uma solução aquosa de “Nile Blue A” 1% (p/v), por 15 minutos. O corante foi removido da placa até o completo esgotamento da solução. Em seguida, recobriu-se as colônias com a solução descorante (ácido acético 8% v/v), por 1 minuto. Retirou-se a solução descorante e procedeu-se à análise. As colônias que acumulam polímeros coram-se em azul claro e não são descoradas pela solução de ácido acético 8%(v/v).

4.6.1.3. Coloração por “Nile Red” (Spiekermann *et al.*, 1999)

Foi adicionado 1 µl de Nile Red (solução estoque de 25 µg/ml em DMSO) a cada ml de meio de cultura (James *et al.*, 1999). A avaliação da produção e do acúmulo de PHA foi feita pela detecção de fluorescência vermelha em luz U.V.

Para avaliação do tempo necessário para o acúmulo de PHA com ambos os métodos, as placas foram incubadas em estufa a 25°C e mantidas por 24, 48, 72h e até duas semanas para depois serem analisadas para produção de PHA. Para tal avaliação foi utilizado um transiluminador com luz ultravioleta (UV)

4.7. Curva de crescimento

O crescimento celular em meio LB foi acompanhado pela medida da Absorbância a 600nm, em espectrofotômetro (Eppendorf BioPhotometer). Para leitura da absorbância, foram retiradas alíquotas da cultura celular nos diferentes tempos de incubação (tempo: zero, 1,2,4,6,8,24, 26, 28, 30, 32, 48, 50, 52, 54 horas de incubação). As leituras foram realizadas 600 nm e foram plotadas em um gráfico. Estas leituras se referem ao número de células na suspensão e não tiveram a influência da violaceína já que os isolados utilizados eram brancos.

4.8. Espectrofluorometria (Berlanga et al., 2006).

A produção de PHA foi monitorada por espectrofluorometria utilizando Nile Red como fluorocromo. Os isolados foram crescidos overnight em meio LB a 30°C. Alíquotas (1/100) de cada cultura foram transferidas em frascos de 100ml cada contendo meio M9 suplementado com glicose, sacarose ou glicerol, ambos a 2%, e 0.5 µg do corante Nile red (dissolvido em dimetilsulfóxido – DMSO). Essas culturas líquidas foram incubadas em shaker a 30°C, alíquotas de 5ml foram coletadas: no tempo zero, após 2, 4, 6, 8, de duas em duas horas até 48 horas de incubação e foram tratadas com formalina (1% v/v de formaldeído). Em seguida, as células do sedimento foram lavadas novamente com formalina, centrifugadas e ressuspensas em água deionizada até se obter uma concentração equivalente a uma absorbância de 0,5 a 600nm e, novamente centrifugadas a 10.000 rpm em temperatura ambiente. As células foram então, incubadas com uma solução 1µl/ ml de Nile Red (25mM em DMSO), por 60 minutos. O montante relativo ao PHA dentro destas células será indicado pela intensidade da fluorescência vermelha de Nile Red, medida no espectrofluorímetro calibrado para o

comprimento de onda de excitação de 545 nm e a emissão de 600 nm e que havia sido zerado usando-se uma amostra de células não coradas (*Delegau et al.* 1995).

4.9. Microscopia de fluorescência (modificado de *Jendrossek et al.*, 2005)

Uma alíquota de bactérias foi fixada com formalina 1% (v/v) como descrito em Material e Métodos item 4.8, ressuspensa em água e corada com “Nile Red” (Material e Métodos ítem 4.6.1.3). Essa suspensão de bactérias foi imobilizada na lâmina ao ser misturada a 1% agarose (50 °C) e, imediatamente coberta por uma lamínula. As bactérias foram visualizadas no maior aumento de um microscópio de fluorescência Zeiss Axioplan, com uma objetiva de imersão a óleo com um filtro F41-007 Cy3, adequado para visualização de dos grânulos de PHA, corados por “Nile red”. Esse ensaio foi realizado no Laboratório de Biologia Celular do Prof. Luiz Renato de França. Os modelos do microscópio e da câmera são, respectivamente: Olympus BX60 e Olympus C7070.

4.10. Eletromicroscopia de Transmissão - TEM (*Berlanga et al.*, 2006)

Para análise de TEM, foi coletada uma alíquota de 1 ml de cultura dos isolados crescidos em meio mínimo líquido M9 suplementado com glicose, sacarose ou glicerol, com 48h de crescimento. Essa alíquota é centrifugada a 10.000 rpm em temperatura ambiente, os pelets resultantes lavados em 1 ml of PBS (pH 7.0), e fixados com 2% de glutaraldeído-PBS e então fixados com tetróxido de ósmio e uranil acetato. Esta análise foi feita em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss-EM10 instalado no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Minas Gerais (CEMEL).

4.11. Preparação das células bacterianas e extração de polímero

Após as 48 horas de cultivo bacteriano nos diferentes meios de cultura, as células foram centrifugadas e as massas celulares obtidas foram liofilizadas.

Em um balão de 50 mL munido de condensador de refluxo, foram adicionados de 0,25g a 1g de massa celular seca (liofilizada) e 10mL de diclorometano. Esta mistura foi agitada por 24 horas, a 50°C. Em seguida, após resfriamento, a mistura foi filtrada e o solvente evaporado. O material que restou da evaporação do solvente foi submetido às análises por Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

4.12. Determinação dos grupamentos funcionais da amostra utilizando espectrômetro de IV

Os grupamentos funcionais da amostra resultante da extração de polímero de CV SC 48 foram determinados por espectros na região do infravermelho que foram registrados em espectrômetro ATR-IR, Spectrum One, Perkin Elmer no Laboratório de Química Farmacêutica, FaFar, UFMG.

4.13. Determinação da composição do PHA por RMN

As análises por RMN foram realizadas diretamente a partir das amostras obtidas em Material e Métodos item 4.11. Os espectros de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C foram registrados nos aparelhos BRUKER AVANCE DPX-200 e BRUKER AVANCE DRX-400 (Laremar, Departamento de Química, ICEX, UFMG), utilizando-se sonda dual ^{13}C e ^1H de detecção direta de 5 mm para os experimentos unidimensionais de RMN de ^1H , de ^{13}C e DEPT 135 e sonda de detecção inversa de 5 mm equipada com bobina para o emprego de pulsos de gradiente de campo para os experimentos bidimensionais (COSY e HMQC). Como referência interna utilizou-se o tetrametilsilano (TMS).

4.14. Extração e purificação de DNA plasmidiano de *E. coli* por minipreparações (Mini-preps)

As colônias de clones recombinantes de *E.coli* foram transferidas para tubos de 50 ml contendo 10ml de LB líquido suplementado com ampicilina (100µg/ mL). As culturas foram incubadas por 16 horas, a 37°C, com agitação a 110 rpm. Após esse período as culturas foram centrifugadas em um tubo do tipo “Eppendorf”, a 3.500 rpm, por 10 minutos, sendo o sobrenadante cuidadosamente descartado e o precipitado ressuspensionado em 300µl de solução I gelada, sendo homogeneizados e transferidos para um outro tubo tipo eppendorf de 1,5ml. A seguir, adicionou-se 300µl de solução II, que foi homogeneizada e mantido em gelo por 5 minutos. Foi então adicionada 300µl de solução III gelada, que foi novamente homogeneizada e incubada em gelo por 5 minutos. Decorrido este tempo, os tubos foram centrifugados por 5 minutos, a 4°C, a 13.200g e o sobrenadante foi transferido para outro tubo e a este foram adicionados 500µl de isopropanol e deixado em repouso em temperatura ambiente por 15 min. Após esse período de precipitação do plasmídeo os tubos foram centrifugados por 15 minutos, a 13.200rpm, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com 1ml de etanol 70 %. O precipitado resultante contendo os plasmídios foi seco em temperatura ambiente dentro do fluxo, durante pelo menos 10 minutos.e, posteriormente ressuspensionado em 50µl de água bi-destilada esterilizada, contendo 1µg de RNase (Sambrook et al., 2001). O material foi submetido à corrida eletroforética em gel de agarose a 0,8%.

Para verificar se realmente havia o inserto de tamanho esperado, uma alíquota de 1µl do volume de cada mini prep foi digerida com enzima de restrição FastDigest® EcoRI, por 2 horas, a 37°C. Ao final de 2 horas, as digestões foram interrompidas e os DNAs digeridos foram submetidos a corrida eletroforética em gel de agarose 0,8%. Os géis foram corados com brometo de etídio e os fragmentos de DNA foram visualizados empregando-se um transiluminador com luz ultravioleta (UV).

4.15. Amplificação do gene de RNA ribossômico 16 S

Para identificação dos isolados foi feita a amplificação do gene ribossômico 16S utilizando os iniciadores descritos abaixo.

Tabela 6 - Seqüência de oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do rDNA codificador do RNA 16S e seqüenciamento, a partir do DNA genômico.

Nome	Seqüência	Referência	Gerando um fragmento de 1,496 bp
PA	(5'-TCCTGGCTCAGATTGAACGC-3')	Bittencourt, 2003.	
U2	(5'-ATCGGYTACCTTGTTACGACTTC-3')	Bittencourt, 2003.	

Tabela 7 - Seqüências de oligonucleotídeos utilizados para a detecção e amplificação de insertos clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega) e no vetor pCR[®]2.1- TOPO[®] (Invitrogen).

Nome	Seqüência	Referência
TOPO T7	ATTATGCTGAGTGATATCCC	Promega cat # Q5021
TOPO SP6	AAGATATCACAGTGGATTTA	Promega cat # Q5011
M13 Forward (-20)	GTAAAACGACGGCCAG	Invitrogen cat# K4500-01
M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC	Invitrogen cat# K4500-01

4.16. Extração de DNA genômico (adaptado de Sambrook *et al.*, 1989 com modificações).

Uma colônia de bactéria é utilizada para inocular 2ml de meio rico LB e deixado sob agitação 100 rpm durante 24h.

Lise de Bactéria:

A cultura é centrifugada a 12000 rpm durante 2 min seu sobrenadante é descartado. O precipitado é ressuspendido em 60µl de solução de lise (para 5ml; 200µl de NaOH 5N,

500µl de SDS 10% e H₂O mili-Q para completar o volume), que deve ser preparada imediatamente antes do uso e encubado a 37 °C durante 1 hora.

Remoção de proteínas:

À suspensão é adicionada 3µl de proteinase K (200 mg/ml), 507µl de T.E. (pH 7,5) e 30µl de SDS 10%, misturada e incubada a 37 °C por 1 hora. Ao se tornar clara e viscosa, então é adicionado 100µl NaCl 5M e mistura-se. Adicionar 80µl de CTAB/ NaCl (1:1). Misturar, a solução deve se tornar leitosa. Incubar por 10min a 65 °C, A solução deve ficar clara. Adicionar 750 µl de clorofórmio álcool isoamil (24:1) e misturar (vortexar por 1min).

Centrifugar por 15 min a 13.000 rpm. Transferir o sobrenadante para um outro tubo adicionar 375µl de clorofórmio álcool isoamil (24:1) e 375µl de fenol e misturar. Repetir Centrifugar por 15 min a 13.000 rpm. Transferir o sobrenadante para um outro tubo e Centrifugar por 15 min a 13.000 rpm. Transferir o sobrenadante para um outro tubo.

Precipitação do DNA:

Adicionar o mínimo de 1 volume de isopropanol misturar e deixar descansar por 1 min Centrifugar por 1 min a 12.000 remover o sobrenadante, repetir a centrifugação e retirada do sobrenadante. Adicionar então, 1,5ml de etanol 70-80% e misturar levemente por 5 min Centrifugar por 2 min a 12.000 rpm e remover sobrenadante. Secar o DNA por 5 min no fluxo adicionar 100µl de TE-RNase e incubar por 30min em temperatura ambiente ou overnight a 4°C.

4.17. Amplificação de fragmentos de DNA para a identificação dos genes responsáveis pela informação genética da PHA sintase

Esta reação é uma amplificação de um fragmento de DNA usado como molde. Tem como objetivo a identificação do gene de PHA sintase (*phaC*). Para um DNA purificado foi utilizado em torno de 1ng deste na reação. Para as reações são utilizadas alíquotas de 20µl para cada amplificação contendo um tampão de PCR (50mM de KCl , 10mM de Tris-HCl pH9, 0,1% de Triton X100 e 0,15 mM de MgCl₂), 0,2µl de cada

desoxinucleotídio trifosfatado (2,5 mM), 1 U de Taq DNA polimerase, 20µM de cada iniciador e o molde de DNA a ser amplificado (1ng). A solução será acondicionada em termociclador e o resultado é analisado em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio.

O protocolo da reação de Pcr semi-nested é composto de um ciclo de 94°C por 1 min, seguido de 24 ciclos de 94°C por 1min, 57°C por 45s, decrescendo 1°C por ciclo e sendo repetido 1x cada temperatura até atingir 45°C, fechando o ciclo a 72°C por 1 min. Em seguida um período de extensão final por 20 min a 72°C e incubação final a 10°C.

4.18. Iniciadores

Em *C. necator* o último passo na via de produção de PHA é catalisado por PHA sintase, produto do gene *phaC*. Seis iniciadores foram desenhados e sintetizados para identificação do gene, modificados de outros iniciadores já descritos em Sheu *et al.*2000. As seqüências dos iniciadores, e os tamanhos dos amplicons esperados se encontram na tabela 8.

