

Artigo original

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DA RIZOSFERA DE INHAME, MACAXEIRA E BATATA-DOCE POTENCIALMENTE PRODUTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS

Pereira JCN*

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco (IFPE)
<https://orcid.org/0000-0001-6831-1639>

Oliveira IS†

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
<https://orcid.org/0000-0002-8854-5018>

Locatelli GO‡

Centro Universitário Brasileiro (UNIBRA)
<https://orcid.org/0000-0002-5109-7485>

Finkler L§

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
<https://orcid.org/0000-0002-8470-7278>

Resumo: Inhame, macaxeira e batata-doce são vegetais importantes no Nordeste brasileiro, uma vez que esses tubérculos são ricos em amido. Os Polihidroxicanoatos (PHAs) são polímeros biodegradáveis produzidos a partir de amido e utilizados na produção de plásticos. O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar bactérias com potencial aplicação biotecnológica para produção de polihidroxicanoatos a partir da rizosfera e superfície de túberas de inhame, macaxeira e batata-doce. A coleta das culturas bacterianas ocorreu por meio da retirada do solo da rizosfera e da superfície das túberas. Após diluições seriadas

* Mestre em Saúde Humana e Meio Ambiente pela Universidade Federal de Pernambuco; doutoranda em Saúde Integral pelo Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira; juli_decastro@hotmail.com

† Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco; Mestre em Genética pela Universidade Federal de Pernambuco; idjaneoliveira@yahoo.com

‡ Doutor em Biotecnologia em Universidade Federal Rural de Pernambuco; Mestre em Biotecnologia Industrial pela Universidade Federal de Pernambuco; gabriel_locatelli@hotmail.com

§ Doutor em Engenharia Química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro; Mestre em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina; leandro.finkler@gmail.com

e semeio do solo em meio de cultura, bactérias com características morfológicas distintas foram selecionadas para análise através do PCR de colônia. Das 214 bactérias analisadas, 11 amostras foram positivas para o gene *phaC*, fator fundamental para síntese de PHA. Nove bactérias apresentaram resultado satisfatório para produção de grânulos de PHAs após coloração de Sudan Black. Dentre as bactérias positivas no PCR e Sudan Black, oito foram identificadas por sequenciamento ao nível de gênero ou espécie, como: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Cupriavidus* e *Microvirga flocculans*, sendo esta última descrita pela primeira vez na literatura como produtora de PHA. A aplicação de PCR de colônia com coloração por Sudan Black mostrou-se eficiente e rápida para a seleção de bactérias potencialmente produtoras de PHAs a partir de amostras de solo.

Palavras-chave: Túbera. *Microvirga flocculans*. Polímeros biodegradáveis.

Identification of inhame, macaxeira, and potentially sweet potential polyhydroxialcanoat riser bacteria

Abstract: Yam, sweet potatoes and cassava are important cultures in northeastern Brazil once these tubercles are full of starch. Polyhydroxyalkanoates are biodegradable polymers made from starch used in the production of plastics. The objective of this work was isolate and identify bacterial communities with potential biotechnological applications from rhizosphere and surface soil of yam, cassava and sweet potatoes tubers. The bacterial cultures collection occurred through the removal of rhizosphere and surface soil from the tubers. After serial dilutions and soil sowing in culture medium, bacteria with distinct morphological characteristics were selected for analysis by colony PCR. Of the 214 bacteria analyzed, 11 samples were positive for *phaC* gene, a key factor for PHA synthesis. Nine bacteria showed satisfactory results for the production of PHAs granules after staining with Sudan Black. Among the bacteria positive in PCR and Sudan Black, eight were identified by sequencing to genus or species, such as: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Cupriavidus* e *Microvirga flocculans*. *Microvirga flocculans* was described first time in the literature as producing PHA. The application of colony PCR with Sudan Black staining was efficient and rapid selection of bacteria potentially producing PHAs from soil samples.

Keywords: Tuber. *Microvirga flocculans*. Biodegradable polymers.

Recebido em 8 de maio de 2019

Aceito em 19 de junho de 2019

1 INTRODUÇÃO

Inhame, macaxeira e batata-doce são grupos vegetais de grande importância econômica e social para o Nordeste brasileiro. A principal diferença entre esses tubérculos é o local no qual as reservas de nutrientes são acumuladas. Nos tubérculos (inhame) estes se localizam no caule do vegetal, já nas tuberosas (macaxeira e batata doce), as reservas são acumuladas nas raízes.

O amido como fonte de carboidrato é o principal componente desses alimentos, os quais contêm também outros nutrientes. O inhame contém cálcio, fósforo, ferro e vitaminas do complexo B, além de apresentar menor valor calórico.¹ Este apresenta, ainda, relevância na indústria farmacêutica, permitindo a síntese industrial de cortisona e hormônios esteroides.²

O inhame contém um grupo de proteínas chamadas dioscorinas, que apresentaram propriedades antioxidantes trazendo vários benefícios para a saúde humana, incluindo o controle da pressão arterial.³

A macaxeira apresenta um fácil cultivo e não exige muitos recursos do solo e técnicas de manejo, sendo importante agronegócio na economia nacional, juntamente com o inhame.⁴ A batata-doce é uma planta de clima tropical ou subtropical, também cultivada em regiões temperadas. É de fácil cultivo, rústica, de ampla adaptação, de alta tolerância à seca e de baixo custo de produção.

