



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO
AMBIENTE - PPGSHMA**

Juliana de Castro Nunes Pereira

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

Vitória de Santo Antão

2013

Juliana de Castro Nunes Pereira

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Idjane Santana de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Leandro Finkler

Vitória de Santo Antão

2013

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Ana Ligia Feliciano dos Santos, CRB4: 1650

P436i Pereira, Juliana de Castro Nunes.

Identificação de bactérias da rizosfera de inhame, macaxeira e batata-doce potencialmente produtoras de polihidroxialcanoatos./ Juliana de Castro Nunes Pereira. Vitória de Santo Antão: O Autor, 2013.
xv, 52 folhas: il.; fig.

Orientador: Idjane Santana de Oliveira.

Co-orientador: Leandro Finkler.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Polihidroxialcanoatos (PHA). 2. túbera. 3. Autogamia. 4. *Microvirga flocculans*. I. Oliveira, Idjane Santana de (Orientador). II. Finkler, Leandro (Co-orientador). III. Título.

579.1757 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-004/2013



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE - MESTRADO ACADÊMICO



Dissertação de Mestrado apresentada por **Juliana de Castro Nunes Pereira** à Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título "IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DA RIZOSFERA DE INHAME, MACAXEIRA E BATATA-DOCE POTENCIALMENTE PRODUTORAS DE *POLIHIDROXIALCANOATOS*", orientada pela Profa. Dra. Idjane Santana de Oliveira, aprovada no dia 28 de fevereiro de 2013 pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

Dra. Christine Lamenha Luna Finkler
Núcleo de Nutrição - CAV/UFPE

Dra. Gláucia Manoella de Souza Lima
Núcleo de Enfermagem - CAV/UFPE

Dra. Claudia Elizabeth Pereira de Lima
Departamento de Micologia/UFPE

Autor

Juliana de Castro Nunes Pereira

Pelo apoio e imensa ajuda no decorrer de toda esta trajetória,
DEDICO este trabalho a meus pais (Ana Claudia e Ulisses), meu namorado (Juliano)
e minha amiga e orientadora (Idjane).

AGRADECIMENTOS

A minha família principalmente ao meu avô Luiz Cláudio de Castro Nunes, minha mãe Ana Cláudia Soares e ao meu pai Ulisses Soares que além do apoio fornecido durante toda esta jornada também contribuiu diretamente nas coletas de campo. Sou grata por ter vocês como exemplo a seguir.

As minhas queridas irmãs, Maria Luiza e Bárbara pela paciência e compreensão nos meus momentos de nervosismo.

Ao amigo, companheiro e namorado Juliano Silva, que com sua tranqüilidade e paciência me auxiliou nos momentos difíceis. As várias horas trabalhadas ao seu lado foram fundamentais.

À Dra. Idjane Santana de Oliveira, pessoa esta que desde o início da minha trajetória acadêmica sempre acreditou em mim, que tenho hoje como uma grande amiga, e um exemplo de profissional que vou levar para toda a vida.

Ao Dr. Leandro Finkler, pela co-orientação do trabalho.

Ao Dr. Romero Marinho de Moura, pelos conselhos e sugestões sempre pertinentes. Posso dizer que foi um privilégio ter um profissional de tamanha capacidade contribuindo durante todo processo.

Aos professores e funcionários que fazem parte do curso de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, com destaque para Maria Adalva e Ana Patrícia secretárias do programa e que estavam sempre dispostas a ajudar.

Aos meus grandes amigos Soraia Lins, Audenis, Janice, Jordana, Aluísia e Neto que fizeram parte desta trajetória acadêmica e do meu crescimento profissional.

A todos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia, onde dedicamos tanto tempo das nossas vidas e que considero hoje como minha segunda família. Obrigada pelo apoio e ajuda concedida.

Aos meus grandes amigos que dividiram muito mais do que um lugar para morar dividimos sonhos, incertezas, desejos e a busca por uma vida melhor, vocês irão fazer sempre parte da minha vida Bárbara, Elaine, Eloisa, e Nízia.

Em especial, ao casal, Maria de Lourdes de Lira Lopes e José Paulo de Souza, que cederam o seu sítio para a realização das nossas coletas de campo em Lagoa de Itaenga.

Às pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE SÍMBOLOS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO 1	1
1.1 Introdução	1
1.2 Objetivos	3
1.2.1 Objetivo Geral	3
1.2.2. Objetivos Específicos	3
1.3 Revisão da Literatura	4
1.3.1 Cultura de inhame, macaxeira e batata-doce	4
1.3.1.1 Inhame (<i>Dioscorea spp.</i>)	4
1.3.1.2 Macaxeira (<i>Manihot utilissima</i>)	6
1.3.1.3 Batata-doce (<i>Ipomoea batatas</i>)	7
1.3.2 Rizosfera de plantas e potencial biotecnológico	8
1.3.3 Bactérias da rizosfera de plantas	10
1.3.4 Polihidroxicanoatos	12
CAPÍTULO 2	19
Identificação de bactérias da rizosfera de inhame, macaxeira e batata-doce potencialmente produtoras de polihidroxicanoatos	
2.1. Resumo	21
2.2 Abstract	22
2.3 Introdução	23
2.4 Resultados e Discussão	25
2.5 Material e Método	29
2.7 Referências Bibliográficas	32

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXOS	xiii

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	A. Estrutura herbácea de <i>Discorea</i> spp. B. Túbera de <i>Discorea cayennensis</i> .	4
Figura 1.2	Túbera de macaxeira (<i>Manihot utilíssima</i>)	6
Figura 1.3	Grânulos de polihidroxicanoatos em bactéria (Fonte: TurtleBio, 2012).	13
Figura 1.4	Via de síntese resumida de polihidroxicanoato (Fonte: Gomez e Bueno Netto, 2001).	14
Figura 1.5	<i>Primers</i> para detecção do gene <i>phaC</i> (Fonte: Romo, 2007)	16
Figura 2.1	Eletroforese em gel de agarose a 1% do Nested - PCR de colônia, evidenciando produtos de PCR de 550pb, correspondendo às amostras positivas controles e testadas (seta). Nas extremidades observa-se o padrão de peso molecular (1Kb).	39
Figura 2.2	Bactéria 30 (<i>Microvirga flocculans</i>) positiva na coloração de Sudan Black nos tempos de 6hs (A), 12hs (B) e 24hs (C) ao microscópio ótico (100x).	41
Figura 2.3	Bactéria 113, negativa na coloração de Sudan Black nos tempos de 6hs (A), 12hs (B) e 24hs (C) ao microscópio ótico (100x).	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Contagem de colônias bacterianas em cada amostra de solo da rizosfera ou túbera em cada tipo vegetal.	37
Tabela 2.2	Total de colônias bacterianas selecionadas das amostras de inhame, macaxeira e batata-doce utilizadas no PCR de colônia.	38
Tabela 2.3	Bactérias isoladas no solo de rizosfera e superfície de túbera de inhame, macaxeira e batata-doce produtoras de polihidroxicanoatos.	40

LISTA DE SÍMBOLOS

T	Tonelada
%	Porcentagem
Kcal	Quilocalorias
G	Gramma
CO ₂	Gás carbônico
O ₂	Oxigênio
pb	Pares de base
CoA	Coenzima A
M	Metro
cm	Centímetro
mg	Miligramma
cm ²	Centímetro quadrado
μL	Microlitros
μM	Micromolar
H	Hora
mL	Mililitro
NaCl	Cloreto de Sódio
°C	Graus Celsius
Min	Minuto
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
v/v	Volume/volume
H ₃ BO ₃	Ácido bórico
g/L	Gramas por litro
CoCl ₂	Cloreto de cobalto
H ₂ O	Água
ZnSO ₄	Sulfato de zinco
CuSO ₄	Sulfato de cobre
MnCl ₂	Cloreto de manganês
NiCl ₂	Cloreto de níquel
ml/L	Mililitro por litro
NaPO ₄	Fosfato de sódio

KH_2PO_4	Hidrogenofosfato de Potássio
Seg	Segundos
Ng	Nanogramas
Λ	Lambda

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PHA	Polihidroxialcanoato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
PADs	Plásticos ambientalmente degradáveis
P(3HB)	Poli (3) hidroxibutirato
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
UFC	Unidade Formadora de Colônia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
PVOH	Álcool polivinílico
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PE	Pernambuco
CAV	Centro Acadêmico de Vitória
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UI	Unidade Internacional
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
CN	Caldo nutrient
Rpm	Rotações por minute
MM	Meio mineral
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
MS	Metabólito secundário
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazo-2il) -2,5-brometo de difeniltetrazolium)
CG	Cromatografia Gasosa

RESUMO

Inhame, macaxeira e batata-doce são vegetais ricos em amido e importantes sócio economicamente para o Nordeste brasileiro. O solo da rizosfera desses tubérculos e raízes é ambiente rico em bactérias que produzem metabólitos com diversas aplicações biotecnológicas, a exemplo de Polihidroxicanoatos (PHAs), polímeros biodegradáveis produzidos a partir dos produtos da hidrólise do amido e utilizados na produção de plásticos. O objetivo do trabalho foi isolar e identificar do solo da rizosfera e do aderido à superfície desses três vegetais, bactérias potencialmente produtoras de PHAs, selecionando-as por PCR de colônia e avaliando a produção de PHAs por coloração de Sudan Black. Colônias bacterianas isoladas com características morfológicas distintas foram selecionadas para a PCR de colônia. Das 214 bactérias selecionadas, 11 amostras foram positivas para o gene *phaC* da via de síntese de PHA. Nove bactérias apresentaram resultado satisfatório para produção de grânulos de PHAs após coloração de Sudan Black. Dentre as bactérias positivas na PCR e Sudan Black, oito foram identificadas por seqüenciamento ao nível de gênero ou espécie, tais como: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Cupriavidus* e *Microvirga flocculans*, sendo esta última descrita pela primeira vez como produtora de PHA. A aplicação da 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.