Tabela 8: Iniciadores desenvolvidos baseados nas seqüências de PHA sintase de *C. necator*

Nome do Iniciador	Seqüência	Região correspondente no gene <i>phaC</i> de <i>C. necator</i>	Tamanho esperado do amplicon (pb)
phaCmF1	5'- ATCAACAAGTTCTACATCCTCGACCT - 3'	nt 741-766	496 (utilizando o iniciador reverso CmR4)
phaCmF2	GTCTTCGTGATCTCCTGGCGCAACCC	nt 846-871	406 (utilizando o iniciador reverso CmR4)
PhaCmR4	AGGTAGTTGTTGACCAAGTAGTTCCA	nt 1237-1212	
phaCiF1	ATCAAITICTACITCITIGACCT	nt 741-766	496 (utilizando o iniciador reverso CiR4)
phaCiF2	GTITTCITITIIICTGGCGCAACCC	nt 846-871	406 (utilizando o iniciador reverso CiR4)
phaCiR4	AGGTAGTTGTIGACIIITAGITCCA	nt 1237-1212	

Modificada de Sheu *et al.*2000.

Dois iniciadores específicos para o gene de PHA sintase foram desenhados baseados na seqüência de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, depositada no Gene Bank.

Tabela 9: iniciadores específicos baseados na seqüência de *Chromobacterium violaceum*

Nome	Seqüência	Região correspondente em no gene Pha C em C. violaceum no Genbank	Referência	Tamanho esperado do amplicon
PHAPF	5'-CGTTTCGCTCTCCAG TCC TC - 3'	pb 3022983 - 3023002	Este estudo	1775 pb
PHAPR	5'-GTCTTCTCCAGCAACGCCT- 3'	pb 3024776 - 3024758	Este estudo	

4.19. Eletroforese em gel de agarose (Sambrook et al., 2001):

A agarose 0,8% (p/v) é acrescida de TAE 1X e aquecida até sua dissolução. Em seguida, após a solução esfriar, é adicionado brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/ ml. Espera-se até o gel solidificar, à temperatura ambiente, aplica-se a amostra de DNA nas canaletas do gel e realiza-se a corrida a uma voltagem de 80 V na cuba de eletroforese mergulhada em TAE 1x.

4.20. Precipitação de DNA com polietilenoglicol (PEG 8000)

Foi adicionado ao produto de PCR, PEG 20% (P/V) + NaCl 2,5M em eppendorf 1,5 ml na razão de 1:1 (PEG/ produto de PCR) e bem homogeneizado utilizando o vórtex. Os eppendorfs são então, incubados em banho-maria 37°C por 15 min, centrifugados a velocidade máxima (13000 rpm) por 15 min. O sobrenadante é então, retirado cuidadosamente com uma pipeta. Ao pelet é adicionado 125 µl de etanol80% (p/v) gelado, centrifugado a velocidade máxima (13000 rpm) por 5 min. Novamente o sobrenadante é cuidadosamente retirado com uma pipeta e os procedimentos de centrifugação seguido de retirada do sobrenadante repetidos. Os tubos são deixados secando em estufa a 37 °C por no mínimo de 5-10 min para a completa secagem dos

pelets. Quando secos, os pelets são ressuspensos em água mili-Q estéril, vortexados e por fim armazenados em freezer a -20°C.

4.21. Clonagem e expressão do gene de PHA sintase

O fragmento de DNA do produto de PCR amplificado de interesse foi eluído do gel de agarose com o auxílio do kit de extração ou da técnica de extração com lâ de vidro e ressuspensado na concentração de 20 ng/ µL. O fragmento de DNA foi clonado no vetor pGEM-T Easy (figura 7) ou pCR[®]2.1- TOPO[®](figura 7) e introduzido em *E. coli* DH5α, por eletroporação (Material e Métodos, item 4.22.2). Após crescimento em meio LB/ X-gal, as colônias brancas foram cultivadas para extração e purificação dos plasmídeos (mini-preparação; Material e Métodos, item 4.14). Para a comprovação do sucesso da clonagem foi feita uma reação de PCR com os mesmos primers utilizados para a produção do inserto clonado. Os produtos destes PCR foram eluídos do gel de agarose 0,8%, ressuspensos na concentração de 20ng/µL, e submetidos a seqüenciamento.

4.22. Transformação de células de *E.coli* por eletroporação

4.22.1. Preparo de células competentes

A partir de uma cultura de DH5α pré-crescida durante a noite, 1ml foi inoculado em 100 ml de meio 2XYT e incubada, a 37°C, com agitação a 110 rpm em “shaker”, até atingir uma absorbância, em 600 nm, em torno de 0,2-0,3. A suspensão foi coletada em tubos de centrifuga, deixada em repouso no gelo, por cerca de 15-30 minutos e centrifugada a 4.500g, por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi ressuspensado em 100 ml de glicerol 10% estéril, a 4°C. As células foram ressuspensadas em 50ml de glicerol 10%, estéril, a 4°C e centrifugadas, novamente ressuspensadas em 10ml de glicerol 10% e centrifugadas, repetido nesta última condição por mais três vezes. As células foram então ressuspensadas em 2ml de glicerol

a 10%, a 4°C e centrifugadas pela última vez. Após a última centrifugação, as células foram ressuspensas a um volume final de 300µl com glicerol 10%, a 4°C (concentração de $1-3 \times 10^{10}$ células/ ml). A suspensão de células foi distribuída em alíquotas de 40µl em tubos “Eppendorf” de 1,5 ml, resfriados por gelo seco e imediatamente armazenados no ultrafreezer a uma temperatura de -70°C (Sambrook et al., 2001).

4.22.2. Eletroporação

As células foram retiradas do freezer -70°C e colocadas imediatamente no gelo. Após 15 minutos, foram adicionados 2µl de ligação, em 40µl da suspensão de células DH5α eletrocompetentes. A suspensão de células juntamente com o DNA foi transferida para uma cubeta de eletroporação previamente resfriada, que foi por sua vez, inserida no eletroporador. Em seguida foi aplicado um pulso de 2,5 KV, capacitância de 50µF e resistência de 100 ohms por 5s. Imediatamente após o pulso, as cubetas foram removidas da câmara de aplicação e foi adicionado às células 0,6 ml de meio SOC. A suspensão bacteriana foi então transferida para eppendorf e incubada em banho a 37°C, por 1 hora (Sambrook et al., 2001).

4.23. Reações de seqüenciamento

4.23.1. Seqüenciamento dos produtos de PCR clonados nos vetores pGEM-T

Easy (Promega) e pCR[®] 2.1- TOPO[®] (Invitrogen)

4.23.2. Reação de seqüenciamento

A reação de seqüenciamento foi preparada utilizando o kit comercial “DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis Systems”. Cada reação continha 4 µl de pré-mix (reagente fornecido pelo fabricante contendo a enzima Termo Sequense e deoxi/ dideoxinucleotídeos), 5 pmoles de primer e cerca de 200ng de DNA. Sendo o volume final completado para 10 µl com água deionizada. A reação de

seqüenciamento foi realizada em termociclador totalizando 30 ciclos, cada um deles era composto por três etapas. A primeira etapa (desnaturação) ocorreu a temperatura de 95°C durante 20 segundos, a segunda (anelamento do primer) ocorreu a 50°C por 15 segundos, a terceira (extensão) a 60°C durante 1 minuto e ao término, a placa foi armazenada a 4°C.

4.23.3. Precipitação da reação de seqüenciamento

O processo de precipitação da reação de seqüenciamento tem como função limpar a reação retirando os dNTPs e ddNTPs que não foram incorporados, os restos de enzimas que não foram utilizadas e sais em geral que poderiam atrapalhar o processo de seqüenciamento no seqüenciador automático. Durante a precipitação foram utilizados acetato de amônio 7,5 M, etanol absoluto e etanol 70% que promoveram a precipitação do DNA, o sobrenadante foi descartado e para ressuspender o DNA foi adicionado *loading buffer* (tampão fornecido pelo fabricante) para que houvesse a diluição da amostra. Até sua injeção no seqüenciador automático, a amostra era mantida a 4°C e protegida da luz. O seqüenciamento das amostras de DNA plasmidiano foi feito em um seqüenciador automático capilar MEGABACE 1000 (Amersham Biotec) no Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular (LBEM) do Prof. Fabrício R. dos Santos.

4.23.4. Análise das seqüências dos produtos de PCR

As seqüências obtidas foram analisadas quanto a similaridades com outras já depositadas no Gene Bank através da ferramenta BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”).

5. Resultados e Discussão

5.1. Identificação de bactérias produtoras de PHA

Cerca de 250 espécies bacterianas diferentes, tanto Gram-negativas quanto Gram-positivas, têm sido relatadas como produtoras e acumuladoras de vários tipos de PHA na forma de grânulos citoplasmáticos de material de reserva (Steinbüchel *et al.*, 1991; Lenz *et al.*, 1992; Steinbüchel, 1992). Estas, encontram-se dispersas em um número enorme de ambientes.

Neste trabalho, buscou-se a identificação de bactérias produtoras de PHA através de métodos de coloração, assim como a produção, isolamento e identificação do tipo de polímero produzido, além do isolamento de genes codificadores de PHA sintase. De posse de bactérias isoladas do Parque Nacional da Serra do Cipó, cedidas por Cláudia Bittencourt e prof.^a Andréia Amaral, iniciamos nosso estudo com a identificação qualitativa de isolados produtores através de métodos de coloração.

5.2. Métodos de coloração

5.2.1. “Sudan Black B”

A identificação qualitativa de bactérias capazes de sintetizar PHA foi feita inicialmente através de método de coloração (Material e Métodos item 3.6.1.1) empregando-se “Sudan Black”, um corante lipofílico não específico para PHA. A cor violeta é característica de *Chromobacterium violaceum*, devido ao pigmento violaceína, esse tom se intensifica ao longo dos dias de crescimento ficando bastante escuro, próximo à cor preta, sendo assim facilmente confundido com a tonalidade azul escura também quase preta de “Sudan Black B” quando positivo para lipídeos (figura 10).

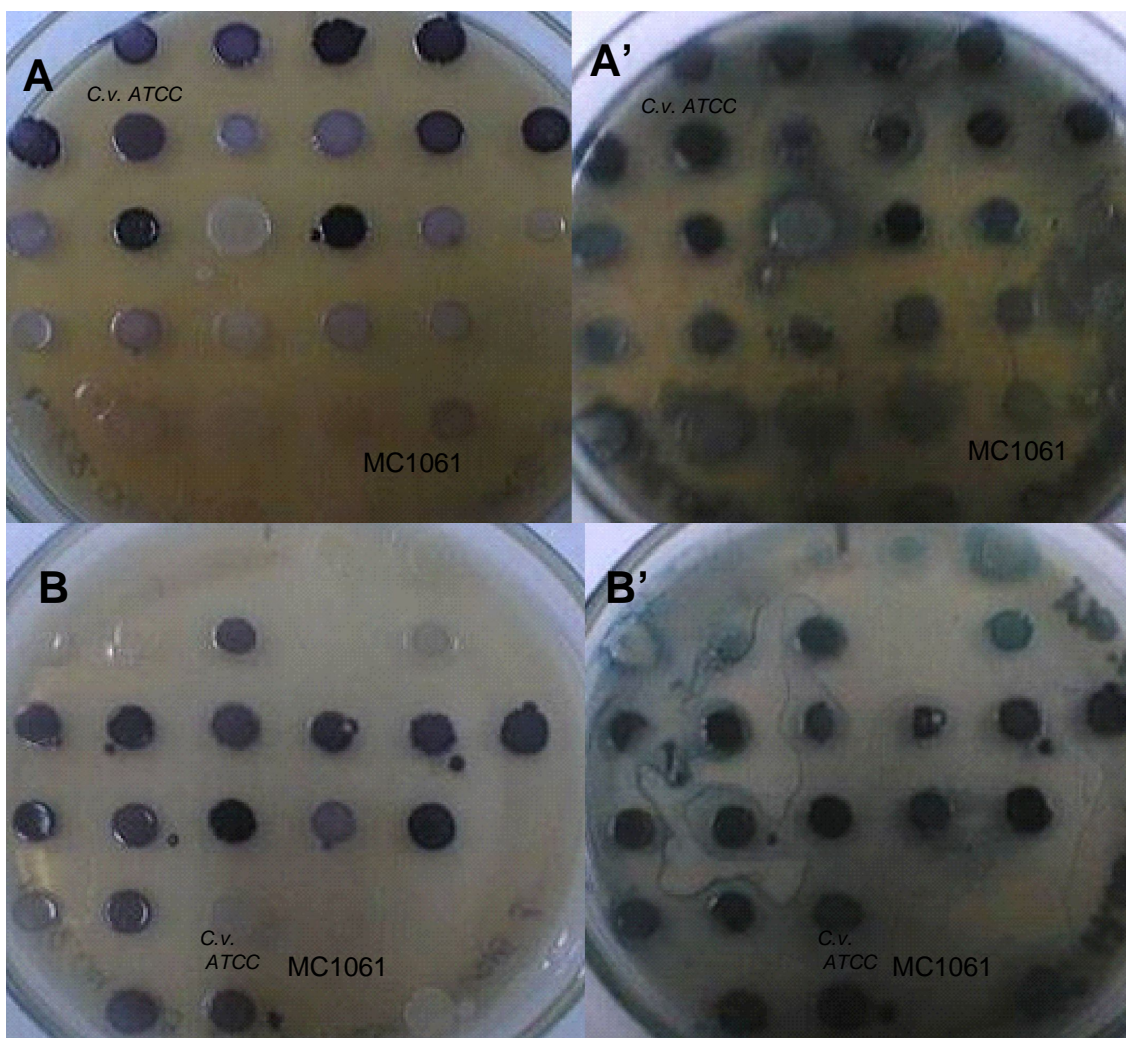


Figura 10: Culturas bacterianas de 28 isolados foram inoculadas em meio mínimo sólido M9 +2% glicerol (A e A') e M9 +2% glicose (B e B'), incubadas a 37°C, por 48 horas, antes (A e B) e após (A' e B') coloração com "Sudan Black B". *C. violaceum* ATCC 12472 e *Cupriavidus necator* foi utilizada como controle positivo e *E. coli* MC1061 como controle negativo.