A versatilidade das três culturas também é um fator interessante, visto que podem servir tanto para a base alimentar humana, sendo cozidas, assadas e em forma de farinha, quanto para a alimentação animal, além da produção de álcool, como é caso da batata-doce, aplicação não muito comum no Brasil.⁵

Além da acumulação de químicos biologicamente ativos, as raízes de plantas produzem e liberam continuamente substâncias químicas diversas na rizosfera. Esse processo de exsudação da raiz inclui a secreção de íons, oxigênio e água, enzimas, mucilagem e uma vasta ordem de compostos ricos em carbono e metabólitos primários e secundários.⁶ A composição desses exsudatos pode variar com a idade e o genótipo da planta, bem como metabolismo, condição nutricional, tipo de estresse e outros fatores ambientais.⁷ Esse tipo de ambiente favorece a multiplicação de rizobactérias.

As rizobactérias que crescem próximas ou associadas às raízes, estimuladas pelos exsudados radiculares, têm a capacidade de promover o crescimento de plantas. Tal efeito é atribuído à produção de substâncias reguladoras de crescimento, à produção de antibióticos e sideróforos, à mineralização e solubilização de nutrientes como o fósforo e à fixação de nitrogênio.⁸ Essas bactérias apresentam grande versatilidade metabólica, sendo capazes de armazenar substâncias como estratégia de aumento da sobrevivência bacteriana, a exemplo de polihidroxialcanoatos (PHA).

O termo PHA é aplicado a uma família de poliésteres produzidos por diversas bactérias, entre elas: *Rhizobium* sp., *Burkholderia cepacia*, *Cupriavidus necator*, *Bacillus megaterium*, *B. thuringiensis israelensis*, *B. subtilis*, *Chromobacterium violaceum* e, principalmente, várias espécies de *Pseudomonas* sp.⁹ Esses polímeros despertam grande interesse biotecnológico e industrial, pois são termoplásticos, biodegradáveis, biocompatíveis e podem ser sintetizados a partir de matérias-primas renováveis pela agricultura, sendo o amido uma fonte importante de carbono.¹⁰

Em diversas etapas da via de síntese de PHA, a partir da fonte de carbono, a bactéria pode gerar intermediários na forma de hidroxiacil-CoA, os quais serão reconhecidos e polimerizados pela enzima PHA sintase, presente nas bactérias capazes de acumular esses materiais.¹¹

Atualmente, os genes codificantes dessa enzima representam as moléculas-alvo para a detecção de novas espécies bacterianas produtoras de PHAs nas mais diversas amostras ambientais. Dos três genes (*phaA*, *phaB* e *phaC*) codificadores de enzimas da via metabólica de produção de PHAs, o gene *phaC* é o mais importante, visto que ele é o codificador para a enzima-chave da última etapa da via metabólica de síntese de PHAs.¹²

Pesquisadores desenvolveram um método molecular por PCR para detecção de linhagens bacterianas produtoras de PHAs de cadeias curtas e médias provenientes do solo de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) e de lodo marinho (com 1,20 m de profundidade) usando o gene *phaC*. Tal método possibilitou fazer PCR diretamente das colônias isoladas em placas de Petri em meio acrescido de uma fonte de carbono para seleção.⁹

Este trabalho visa isolar e identificar bactérias da rizosfera e superfície de túberas de inhame, macaxeira e batata-doce com aplicação biotecnológica para produção de polihidroxialcanoatos.

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 ISOLAMENTO E COLEÇÃO DE BACTÉRIAS DA RIZOSFERA E DO SOLO ADERIDO À SUPERFÍCIE DE INHAME, MACAXEIRA E BATATA-DOCE

As amostras do solo foram coletadas diretamente da área de plantio de inhame, macaxeira e batata-doce em propriedades rurais nos Municípios de Camocim de São Félix, Bonito e Lagoa de Itaenga, em Pernambuco. Em seguida, esse material foi levado ao laboratório de Microbiologia do CAV/UFPE onde foi retirado 1 g de solo da superfície da túbera e da rizosfera, respectivamente.

Separadamente, as amostras foram misturadas à solução salina (NaCl) a 0,85% estéril, em seguida foram agitadas no vortex para extração de micro-organismos do solo durante três min. Logo após foi realizada uma diluição seriada na proporção de 1:10. Das diluições de 10^{-6} a 10^{-9} foi retirado 0,1 mL e semeado em placas de Petri contendo meio agar nutriente. O crescimento foi acompanhado durante 24/48 h na estufa a 37 °C.

Foram utilizadas como culturas controle positivo de PCR e produção de PHA, *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Cupriavidus necator* e *Pseudomonas putida*.

Após crescimento das culturas, as colônias bacterianas foram analisadas e, de acordo com suas características morfológicas e aparência, foram selecionadas para sucessiva extração de DNA e PCR de colônia.

2.2 PCR DE COLÔNIA

Extração de DNA: Foi utilizado o protocolo padrão de extração de DNA.¹³ Após crescimento das bactérias do solo, o DNA foi extraído pelo método de fervura em microtubo utilizando-se 50 µL de TE e uma alçada da colônia retirada da placa de Petri. A fervura foi realizada por 10 min a 96 °C, 1 min à temperatura ambiente e novamente a 96 °C por mais 10 min para promover lise das bactérias.