Palavras-Chave: túbera, PCR, *Microvirga flocculans*, Sudan Black, PHA

ABSTRACT

Yams, cassava and sweet potatoes are starch vegetables and important socioeconomically to northeastern Brazil. The soil from the rhizosphere of these tubers and roots is rich in bacteria that produce metabolites with various biotechnological applications, for example Polyhydroxyalkanoates (PHAs), biodegradable polymers produced from starch hydrolysis and used in the production of plastics. The objective of this study was to isolate and identify the rhizosphere soil and adhered these three vegetable surface, potentially producing bacteria PHAs, selecting them by PCR of the colony and evaluating the production of PHAs by Sudan Black staining. Isolated bacterial colonies with distinct morphological characteristics were selected for PCR. Of the 214 selected bacteria, 11 samples were positive for gene *phaC* of PHA synthesis pathway. Nine bacteria showed satisfactory result for production of PHA granules after Sudan Black staining. Among positive bacteria in PCR and Sudan Black, eight were identified by sequencing the level of genus or species, such as *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Cupriavidus* and *Microvirga flocculans*, the latter being described for the first time as producer of PHA. The application of PCR in colonies with coloring by Sudan Black proved to be efficient and quick to check potentially producing PHAs bacteria from soil samples.

Keywords: tuber, PCR, *Microvirga flocculans*, Sudan Black, PHA

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

O inhame, a macaxeira e batata-doce são culturas de grande importância econômica e social para o Nordeste brasileiro, encontrando nas zonas produtoras dessa região condições ambientais favoráveis para seu desenvolvimento e produção.

O baixo custo de produção, o cultivo relativamente simples, alto potencial produtivo e o valor alimentício, são fatores relevantes para utilização, principalmente na Agricultura Familiar (EMBRAPA, 2012). Em relação à cultura de inhame, soma-se a isso o grande potencial que o inhame apresenta para expansão de sua área de cultivo. Isto ocorre devido à existência de linha de crédito específica para o agricultor nos bancos governamentais, possibilitando maior produção e exportação para os grandes centros consumidores do centro-sul, além do mercado externo. Entretanto, alguns fatores como a falta de métodos de conservação, industrialização e a pouca divulgação de suas qualidades alimentícias, ainda limitam a maior parte do consumo às regiões produtoras.

Quanto às características nutricionais, estas culturas apresentam grande capacidade de armazenar reservas em suas raízes ricas em carboidratos, principalmente, amido. Além de possuir uma expressiva fonte de minerais, e vitaminas como complexo B, vitamina C e A.

As raízes do inhame, da macaxeira e da batata-doce mantêm uma relação direta com o solo. Algumas das mais complexas interações químicas, físicas e biológicas conhecidas nas plantas terrestres são aquelas que ocorrem entre raízes e o ambiente de solo em seu entorno, ou seja, na rizosfera (DANTAS et. al., 2009).

A rizosfera das plantas é considerada o ambiente que apresenta maior diversidade microbiana, devido à exsudação das raízes, modificando dinamicamente as condições e nutrientes neste ambiente (BAIS *et al.* 2006). Micro-organismos endógenos estão bem adaptados às mudanças de condições ambientais e flutuações na concentração de nutrientes liberados pelas raízes. Destes, os procariontes apresentam mecanismos envolvidos à resistência a essas condições de estresse devido a sua habilidade em formar

cistos ou endósporos para sobreviver em ambientes desidratados. Ademais, bactérias são capazes de apresentar versatilidade metabólica que permitam superar flutuações das condições químicas ambientais, sendo as inclusões de armazenamento de substâncias outra estratégia que aumenta a sobrevivência bacteriana (MUELLER *et al.* 1999). Polihidroxialcanoatos (PHAs) são um desses grupos de grânulos intracelulares produzidos por bactérias para armazenar energia.

O termo PHA é aplicado a uma família de poliésteres produzidos por diversas bactérias, entre elas *Cupriavidus necato* e *B. thuringiensis israelensis*. Possuem propriedades similares a vários plásticos convencionais correntemente em uso (do polipropileno a borrachas sintéticas) e são completamente degradados a dióxido de carbono e água, quando descartados no meio ambiente (FONSECA, 2003).

Estes 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 (ZINN *et al.* 2001). São normalmente derivados do CO₂ e água e, após sua conversão em PHAs, são novamente convertidos em CO₂ e água, fechando completamente o ciclo do carbono.

Sabendo-se que o inhame, a macaxeira e a batata-doce possuem grande quantidade de amido em sua constituição química, foi pesquisada a presença de bactérias com potencial produção de PHAs na rizosfera e no solo aderido a superfície desses túberculos, corroborando com resultados encontrados na rizosfera de outros tubérculos, a exemplo da beterraba e batata (GASSER *et al.*, 2009).

1.2 Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

- Identificar bactérias da rizosfera e superfície de túberas de inhame, macaxeira e batata-doce com aplicação biotecnológica para produção de polihidroxialcanoatos.

1.2.2. Objetivos específicos

- Formar coleção de bactérias isoladas do solo de rizosfera e superfície de túberas de inhame, macaxeira e batata-doce;
- Detectar o gene *phaC* da via de síntese de PHA na coleção de bactérias;
- Detectar qualitativamente a produção de PHAs por coloração de bactérias;
- Identificar e preservar espécies bacterianas produtoras de PHAs.

1.3 Revisão da Literatura

1.3.1 Cultura de Inhame, macaxeira e batata-doce

1.3.1.1 Inhame (*Dioscorea* spp.)

O inhame (*Dioscorea* spp.) é uma monocotiledônea tuberosa, herbácea, pertencente à família Dioscoreaceae, cujo órgão de reserva é conhecido como túbera (Figura 1.1 A e B). Este gênero possui cerca de 600 espécies originárias da Ásia, África ou América do Sul (COURSEY, 1980; SANTOS, 1996). A maioria das espécies não serve para alimentação.



Figura 1.1 A. Estrutura herbácea de *Dioscorea* spp. B. Túbera de *Dioscorea cayennensis*.
(Fonte: Pereira, 2012)

Apesar de o inhame estar no cardápio de diversas civilizações ao longo dos séculos e estar presente desde o início da colonização brasileira, são os nordestinos quem, praticamente, assumem a demanda do inhame no Brasil (ANDRADE, 2007).

O Brasil produziu em 2008 cerca de 250.000 t de inhame anualmente com área plantada de 27.000 t (FAO, 2011). Nacionalmente, o Nordeste é o maior produtor, concentrando aproximadamente 90% de todo o inhame produzido no país, com destaque para os Estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia e Maranhão (GARRIDO, 2005; OLIVEIRA et.al., 2005).

No mundo, a cadeia produtiva do inhame constitui expressiva atividade geradora de empregos e renda, movimentando cifras superiores a 150 milhões de dólares anuais, além de promover a fixação do homem no campo, exigindo cerca de 1,25 homem por hectare de área plantada (SANTOS, 2002).

As espécies comestíveis do gênero *Dioscorea* mais cultivadas no Brasil são: *D. cayennensis* Lam. e *D. alata* L. *Dioscorea cayennensis* cultivar da Costa, é a preferida para o consumo no Nordeste e praticamente a única nos programas de exportação. *Dioscorea alata*, possui duas variedades difundidas na região nordeste; inhame São Tomé e inhame Nambu (antigos cará São Tomé e Nambu), muito bem aceitas como alimento (OLIVEIRA et. al., 2005). Porém este é usado para plantio em menor escala, apresentando forte potencial para expansão, por proporcionar elevada rentabilidade. Ainda segundo Oliveira et. al.(2005), *Dioscorea alata* é pouco cultivada na Paraíba e Pernambuco, por ser altamente suscetível à doença requeima das folhas, de alta severidade e etiologia ainda desconhecida, ocorrente, aparentemente, apenas nesses Estados.

A cultura do inhame no Brasil tem sido explorada economicamente nas Regiões Sudeste e Nordeste, com destaque para os estados da região Nordeste. Nestes, o cultivo de inhame constitui uma atividade agrícola tipicamente familiar, gerando renda e trabalho, sendo parte do Programa de Agricultura Familiar do Governo Federal (SANTOS, 2002). Além destes empregos diretos, a cadeia produtiva de inhame envolve outros setores como armazenamento, comercialização e transporte. Desta forma, esta cultura apresenta grande importância econômica e social para o desenvolvimento da região Nordeste, além de promover a fixação do homem no campo.