Foram analisados em torno de 200 isolados do Parque Nacional da Serra do Cipó (PNSC). Essa primeira triagem visual permitiu a identificação qualitativa de todos os isolados como positivos para a produção e acúmulo de PHA corados em azul escuro por "Sudan Black B". A possibilidade de um falso positivo devido à violaceína, além da inespecificidade deste corante, fez necessário o uso de outros métodos para resultados confiáveis.

5.2.2. “Nile Blue A”

Após certo período só 71 isolados foram mantidos viáveis no laboratório, com estes, foi feita então, uma segunda identificação também qualitativa com outros métodos de coloração. Foi utilizado “Nile Blue A” (resultado não mostrado) cujos resultados também não foram conclusivos, pois apresentam uma coloração muito próxima da obtida com o uso de “Sudan Black B”, passível também de ser confundida com a coloração própria de *C. violaceum*.

5.2.3. “Nile Red”

O uso do método de coloração “Nile Red” (Ostle; Holt, 1982; James *et al.*, 1999, Spiekermann,1999), um corante fluorescente específico para polihidroxialcanoato, permitiu um resultado confiável, além da sua afinidade por polihidroxialcanoato, sua cor quando positiva se destaca mesmo nos isolados de cor violeta intensa formando halos de coloração rosada (figura 11).

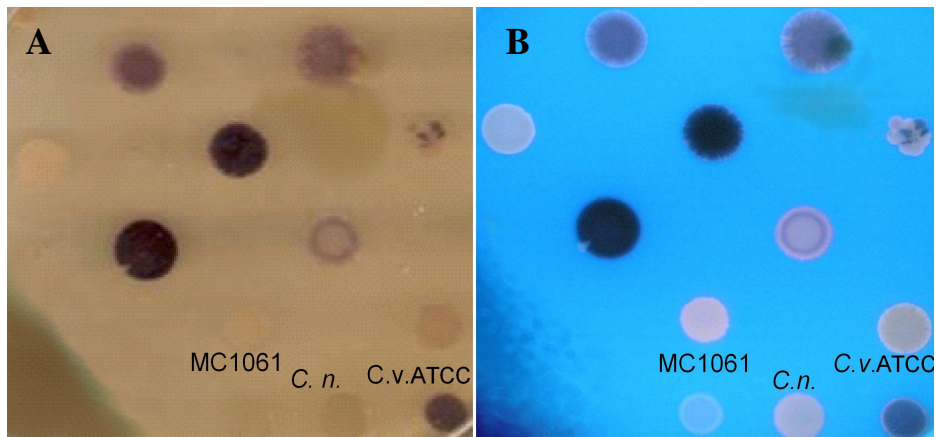


Figura 11 - Colônias bacterianas crescidas a 37°C, por 48 horas, em meio sólido M9 suplementado com glicerol 2% e coradas com “Nile Red”. (A) placa exposta à luz ambiente e (B) exposta à irradiação com luz UV.

Foram testadas 71 linhagens por este método, destas 30 se apresentaram positivas para PHA em meios suplementados com glicose 2%, glicerol 2% ou sacarose 2%. Após a coloração semi-quantitativa com Nile Red, dez isolados foram escolhidos como melhores produtores de PHA pela maior intensidade de coloração. Essas linhagens ou

foram positivas simultaneamente nos meios de cultura contendo 2% de glicose, glicerol e sacarose como substrato ou tiveram brilho mais intenso que os controles positivos em pelo menos um substrato.

De todos os métodos de coloração, o corante fluorescente Nile red oferece uma técnica de triagem relativamente fácil que pode ser utilizada para isolamento de potenciais linhagens bacterianas produtoras de PHA de amostras de ambiente (Berlanga *et al.*, 2006).

5.3. Microscopia ótica de fluorescência

Os isolados escolhidos como melhores produtores foram submetidos à microscopia de fluorescência corados com “Nile Red” (Material e Métodos item. 1.6.1.3) (figura 12). Todos os isolados analisados apresentaram resultados positivos utilizando-se Nile Red como corante.

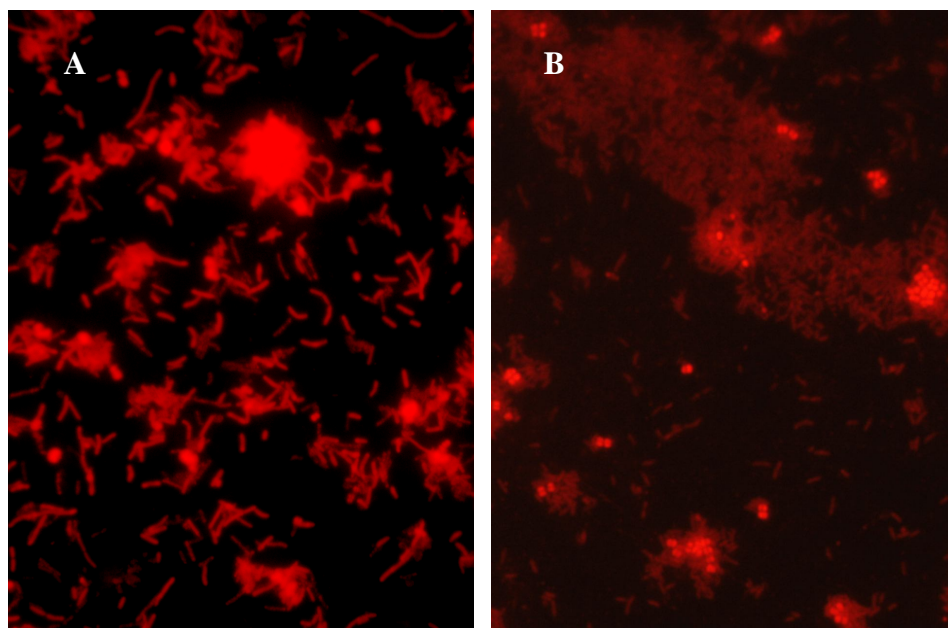


Figura 12 - Células bacterianas de *Cupriavidus Necator* (A) e *Chromobacterium violaceum* SC 51 (B) crescidas a 37°C, por 48 horas, em meio líquido M9 suplementado com glicose, coradas com “Nile Red” e submetidas à irradiação com luz UV. Após a coloração, dez dos isolados, entre eles SC48, SC51 e SC71, se apresentavam qualitativamente como bons produtores de PHA.

6. Grânulo de PHA

Podemos confirmar a presença de corpos de inclusão, possivelmente armazenando PHA, nos isolados SC 51 (figura 13). Esse experimento foi feito com células crescidas em meio de cultivo rico (LB) para aumento de massa e, posteriormente repicadas em meio de produção de PHA, meio mínimo M9 suplementado com glicose, glicerol e sacarose todos a 2% no meio. Foram utilizados como controle positivo *Cupriavidus necator* nas mesmas condições de crescimento supracitadas, mas como não obtivemos fotos que pudessem evidenciar seus grânulos, utilizamos uma foto da literatura só como forma de demonstração.

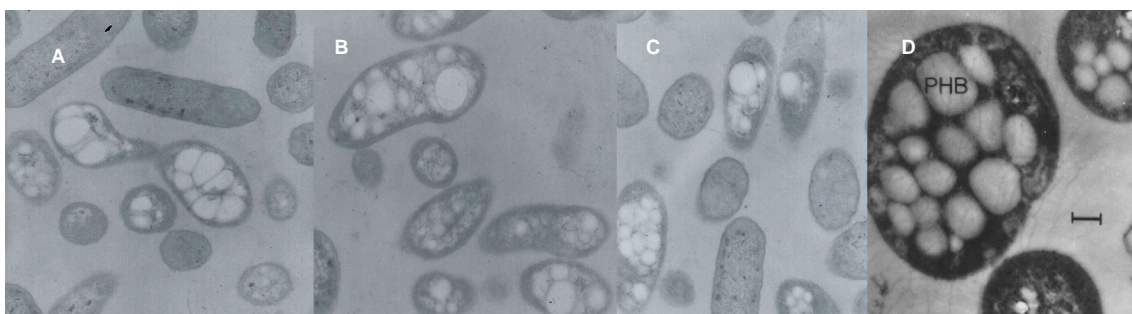


Figura 13: Eletromicrografia de transmissão de células de *C. violaceum* SC 51 contendo grânulos de PHA acumulados em meio mínimo mineral M9 com glicose 2% (A), glicerol 2% (B) e sacarose 2% (C) todas com aumento 25000x. *Cupriavidus necator* (D) foi utilizado como controle positivo (Castaneda et al., 2000).

Esse ensaio possibilitou mais um indício da produção e acúmulo deste polímero pelos isolados. Após esta análise, passamos para a parte molecular através da identificação da PHA sintase, gene importante da via de produção do polímero.

7. Identificação da bactéria considerada produtora

Em estudo anterior desenvolvido em nosso Laboratório, Cláudia Bittencourt descreveu em sua tese de mestrado, análises do gene ribossômico 16S de diversas linhagens utilizadas neste trabalho. Os isolados utilizados nos ensaios de espectrofluorometria, microscopia ótica, tendo como corante o Nile Red, bem como de Microscopia eletrônica, possuíam além de resultados melhores que os demais para a coloração em placa, a

característica de ter sua cor branca. A dúvida então, se seria ou não esse isolado *C. violaceum* já que houve perda de produção de violaceína pela bactéria e sendo esse fenômeno raro na natureza poderia ter ocorrido alguma contaminação ao longo do cultivo por mais de um ano em laboratório. Foram feitas então, ampliações, por PCR, do gene ribossômico 16S. Para foram utilizados os iniciadores PA e U2 (Material e Métodos, item 1.15).

O fragmento de DNA obtido foi submetido ao seqüenciamento, utilizando os mesmos iniciadores (figura 14).

Foram feitas comparações entre esta seqüência com seqüências de genes 16S disponíveis no banco de dados (Gene Bank) através do programa Clusta W. Esta análise mostrou que o fragmento gênico SC51 é 98% similar às seqüências de rRNA 16S de *Chromobacterium violaceum*. ATCC 14742, enquanto SC71 é 97% similar. Confirmando então, ser a *Chromobacterium violaceum* a bactéria estudada.