PCR de colônia para detecção do gene *phaC* da via de síntese de polihidroxicanoatos: Após extração de DNA as amostras foram submetidas ao método de PCR, para detecção específica do gene *phaC*.⁹ Os *primers* utilizados para a detecção do gene *phaC* foram G-D (5'-GTGCCGCC(GC)(CT)(AG)(GC)ATCAACAAGT-3') e G-1R (5-'G TTCC AG(AT)AC AG (GC)A(GT)(AG)TCGAA-3'), que amplificam fragmento de 551 pb, no mix de reação (25 µL) contendo 0,5 µM de mix de dNTPs, 1,25 mM de MgCl₂, 0,3 µM de cada primer e 0,25 UI de Taq e 2 µL de DNA extraído da colônia.

O programa de amplificação utilizado para o PCR foi: 1 ciclo de 94 °C por 10 min, 60 °C por 2 min e 72 °C for 2 min, seguido por 40 ciclos de 94 °C por 20 s, 55,5 °C por 45 s e 72 °C por 1 min, e o último ciclo em 72 °C por 5 min.

Para o Nested PCR, foram utilizados 2 µL do produto de amplificação aplicando o mesmo programa e o mesmo mix da reação anterior.

Os produtos de amplificação do PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose (1,0%), corados com *syber safe* e visualizados em transiluminador de luz azul.

2.3 PRODUÇÃO QUALITATIVA DE PHAS DAS BACTÉRIAS POR PCR DE COLÔNIA

Preparação do inóculo para análise qualitativa: As bactérias foram cultivadas em meio caldo nutriente (CN) com excesso de fonte de carbono, sob agitação de 600 rpm, a 30 °C por 24 h. Após o crescimento, as bactérias foram centrifugadas por 20 min a uma agitação de 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado uma vez com solução salina estéril e centrifugado por 20 min a 4000 rpm. Finalmente o sedimento foi ressuspenso em meio mineral com restrição de fonte de nitrogênio, perfazendo o inóculo na proporção de 5% (v/v).

A composição do meio mineral: [Soluções de oligoelementos (H₃BO₃ 0,30 g/L; CoCl₂.6H₂O 0,20 g/L; ZnSO₄.7H₂O 0,10 g/L; MnCl₂.4H₂O 0,03 g/L; NaMoO₄.2H₂O 0,03 g/L; NiCl₂.6H₂O 0,02 g/L; CuSO₄.5H₂O 0,01 g/L), Solução I (ácido nitrolacético 0,19 g/L; citrato ferroso de amínia 0,06 g/L; sulfato de magnésio heptahidratado 0,50 g/L; cloreto de cálcio dihidratado 0,01 g/L; solução de oligoelementos 1,00 ml/L); Solução II (Na₂PO₄.12H₂O 8,95g/L; KH₂PO₄ 1,50 g/L); Solução III (fonte de carbono – glicose 40 g/L)].^{1,14}

Análise qualitativa da produção de PHAs – coloração de bactérias: Para a análise qualitativa da presença de PHAs intracelular, utilizou-se a técnica de coloração Sudan Black.¹⁵ A etapa de análise qualitativa da produção de PHA por coloração de Sudan Black foi realizada após retirada das amostras do meio MM às 6, 12 e 24 h, e montagem em lâmina.

Preparou-se uma solução de safranina a 10% (v/v) em álcool 95% (v/v) e uma solução de Sudan Black a 0,3% (p/v) em álcool 70% (v/v). Para a análise seguiu-se o seguinte procedimento: fez-se um esfregaço da biomassa bacteriana em uma lâmina, sendo este seco e fixado à chama. Em seguida, cobriu-se o material com a solução de Sudan Black por 15 min, deixou-se escorrer e secar ao ar. Descolorou-se com xileno (tempo de contato 20 s), secou-se ao ar e cobriu-se com a solução de safranina (tempo de contato 5 s).

Posteriormente, lavou-se suavemente com água e secou-se levemente para observação microscópica da presença dos grânulos de PHAs, que ficam tingidos de preto. Assim, as bactérias contendo grânulos de PHA adquirem coloração preta ou azul-escura, enquanto as não produtoras não se coram.

2.4 IDENTIFICAÇÃO E PRESERVAÇÃO BACTERIANA

O sequenciamento para identificação bacteriana foi realizado com os isolados positivos no PCR e na coloração por Sudan Black. As amostras foram enviadas para sequenciamento para empresa Macrogen (Korea), usando os primer fD1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') e rD1 (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3'), que amplificaram fragmentos de 1500 pb do gene rDNA 16S.

O mix de reação de PCR para o gene rDNA 16S (25µL) foi: 200 µM de mix de dNTPs, 3 mM de MgCl₂, 1,5 µL de cada primer (10pM) e 0,5 µL de Taq e 1 µL de DNA extraído da colônia (10-30 ng). O programa de amplificação utilizado foi: 1 ciclo de 94 °C por 5 min, 25 ciclos de 94 °C por 1 min, 52 °C por 30 s, 72 °C por 2 min, e o último ciclo a 72 °C por 10 min.

Para a identificação das espécies bacterianas com base nas sequências de nucleotídeos e aminoácidos relacionados, foi consultada a base de dados do NCBI usando a ferramenta de programa BLASTn e BLASTx (Basic Local Alignment Search Tool). O grupo

foi definido com base no grau de similaridade existente entre a amostra e o banco de dados (e-value e identidade máxima).