Dentre as raízes e tubérculos usados na alimentação humana, o inhame apresenta importante valor nutricional por ser uma expressiva fonte de minerais, carboidratos e vitaminas C e do complexo B, sendo seu amido considerado de qualidade superior à mandioca. Além desses nutrientes, a túbera de inhame contém um grupo de proteínas, chamada dioscorinas as quais representam aproximadamente 85% do total de proteínas do inhame (HARVEY & BOULTER, 1983). HOU et al. (2001) demonstraram que as dioscorinas apresentaram propriedades antioxidantes contra radicais hidroxilas e sugeriram que o consumo das proteínas do inhame pode trazer benefícios para a saúde humana. HSU et al. (2002) descreveram que dioscorina e hidrosilases pépticas foram capazes de inibir a enzima conversora de angiotensina (ACE), molécula alvo dos fármacos usados no tratamento da hipertensão arterial.

Além de alimento humano, o gênero *Dioscorea* apresenta ainda aplicação na indústria farmacêutica, devido as suas características medicinais que permitem a síntese industrial de cortisona e hormônios esteróides (MESQUITA, 2002).

Outra planta de importância nutricional e social para o Nordeste é a raiz tuberosa, macaxeira.

1.3.1.2 Macaxeira (*Manihot utilissima*)

Macaxeira (*Manihot utilissima*) é uma espécie de mandioca que pode ser utilizada para alimentação, apresentando várias denominações dependendo da região do Brasil, podendo ser chamada de: aipi, aipim, castelinha, uaipi, mandioca-doce, mandioca-mansa, maniva, maniveira e pão-de-pobre (Figura 1.2). Constitui a base alimentar de grande parte da população (cerca de 500 milhões de pessoas) da África, Ásia e América Latina (COSTA, 2003). No Brasil teve sua origem com a cultura indígena, sendo difundida para todo o país.



Fig. 1.2 Túbera de macaxeira (*Manihot utilissima*) (Fonte: Pereira, 2012)

Hoje o Brasil é um dos maiores produtores mundiais de mandioca, com produção de 23 milhões de toneladas de raízes frescas (BRASIL ESCOLA, 2012). Segundo dados de 2012 do IBGE quanto à produção agrícola de mandioca, as regiões que se destacaram foram Norte e Nordeste, com destaque para o estado do Pará como o maior produtor nacional de mandioca e que responde por 70 % da produção na Região Norte, além de Bahia e Maranhão (IBGE, 2012).

A macaxeira apresenta excelente fonte de carboidratos, sais minerais (cálcio, ferro e fósforo) e vitaminas do complexo B. Pertence ao grupo dos alimentos energéticos sendo que cem gramas de mandioca fornecem em média 149 Kcal (GALANTE, 2012).

De acordo com pesquisas realizadas por Marques *et. al.* em 2000, a mandioca e seus resíduos podem ser fontes alternativas de energia, visto que os grãos mais nobres são usados na alimentação humana e de animais não-ruminantes, que apresentam melhor resposta à utilização deste tipo de alimento.

Juntamente com o inhame e macaxeira, a batata-doce é um tubérculo que compõe a base alimentar dos nordestinos.

1.3.1.3 Batata-doce (*Ipomoea batatas*)

A batata-doce é uma dicotiledônea que pertence à família botânica Convolvulaceae, gênero *Ipomoea* e espécie *Ipomoea batatas* (L.) Lam (SCHULTZ, 1968). É uma planta de fácil cultivo, rústica e amplamente difundida, estando dentre as doze culturas fundamentais do mundo (BARREIRA, 1986). De acordo com Peixoto & Miranda (1984), teve origem na América Tropical, sendo levada para a Europa pelos portugueses e espanhóis, difundindo-se, posteriormente, para os demais continentes, sendo cultivada em todas as zonas tropicais e temperadas.

Atualmente sabe-se que a batata-doce é cultivada em 111 países, sendo aproximadamente 90% da produção obtida na Ásia, 5% na África e 5% no restante do mundo. Apenas 2% da produção estão em países industrializados como os Estados Unidos e Japão. Em termos de volume de produção mundial, a cultura da batata-doce ocupa o sétimo lugar, mas é a décima quinta em valor de produção, o que indica ser uma cultura de baixo custo (EMBRAPA, 2012).

No Brasil, a batata-doce é cultivada em todas as regiões. Embora bem disseminada no país, está mais presente nas regiões Sul e Nordeste, notadamente no estado do Rio Grande do Sul, sendo responsável por 54% da safra nacional, seguido por Sergipe, Pernambuco e Paraíba (IBGE, 2010).

O baixo custo de produção, cultivo relativamente simples, alto potencial produtivo e o valor alimentício da batata-doce são fatores relevantes para sua utilização, principalmente no Programa de Agricultura Familiar, caracterizando-se como uma cultura de subsistência (EMBRAPA, 2012). Além de ser uma hortaliça muito popular e bastante consumida.

Quanto às características nutricionais, esta cultura apresenta a capacidade de armazenar reservas em suas raízes sendo rica em carboidratos, principalmente, amido. Segundo um estudo realizado por Noda *et. al.* (1992) constataram que este amido isolado de diferentes zonas da batata-doce possui diferentes propriedades físico-químicas. Sendo assim, o mesmo pode ser utilizado com diversas finalidades. No Japão, por exemplo, a

batata-doce é usada como matéria prima para produção de amido comercial e para fabricação de xaropes de glicose e frutose (VIEIRA, 2004).

Ainda referente a sua capacidade nutricional, a batata-doce apresenta uma boa quantidade de vitamina A, além de vitaminas do complexo B, minerais e água, com baixos teores de proteínas e de gorduras, possuindo assim um imenso potencial alimentício e industrial. (MIRANDA, 1995). Este potencial industrial pode ser observado em diversas áreas como matéria prima nas indústrias de alimento, tecido, papel, cosmético, preparação de adesivos e álcool carburante.

Ainda referente a este potencial industrial, Naval (2012) teve por objetivo empregar águas de esgoto para irrigar cultivares de batata-doce (*Ipomea batatas*-(L) Lam) para produção de biomassa, visando à produção de álcool como fonte alternativa de bioenergia em regiões tropicais. A batata-doce apresentou uma ótima produção de biomassa para obtenção de álcool combustível, associada a baixo custo de produção e rusticidade.

O inhame, a macaxeira e a batata-doce como já citados, são tubérculos. Possuem uma relação direta com o solo e com um ambiente rico em micro-organismos, especialmente bactérias e fungos, constituindo um ambiente diverso em nutrientes denominado rizosfera.

1.3.2 Rizosfera de plantas e potencial biotecnológico

A rizosfera é a zona de solo sob influência direta da presença das raízes. O termo rizosfera atribuído a este compartimento de solo foi primeiramente definido em 1904 por Lorentz Hilner, e após mais de um século de estudos sobre este assunto pôde-se concluir que muitas interações microbiológicas ocorrem nesse nicho ambiental específico (DOOMBOS et. al., 2012).

A rizosfera é a área do solo onde há intensa atividade biológica e química, cuja composição é diretamente influenciada por compostos exsudados pela raiz e por micro-organismos que se alimentam destes (ABBOTT, 2005).

O uso de exsudatos das raízes pelos micro-organismos resulta em um aumento da biomassa microbiana e da atividade em volta das raízes, o então chamado “efeito rizosfera” (DOOMBOS et. al., 2012).

Como consequência do crescimento e desenvolvimento normais das plantas, uma grande variedade de substâncias orgânicas e inorgânicas são secretadas pelas raízes para o solo, o qual inevitavelmente leva a alterações na sua bioquímica e propriedades físicas (WALKER et. al., 2003).

Os exsudados das raízes incluem aminoácidos, ácidos orgânicos, carboidratos e proteínas que atuam como mensageiros, estimulando as interações físicas e biológicas entre os organismos do solo e as raízes. Eles modificam as propriedades bioquímicas e físicas da rizosfera e contribuem para o desenvolvimento da raiz e sobrevivência da planta (ABBOTT, 2005).

Através da exsudação dessa ampla variedade de substâncias, as raízes podem regular as populações microbianas do solo nas suas imediações, competir com herbívoros, promover relações simbióticas, mudar as propriedades químicas e físicas do solo e inibir o crescimento de grupos de plantas competidoras.

Além dessas, outras funções tem sido atribuídas à exsudação da raiz, incluindo a manutenção do contato entre a raiz e o solo, lubrificação da ponta da raiz, proteção das raízes contra dessecação, estabilização de micro agregados do solo e armazenamento e adsorção seletiva de íons (WALKER et. al., 2003).

Mais de 40% de todo carbono fixado pela fotossíntese é secretado na rizosfera (DOOMBOS et. al., 2012). Embora a exsudação das raízes represente claramente um significativo dispêndio de carbono para a planta, o mecanismo e o processo regulatório da secreção de raízes começaram a ser examinados há pouco tempo.

Antes, a exsudação das raízes era tratada como um processo passivo. No entanto, crescentes evidências sugerem que a proteína transportadora ABC (“ATP-binding cassette Transporters”) presente nas raízes está envolvida na translocação de fitoquímicos na rizosfera, indicando que plantas secretam ativamente metabólitos no ambiente. Além disso, uma ampla variedade de plantas possui em suas raízes células especializadas que contém grande número de mitocôndrias e pilhas de vesículas derivadas de complexo de Golgi, indicando uma secreção ativa de metabólitos (DOOMBOS et. al., 2012).

Os exsudados na rizosfera variam de acordo com o estágio de crescimento da planta. Por exemplo, sabe-se que há mais carboxilatos e mucilagem na raiz no sexto estágio das folhas do que mais cedo (ABBOTT, 2005).