SC51	-----CGGTTAGCCTACCCACTTCTGGTGAAC	29
SC71	-----TTCTGGTGAAC	13
16S	ATGAATCCCACCGTGGTAAAGCGCCTCCTTGC	60
SC51	CACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCAGCATG	89
SC71	CACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCAGCATG	73
16S	CACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCAGCATG	120
SC51	CTGATCTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCACTCGAGTTGCAGAGTGGATCCGG	149
SC71	CTGATCTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCACTCGAGTTGCAGAGTGGATCCGG	133
16S	CTGATCTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCACTCGAGTTGCAGAGTGGATCCGG	180
SC51	ACTACGATCGGTTTCTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGAACCCCTCTGTACCGAC	209
SC71	ACTACGATCGGTTTCTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGAACCCCTCTGTACCGAC	193
16S	ACTACGATCGGTTTCTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGAACCCCTCTGTACCGAC	240
SC51	CATTGTATGAC--GTGTGAAGCCCTGCTCATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCC	267
SC71	CATTGTATGAC--GTGTGAAGCCCTGCTCATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCC	253
16S	CATTGTATGAC--GTGTGAAGCCCTGCTCATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCC	298
SC51	ACC--TTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCATTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAAC	326
SC71	ACC--TTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCATTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAAC	313
16S	ACC--TTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCATTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAAC	357
SC51	TAATGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAAACATCTCACGACACGAGCTGAC	386
SC71	TAATGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAAACATCTCACGACACGAGCTGAC	373
16S	TAATGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAAACATCTCACGACACGAGCTGAC	417
SC51	GACAGCCATGCAGCACCTGTGTTAAACGCTCCCTTTGCGGCACCAAGATATCTTACCAAG	446
SC71	GACAGCCATGCAGCACCTGTGTTAAACGCTCCCTTTGCGGCACCAAGATATCTTACCAAG	433
16S	GACAGCCATGCAGCACCTGTGTTAAACGCTCCCTTTGCGGCACCAAGATATCTTACCAAG	477
SC51	TTGCTTACATGTCAAGAGCAGGTAAGGTTTTTTCGGTTCGATCGAATTAATCCACATCAT	506
SC71	TTGCTTACATGTCAAGAGCAGGTAAGGTTTTTTCGGTTCGATCGAATTAATCCACATCAT	493
16S	TTGCTTACATGTCAAGAGCAGGTAAGGTTTTTTCGGTTCGATCGAATTAATCCACATCAT	537
SC51	CCACCGCTTGTGCGGGTCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTAAACCTTGCGGCGTACTCCC	566
SC71	CCACCGCTTGTGCGGGTCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTAAACCTTGCGGCGTACTCCC	553
16S	CCACCGCTTGTGCGGGTCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTAAACCTTGCGGCGTACTCCC	597
SC51	CAGGCGGTCAACTTCAACGCTTAGCTTCGCTACCAAGGATTCAAACCCCAACAGCTAGT	626
SC71	CAGGCGGTCAACTTCAACGCTTAGCTTCGCTACCAAGGATTCAAACCCCAACAGCTAGT	613
16S	CAGGCGGTCAACTTCAACGCTTAGCTTCGCTACCAAGGATTCAAACCCCAACAGCTAGT	657
SC51	TGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCCTCCCAACGCTTTC	686
SC71	TGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCCTCCCAACGCTTTC	673
16S	TGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCCTCCCAACGCTTTC	717
SC51	GTGCATGAGCGTCAGTGCATCCAGGGGCTGCCTTCGCCATCGGATTCCTCCACATC	746
SC71	GTGCATGAGCGTCAGTGCATCCAGGGGCTGCCTTCGCCATCGGATTCCTCCACATC	733
16S	GTGCATGAGCGTCAGTGCATCCAGGGGCTGCCTTCGCCATCGGATTCCTCCACATC	777

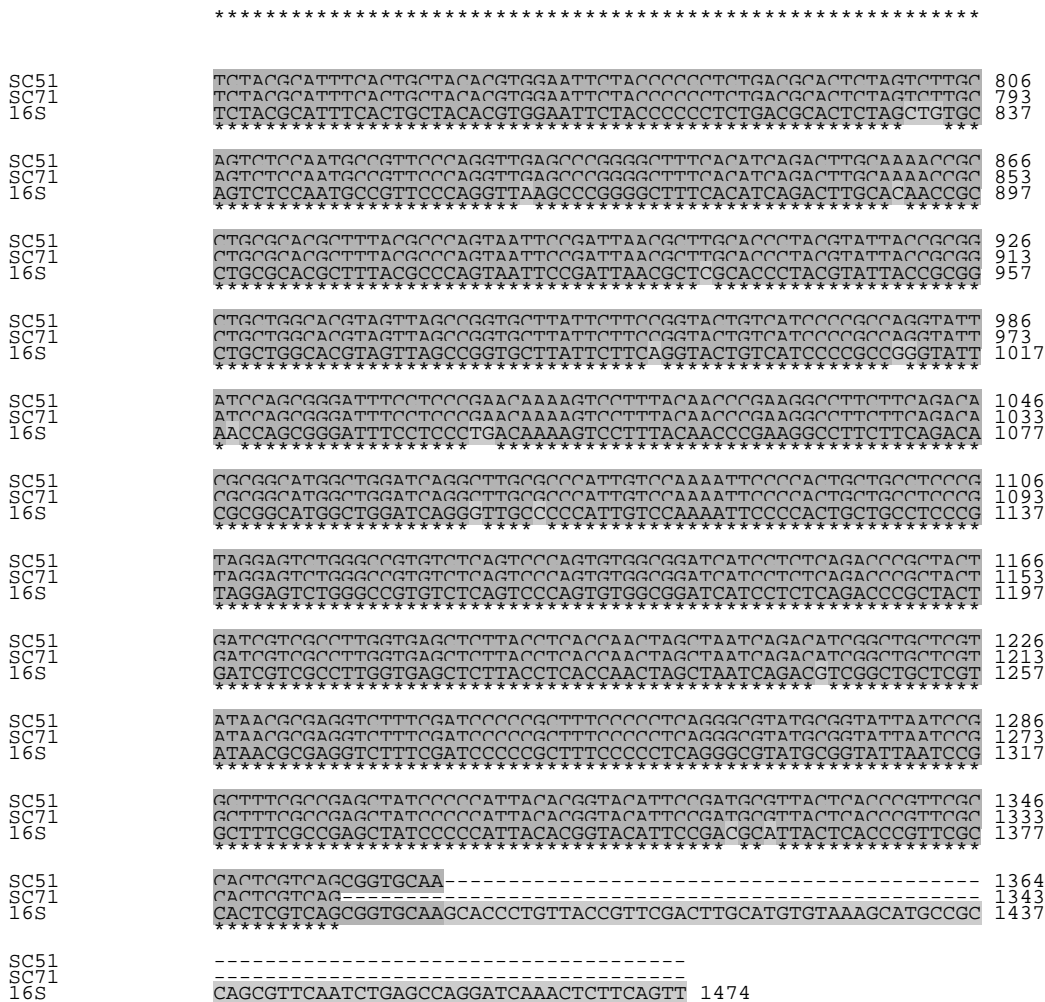


Figura 14 – Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do gene que codifica o rRNA 16S das linhagens isoladas das águas do PNSC , SC 51, SC 71. e C. V AtCC 12742. Estão representados em cinza escuro os pareamentos (match), em cinza claro os não pareamentos (mismatch), com – os intervalos (gaps) e com * as identidades.

8. Capacidade de conversão de diferentes fontes de carbono em PHA

Para avaliar a capacidade de CV SC 48 metabolizar diferentes substratos como fonte de energia foram feitas curvas de crescimento celular em função do tempo (Material e Métodos, item 4.7).

O isolado *C. violaceum* SC 48 foi crescida em meio de cultivo rico (LB) para se obter uma massa celular alta e posteriormente repicada em meio de cultivo mínimo M9 (Material e Métodos item 4.4.7) acrescentado de glicose, glicerol ou sacarose de forma que estivessem ambos a 2% na solução final (figura 14).

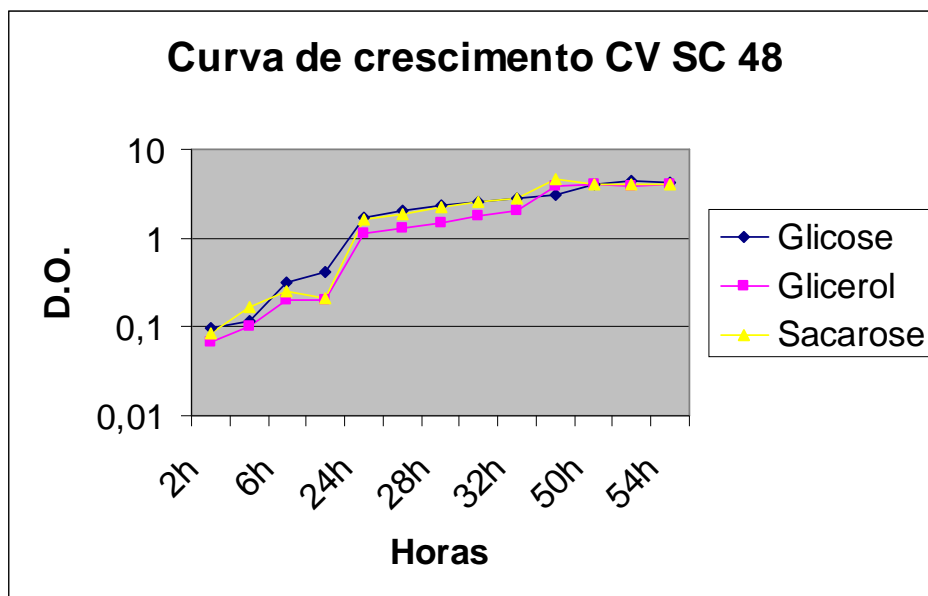


Figura 14. Curva de crescimento celular por tempo, o isolado CV SC48 foi cultivados em meio mínimo M9 contendo como substratos glicose, glicerol e sacarose todos a 2% na solução final e medido em espectrofotômetro, medidos de duas em duas horas.

A análise do gráfico nos permite constatar a capacidade de *C. violaceum* SC 48 em metabolizar todos os substratos analisados. Mais tarde ao obtermos a massa seca liofilizada desses isolados e observamos um melhor crescimento em glicose, seguido de glicerol e por fim a sacarose.

Após a análise do crescimento utilizando como fonte de carbono esses três substratos, foi feito o acompanhamento da produção de PHA nas células vivas pelos isolados SC 51 e SC 71 através de uma curva após 48h de acúmulo (figura 15). As células previamente coradas com o “Nile Red” (Material e Métodos, item 3.8), foram submetidas às mesmas condições realizadas no ensaio da curva de crescimento celular. As suspensões foram analisadas nos tempos zero, 2,4,6,8,24, 26, 28, 30, 32, 48, 50, 52, 54 horas de incubação em meio mínimo contendo glicose, glicerol e sacarose, todos a 2% na solução final (figura 15) .

Devido a um crescimento laborioso, não podemos realizar todos os testes com um mesmo isolado, mas baseados no resultado da curva de crescimento do isolado SC48, esperávamos um comportamento semelhante na curva de espectrofluorometria para os isolados SC10 e SC71 na utilização dos substratos para produção de PHA, ou seja, que todos os substratos fossem utilizados de forma semelhante já que durante o

crescimento isso ocorreu. Apesar disso tivemos uma diferença grande quanto à produção de PHA quando o substrato é a sacarose. Poderíamos à primeira vista supor ser algum desvio neste experimento especificamente quando o substrato utilizado é a sacarose, mas os controles nos provam do contrário. Posteriormente na liofilização do isolado SC48 para a extração do polímero, obtivemos diferenças nítidas na quantidade de massa, sendo o maior valor utilizando-se como substrato glicose, seguido de glicerol e por fim sacarose.

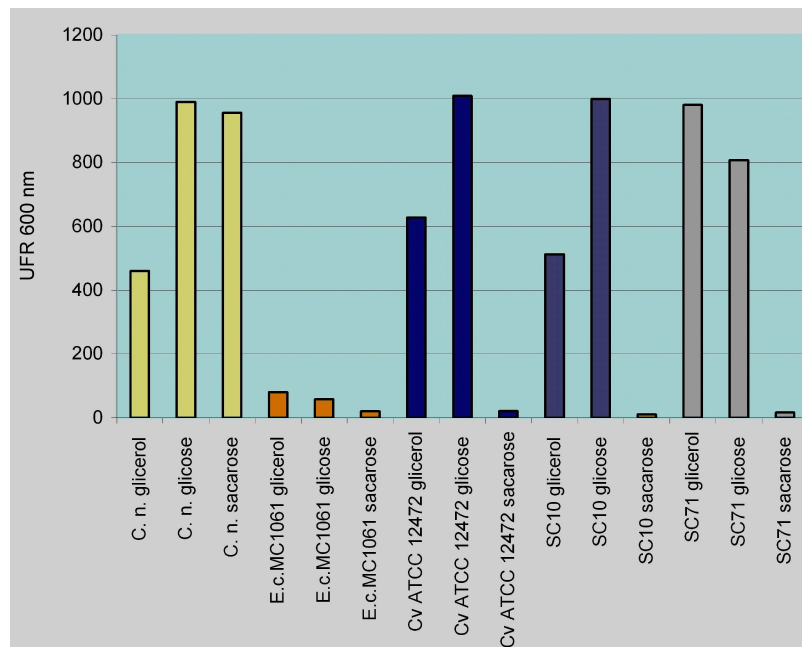


Figura 15: Gráfico de produção de PHA do isolado *C. violaceum* SC 10 e SC 71 cultivados em meio mínimo, a 28°C, com 2% de glicose, glicerol ou sacarose, como fontes de carbono. O conteúdo de PHA presente nas células foi avaliado pela técnica de coloração com “Nile Red” e posterior leitura da fluorescência relativa (UFR) em espectrofluorímetro, empregando-se filtro de excitação de 545 nm e filtro de emissão de 600 nm. CV ATCC 12472 e *C. necator* (controles positivos), *E. coli* MC1061 (controle negativo) e *C. violaceum* SC 10 e SC 71 isolados analisados. Os resultados do branco utilizado para cada foram subtraídos dos resultados apresentados.

9. Análise do PHA produzido por *C. violaceum* SC 48

9.1. Avaliação de produção de PHA

Para que fosse feita a análise do PHA produzido por *C. violaceum* SC 48 suas células foram crescidas em meio rico (LB) e foi feito posteriormente um reinóculo em Meio mineral mínimo (MM) M9 contendo como fonte de carbono glicose, glicerol ou sacarose, todas a 2%. Após 48 horas as células foram centrifugadas e liofilizadas para

isso, foram utilizados 10L de cultura com cada um dos substratos citados. A partir disto foram obtidos, após extração (Materiais e Métodos item 3.1.1), 73,84 mg massa seca de SC 48 cultivada em MM M9 com glicose das quais, ~5,02 mg eram de PHA, 61,1 mg de massa seca em MM M9 com glicerol, das quais, ~0,9776 mg eram de PHA e 10 mg em MM M9 com sacarose, das quais ~0,135 mg eram de PHA (tabela 8).