Cada uma das linhagens bacterianas a ser preservada foi cultivada em caldo nutriente por 24/48 horas, e, em seguida, 5 mL de cada uma das culturas foram diluídos em 5 mL de uma solução aquosa de glicerol a 40%. A suspensão de células na solução de glicerol foi distribuída em tubos de microcentrífuga (500 µL por tubo), que foram mantidos a -20 °C.

Para preservação em óleo mineral as culturas bacterianas foram inicialmente incubadas em tubo inclinado com agar nutriente por 24/48 horas; após o crescimento foi realizada aplicação de uma camada de óleo mineral estéril, e todo o meio ficou imerso. Para melhor preservação o material permaneceu em temperatura ambiente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ISOLAMENTO E COLEÇÃO DE BACTÉRIAS DA RIZOSFERA E DO SOLO ADERIDO À SUPERFÍCIE DE INHAME, MACAXEIRA E BATATA-DOCE

Após processamento e isolamento de bactérias das amostras de solo da rizosfera e superfície das túberas de inhame, macaxeira e batata-doce, observou-se que as colônias isoladas apareceram nas diluições de solo a partir de 10^{-6} , e a maior diversidade de micro-organismos ocorreu a partir da diluição de 10^{-5} .

Após o crescimento das colônias bacterianas, cada amostra foi submetida à contagem (Tabela 1). Foi observado que tanto no inhame quanto na macaxeira e na batata-doce, o maior número de colônias bacterianas isoladas por amostra ocorreu no solo da rizosfera quando comparado ao solo da túbera.

Com apenas uma exceção para uma amostra de macaxeira, que apresentou valores aproximados entre a quantidade de colônias do solo da túbera e a da rizosfera. Isso ocorreu possivelmente em decorrência da grande diversidade bacteriana existente no ambiente da rizosfera de plantas, com características distintas das demais áreas do solo. A rizosfera é onde ocorre a maior parte das interações entre micro-organismos e plantas. Sua composição é diretamente influenciada por substâncias químicas exsudadas pelas raízes das plantas e por micro-organismos.¹⁶

Tabela 1 – Contagem de colônias bacterianas em cada amostra de solo da rizosfera ou túbera

Material coletado	Solo Rizosfera	Solo Túbera
Inhame (amostra 1)	7500x10 ⁶ UFC/g	92x10 ⁶ UFC/g
Inhame (amostra 2)	210x10 ⁶ UFC/g	35x10 ⁶ UFC/g
Macaxeira (amostra 1)	63x10 ⁶ UFC/g	38x10 ⁶ UFC/g
Macaxeira (amostra 2)	10x10 ⁶ UFC/g	17x10 ⁶ UFC/g
Batata-doce (amostra 1)	300x10 ⁶ UFC/g	13x10 ⁶ UFC/g
Batata-doce (amostra 2)	27x10 ⁶ UFC/g	10x10 ⁶ UFC/g

A massa bacteriana nesse ambiente pode atingir 36 mg de bactérias por g de raiz. Pesquisa demonstrou por microscopia eletrônica que a densidade da população bacteriana pode chegar entre 120 e 160 x 10⁶ UFC cm⁻² de raiz.⁸ Por isso, quanto maior a quantidade de bactéria nessa área, maior a diversidade bioquímica das bactérias com possibilidade para produção de metabólitos secundários com atividade biotecnológica.

Com base nas diferenças de aspecto e coloração das colônias foram selecionadas 214 colônias bacterianas, incluindo amostras da rizosfera e superfície da túbera, sendo 79 colônias do solo do inhame, 47 colônias de macaxeira e 88 de batata-doce (Tabela 2).

Tabela 2 – Total de colônias bacterianas selecionadas das amostras de inhame, macaxeira e batata-doce utilizadas no PCR de colônia

	Inhame	Macaxeira	Batata-doce
Colônias do solo da rizosfera	38	33	49
Colônias do solo aderido à túbera	41	14	39
Total de colônias	79	47	88

3.2 PCR DE COLÔNIA PARA DETECÇÃO DO GENE *PHAC*

As 214 colônias bacterianas selecionadas foram processadas para extração de DNA e PCR de colônia usando primers para detecção do gene *phaC*. Após otimização do protocolo de extração de DNA, observou-se que o DNA mais diluído, ou seja, ressuspensado em 50 µL de TE, foi de melhor qualidade e quantidade adequadas ao PCR do que a ressuspensão em 30 µL, conforme estabelecido.¹³ Além disso, após otimização da PCR de colônia, a amplificação do gene *phaC* (500pb) foi obtida quando da utilização de 0,3 µM de cada primer (GD e G2R) no mix de reação.

Dentre as 214 amostras de DNA bacteriano analisadas, 11 (C, F, H, 1, 4, 19, 30, 50, 99, 113 e 131) foram positivas no PCR (Figura 1). Destas, cinco amostras foram decorrentes do inhame, quatro provenientes da batata-doce e duas da macaxeira. Das 11 colônias bacterianas positivas, 10 foram obtidas do solo aderido à superfície da túbera, e apenas uma amostra bacteriana positiva foi isolada do solo da rizosfera (Tabela 3).