A relação micro-organismo-raiz é outro importante processo que caracteriza esta zona no solo. Alguns compostos identificados nos exsudados de raízes têm apresentado um importante papel nessa interação entre micro-organismo e raiz. Os flavonóides presentes nos exsudados de raízes de leguminosas ativam os genes de *Rhizobium meliloti* responsáveis pelo processo de nodulação (WALKER et. al., 2003).

1.3.3 Bactéria da rizosfera de plantas

A rizosfera é a região do solo sob influência direta da presença das raízes, com características distintas das do solo. É a região onde ocorre a maior parte das interações entre micro-organismos e plantas, considerado o ambiente que apresenta maior diversidade microbiana, devido à exsudação das raízes, modificando dinamicamente as condições e nutrientes (BAIS *et al.*, 2006). É também importante local para processos relacionados com a nutrição da planta, trocas de O₂ e CO₂, gradientes de unidades do solo, mineralização, amonificação, nitrificação e simbiose (EMBRAPA, 2012).

Em relação às bactérias que crescem próximo ou associadas às raízes, sendo estimuladas pelos exsudados radiculares, estas são chamadas rizobactérias. Diversas rizobactérias tem 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, mineralização e solubilização de nutrientes como o fósforo e fixação de nitrogênio (DANTAS *et. al.*, 2009).

Micro-organismos endógenos estão bem adaptados às mudanças de condições ambientais e flutuações na concentração de nutrientes liberados pelas raízes. Estes por sua vez, também realizam atividades metabólicas relevantes para o crescimento das plantas. Entre esses micro-organismos, os procariontes apresentam mecanismos envolvidos à resistência a essas condições de estresse devido a sua habilidade em formar cistos ou endósporos para sobreviver em ambientes desidratados.

Todos os micro-organismos vivos crescem e se reproduzem utilizando rotas metabólicas muito semelhantes, ou até idênticas, para a geração de energia. Essas reações fazem parte do metabolismo primário. A grande diversidade entre os organismos é decorrente da maneira como cada um organiza algumas unidades monoméricas em grandes macromoléculas. No entanto, existem outras rotas metabólicas que possibilitam os organismos produzirem os mais diversos tipos de compostos, alguns inclusive restritos a certos gêneros ou espécies. Essas rotas constituem o metabolismo secundário (MS), ou seja, seus produtos não são essenciais para a vida do micro-organismo, e normalmente, são produzidos na fase estacionária do indivíduo (HECK, 2007). O MS apresenta frequentemente um papel importante na defesa, podendo possuir diversas atividades que formam a base de um grande número de processos biotecnológicos.

Os metabólitos secundários participam de importantes funções vitais. Como mediadores de interações ecológicas, têm a função de garantir a sobrevivência de

organismos particulares em ambientes hostis, onde muitos organismos competem entre si. Desta forma, eles aumentariam a competitividade desses organismos.

A produção de metabólitos secundários existe dentre os mais diversos reinos. As plantas, por exemplo, produzem inúmeros metabólitos secundários com variadas funções, como proteção a predadores e pigmentos para reprodução; além disso, elas apresentam uma gama de metabólitos com ação anticarcinogênica. Além das plantas, os insetos produzem metabólitos para comunicação ou proteção; e ainda dentre os eucariontes, os fungos são grandes produtores de metabólitos secundários como diversos tipos de enzimas e até mesmo alguns compostos com ação antitumoral (PERES, 2012).

As bactérias, assim como os fungos, podem sintetizar enzimas e outros metabólitos com ação antibiótica na rizosfera de plantas. Como exemplo podem ser citados, *Bacillus colistinus*, produtor da colistina; *B. brevis* (tirotricina); *B. licheniformis* (gramicidinas); *B. polymyxa* (polimixina). *Bacillus subtilis*, além de ação antibiótica relacionada com a secreção de compostos do grupo iturin, também pode sintetizar fitohormônios e antifúngicos (ARAUJO et al., 2005).

Em relação a sua estrutura molecular, estes metabólitos normalmente são moléculas aromáticas, o que leva a torná-los bastante estáveis. Ademais, bactérias são capazes de apresentar versatilidade metabólica que permitam superar flutuações das condições químicas ambientais, sendo as inclusões de armazenamento de substâncias outra estratégia que aumenta a sobrevivência bacteriana (MUELLER et al. 1999).

Outro metabólito secundário produzido por bactérias são os polihidroxicanoatos (PHAs), polímeros de reserva de energia produzidos para garantir a sobrevivência em períodos de escassez em ambientes naturais (GASSER, et. al., 2009).

Os polihidroxicanoatos podem ser acumulados por diversas bactérias. A produção geralmente ocorre quando um nutriente essencial, a exemplo do nitrogênio, fósforo, enxofre ou oxigênio, é limitado na presença de excesso de fonte de carbono. Estes polímeros, por sua vez, 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 (ZINN et al. 2001).

Gasser et al.(2009) analisaram micro-organismos potencialmente produtores de PHAs em diversos *habitats* de plantas, incluindo rizosfera e solo. Os autores concluíram que os exsudados encontrados na rizosfera são um fator chave para o enriquecimento de populações microbianas específicas nesta região.

O exsudado é composto por íons de oxigênio livre e água, enzimas, um diversificado leque de fontes de carbono, além de produtos de metabólitos primários e secundários (UREN, 2000). Os ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos, lípidos, cumarinas, flavonóides, proteínas, enzimas, compostos alifáticos e compostos aromáticos são exemplos das substâncias primárias encontradas na interface solo-raiz

1.3.4 Polihidroxialcanoatos

Polihidroxialcanoatos (PHAs) são grupos de grânulos intracelulares produzidos por bactérias para armazenar energia, sem afetar a pressão osmótica da célula. Algumas bactérias como *Cupriavidus necator* em condições desfavoráveis de crescimento e na presença de excesso de fonte de carbono, pode acumular mais de 80% de sua massa seca em PHAs, (Figura 1.3) (RAMSAY, 1994). A função mais frequentemente atribuída a estes grânulos é reserva de carbono, energia e equivalentes redutores. Assim, a síntese de PHA normalmente ocorre quando há excesso de fonte de carbono disponível e limitação de pelo menos um nutriente essencial à multiplicação das células bacterianas. Por outro lado, quando há limitação de carbono ou energia, mas não de outros nutrientes, os PHAs podem ser reutilizados para suprir essa necessidade (SILVA *et al.*, 2007).

São normalmente derivados do CO₂ e água e, após sua conversão em PHAs, são novamente convertidos em CO₂ e água, fechando completamente o ciclo do carbono.

Os plásticos têm papel fundamental na sociedade moderna. No entanto, devido ao fato de algumas aplicações destes materiais serem de descartabilidade muito rápida, têm despertado fortes preocupações nos dias atuais devido à grande dificuldade de degradação no ambiente, podendo demorar séculos para se degradar e ocupando grande volume na área dos aterros. O aumento no interesse científico pela área ambiental, atraído pelo crescimento explosivo do consumo de polímeros ou plásticos e pela disposição final destes resíduos sólidos urbanos, tem tornado cada vez mais necessária à produção de substitutos ambientalmente sustentáveis. São importantes no gerenciamento de resíduos os chamados polímeros ou plásticos ambientalmente degradáveis (PADs), compostos por um vasto grupo de materiais poliméricos, naturais e sintéticos, que sofrem alterações químicas sob a influência de fatores ambientais (VINHAS, 2007).



Figura 1.3 Grânulos de polihidroxicanoatos em bactéria (Fonte: TurtleBio, 2012)

Em 1926 o microbiologista Maurice Lemoigne obteve pela primeira vez, através do *Bacillus megaterium*, bactéria Gram positiva, a determinação da composição de PHAs, no qual o primeiro composto foi o ácido 3-hidroxi-butírico P(3HB) sendo este o primeiro polímero da família dos PHAs a ser estudado (GLAZER; NIKAIDO, 2007). Posteriormente em 1958, Macrae e Wilkinson ainda estudando *Bacillus megaterium*, observaram que este micro-organismo armazenava homopolímero, principalmente quando as proporções de glicose/nitrogênio no meio estavam altamente elevadas. Concluíram assim, que o P(3HB) era uma fonte de reserva de carbono e energia. Esta propriedade termoplástica aumentou consideravelmente o interesse sobre o plástico biodegradável (CARMINATTI et. al., 2006).

Quanto a estrutura geral, segundo Lee (1996), os polihidroxicanoatos podem apresentar de 100 a 30.000 monômeros, demonstrando que a variação das posições do grupo hidroxila (n) e do radical R nas unidades monoméricas e o grau de polimerização, influem nas propriedades físicas dos polímeros (STEINBUCHEL et. al., 1998) (Figura 1.4).

Atualmente são conhecidos mais de 150 ácidos hidroxicanoicos que podem compor os PHAs entre as diferentes espécies de micro-organismos (REHM, 2003). A maioria destes monômeros possui o grupo hidroxila na posição 3, embora em alguns PHAs o grupo hidroxila foi encontrado nas posições 4, 5 ou 6. Dentre a ampla variedade de ácidos hidroxicanoatos já detectados como constituintes de PHAs, incluem-se monômeros com cadeias carbônicas saturadas ou insaturadas, halogenadas, ramificadas com grupos substituintes lineares, cíclicos ou aromáticos, entre outros. A composição monomérica, ao lado da massa molecular e da distribuição das massas moleculares do polímero, é responsável pelas propriedades físicas e mecânicas destes materiais (LÍCIO, 2011).