Tabela 8 - Massa celular seca e porcentagem de PHA total produzida pelo isolado *C. violaceum* SC 48 cultivado em meio mínimo com diferentes fontes de carbono.

Fonte de Carbono	Glicose	Glicerol	Sacarose
Produto			
Massa celular seca (mg/ L)	73,84	61,1	10,0
Massa do PHA extraído #	~5,02 mg	~0,9776 mg	~0,135 mg
PHA % (mg PHA/ mg massa celular seca)	6,81	1,6	1,35

O valor da pesagem do PHA é aproximado já que o produto da extração não se encontra totalmente livre de impurezas.

A fonte de carbono que produziu maior massa celular seca e também, maior produção de PHA/massa seca foi a de glicose (Tabela 8). Apesar do ensaio de espectrofotometria ter sido realizado em isolados diferentes da extração, podemos dizer que os resultados destes dois experimentos reforçam um ao outro. Em ambos temos um resultado melhor das linhagens crescidas em glicose, seguido de glicerol e por fim a sacarose.

A bactéria *C. necator*, uma das bactérias empregadas para produção de PHA em escala industrial, é capaz de produzir até 80-90% de seu peso seco em PHA (Lee, 1996). Existem poucos relatos sobre a produção de PHA em *C. violaceum*, segundo Kolibachuk et al (1999), ela pode acumular até cerca de 38%, quando o substrato utilizado é a glicose. Os valores que encontramos fogem um pouco do esperado, apesar de só existir um relato e que dentre desses substratos só utiliza glicose como substrato. Deve-se lembrar que pequenas mudanças nas condições de cultivo podem ter grande impacto na produção do polímero, um exemplo disso é que os isolados que apresentam grande quantidade de grânulos no ensaio de TEM, na maioria das vezes apresentam grande dificuldade de crescimento.

Para que os próximos ensaios fossem mais confiáveis, foram utilizados os polímeros extraídos (Material e Métodos item 4.11)(figuras 16 a 18). Os estudos físicos em polihidroxialcanoatos utilizando a massa celular total seca, sem a extração prévia do polímero, acarretariam um resultado confuso devido ao volume de substâncias presentes nas células que aparecerão no espectro em meio aos picos referentes a PHA.

9.2. Análises físico-químicas do PHA produzido

Com o objetivo de identificar nos polímeros obtidos, a composição monomérica do PHA produzido por *Chromobacterium violaceum* SC 48 foram feitos ensaios de IV e RMN (Material e Métodos itens 1.12 e 1.13).

9.2.1. Análise por Infravermelho (IV)

Para identificar os grupamentos orgânicos presentes nas amostras poliméricas obtidas foram realizadas análises de espectroscopia de infravermelho (IV). No espectro de I.V. (figuras 19, 20 e 21) foram observadas as bandas de OH, de CH e de COO, estes grupamentos orgânicos identificados correspondem aos grupamentos presentes em polímeros de PHA.



Figura 16 – Polímero extraído do isolado *C. violaceum* SC 48 cultivado em meio mínimo, a 28°C, com 2% de glicose.

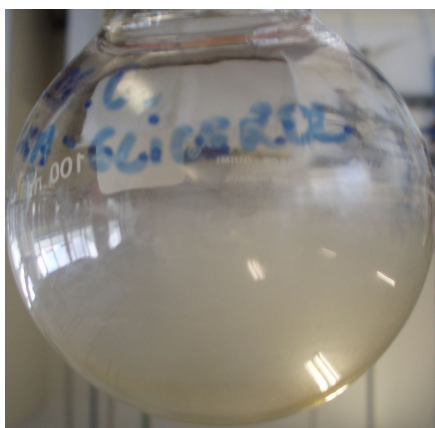


Figura 17 – Polímero extraído do isolado *C. violaceum* SC 48 cultivado em meio mínimo, a 28°C, com 2% de glicerol.



Figura 18 – Polímero extraído do isolado *C. violaceum* SC 48 cultivado em meio mínimo, a 28°C, com 2% de sacarose.

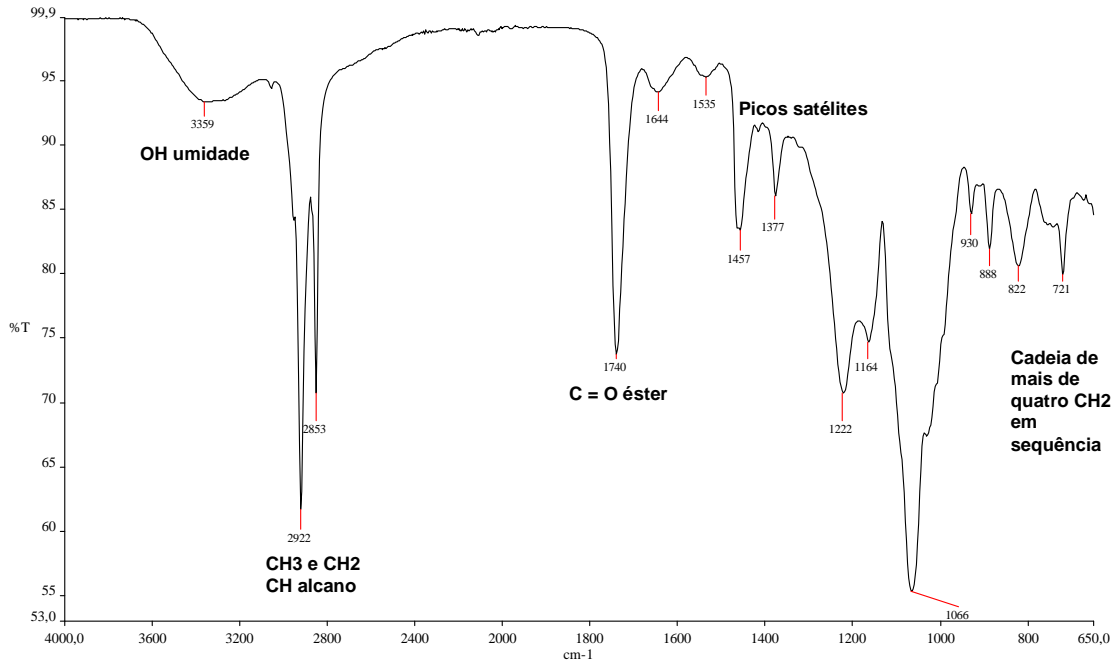


Figura 19 - Espectro de I.V. do polímero produzido por *C. violaceum* SC 48 cultivado em meio mínimo M9 contendo glicose (2%) como fonte de carbono.

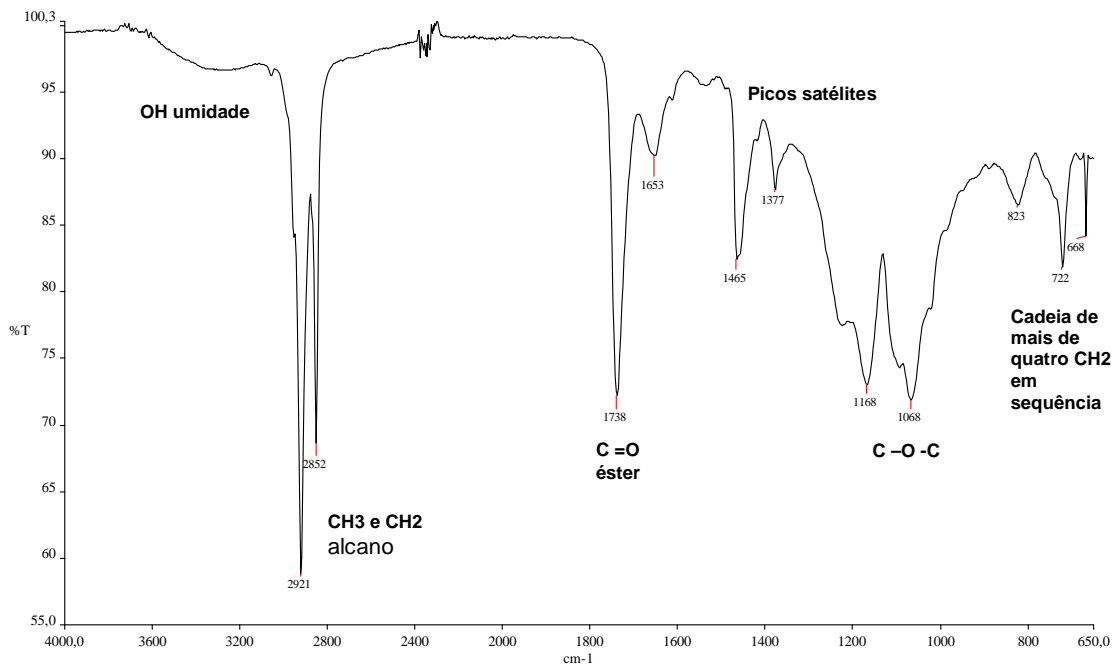


Figura 20 - Espectro de I.V. do polímero produzido por *C. violaceum* SC 48 cultivado em meio mínimo M9 contendo glicerol (2%) como fonte de carbono.

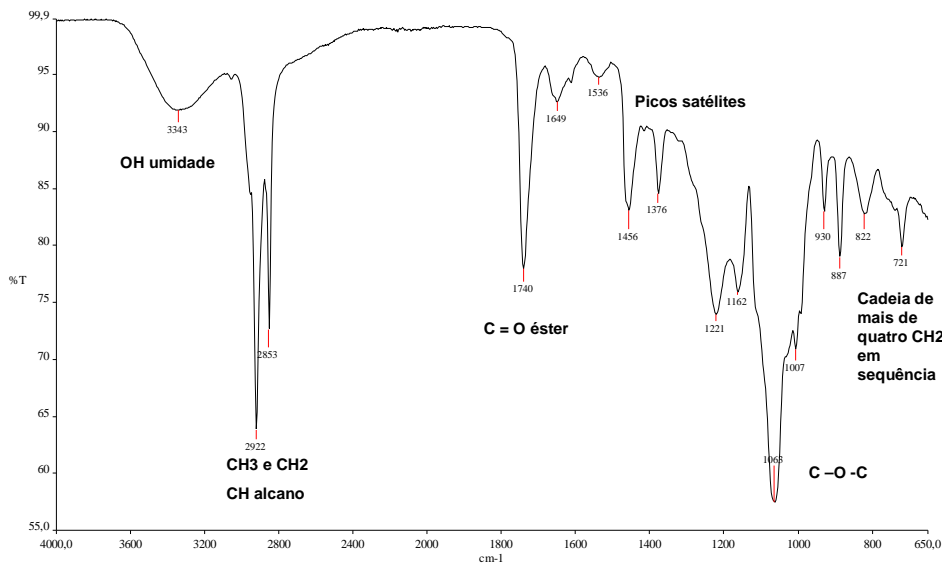


Figura 21 - Espectro de I.V. do polímero produzido por *C. violaceum* SC 48 cultivado em meio mínimo M9 contendo sacarose (2%) como fonte de carbono.

Estes resultados obtidos indicam mais uma vez que as amostras analisadas possivelmente contem polímeros de PHA.

9.2.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A verificação da presença de PHA, bem como avaliação dos tipos de PHA produzidos, foram realizadas com as análises de RMN ^{13}C e de RMN ^1H do polímero produzido, extraído e parcialmente purificado do isolado cultivado em meio mínimo contendo glicose, glicerol ou sacarose como fontes de carbono.

A técnica da Ressonância Magnética Nuclear de prótons (RMN ^1H) identifica os sinais referentes aos átomos de hidrogênio presentes no polímero PHA. Já a Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13 (RMN ^{13}C) identifica os sinais referentes aos átomos de carbono presentes no polímero PHA. Para esta análise foi utilizado o polímero produzido pelo isolado *C. violaceum* SC48 cultivado em MM M9 com glicose 2% (figuras 22 e 23).

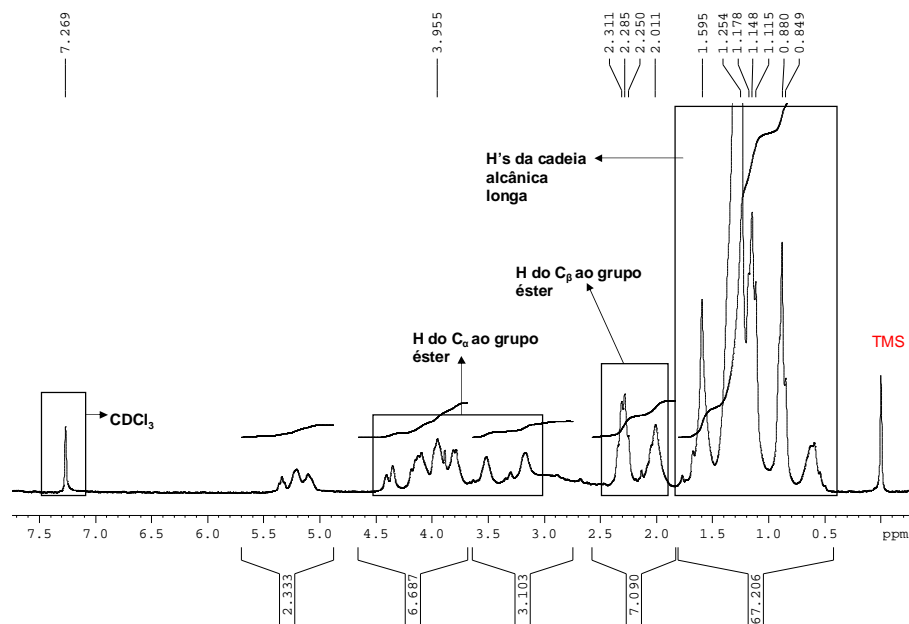


Figura 22 - Espectro de RMN ¹H do PHA produzido pelo isolado *C. violaceum* SC 48 quando cultivado em meio mínimo com 2% de glicose.