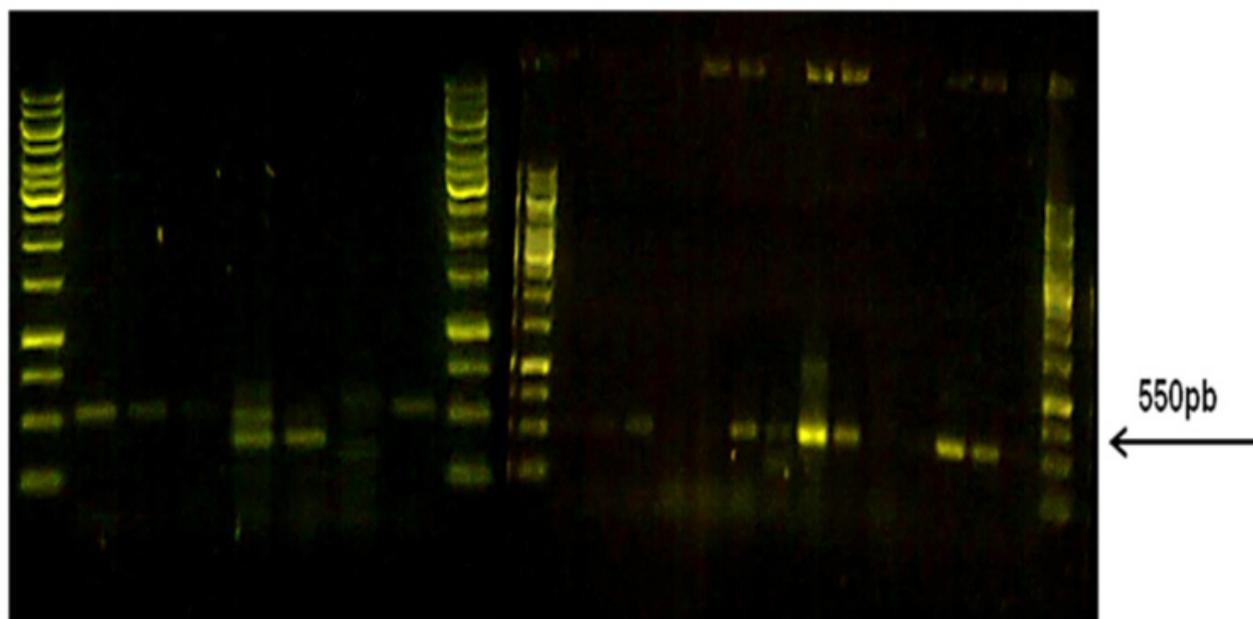


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose a 1% do Nested de PCR de colônia, evidenciando produtos de PCR de 550pb, correspondentes às amostras positivas (seta)

Nota: Nas extremidades observa-se o padrão de peso molecular 1 kb.

Tabela 3 – Bactérias isoladas no solo de rizosfera e superfície da túbera de inhame, macaxeira e batata-doce produtoras de polihidroxicanoatos

Amostras	Tipo de túbera e localização do solo	Bactérias isoladas	% de homologia (base de dados: NCBI)
1	Inhame (solo da rizosfera)	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99%
4	Inhame (solo da túbera)	<i>Bacillus cereus</i>	97%
C	Inhame (solo da túbera)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	97%
H	Inhame (solo da túbera)	<i>Agrobacterium</i>	97%
19	Macaxeira (solo da túbera)	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	97%
30	Batata-doce (solo da túbera)	<i>Microvirca flocculans</i>	97%
99	Batata-doce (solo da túbera)	<i>Pseudomonas sp.</i>	97%
131	Batata-doce (solo da túbera)	<i>Cupriavidus sp.</i>	98%

Apesar de o solo de rizosfera apresentar maior diversidade de colônias bacterianas nos três tipos de tubérculos analisados, apenas uma amostra do solo da rizosfera (inhame) foi positiva no PCR de colônia para o gene *phaC*.

Uma vez que existem apenas relatos com estudos referentes ao solo de rizosfera em beterraba (*B. vulgaris* L.), colza (*B. napus* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), morango (*Fragaria ananassa* L.),¹³ cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.),¹⁷ soja (*Glycine max* L.),¹⁸ milho (*Zea mays* L.) e gramínea (*Arundinaria aristulata*).¹⁹ Este trata-se do primeiro relato sobre seleção de bactérias produtoras de PHAs a partir do solo de rizosfera de inhame, macaxeira e batata doce, fontes reconhecidas de amido.

A proximidade entre o tubérculo e o solo a ele aderido sugere que as bactérias nesse ambiente estejam em condições favoráveis à produção de PHAs, dada a grande disponibilidade de amido e intimidade direta entre a bactéria e o tecido vegetal. Pode existir, ainda, influência da diferença de conteúdo de amido em cada tubérculo e tuberosa, pois o inhame apresenta 30% de amido *in natura*, a batata-doce, de 13,4 a 29,2%, variando de acordo com a cultivar, e a mandioca, de 15 a 22%.²⁰

Sabe-se que existem diferenças na estrutura e na quantidade do carbono disponível de acordo com as zonas da raiz. Essa diferenciação pode promover a formação de estruturas de comunidades distintas na rizosfera. Uma ampla proporção do carbono é disponibilizada na forma de substâncias solúveis em água, como açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos.²¹ Essa constatação assevera que o ambiente da rizosfera apresenta intensa competição bacteriana, além de diminuição relativa de fonte de carbono no decorrer de sua estrutura.