Embora um grande número de monômeros diferentes já tenha sido observado como constituintes de PHAs, convém destacar que a síntese e incorporação destes monômeros

dependem do fornecimento de um substrato adequado, que possa ser convertido no hidroxiaçil-CoA desejado através das vias metabólicas existentes na célula bacteriana. Além disso, é necessário que a célula bacteriana contenha uma PHA sintase capaz de incorporar ao poliéster formado, o hidroxiaçil-CoA gerado. Assim, tanto a especificidade das vias metabólicas geradoras do hidroxiaçil-CoA como da PHA sintase, podem impedir ou favorecer a combinação de certos monômeros em uma mesma cadeia polimérica ou, ainda, restringir a quantidade de um determinado monômero que pode ser incorporada ao PHA (GOMEZ; BUENO NETO 2001).

Em diversas etapas do metabolismo, a partir da fonte de carbono, a bactéria pode gerar intermediários na forma de hidroxiaçil-CoA, os quais serão reconhecidos e polimerizados pela enzima PHA sintase, presente nas bactérias capazes de acumular estes materiais (SILVA *et al.*, 2007). Atualmente, os genes codificantes desta enzima PHA sintase representam as moléculas alvos para 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 e utilizado devido ser o codificador para enzima chave da última etapa da via metabólica de síntese de PHAs, Figura 1.4 (SHEU *et al.*, 2000).

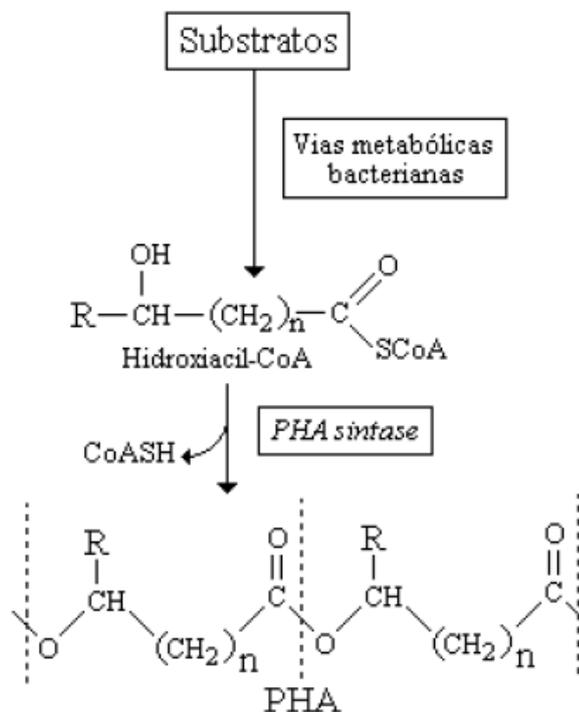


Figura 1.4 Via de síntese resumida de polihidroxicanoato (Fonte: Gomez e Bueno Netto, 2001)

Atualmente são utilizados vários métodos para detecção de bactérias produtoras de polihidroxialcanoato. Como por exemplo os métodos por coloração com Sudan Black, vermelho do Nilo, azul do Nilo e verde malaquita, podendo-se detectar grânulos intracelulares de PHA.

O azul do Nilo é um corante básico de oxazina, solúvel em água e álcool etílico. Em virtude da oxidação espontânea do azul do Nilo em solução aquosa, resultando na produção de vermelho do Nilo, suspeita-se que este seja o responsável pela coloração e fluorescência dos grânulos de PHA nas células bacterianas. Além da oxidação espontânea, o vermelho do Nilo também pode ser formado pelo refluxo do azul do Nilo e ácido sufúrico diluído (TAKAHASHI, 2012).

Sudan Black é um corante lipofílico, com afinidade pelo PHA; assim, as colônias bacterianas contendo PHA adquirem coloração azul e as não produtoras permanecem descoloradas (STRELEC, 2006). É um método utilizado para seleção e análise qualitativa da síntese de PHA, muitas vezes associado ao PCR para confirmação de bactérias potencialmente produtoras. Esta associação de coloração por Sudan Black com o PCR foi utilizada para identificar *Pseudomonas sp.* extraída de cultura de cana-de-açúcar (LIMA *et. al.*, 1999). O mesmo método, associado à coloração vermelho do Nilo, foi aplicado para detecção de 261 isolados de lodo de esgoto doméstico potencialmente produtores de PHA (LICIO, 2011).

Verde Malaquita, também é um corante com afinidade lipofílica utilizado para análise e detecção de bactérias potencialmente produtoras de PHA. Este pode ser utilizado associado a outros corantes para confirmação da positividade. Takaki *et. al.* em (2006) utilizaram o verde malaquita associado ao azul do Nilo a fim de avaliar o acúmulo de PHA em *Chromobacterium violacem*, cujo resultado obtido pelo autor confirmou a facilidade deste método de detecção.

Segundo Tyo *et. al.*(2006), esta técnica de coloração trata-se de um método qualitativo, porém letal para as bactérias. Pois, apesar de ser uma metodologia simples e rápida tem como desvantagem a morte das células durante a coloração. Já as técnicas empregadas na espectrofluorometria e citometria de fluxo podem ser classificadas como não-letais e quantitativas, pois permitem a quantificação de PHA a partir de células intactas (DEGELAU *et. al.*1995). A espectrofluorometria mede a intensidade de fluorescência de toda a célula, enquanto que a citometria determina a intensidade da fluorescência contida apenas no interior das células. No entanto, ambas apresentam uma relação linear entre intensidade e conteúdo de PHA (DEGELAU *et. al.*1995). Sendo assim, quanto maior a fluorescência, maior a quantidade de biopolímero acumulado na célula bacteriana.

A cromatografia gasosa permite a quantificação e caracterização das unidades monoméricas do PHA, e se enquadra como um método quantitativo e letal, pois as células são inicialmente liofilizadas, pesadas e congeladas para posterior análise (TYO *et. al.*, 2006).

Existem estudos que utilizam PCR como método de detecção de bactérias potencialmente produtoras de PHA. ROMO *et al.* (2007) desenvolveram um método molecular por PCR para detecção de linhagens bacterianas produtoras de PHAs (via gene *phaC*) de cadeias curtas e médias provenientes de vários ambientes. Os *primers* utilizados para a detecção do gene *phaC* foram: G-D (5'-GTGCCGCC(GC)(CT)(AG)(GC)ATCAACAAGT-3'), G-1R (5'-G TTCC AG(AT)AC AG (GC)A(GT)(AG)TCGAA-3') e G-2R (5'-GTAGTTCCA(GC)A(CT)CAGGTCGTT-3') que amplificam fragmento de 551pb (Figura 1.5). Tal método possibilitou fazer PCR diretamente das colônias crescidas em placas de Petri com meio acrescido de uma fonte de carbono para seleção.

Gasser *et. al.* em (2009) também utilizaram o método de PCR de colônia para confirmação de bactérias potencialmente produtoras de PHA em culturas de beterraba, colza, trigo e morango.

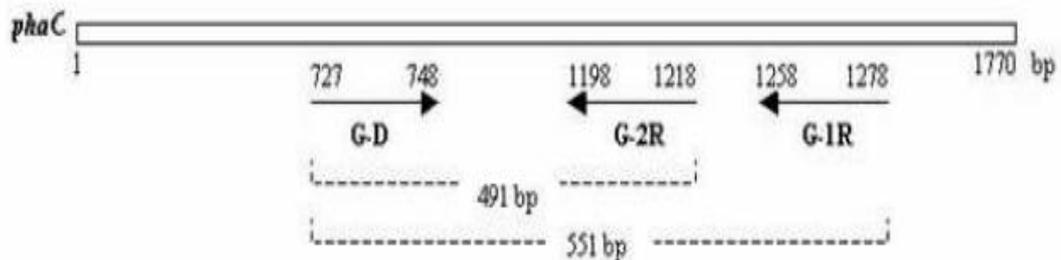


Figura 1.5 Primes para detecção do gene *phaC* (Fonte: Romo *et. al.*, 2007)

Kung *et. al.* .2007 propuseram metodologia polifásica usando métodos fenotípicos (coloração com vermelho do Nilo, cromatografia gasosa (CG) e análise de ressonância) e genotípicos (PCR do gene *phaC1* e sequenciamento do gene 16S rRNA) para identificação de bactérias produtoras de PHAs em amostras de solo. Os autores estudaram diferentes fontes de solo para amostragem, a saber: solo agricultável, de áreas de drenagem de resíduos industriais e solos contaminados com óleo. De 1027 bactérias isoladas das diversas fontes de solo, mais de uma centena foram produtoras de PHAs. Todas as bactérias positivas na coloração apresentaram picos de vários tipos de polihidroxicanoatos na CG e espectro de PHAs na ressonância magnética. Além disso, essas mesmas bactérias

apresentaram positividade no PCR para o gene *phaC1* sintase. Os resultados mostraram que a associação dos métodos foi eficiente para seleção de bactérias capazes de produzir quantidades significativas de PHAs de cadeia média. Foram isoladas e identificadas bactérias ao nível de gênero, a saber: *Pseudomonas* sp, *Aeromonas* sp, *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Acinetobacter* sp., *Exiguobacterium* sp

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 (ROMO *et al.*, 2007).