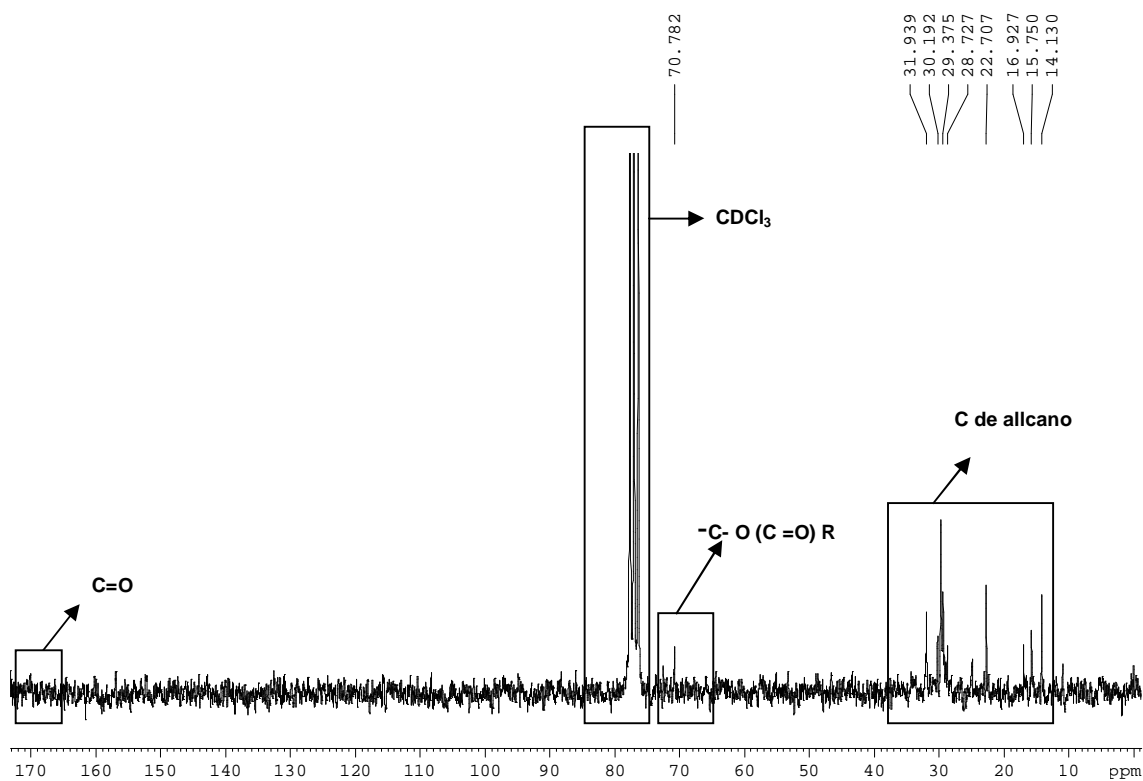


Figura 23 - Espectro de RMN ¹³C do PHA produzido pelo isolado *C. violaceum* SC 48 quando cultivado em meio mínimo com 2% de glicose

As análises dos PHA por RMN não permitiram a determinação da porcentagem de cada um dos monômeros no polímero, mas podemos ressaltar a presença de grupamentos correspondentes a polihidroxicanoatos que indicam a presença destes, mesmos que impuros na amostra obtida por extração do isolado CV SC 48.

10. Amplificação de PHA sintase por PCR

Os primeiros iniciadores empregados foram modificados tendo como base o trabalho de Sheu *et al.* (2000), baseando-se na seqüência central de *phaC* de *C. necator*, que possui uma PHA sintase de classe I. Estes oligonucleotídeos foram desenhados com degenerações, baseando-se em múltiplos alinhamentos de seqüências de *phaC* de 13 bactérias.

Utilizando estes iniciadores realizamos o PCR semi-nested (SN-PCR), quando foi utilizado o DNA molde de *C. necator* (controle positivo), conforme esperado, foi possível obter-se um fragmento de DNA de 406pb (figura 24) tamanho esperado para a parte central do gene *phaC* que pôde ser visualizado numa banda bem definida. Nenhuma amplificação foi obtida quando se empregou, como molde, o DNA extraído de *E. coli* (controle negativo). Somente alguns isolados apresentaram amplificação para essa estratégia (figura 24).

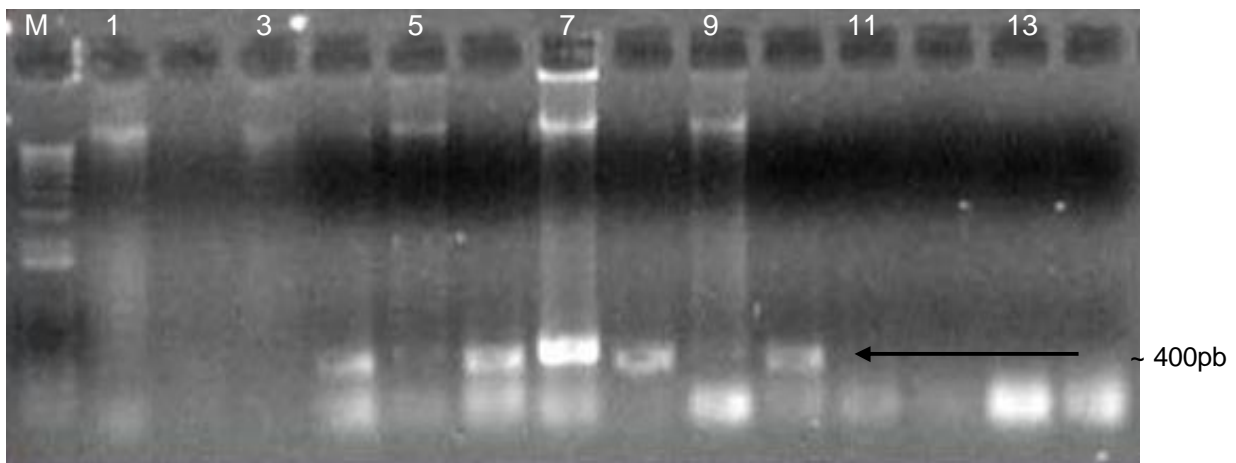


Figura 24. Amplificação de DNAs com os pares de iniciadores *phaCmF1-phaCmR4* (canaletas ímpares), *phaCiF1-phaCiR4* (canaletas pares) observado em gel de agarose 0,8% com brometo de etídio. M, marcador molecular; 1 e 2, isolado SC09; 3 e 4, SC67; 5 e 6, *C. violaceum* ATCC 12472; 7 e 8, *C. necator* (controle positivo); 9 e 10, SC71; 11 e 12, SC91; 13 e 14 *E. coli* DH 5 α (controle negativo).

A primeira *PhaC* de *C. violaceum* somente foi descrita em 2003, quando do término do consórcio do genoma de *C. violaceum*. Somando isto ao fato de nem todas os isolados terem sido amplificados, desenvolvemos novos iniciadores que pudessem ser mais adequados a este trabalho. Foram desenhado, um par de oligonucleotídeos específicos (tabela 8, figura 25) com base na seqüência de *phaC Chromobacterium violaceum* disponível no “GenBank” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O gene *phaC* completo tem o tamanho de 1706pb (302281-3024587, no Gene Bank) os iniciadores desenhados produzem um amplicon de 1775 pb (3022983-3024758).

```
TGCAGCAGTTCGTCAAACTCGCTGTCGCGAGCCTCCAGCCCCGACGGCGCAGCCCATCCCTTCGCCGGCGCCTGGGC
GCAGCTGATGAACCAGACCAACCAGCTGTTTCGCTCTCCAGTCCCTCGCTTTTACCAGCAGCAGCTCAATCTGTGGTTCG
CAATTCCTCGGCCAGGCCGCCGGCCAGGAAGCCGCCGCGCAAGCGGGCGCCAAGCCGGCCGACCGCCGCTTCGCGT
CGCCGGAATGGAACGAGCACCCGTTCTACAACCTTCCTCAAGCAGAGCTATCTGCAGACCTCCAAGTGGATGATGGA
GCTGGTGGACAAGACCCAGCTCGACGAGGACGCCAAGGACAAGCTGGCTTTTCGCCACCCGCCAGTACCTGGACGCG
ATGTCCCCCAGCAACTTCATGCTGACCAACCCCGACGTGGTCAAGCGCGGATCGAGACCAAGGGCGAAAAGCCTGG
TCGAGGGCATGAAGAACATGCTGGACGACTTCCAGAAGGGCCACATCTCGATGTCGGACGAGAGCAAGTTCGAGAT
CGGCAAGAACCCTGGTGGTCAACCCCGGGCCAGGTGGTGTTCGCAACGAACTGATCGAGCTGATCCAGTACACGCCG
ACCACCGACAAGGTCTACGAGAAGCCGCTGCTGTTTCGTGCCGCCCTGCATCAACAAGTACTACCTGATGGACCTGC
AGCCGGACAACCTCCATGGTGCGCCACTTCGTCGCCAGGGTTACC CGTGTTCCTGATCAGCTGGCGCTCCGCGGT
CGCCGAGATGAAGCACTTCACCTGGGAAAACCTATATCGAGAAAAGCGTGTTCGCCCGCGCGGAAGCGGTGCAGAAA
ATCACC AAGCAGCCGACGATGAACGTGCTGGGCTTCTGCGTCGGCGGCGTCATCCTCACCACCGCGCTGTGCGTGG
CTCAGGCCAAGGGGCTGAAATACTTCGACTCCGCCACCTTCATGACCTCGCTGATCGACCACGCCGAACCGGGCGA
GATCTCCTTCTTCATCGACGAGAGCGTGGTGGCCGGCCGGAAGCCAAGATGGCCAGCGCGGCATCATCAGCGC
AAGGAAATCGGCCGACCTTCGCCAGCCTGCGCGCCAACGACCTGGTGTGGAAC TACGTGGTCAACAAC TACCTGC
TGGGCAAGACCCCGCGCCGTTTCGACTGCTGTTCTGGAACAACGACGCGGTGGATCTGCCGCTGCCGATGCACAC
CTTCTGCTGCGCCAGTTCATACATGAACAACGCGCTGGTGGTCCGGCGCGATCAGCTGTGCGGCGTGCCGATC
GACATCGCCAAGATCGACGTGCCGCTTACATGTTTCGCCCGCGCGACGACCACATCGTGTGCTGTGGAGCTCCGCCCT
TCTCCGGCTGAAATACCTGCAGGGCGCGCCAGCCGCCGCTTCGTGCTGGGCGCGTCCGGCCACATCGCCGGCTC
GATCAACCCGGTCAACCAAGGACAAGCGCAACTACTGGGCAACGACACGCTGCCGCTGCACGCCGAGGAATGGCTG
GAAAGCGCGAAAAGCCGCCCGGCGAGCTGGTGGAAAGGACTGGGACGCCTGGCTGGCGCCGAGTCCGGCAAGCAAG
TGGCCGCGCCAAAAGCCTGGGCAACAAGGAATTCGCCGCTGCTGGCGGCGCCGGGAGTTATGTGCTGGCCAA
GGCCATGCCGTCGCTCGCCGACCTGCAATGACAACCTATTCGAACGCCCCGAGCGGCATGATCCGCTCCCG
ACGAGGGCCGCAACAAAAGGAGAAAGACATGGAAGTAGCAATCGTAGCCGCGCAGCGCACCCGCATCGGCAGCTTC
GGCGGCGCTTGGCCAAGATTCGCCGCGCCGAGCTGGGCGCCACTGTGATCAAGGCGTTGCTGGAGAAGAC
```

Figura 25: Seqüência de nucleotídeos do gene de *pha C* de *C. violaceum* . Os iniciadores se encontram destacados em cinza.

Esta abordagem se mostrou mais eficiente e revelou, isolados com amplicons de tamanhos diferentes (figura 26). Com o objetivo de aumentar a especificidade e conseguir uma única banda de fragmentos de DNA, como produto de PCR, foram feitas variações da temperatura de anelamento, tempo de cada ciclo e componentes do mix com o uso em diversas proporções de gelatina, betaína, DMSO e BSA.