O PCR de colônia pode ser utilizado como método de detecção de bactérias potencialmente produtoras de PHA. Com o PCR foi possível comparar dois genes codificadores da PHA sintase (*phaC1* e *phaC2*), com os quais foram selecionadas 35 novas cepas bacterianas produtoras de PHA.^{9,22} Esse método também possibilitou confirmar bactérias potencialmente produtoras de PHA em culturas de beterraba, colza, trigo e morango.¹³

A efetividade do uso do PCR para detecção de genes também pôde ser vista em estudo utilizando 19 espécies de bactérias reconhecidamente produtoras de PHAs, a partir das quais foram desenvolvidos mais primers do gene *phaC*.¹² Este estudo ampliou a

possibilidade de seleção de bactérias em diversos tipos de amostras ambientais e confirmou a positividade da PCR com coloração de colônia com azul do Nilo. Dentre as 19 espécies bacterianas estudadas, 15 foram positivas no PCR usando os novos primers (*phaCF1*, *phaCF2* e *phaCR4*) e coloração de colônias, e quatro foram positivas após nested-PCR. O autor sugere que esse protocolo é adequado para o rastreamento de grande número de isolados bacterianos ambientais.¹²

3.3 ANÁLISE QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE PHAS

As 11 amostras de bactérias positivas ao PCR foram repicadas para o caldo nutriente, e após 24 horas as culturas bacterianas foram centrifugadas e o sedimento resuspenso em meio mineral, com restrição de nitrogênio e excesso de fonte de carbono (glicose).

O ensaio para a análise qualitativa da produção de PHA a partir de glicose por coloração de Sudan Black foi realizado pela retirada de alíquotas das culturas bacterianas crescendo em meio mineral após 6, 12 e 24 h de incubação para coloração. Utilizou-se glicose como fonte de carbono para produção de PHA.¹⁷ Entre todas as fontes testadas (sacarose, frutose, propionato de sódio, carboxi-metil-celulose e a glicose) esta última foi a que apresentou melhor desempenho.

Além da bactéria controle positivo do experimento *Cupriavidus necator*, das 11 amostras bacterianas analisadas e positivas no PCR, nove (1, 4, C, H, 19, 30, 50 99 e 131) foram igualmente positivas na coloração por Sudan Black em análise qualitativa para produção de PHA em todos os tempos de crescimento 6, 12 e 24 h (Figura 2).

Por outro lado, duas amostras (F e 113) foram negativas na coloração por Sudan Black (Figura 3), as quais indicaram que possivelmente, mesmo apresentando o gene para a via metabólica dos PHAs, isso não ratifica a sua capacidade produtora, pois o gene pode estar corrompido ou não estar ativo no momento da análise.

Alguns fatores influenciam e são variáveis à ativação dessa via alternativa de síntese de PHA para diferentes espécies bacterianas, como tipo de fontes de carbono, tempo de incubação, pH, temperatura, oxigênio dissolvido no meio e limitações de nutrientes.²³ As demais bactérias apresentaram positividade ao corante em todas as etapas da coloração.

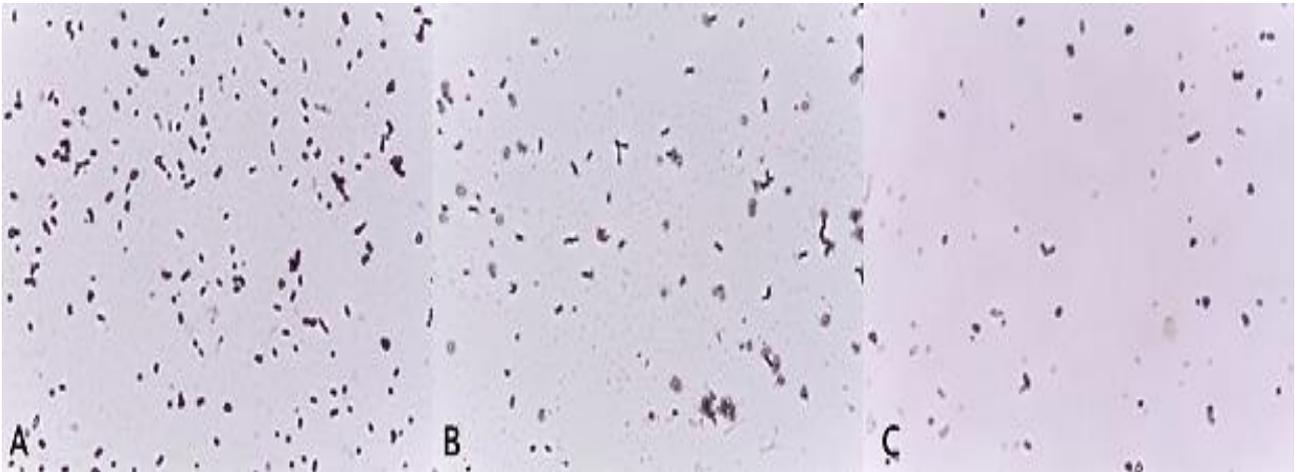


Figura 2 – *Microvirga flocculans* (bactéria 30) apresenta reação positiva ao Sudan Black durante os tempos de 6 h (A), 12 h (B) e 24 h (C) ao microscópio ótico (100x)