Pseudomonas aeruginosa, devido a sua versatilidade metabólica, tem se tornado um dos principais organismos estudados quanto a produção e síntese molecular de PHA além de fenômenos de regulação envolvendo a síntese deste biopolímero (ROSAS *et al.*, 2007).

Matsuda (2009) descreveu o gênero *Aeromonas* como um potencial produtor de PHA a partir do óleo de soja, este sendo uma fonte de carbono interessante para produção de PHA, pois é renovável. Outra espécie bacteriana que vem trazendo novas perspectivas para a possível produção de PHA é a *Sphingomonas capsulada*, utilizando meio de cultivo a base de melão (bruto e pré-tratado) como fonte de carbono (BERWANGER, 2005).

Solo de rizosfera também é um ambiente favorável para isolamento de bactérias potencialmente produtoras de PHA usando como fonte de energia os seguintes substratos: beterraba - *B. vulgaris* L., colza - *B. napus* L., trigo - *Triticum aestivum* L. e morango - *Fragaria ananassa* L. (GASSER *et al.*, 2009), cana-de-açúcar - *Saccharum officinarum* L. (LIMA *et al.*, 1999), soja - *Glycine max* L. (CARMINATTI *et al.* 2006), milho - *Zea mays* L., e gramínea - *Arundinaria aristula*. Considerando que as bactérias acumulam PHAs em ambientes com condições de estresse de nutrientes, particularmente limitações de nitrogênio e fósforo, os vegetais supracitados apresentaram-se como excelentes fontes de carbono.

Chansatein *et al.*(2012) desenvolveram um meio de cultura para as bactérias produzirem PHA a partir da mandioca, usando adaptação de vários autores em meio complexo e mínimo e 1g de fragmento de mandioca sem pele. Após o cultivo das bactérias, a presença de acúmulo de PHA foi evidenciada pela coloração com azul do Nilo a 1% e observação de fluorescência a um comprimento de onda de 650nm. A microscopia eletrônica de transmissão foi usada apenas para confirmar a presença de grânulos de PHA nas bactérias. Os autores não identificaram as bactérias isoladas a partir da fermentação do meio de cultura preparado com mandioca.

Krueger (2012) estudou 72 linhagens de bactérias das quais 21 eram *Bacillus* quanto a capacidade de bioconverter amido de mandioca em PHA. O crescimento bacteriano no meio com amido hidrolisado foi medido pelo ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazolium), enquanto a habilidade de produção de PHAs foi avaliada pela coloração com vermelho do Nilo, além dos teste de produção da enzima amilase. Quatro isolados apresentaram resultado positivo no ensaio de MTT (crescimento) e produção de PHA. As bactérias foram seqüenciadas usando primers para o gene 16S rRNA e foram identificadas como *Bacillus megaterium*. A produção máxima atingiu 4,97g de peso seco/L com 29,7% do PHA polihidroxibutirato. Desta forma, os autores concluíram que o ensaio de MTT é uma metodologia aplicável para monitorar crescimento bacteriano em meio insolúvel, e que as linhagens bacterianas amilolíticas selecionadas podem ser usadas como um processo industrial alternativo para produção de plásticos biodegradáveis, a partir de resíduos de amido, reduzindo os custos para produção de biopolímeros.

Apesar de existir na literatura várias espécies bacterianas produzindo PHA, há necessidade ainda de pesquisas que descrevam novas espécies produtoras de PHA em meio de cultura alternativo e otimizado para atender a demanda crescente da indústria de plásticos biodegradáveis no Brasil e no mundo. Desta forma, estudos que identifiquem bactérias do solo de diferentes ambientes para produção de PHA poderão contribuir para a preservação do meio ambiente e a economia do país.

CAPÍTULO 2

Identificação de bactérias da rizosfera de inhame, macaxeira e batata-doce potencialmente produtoras de polihidroxicanoatos

Artigo a ser submetido a Letters in Applied Microbiology

ISSN: 1472-765X

Identificação de bactérias da rizosfera de inhame, macaxeira e batata-doce potencialmente produtoras de polihidroxicanoatos

Juliana de Castro Nunes Pereira^{a,b}, Gabriel Olivo Locatelli^c, Idjane Santana de Oliveira^{a,b}, Leandro Finkler^c

^a Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória. Alto do Reservatório, s/n. Vitória de Santo Antão – PE – Brasil.

^b Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória. Alto do Reservatório, s/n. Vitória de Santo Antão – PE – Brasil.

^c Laboratório de Bioprocessos Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória. Alto do Reservatório, s/n. Vitória de Santo Antão – PE – Brasil.

Autor para correspondência

Profa. Idjane Santana de Oliveira
Email: idjaneoliveira@gmail.com
Universidade Federal de Pernambuco
Centro Acadêmico de Vitória – CAV
Rua Alto do Reservatório, s/n
Vitória de Santo Antão – PE CEP. 55.608-680

Artigo a ser submetido a revista Letters in Applied Microbiology

ISSN: 1472-765X

Significado e Impacto do Estudo:

O presente estudo apresenta relevância por relatar pela primeira vez na literatura a bactéria Gram negativa *Microvirga flocculans* produzindo polihidroxialcanoato e por aplicar PCR de colônia detectando bactérias produtoras de PHA no solo de rizosfera e no aderido à superfície das túberas do inhame, macaxeira e batata-doce.

Resumo

Inhame, macaxeira e batata-doce são vegetais importantes no Nordeste brasileiro uma vez que esses tubérculos são ricos em amido. Os Polihidroxialcanoatos (PHAs) são polímeros biodegradáveis produzidos a partir dos produtos da hidrólise do amido e utilizados na produção de plásticos. O objetivo do trabalho foi isolar do solo da rizosfera e do aderido à superfície desses três vegetais, bactérias potencialmente produtoras de PHAs, selecionando-as por PCR de colônia e coloração por Sudan Black. Após diluições seriadas e semeio do solo, bactérias com características morfológicas distintas foram selecionadas para uso no PCR de colônia. Das 214 bactérias selecionadas, 11 amostras foram positivas para detecção do gene *phaC* da via de 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 seqüenciamento ao nível de gênero ou espécie, tais 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 seleção de bactérias potencialmente produtoras de PHAs a partir de amostras de solo.

Palavras-Chave: túbera, PCR, *Microvirga flocculans*, Sudan Black, PHA

Significance and Impact of study:

This study has relevance for reporting for the first time in literature the Gram negative bacteria *Microvirga flocculans* producing polyhydroxyalkanoate and for apply colony PCR detecting PHA-producing bacteria in the rhizosphere soil and adhered soil to the surface of tubers of yam, cassava and sweet potato.

Abstract

Yams, cassava and sweet potatoes are starch vegetables and important socioeconomically to northeastern Brazil. The soil from the rhizosphere of these tubers and roots is rich in bacteria that produce metabolites with various biotechnological applications, for example Polyhydroxyalkanoates (PHAs), biodegradable polymers produced from starch hydrolysis and used in the production of plastics. The objective of this study was to isolate and identify the rhizosphere soil and adhered these three vegetable surface, potentially producing bacteria PHAs, selecting them by PCR of the colony and evaluating the production of PHAs by Sudan Black staining. Isolated bacterial colonies with distinct morphological characteristics were selected for PCR. Of the 214 selected bacteria, 11 samples were positive for gene *phaC* of PHA synthesis pathway. Nine bacteria showed satisfactory result for production of PHA granules after Sudan Black staining. Among positive bacteria in PCR and Sudan Black, eight were identified by sequencing the level of genus or species, such as *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Cupriavidus* and *Microvirga flocculans*, the latter being described for the first time as producer of PHA. The application of PCR in colonie with coloring by Sudan Black proved to be efficient and quick to check potentially producing PHAs bacteria from soil samples.

Keywords: tuber, PCR, *Microvirga flocculans*, Sudan Black, PHA

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) este se localiza 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 (ARAGÃO, 2012). Este apresenta ainda relevância na indústria farmacêutica, permitindo a síntese industrial de cortisona e hormônios esteróides (MESQUITA, 2002).

O inhame contém um grupo de proteínas, chamada dioscorinas que apresentaram propriedades antioxidantes trazendo vários benefícios para a saúde humana, incluindo controle da pressão arterial (HOU et al., 2001). 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 (VALLE, 2007). 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 a seca e 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 alimentação animal, além da produção de álcool como é caso da batata-doce, aplicação não muito comum no Brasil (EMBRAPA, 2012).

Mesmo apresentando esta pequena diferença entre tubérculo e raiz tuberosa, estas três estruturas vegetais possuem relação direta com o solo e com um ambiente rico em micro-organismos, especialmente bactérias e fungos, constituindo um ambiente diverso em nutrientes denominado rizosfera, local onde ocorrem complexas interações químicas, físicas e biológicas.

Além da acumulação de químicos biologicamente ativos, as raízes de plantas produzem e liberam continuamente substâncias químicas diversas na rizosfera. Este processo de exsudação da raiz inclui a secreção de íons, oxigênio e água, enzimas,

mucilagem e uma vasta ordem de compostos ricos em carbono, metabólitos primários e secundários (BAIS 2006). 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 (OLIVEIRA *et al.* 2009). Este tipo de ambiente favorece a multiplicação de rizobactérias.