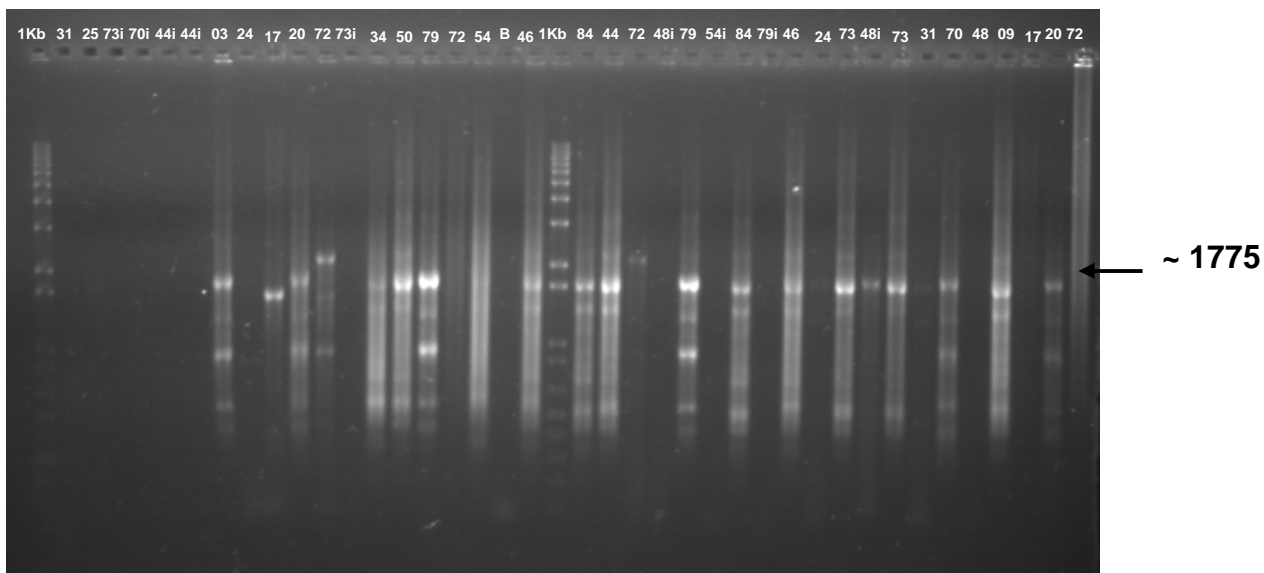


Figura 26. Amplificação de DNAs (Material e Métodos 1.17) de isolados do PNSC denominados CV SC com os pares de iniciadores phaCiF1-phaiCR4 (isolados identificados por números seguidos de i), phaCiF1-phaCiR4 e phaCF-phaCR (isolados identificados somente por números) observado em gel de agarose 0,8% com brometo de etídio. Marcador molecular; 1Kb.

Obtivemos amplificações nos controles positivos e em isolados SC em torno de 1770 pb, tamanho esperado para todo o gene *phaC*. É interessante observar que algumas linhagens apresentam amplicons de tamanho um pouco diferente do esperado, menor, no caso de SC17 e maior em SC72.

11. Análise da seqüência da PHA sintase por seqüenciamento

Para comprovar se o amplicon obtido se tratava do gene *phaC*, foi realizado o seqüenciamento, obtido com pouca qualidade. A análise da seqüência foi feita, através do programa “Blast” e apesar da baixa qualidade houve alguma similaridade com *phaC* de *Chromobacterium violaceum* bem como o mesmo gene em diversas bactérias conhecidas produtoras de PHA o que permite dizer que o *phaC* nesses isolados foi seqüenciado. A baixa qualidade da seqüência obtida; impede que conclusões sejam tiradas da baixa similaridade.

Conclusão

Como já mencionamos neste trabalho, é cada vez maior a busca pela independência do petróleo para a fabricação de componentes plásticos. A natureza renovável dos PHAs são uma alternativa nessa busca (Stevens 2002). Entretanto em relação aos plásticos convencionais, estes têm produção cara, mas se encontram em um estágio apenas inicial de desenvolvimento comercial (Lee, 1996). Pesquisa tem foco em novas linhagens selvagens, linhagens recombinantes, culturas mistas, purificação eficiente, uso de substratos mais baratos, dentre outras alternativas para a diminuição dos custos de produção de plásticos biodegradáveis.

Neste estudo foram identificados dentre novos isolados de *C. violaceum*, organismos produtores de PHAs utilizando diversos substratos como fonte de carbono. Em nosso conhecimento, não tinha sido ainda relatada a produção de biopolímeros de *C. violaceum* utilizando -se glicerol como fonte de carbono. Este resultado é importante já que a indústria do Biodiesel com potencial de grande crescimento no nosso país tem o glicerol como resíduo. Dentre os resultados positivos, podemos destacar a glicose com a mais alta produção dentre os substratos testados e a sacarose produto atrelado à produção de cana de açúcar. As análises feitas revelam neste trabalho, são uma etapa preliminar e uma importante ferramenta para um melhor direcionamento e planejamento experimental sem implicar desperdício de tempo e recursos financeiros em estudos posteriores envolvendo outros microrganismos na produção de PHA.

5. Referências Bibliográficas

- Akar, A.; Akkaya, E.U.; Yesiladali, S.K.; Celik, G.; Cokgor, E.U.; Tamerler, C.; Orhon, D.; Celik, Z.P. (2006) Accumulation of polyhydroxyalkanoates by *Microlunatus phosphovorius* under various growth conditions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33, 215–220.
- Alias, Z. ;Tan, I.K.P. (2005) Isolation of palm oil-utilising, polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacteria by an enrichment technique. *Bioresource technology*. 96, 1229–1234.
- Anderson, A. J.; Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews* v.54, p.450-472.
- Anderson, A. J.; Haywood, G. W; Williams, D. R.; Dawes, E. A. (1990). The production of polyhydroxyalkanoates from unrelated carbon sources. Dordrecht: Klumer Academic Publishers, p.119-129.
- Arkansas State University – The Center for Learning Technology. Endereço:<http://www.clt.astate.edu/dgilmore/Research%20students/phas.htm>. Acesso em Janeiro de 2008
- Berlanga, M.; Montero, M. T.; Fernandez-Borrell J.; Guerrero, R. (2006). Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats. *International Microbiology* ; 9(2):95-102.
- Bittencourt, C. I. (2003) Identificação e Avaliação da Susceptibilidade a Antimicrobianos em Bactérias Gram-negativas Isoladas da Bacia do Rio Doce. Monografia. . Departamento de Biologia Geral, UFMG, Belo Horizonte.
- Bittencourt, C. I. (2005). Diversidade Molecular e Fisiológica de *Chromobacterium* sp. e outras bactérias isoladas de diferentes ecossistemas tropicais.. Dissertação de mestrado. Departamento de Biologia Geral, UFMG, Belo Horizonte.
- Brämer, C.O., Vandamme, P., Silva, L.F.d., Gomez, J.G.C. and Steinbüchel, A. (2001) *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 1709–1713.
- Brandl, H. ; Gross, R. A. ; Lenz, R. W.; Fuller, R. C. (1998). *Pseudomonas oleovorans* as a Source of Poly (β -Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 1977-1982.
- Bucci, D. Z.; Tavares, L. B. B.; I. (2005). Sell. PHB packaging for the storage of food products. *Polymer Testing*; Volume 24, Issue 5, 564-571.

- Celik, G.Y., Beyatli, Y. and Aslim, B. (2005) Determination of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) production in sugarbeet molasses by *Pseudomonas cepacia* G13 strain. *Zuckerindustrie* 130, 201–203.
- Chen, J-Y.; Song, G.; Chen, G-Q. (2005). A lower specificity PhaC2 synthase from *Pseudomonas stutzeri* catalyses the production of copolyesters consisting of short-chain-length and mediumchain-length 3-hydroxyalkanoates. *Antonie van Leeuwenhoek, Springer*, 10482-005-9019-9.
- Choi, E.; Rhu, D.H; Lee, W.H; Kim, J.Y. (2003) Polyhydroxyalkanoate (PHA) production from waste. *Water, Science & Technology*;48(8):221-8.
- Coutinho, B. C.; Miranda, G. B.; Sampaio, G. R.; DE Souza, L. B. S.; Santana, W. J.; Coutinho, H. D. M. (2004). A importância e as vantagens do polihidroxibutirato (plástico biodegradável). *Holos*, p.76-81.
- Degelau, A. T.; Scheper, J. E. B.; Guuske, C. (1995) Fluorometric measurement of poly-B hydroxybutyrate in *Alcaligenes eutrophus* by flow cytometry and spectrofluorometry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.42, p.653-657.
- Dóí, Y.; Sudesh, K; Fukui, T.; Iwata T. (2000). Factors affecting the freeze-fracture morphology of in vivo polyhydroxyalkanoate granules. *Canadian Journal of Microbiology*. Apr;46(4):304-11.
- Durner, R., Witholt, B. and Egli, T. (2000) Accumulation of Poly[(R)-3-Hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas oleovorans* during growth with Octanoate in continuous culture at different dilution rates. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3408–3414.
- Fernandez, D.; Rodriguez, E.; Bassas, M.; Vinas, M.; Solanas, A.M.; Llorens, J.; Marque's, A.M. (2005) Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045: Effect of culture conditions. *Biochemical engineering journal* 26, 159–167.
- Foster, L.J.R., Sanguanchaipaiwong, V., Gabelish, C.L., Hook, J. and Stenzel, M. (2005) A natural-synthetic hybrid copolymer of polyhydroxyoctanoate-diethylene glycol: biosynthesis and properties. *Polymer* 46, 6587–6594.
- Full, T.D., Jung, D.O. and Madigan, M.T. (2006) Production of poly-beta-hydroxyalkanoates from soy molasses oligosaccharides by new, rapidly growing *Bacillus* species. *Letters in Applied Microbiology* 43, 377–384.
- Gomez, J. G. C.; Bueno-Netto, C. L. (2001) Produção de poliésteres bacterianos. São Paulo: Edgard Blücher v.3, p.219-247.

- Han, J., Qiu, Y.-Z., Liu, D.-C. and Chen, G.-Q. (2004) Engineered *Aeromonas hydrophila* for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with alterable monomers composition. *FEMS Microbiology Letters* 239, 195–201.
- Hartmann, R., Hany, R., Pletscher, E., Ritter, A., Witholt, B. and Zinn, M. (2006) Tailor-made olefinic medium-chainlength poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] by *Pseudomonas putida* GPo1: Batch versus chemostat production. *Biotechnology and Bioengineering* 93, 737–746.
- Hoffmann, N. and Rehm, B.H.A. (2004) Regulation of polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters* 237, 1–7.
- James, B.W., Mauchline, W.S., Dennis, P.J., Keevil, C.W. and Wait, R. (1999) Poly-3-hydroxybutyrate in *Legionella pneumophila*, an energy source for survival in low-nutrient environments. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 822–827.
- Jau, M.H., Yew, S.P., Toh, P.S.Y., Chong, A.S.C., Chu, W.L., Phang, S.M., Najimudin, N. and Sudesh, K. (2005) Biosynthesis and mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) P(3HB) by *Spirulina platensis*. *International Journal of Biological Macromolecules* 36, 144–151.
- Jendrossek, D., Handrick, R. (2004) Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annual Review of Microbiology*, v.56, p.403-432.
- Jung, Y.; Kim, S. S.; Kim, Y. H.; Kim, S. H.; Kim, B. S.; Kim, S. (2005) A poly(lactic acid)/calcium metaphosphate composite for bone tissue engineering. *Biomaterials*; 26(32):6314-22.
- Kahar, P., Agus, J., Kikkawa, Y., Taguchi, K., Doi, Y. and Tsuge, T. (2005) Effective production and kinetic characterization of ultra-high-molecular-weight poly (R)- 3-hydroxybutyrate in recombinant *Escherichia coli*. *Polymer Degradation and Stability* 87, 161–169.
- Kahar, P., Tsuge, T., Taguchi, K. and Doi, Y. (2004) High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. *Polymer Degradation Stability* 83, 79–86. R.A.J. Verlinden et al. Bacterial synthesis of PHAs ^a 2007 The Authors Journal compilation ^a 2007 The Society for Applied Microbiology, *Journal of Applied Microbiology* 102 (2007) 1437–1449 1445
- Katircioglu, H., Aslim, B., Yuksekdağ, Z.N., Mercan, N. and Beyatli, Y. (2003) Production of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) and differentiation of putative *Bacillus* mutant strains by SDS-PAGE of total cell protein. *African Journal of Biotechnology* 2, 147–149.
- Keenan, T.M., Tanenbaum, S.W., Stipanovic, A.J. and Nakas, J.P. (2004) Production and characterization of poly-beta-hydroxyalkanoate copolymers from *Burkholderia cepacia* utilizing xylose and levulinic acid. *Biotechnology Progress* 20, 1697–1704.