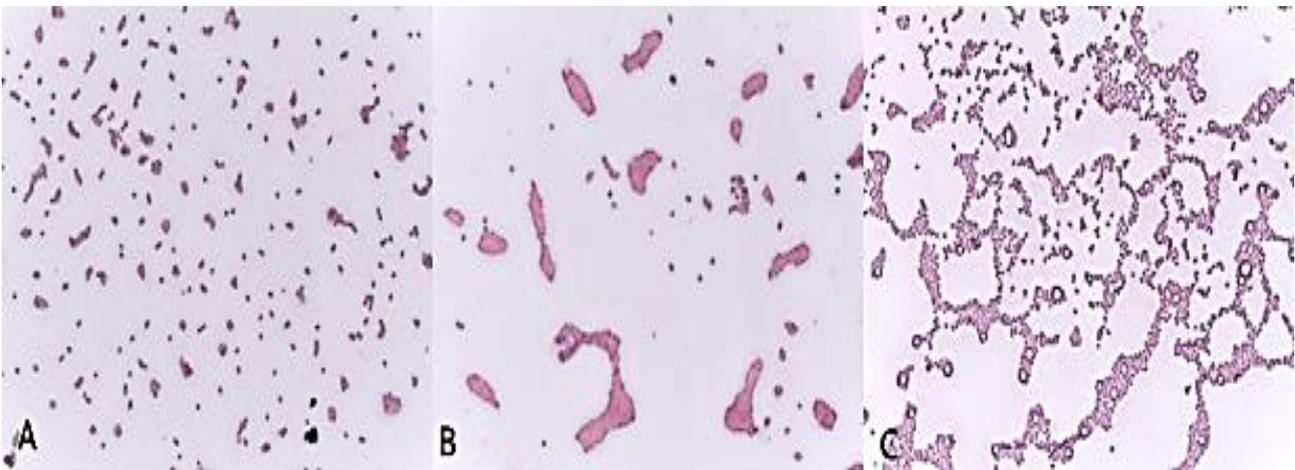


Figura 3 – Bactéria 113, apresenta reação negativa ao Sudan Black durante o período de 6 h (A), 12 h (B) e 24 h (C) ao microscópio ótico (100x)

A confirmação da produção de PHA por coloração de Sudan Black das bactérias positivas no PCR é fundamental para o desenvolvimento de trabalhos que venham a utilizar essas bactérias para fins industriais, favorecendo a população e o meio ambiente. Esse polímero biodegradável com propriedades termoplásticas é um substituto ideal para o plástico convencional. As suas propriedades são conhecidas por assemelharem-se a alguns plásticos comuns, que estão disponíveis comercialmente.²⁴

3.4 IDENTIFICAÇÃO E PRESERVAÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE PHA

Das nove amostras positivas no PCR e na coloração por Sudan Black, todas foram sequenciadas, e a amostra 50 ainda não foi identificada. Todas as bactérias sequenciadas apresentaram mais de 97% de homologia com as sequências do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Os resultados avaliaram o grau de similaridade entre a amostra e o banco de dados do NCBI, considerando e-value 0.0 e identidade máxima.

Entre as oito bactérias positivas, três apresentaram alta homologia com a sequência de nucleotídeos para espécies do gênero *Pseudomonas* - bac 1 (*P. stutzeri* 99%), bac 19 (*P. nitroreducens* 97%) e bac 99 (*Pseudomonas* sp. 97%), corroborando dados de outros autores, que encontraram bactérias desse gênero com potencial produção de PHA em amostras de soro de leite, trigo, colza, beterraba e cana-de-açúcar.^{13,17,25}

As amostras C, H, 4 e 131 apresentaram alta homologia na sequência de nucleotídeos com, respectivamente, *Stenotrophomas maltophilia* (98%), *Agrobacterium* sp. (97%), *Bacillus cereus* (97%) e *Cupriavidus* sp.

A bactéria Gram negativa *Cupriavidus necator* se destaca pela alta taxa de polímero produzido, podendo acumular mais de 80% do peso seco de P(3HB).²⁶ As bactérias Gram negativas potencialmente produtoras de PHA, *P. stutzeri* e *P. nitroreducens*, também foram isoladas de solo contaminado por óleo em um campo de refinaria no Norte da China.²⁷

Stenotrophomas maltophilia, *Agrobacterium* sp. e *Bacillus cereus* são também espécies já descritas como produtoras de PHAs. O bacilo Gram negativo *Stenotrophomas maltophilia* já foi isolado da rizosfera do videeiro (*betula celtiberica* L.) e larício (*Pinus nigra* L.).²⁸ O bacilo Gram negativo *Agrobacterium* sp., naturalmente encontrado no solo, foi estudado produzindo PHA em plantas transgênicas de tabaco.²⁹ *Bacillus cereus*, um bacilo Gram positivo, teve essa propriedade confirmada a partir dos resíduos do processamento de mandioca como substrato.³⁰

A bactéria 30 isolada do solo aderido à superfície da túbera da batata-doce, após análise de sequência, apresentou alta homologia (97%) com a espécie *Microvirga flocculans*, ainda não descrita na literatura como produtora de PHA. Porém, apresentou-se positiva na coloração com Sudan Black às 6, 12 e 24 h de crescimento (Figura 2). Essa

bactéria é um bacilo Gram negativo, sendo descrita pela primeira vez com esse potencial, confirmando a hipótese de que o solo da superfície da túbera é um ambiente interessante e pouco explorado para isolamento de novas bactérias produtoras de polihidroxicanoatos.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação de PCR de colônia com coloração por Sudan Black mostrou-se eficiente e rápida para seleção de bactérias potencialmente produtoras de PHAs a partir de amostras de solo. Foram encontradas várias bactérias positivas na detecção do gene *phaC* da via de síntese de PHA. Nove destas apresentaram resultado satisfatório para produção de grânulos de PHAs após coloração de Sudan Black.