As rizobactérias que crescem próximo ou associadas às raízes, e 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, mineralização e solubilização de nutrientes como o fósforo e fixação de nitrogênio (DANTAS *et al.*, 2009). Estas bactérias apresentam grande versatilidade metabólica, sendo capazes de armazenar substâncias como estratégia de aumento da sobrevivência bacteriana, a exemplo de polihidroxicanoatos (PHAs).

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* (ROMO *et al.*, 2007). 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 (ZINN *et al.* 2001).

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 estes materiais (SILVA *et al.*, 2007). Atualmente, os genes codificantes desta enzima representam as moléculas alvo para 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. Isto deve-se ao fato de que o gene *phaC* é o codificador para enzima chave da última etapa da via metabólica de síntese de PHAs (SHEU *et al.*, 2000). ROMO *et al.*, (2007) 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 (1m, 20 cm 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.

Este trabalho relata a seleção de bactérias produtoras de PHA a partir de solo de rizosfera e do aderido à superfície das túberas de inhame, macaxeira e batata-doce nunca antes estudados.

2- RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Isolamento e coleção de bactérias da rizosfera e do solo aderido à superfície do 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 2.1). Foi observado que tanto no inhame quanto na macaxeira e 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 da rizosfera. Isto ocorreu possivelmente devido à 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 (ABBOTT, 2005).

A massa bacteriana neste ambiente pode atingir 36 mg de bactérias por grama de raiz. Dantas *et. al.*(2009) demonstraram por microscopia eletrônica que a densidade da população bacteriana pode chegar entre $120 - 160 \times 10^6$ UFC cm^{-2} de raiz. Por isso, quanto maior a quantidade de bactéria nesta 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 2.2).

2.2 PCR de colônia

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 descrito por GASSER *et. al.* (2009), observou-se que o DNA mais diluído, ou seja, ressuspensionado em 50µL de TE, foi de melhor qualidade e quantidade adequadas ao PCR do que a ressuspensão em 30µL, conforme estabelecido pelos autores. Além disso, após otimização da PCR de colônia a amplificação do gene *phaC* (500pb) foi obtida quando da utilização de 0,3µM de cada primer (GD e G2R) no mix de reação.

Todas as três amostras controles de bactérias foram positivas no PCR de colônia. 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 2.1). Destas, cinco amostras foram decorrentes do inhame, quatro da batata-doce e duas da macaxeira. Das 11 colônias bacterianas positivas, 10 delas foram obtidas do solo aderido à superfície da túbera e apenas uma bactéria positiva no foi isolada do solo da rizosfera (Tabela 2.3).

Apesar do 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*.

Não existe na literatura estudo de bactérias produtoras de PHA isoladas do solo aderido à superfície de nenhum tubérculo, sendo este trabalho inédito. 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. e morango - *Fragaria ananassa* L. (GASSER *et. al.*, 2009), cana-de-açúcar - *Saccharum officinarum* L. (LIMA *et. al.*, 1999), soja - *Glycine max* L. (CARMINATTI *et. al.* 2006), milho - *Zea mays* L., e gramínea - *Arundinaria aristulata* (VIALLARD *et. al.* 1998). Este trabalho é o 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 neste ambiente estejam em condições favoráveis à produção de PHAs, dada a grande disponibilidade de amido e intimidade direta entre a bactéria e 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% (MAIÉVES, 2010; RAMOS *et. al.* 1997).

Sabe-se que existem diferenças na estrutura e na quantidade do carbono disponível de acordo com as zonas da raiz. Esta diferenciação pode promover a formação de estruturas de comunidades distintas na rizosfera. Uma ampla proporção do carbono são disponibilizado na forma de substâncias solúveis em água, tais como: açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos (MARSCHNER *et. al.*, 2004). Esta constatação assevera que o ambiente da rizosfera apresenta intensa competição bacteriana além de diminuição relativa de fonte de carbono no decorrer de sua estrutura.

Existem vários estudos que utilizam PCR como método de detecção de bactérias potencialmente produtoras de PHA. Hein *et. al.* (2002) compararam, usando a PCR, dois genes codificadores da PHA sintase (*phaC1* e *phaC2*) de bactérias cultivadas em diferentes fontes de carbono. Romo *et al.* em 2007 com uso desses mesmos genes, conseguiram selecionar 35 novas cepas bacterianas produtoras de PHA. Gasser *et. al.* (2009) utilizaram o método de PCR de colônia para confirmação de bactérias potencialmente produtoras de PHA em culturas de beterraba, colza, trigo e morango.

Sheu *et. al.* (2000) desenvolveram mais *primers* do gene *phaC* utilizando 19 espécies de bactérias reconhecidamente produtoras de PHAs. 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 4 foram positivas após nested- PCR. O autor sugere que este protocolo é adequado para o rastreamento de grande número de isolados bacterianos ambientais.

2.3 Análise qualitativa da produção de PHAs

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 6h, 12h e 24h de incubação para coloração. Utilizou-se glicose como fonte de carbono considerando que Lima *et. al.* (1999) analisou a melhor fonte de carbono para produção de PHA. Dentre 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 na 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 24h (Figura 2.2). Por outro lado, duas amostras (F e 113) foram negativas na coloração por Sudan Black (Figura 2.3). Estas duas amostras negativas, indicaram que possivelmente mesmo apresentando o gene para a via metabólica do PHAs, isto 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 desta via alternativa de síntese de PHA para diferentes espécies bacterianas, tais como: tipo de fontes de carbono, tempo de incubação, pH, temperatura, oxigênio dissolvido no meio e limitações de nutrientes (BORGES, 2010). As demais bactérias apresentaram positividade ao corante em todas as etapas da coloração como pode ser visto na (Figura 2.2).

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. Este 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 (SUDESH et al., 2011).

2.4 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 seqüenciadas apresentaram mais de 97% de homologia com as seqüências do NCBI (National Center for Biotechnology Information). 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.

Dentre as oito bactérias positivas, três apresentaram alta homologia com a seqüência de nucleotídeos para espécies do gênero *Pseudomonas* - bac 1 (*P. stutzeri* 99%), bac 19 (*P. nitroreducens* 97%), bac 99 (*Pseudomonas* sp. 97%), corroborando com dados de outros autores que encontraram bactérias deste gênero com potencial produção de PHA em amostras de soro de leite (PANTAZAKI et. al., 2009), trigo, colza, beterraba (GASSER,2009) e cana-de-açúcar (LIMA et. al. 1999).

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.* (Tabela 2.3).

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) (NEVES, 2009). 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 (YAO *et. al.* 1999).

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 videiro (*betula celtiberica L.*) e larício (*Pinus nigra L.*) (BOYANDIN 2012). O bacilo Gram negativo *Agrobacterium sp.* naturalmente encontrado no solo, foi estudado produzindo PHA em plantas transgênicas de tabaco. *Bacillus cereus*, um bacilo Gram positivo teve esta propriedade confirmada a partir dos resíduos do processamento de mandioca como substrato (KRUEGER, 2009).

A bactéria 30 isolada do solo aderido á 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 as 6, 12 e 24h de crescimento (Figura 2.2). Esta bactéria é um bacilo Gram negativo, sendo descrita pela primeira vez com este 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 polihidroxialcanoatos.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Isolamento e Coleção de bactérias da rizosfera e do solo aderido à superfície do 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 (Pernambuco, Brasil). Em seguida, este material foi levado ao laboratório de Microbiologia do CAV/UFPE onde foram retirados 1g de solo da superfície da túbera e da rizosfera, respectivamente. Separadamente, as amostras foram misturadas à solução salina (NaCl) a 0,85% (p/v) estéril e em seguida agitadas em vortex para extração

de micro-organismos do solo durante 3 min. Logo após foi realizada uma diluição seriada na proporção de 1:10. Das diluições de 10^{-6} a 10^{-9} foi retirado 0,1mL e semeado em placas de Petri contendo meio agar nutriente. O crescimento foi acompanhado durante 24/48hs na estufa a 37°C.

Foram utilizadas como culturas controle positivo de PCR e produção de PHA, *Bacillus thuringiensis israelensis* (H-14 obtido do Institut Pasteur por meio do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM-FIOCRUZ), *Cupriavidus necator* (DSM545, obtida junto ao Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) e *Pseudomonas putida* (obtida na coleção de culturas da Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ).

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.

3.2 PCR de colônia

Extração de DNA

Foi utilizado o protocolo de extração de DNA descrito por (GASSER et. al., 2009). Após crescimento das bactérias do solo, o DNA foi extraído pelo método de fervura em microtubo utilizando-se 50µL de TE e uma alçada da colônia retirada da placa de Petri. A fervura foi realizada por 10min a 96°C, 1min 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*, conforme estabelecido em ROMO et. al., (2007). 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 551pb. No mix de reação (25µL) continha 0,5µM de mix de dNTPs, 1,25mM de MgCl₂, 0,3µM de cada *primer*, 0,25UI 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 seg., 55.5°C por 45 seg e 72°C por 1 min e o último ciclo em 72°C por 5 min. Para o Nested PCR, foi utilizado 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.