- Khanna, S. and Srivastava, A.K. (2005a) Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry* 40, 2173–2182.
- Kichise, T., Fukui, T., Yoshida, Y. and Doi, Y. (1999) Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) by recombinant *Ralstonia eutropha* and effects of PHA synthase activity on in vivo PHA biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* 25, 69–77.
- Kim, H.Y., Park, J.S., Shin, J.D. and Lee, Y.H. (1995) Isolation of glucose utilising mutants *Alcaligenes eutrophus*, its substrate selectivity, and accumulation of PHB. *The Journal of Microbiology* 33, 51–58.
- Kolibachuk, D.; Miller, A.; Dennis, D. (1999). Cloning, Molecular analysis and expression of the polyhydroxyalkanoic acid synthase (phaC) gene from *Chromobacterium violaceum*. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 3561–3565.
- Kranz, R.G.; Gabbert, K. K.; Locke, T. A.; Madigan, M. T. (1997) Polyhydroxyalkanoate Production in *Rhodobacter capsulatus*: Genes, Mutants, Expression, and Physiology. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 63, No. 8: 3003–3009.
- Labuzek, S. and Radecka, I. (2001) Biosynthesis of copolymers of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85 strain. *Journal of Applied Microbiology* 90, 353–357.
- Lee, S.H., Oh, D.H., Ahn, W.S., Lee, Y., Choi, J.I. and Lee, S.Y. (2000) Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by high-cell-density cultivation of *Aeromonas hydrophila*. *Biotechnology and Bioengineering* 67, 240–244.
- Lee, S.Y. (1996). Plastic Bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Tibtech*, v.14, p.431-438.
- Lemoigne, M. (2001). Produits de deshydratation et de polymerization de l'acide 3-oxybutyrique. *Bulletin de la Société de Chimie Biologique*, v.8, p.770-782, 1926. in Gomez, J. G. C.; Bueno-Netto, C. L. Produção de poliésteres bacterianos. São Paulo: Edgard Blücher, v.3, p.219-247 .
- Lemos, P.C.; Serafim, L. C.; Oliveira. (2006). Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product. *Macromolecular bioscience*, 9;6 (11):885-906.
- Madison, L. L.; Huisman, G. W. (1999). Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 63, No. 1: 21–53.
- Maehara, A.; Doi, Y.; Nishiyama, T.; Takagi, Y.; Ueda, S.; Nakano, H.; Yamane, T. (2001). PhaR, a protein of unknown function conserved among short-chain-length polyhydroxyalkanoic acids producing bacteria, is a DNA-binding protein and represses *Paracoccus denitrificans* phaP expression in vitro, *FEMS Microbiology Letters*, v. 200, p. 9.

Mahishi, L. H.; Rawal, S. K. (2002). Poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* harbouring *Streptomyces aureofaciens* PHB biosynthesis genes : Effect of various carbon and nitrogen sources. *Microbiological Research*, v.157, p.1-9.

Mahishi, L.H., Tripathi, G. and Rawal, S.K. (2003) Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* harbouring *Streptomyces aureofaciens* PHB biosynthesis genes: Effect of various carbon and nitrogen sources. *Research in Microbiology* 158, 19–27.

Mercan, N. and Beyatlı, Y. (2005) Production of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) by *Rhizobium meliloti*, *R. viciae* and *Bradyrhizobium japonicum* with different carbon and nitrogen sources, and inexpensive substrates. *Zuckerindustrie* 130, 410–415.

Metabolix, Bioindustrial Evolution. Endereço: www.metabolix.com. Acesso em Maio de 2008.

Midani, S.; Rathore, M. (1998) *Chromobacterium violaceum* infection. *Southern Medical Journal*; 91(5):464-6.

Mukhopadhyay, M., Patra, A. and Paul, A.K. (2005) Production of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate- co-3-hydroxyvalerate) by *Rhodospseudomonas palustris* SP5212. *World Journal of Microbiology* 21, 765–769.

Nakas, J.P., Keenan, T.J., Stipanovic, A.J. and Tanenbaum, S.W. (2004) Bioconversion of xylose and levulinic acid to polyhydroxyalkanoate (PHA) copolymers. *Abstr Pap Am Chem Soc* 227, U299.

National Center for Biotechnology Information. Endereço: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acessado em Setembro de 2007

Nikel, P.I., Pettinari, M.J., Galvagno, M.A. and Mendez, B.S. (2006) Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis by recombinant *Escherichia coli* *arcA* mutants in microaerobiosis. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2614–2620.

Ojumu, T. V.; Y. U, J.; Solomon, B. O. (2004) Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology*, v.3, p.18-24.

Ostle, A. G.; Holt, J. G. (1982). Nile Blue A as a fluorescent stain for poly- β -hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology*, v.44, p.238-241.

Park, S.J., Choi, J.I. and Lee, S.Y. (2005a) Engineering of *Escherichia coli* fatty acid metabolism for the production of polyhydroxyalkanoates. *Enzyme and Microbial Technology* 36, 579– 588.

Pohlmann, A., Fricke, W.F., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Cramm, R., Eitinger, T., Ewering, C., et al. (2006) Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature Biotechnology* 24, 1257–1262.

- Qi, Q. and Rehm, B.H.A. (2001) Polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Caulobacter crescentus*: molecular characterization of the polyhydroxybutyrate synthase. *Microbiology* 147, 3353–3358.
- Quillaguaman, J., Delgado, O., Mattiasson, B. and Hatti-Kaul, R. (2006) Poly(beta-hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1. *Enzyme and microbial technology* 38, 148–154.
- Quillaguaman, J., Hashim, S., Bento, F., Mattiasson, B. and Hatti-Kaul, R. (2005) Poly(beta-hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1 using starch hydrolysate as substrate. *Journal of Applied Microbiology* 99, 151–157.
- Rehm, B. H. A. Genetics and biochemistry of polyhydroxyalkanoate granule self-assembly: The key role of polyester synthases. *Biotechnology Letters* 28: 207–213.
- Rehm, B. H. A. (2006). Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *The Biochemical Journal*, v.376, p.15-33, 2003.
- Rosa, D. S.; Franco, B. L. M.; Calil, M.R. (2001). Biodegradabilidade e Propriedades Mecânicas de Novas misturas Poliméricas. *Polímeros* vol. 11, n^o.2, São Carlos.
- Sambrook, J.; Russel, D. W. ,(2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. v.1-3.
- Shamala, T.R., Chandrashekar, A., Vijayendra, S.V.N. and Kshama, L. (2003) Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing *Bacillus* spp. using the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Applied Microbiology* 94, 369–374.
- Sheu, D. S.; Wang, Y. T.; Lee, C. Y. (2000) Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. *Microbiology*, v.146, p.2019-2025.
- Soaliman, D. K. Y.; Ashby, R. D. (2005). Rapid genetic characterization of poly(hydroxyalkanoate) synthase and its applications. *Biomacromolecules*, v.6, p.532-537.
- Spiekermann, P.; Rehm, B. H.; Kalscheuer, R.; Baumeister, D.; Steinbüchel, A. (1999) 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.
- Steinbüchel, A.; Valentinn, H. E. (1995). Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters*, v.128, p.219-228.
- Steinbüchel, A.; Hein, S. (2001). Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*; 71:81-123. Review.

Stubbe, J.A; Tian, J.; He, A.; Sinskey, A. J.; Lawrence, A. G.; Liu, Pinghua, (2005). Nontemplate-dependent polymerization processes: polyhydroxyalkanoate synthases as a paradigm. *Annual Review of Biochemistry*; 74:433-80. Review.

Sudesh, K.; Fukui, T.; Doi, Y. (1998) Genetic Analysis of *Comamonas acidovorans* Polyhydroxyalkanoate Synthase and Factors Affecting the Incorporation of 4-Hydroxybutyrate Monomer. *Applied and environmental microbiology*, 64, p. 3437–3443.

Sudesh, K; Fukui, T; Iwata, T; Doi, Y. (2000) Factors affecting the freeze-fracture morphology of in vivo polyhydroxyalkanoate granules. *Canadian Journal of Microbiology*.;46(4):304-11.

Sujatha, K. and Shenbagarathai, R. (2006) A study on medium chain length-polyhydroxyalkanoate accumulation in *Escherichia coli* harbouring phaC1 gene of indigenous *Pseudomonas* sp. LDC-5. *Letters Applied Microbiology* 43, 607–614.

Suzuki, Y. ; Esumi, Y. ; Koshino, H.; Ueki, M. ; Doi, Y. (2001). Involvement of Catalytic Amino Acid Residues in Enzyme-Catalyzed Polymerization for the Synthesis of Polyesters. *Biomacromolecules* 541; 541-544.

Taguchi, K.; Tsuge, T.; Matsumoto, K.; Nakae, S.; Taguchi, S.; Doi, Y. (2001). Investigation of metabolic pathways for biopolyester production. *Riken*, v.42, p. 71-74.

Taguchi, S., Nakamura, H., Kichise, T., Tsuge, T., Yamato, I. and Doi, Y. (2003) Production of polyhydroxyalkanoate (PHA) from renewable carbon sources in recombinant *Ralstonia eutropha* using mutants of original PHA synthase. *Biochem Eng J* 16, 107–113.

Taguchi, S.; Maehara, A.; Takase, K.; Nakahara, M.; Nakamura, H.; Doi, Y. (2001). In vivo assay system of the polymerase as a key enzyme for PHA biosynthesis. *Riken*, No. 42: Focused on Ecomolecular Science Research. Review

Tajima, K., Igari, T., Nishimura, D., Nakamura, M., Satoh, Y. and Munekata, M. (2003) Isolation and characterization of *Bacillus* sp. INTO05 accumulating polyhydroxyalkanoate (PHA) from gas field soil. *J Biosci Bioeng* 95, 77–81.

Timm, A.; Steinbüchel, A. (1992). Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonas. *Applied and Environmental Microbiology*; v.56, p.3360-3367.

Tobin, K.M. and O'Connor, K.E. (2005) Polyhydroxyalkanoate accumulating diversity of *Pseudomonas* species utilizing aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol Lett* 253, 111–118.

Tsuge, T. (2002) Metabolic Improvements and Use of Inexpensive Carbon Sources in Microbial Production of Polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioxscience and Bioengineering*, Vol. 94, No. 6: 579-584. Review.

- Valappil, S.P., Peiris, D., Langley, G.J., Herniman, J.M., Boccaccini, A.R., Bucke, C. and Roy, I. (2007) Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from structurally unrelated carbon sources by a newly characterized *Bacillus* spp. *J Biotechnol* 127, 475–487.
- Verlinden, R.A.J.; Hill, D.J.; Kenward, M.A.; Williams, C.D.; Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Applied and Environmental Microbiology*; 102(6):1437-49. Review.
- Vieira, Bortoluzzi, R.L.C.; Carvalho- Okano; R. M., Garcia, F.C.P; Tozzi, A.M.G.A. (2004) Leguminosae, Papilionoideae no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brazil, II árvores e arbustos escandentes. *Acta Botânica, Brás.* 18, 49-71.
- Volova, T.G. and Kalacheva, G.S. (2005) The synthesis of hydroxybutyrate and hydroxyvalerate copolymers by the bacterium *Ralstonia eutropha*. *Microbiology* 74, 54–59.
- Volova, T.G., Shishatskaya, E.I., Sevastianov, V.I., Efremov, S. and Mogilnaya, O. (2003) Results of biomedical investigations of PHB and PHB/PHV fibers. *Biochemical engineering journal – Biopolymers* 16, 125–133.
- Ward, P.G. and O'Connor, K.E. (2005) Bacterial synthesis of polyhydroxyalkanoates containing aromatic and aliphatic monomers by *Pseudomonas putida* CA-3. *International Journal of Biological Macromolecules* 35, 127–133.
- Ward, P.G., Roo, G.d. and O'Connor, K.E. (2005) Accumulation of polyhydroxyalkanoate from styrene and phenylacetic acid by *Pseudomonas putida* CA-3. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2046–2052.
- Wendlandt, K.-D., Geyer, W., Mirschel, G. and Al-Haj Hemidi, F. (2005) Possibilities for controlling a PHB accumulation process using various analytical methods. *Journal of Biotechnology* 117, 119–129.
- Wong, P.A.L., Cheung, M.K., Lo, W.-H., Chua, H. and Yu, P.H.F. (2004) Investigation of the effects of the types of food waste utilized as carbon source on the molecular weight distributions and thermal properties of polyhydroxy- butyrate produced by two strains of microorganisms. *e-Polymers* 031, 1–11.
- Wong, P.A.L., Cheung, M.K., Lo, W.L., Chua, H. and Yu, P.H.F. (2005) Effects of types of food waste as carbon source on the molecular weight distributions and thermal properties of the biopolymer (polyhydroxybutyrate) produced by two strains of microorganisms. *Materials Research Innovations* 9, 4–5.
- Wu, Hsan-Au; Sheu, Der-Shyan; Lee, Chia-Yin. (2003). Rapid differentiation between short-chain-length and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria with spectrofluorometry. *Journal of Microbiological Methods* 53: 131-135.

Xu, J., Guo, B.H., Zhang, Z.M., Wu, Q., Zhou, Q., Chen, J.C., Chen, G.Q. and Li, G.D. (2005) A mathematical model for regulating monomer composition of the microbially synthesized polyhydroxyalkanoate copolymers. *Biotechnology and bioengineering* 90, 821–829.

Yilmaz, M. and Beyatli, Y. (2005) Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) production by a *Bacillus cereus* M5 strain in sugarbeet molasses. *Zuckerindustrie* 130, 109–112.

Yilmaz, M., Soran, H. and Beyatli, Y. (2005) Determination of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) production by some *Bacillus* spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21, 565–566.

Zou, X. H.; Chen, G.-Q. (2007) Metabolic Engineering for Microbial Production and Applications of Copolyesters Consisting of 3-Hydroxybutyrate and Medium-Chain-Length 3- Hydroxyalkanoates. *Macromolecular Bioscience* 7, 174–182.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)