Entre as bactérias positivas no PCR e Sudan Black, oito foram identificadas por sequenciamento ao nível de gênero ou espécie, como: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Cupriavidus* e *Microvirga flocculans*. Foi identificada a bactéria *Microvirga flocculans* como potencialmente produtora de PHA, sendo descrita pela primeira vez na literatura com essa característica.

REFERÊNCIAS

1. Aragão GMF, Lindley ND, Uribelarrea JL, Pareilleux A. Maintaining a controlled residual growth capacity increases the production of polyhydroxyalkanoate copolymers by *A. eutrophus*. *Biotechnology Letters*. 1996;18:937-42.
2. Mesquita AS. Inhame na Bahia: A produção no caminho da competitividade. Inhame e Taro. *Sistemas de Produção Familiar: INCAPER*. 2002;279.
3. Hou WC. Antioxidant activities of dioscorin, the storage protein of yam (*Dioscorea batatas* Decne) tuber. *J Agric Food Chem*. 2001;(49):4956-60.
4. Valle TL. Mandioca de mesa, macaxeira ou aipim: a hortaliça negligenciada pelo Brasil. *Instituto Agrônomo*. 2007;1-11.
5. EMBRAPA. Sistema de Produção da Batata-Doce. 2018

6. Bais HP. The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2006;233-266.
7. Oliveira CA. Diversidade bacteriana da rizosfera de genótipos de milho contrastantes na eficiência de uso de fósforo. *Pesq. Agropec. Bras.* 2009;44(11):1473-82.
8. Dantas JS. Interações entre grupos de microorganismos com a rizosfera. *Pesq Aplic & Agrotecnol.* 2009;2(2):1-10.
9. Romo DMR, Grosso MV, Solano NCM, Castaño DM. A most effective method for selecting a broad range of short and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate producing microorganisms. *Electron J. Biotechn.* 2007;10:348-57.
10. Zinn M, Witholt B, Egli T. Occurrence, synthesis and medical applications of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2001;53:5-21.
11. Silva LF, Gomez JGC, Rocha RCS, Taciro MK, Pradella JGC. Produção biotecnológica de polihidroxicanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. *Quim. Nova.* 2007;30:1732-43.
12. Sheu DS, Wang YT, Lee CY. Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. *Microbiology.* 2000;146:2019-35.
13. Gasser I, Muller H, Berg G. Ecology and characterization of polyhydroxyalkanoate-producing microorganisms and its plants. *Fems Microbiol. Ecol.* 2009;70:142-50.
14. Ramsay BA, Lomaliza K, Chavarie C, Dube B, Bataille P, Ramsay JA. Production of poly-(β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric) acids. *Appl Environ Microbiol.* 1990;56:2093-8.
15. Sheehan HL, Storey GW. An improved method of staining leukocyte granules with Sudan Black. *B. J Pathol Bacteriol.* 1947;59:336.

16. Abbott, L. Soil biology basics. [Acesso em 05 dez 2018]. Disponível em: www.dpi.nsw.gov.au
17. Lima TCS, Grisi BM, Bonato MC. Bacteria isolated from sugarcane agroecosystem: their potential production of polyhydroxyalkanoates and resistance to antibiotics. *Rev. Microbiol.* 1999;30:214-24.
18. Carminatti C, Messane FE, Brandão MCZ, Pinheiro VR. Produção de Polihidroxialcanoatos (PHAs). Centro tecnológico – Universidade Federal de Santa Catarina. 2006.
19. Viillard, V, Poirier I, Cournoyer B, Haurat J, Wiebkin S, Ophel-Keller K, et al. *Burkholderia graminis* sp. nov., a rhizospheric *Burkholderia* species, and reassessment of [*Pseudomonas*] *phenazinium*, [*Pseudomonas*] *pyrrocinia* and [*Pseudomonas*] *glathei* as *Burkholderia*. *Int J Syst Bacteriol.* 1998;48:549-63.
20. Maieves HA. Caracterização Física, Físico Química e Potencial Tecnológico de novas Cultivares de Mandioca [dissertação]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2010.
21. Marschner P, Crowley D, Yang CH. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant And Soil.* 2004;199-208.
22. Steinbüchel A, Hein S. Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2001;71:81-123.
23. Borges VSR. Controlo microbiológico de culturas mistas para a produção de PHA [dissertação]. Aveiro: Universidade de Aveiro; 2010.
24. Sudesh K. Synthesis of polyhydroxyalkanoate from palm oil and some new applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;1373-86.
25. Pantazaki AA. Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8. *Process Biochem.* 2009;44:847-53.

26. Neves ALP. Uso de enzimas na extração de polihidroxicanoatos sintetizados por *Cupriavidus necator*. [dissertação]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2009.
27. Yao J. Production of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas nitroreducens*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1999;75:345-9.
28. Boyandin AN. Biodegradation of Polyhydroxyalkanoates by Soil Microbial Communities of Different Structures and Detection of PHA Degrading Microorganisms. *Appl Biochem Microbiol*. 2012;48:28-36.
29. Zachow C, Tilcher R, Gberg G. Sugar beet associated bacterial and fungal communities show a high indigenous antagonistic potential against plant pathogens. *Microb. Ecol*. 2008;55:119-29.
30. Krueger CL. Seleção de linhagens de *Bacillus* produtoras de polihidroxicanoatos a partir de resíduo do processamento de mandioca. [dissertação]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2009.