3.3 Produção Qualitativa de PHAs das bactérias por PCR de colônia

Preparação do inoculo para análise qualitativa

As bactérias foram cultivadas em meio caldo nutriente (CN) com excesso de fonte de carbono (glicose 20g/L), sob agitação de 600 rpm, a 30°C por 24 h. Após o crescimento, as bactérias foram centrifugadas por 20 minutos 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 minutos a 4000rpm. Finalmente o sedimento foi ressuspendido em meio mineral com restrição de fonte de nitrogênio, perfazendo o inóculo na proporção de 5% (v/v). A composição do meio mineral (MM) foi seguindo o protocolo de RAMSAY *et al.* (1990) e modificado por ARAGÃO *et al.* (1996) [Soluções de oligoelementos (H₃BO₃ 0,30g/L; CoCl₂.6H₂O 0,20 g/L; ZnSO₄.7H₂O 0,10g/L; MnCl₂.4H₂O 0,03g/L; NaMoO₄.2H₂O 0,03g/L; NiCl₂.6H₂O 0,02g/L; CuSO₄.5H₂O 0,01g/L), Solução I (ácido nitrolacético 0,19g/L; citrato ferroso de aminia 0,06g/L; sulfato de magnésio heptahidratado 0,50g/L; cloreto de cálcio dihidratado 0,01g/L; solução de oligoelementos 1,00ml/L) Solução II (Na₂PO₄.12H₂O 8,95g/L; KH₂PO₄ 1,50g/L) Solução III (fonte de carbono – glicose 40 g/L)].

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*, descrita pelo método de SHEEHAN & STOREY (1947). A etapa de análise qualitativa da produção de PHA por coloração de *Sudan Black* foi realizada após retirada das amostras do meio MM às 6h, 12h e 24 horas, 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.

3.4 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 1500pb do gene 16S do rRNA. O mix de reação de PCR para o gene rDNA 16S (25µL) foi: 200µM de mix de dNTPs, 3mM de MgCl₂, 1,5µL de cada primer (10pM) e 0,5 µL de Taq e 1µL 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 seg, 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 foi diluída em 5 mL de uma solução aquosa de glicerol a 40%. A suspensão de células na solução de glicerol foi distribuída em tubos de microcentrifuga (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 aplicada uma camada de óleo mineral estéril onde todo o meio ficou imerso. Para melhor preservação o material permaneceu em temperatura ambiente.

4. Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pelo auxílio financeiro.

5. Referências

ABBOTT, Lyn. **Soil biology basics**. 2005; em: <www.dpi.nsw.gov.au>. Acesso em: 12 jan. 2013.

ARAGÃO, S. Saiba como consumir inhame, batata doce e aipim de forma saudável. Disponível em: <http://g1.globo.com/jornal-hoje/noticia/2011/07/saiba-como-consumir-inhame-batata-doce-e-aipim-de-forma-saudavel.html>. Acesso em: 12 de dez. de 2012

ARAGÃO, G.M.F.; LINDLEY, N.D.; URIBELARREA, J.L.; PAREILLEUX, A. Maintaining a controlled residual growth capacity increases the production of polyhydroxyalkanoate copolymers by *A. eutrophus*. **Biotechnology Letters**, v.18, p.937-942, 1996.

BAIS, H. P. The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. **Annu. Rev. Plant Biol.**, Colorado, p.233-266, 2006.

BOYANDIN, A.N. Biodegradation of Polyhydroxyalkanoates by Soil Microbial Communities of Different Structures and Detection of PHA Degrading Microorganisms. **Applied Biochemistry And Microbiology**, Russia, v. 48, n. 1, p.28-36, 2012.

BORGES, V.S.R. **Controlo microbiológico de culturas mistas para a produção de PHA**. 2010. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Aveiro, Aveiro, 2010.

CARMINATTI, C. et al. Produção de Polihidroxialcanoatos (PHAs). **Centro tecnológico** – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

CHEN, G.G. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. **Chem. Soc. Rev**, China, n. 38, p.2434-2446, 2009.

DANTAS, J.S. *et al.* Interações entre grupos de microorganismos com a rizosfera. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, São Paulo, v. 2, n. 2, p.1, 2009.

EMBRAPA. **Sistema de Produção da Batata-Doce**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Batata-doce/SistemaProducaoBatata-doce/index.htm>>. Acesso em: 21 nov. 2012.

GASSER, I.; MULLER, H.; BERG, G.. Ecology and characterization of polyhydroxyalkanoate-producing microorganisms and its plants. **Fems Microbiol. Ecol**, n. 70, p.142-150, 2009.

HEIN, S.; PALETTA, J. R. J.; STEINBUCHER, A. Cloning, characterization and comparison of the *Pseudomonas mendocina* polyhydroxyalkanoate synthases PhaC1 and PhaC2. **Appl Microbiol Biotechnol** (2002) 58:229–236

HOU, W.C. *et al.* Antioxidant activities of dioscorin, the storage protein of yam (*Dioscorea batatas* Decne) tuber. **Journal of Agric. and Food Chemistry**. n.49: 4956-4960, 2001.

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

LEONEL, M.; JACKEY, S.; CEREDA, M.P. Processamento Industrial de Fécula de Mandioca e Batata Doce: um estudo de caso. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, p.343-345, 1998.

LIMA, T.C.S.; GRISI, B.M.; BONATO, M.C. Bacteria isolated from sugarcane agroecosystem: their potential production of polyhydroxyalkanoates and resistance to antibiotics. **Rev. Microbiol.** 30:214-224, 1999.

MAIEVES, H.A. **Caracterização Física, Físico Química e Potencial Tecnológico de novas Cultivares de Mandioca**. 2010. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal De Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; YANG, C.H. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. **Plant And Soil**, Califórnia, p.199-208, 2004.

MESQUITA, A.S. Inhame na Bahia: A produção no caminho da competitividade. **Inhame e Taro. Sistemas de Produção Familiar**: INCAPER, Vitória do Espírito Santo, p.279, 2002.

NEVES, A.L.P. **Uso de enzimas na extração de polihidroxicanoatos sintetizados por *Cupriavidus necator***. 2009. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal De Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

OLIVEIRA, C.A. *et al.* Diversidade bacteriana da rizosfera de genótipos de milho contrastantes na eficiência de uso de fósforo. **Pesq. Agropec. Bras**, Brasília, v. 44, n. 11, p.1473-1482, nov. 2009.

PANTAZAKI, A.A. *et al.* Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8. **Process Biochemistry**, Grécia, n. 44, p.847-853, 2009.

PELCZAR, Jr.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. *Microbiology – Concepts and Applications*. McGraw Hill – New York. p. 896. 1993.

RAMOS FILHO, M.M.; RAMOS, M.I.L.; HIANE, P.A. Avaliação química do inhame (*Colocasia esculenta* L. Schott) Cultivado em solo alagadiço na região pantaneira de Mato Grosso do Sul. **B.ceppa**, Campo Grande, v. 2, n. 15, p.175-186, 1997.

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

ROMO, D.M.R; GROSSO, M.V.; SOLANO, N.C.M.; CASTAÑO, D.M. A most effective method for selecting a broad range of short and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate producing microorganisms. **Electronic J. Biotechnology**. 10: 348-357, 2007

SHEEHAN H.L; STOREY, G.W. An improved method of staining leukocyte granules with Sudan Black. **B. J Pathol Bacteriol**, v.59, p336, 1947.

SHEU, D.S.; WANG, Y.T; LEE, CY. Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. **Microbiology**. 146:2019-2035, 2000

SILVA, L.F.; GOMEZ, J.G.C.; ROCHA, R.C.S.; TACIRO, M.K.; PRADELLA, J.G.C. Produção biotecnológica de polihidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Quim. Nova.** 30: 1732-1743, 2007

SUDESH, K. *et al.* Synthesis of polyhydroxyalkanoate from palm oil and some new applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, Malásia, p.1373-1386, 29 jan. 2011.

THELLEN, C.; CHENEY, S.; RATTO, J.A. Melt Processing and Characterization of Polyvinyl Alcohol and Polyhydroxyalkanoate Multilayer Films. **Journal Of Applied Polymer Science**, Massachusetts, v. 127, p.2314-2324, 2013.

VALLE, T.L. Mandioca de mesa, macaxeira ou aipim: a hortaliça negligenciada pelo Brasil. **Instituto Agrônomo**, Campinas, p.1-11, 2007.

VIALARD, V., POIRIER, I., COURNOYER, B., HAURAT, J., WIEBKIN, S., OPHELI-KELLER, K., and BALANDREAU, J. (1998) *Burkholderia graminis* sp. nov., a rhizospheric *Burkholderia* species, and reassessment of [*Pseudomonas*] *phenazinium*, [*Pseudomonas*] *pyrocinia* and [*Pseudomonas*] *glathei* as *Burkholderia*. *Int J Syst Bacteriol* **48**: 549–563.

YAO, J. *et al.* Production of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas nitroreducens*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, China, v. 75, p.345-349, 1999.

ZACHOW, C.; TILCHER, R.; GBERG, G. Sugar beet associated bacterial and fungal communities show a high indigenous antagonistic potencial against plant pathogens. **Microb. Ecol.** 55: 119-129, 2008.

ZINN, M; WITHOLT, B.; EGLI, T. Occurrence, synthesis and medical applications of bacterial polyhydroxyalkanoate. **Adv. Drug. Deliv. Rev.** 53: 5-21, 2001.

Apêndice

Tabela 2.1. Contagem de colônias bacterianas em cada amostra de solo da rizosfera ou túbera em cada tipo vegetal:

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

Tabela 2.2. 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 a túbera	41	14	39
Total de colônias:	79	47	88

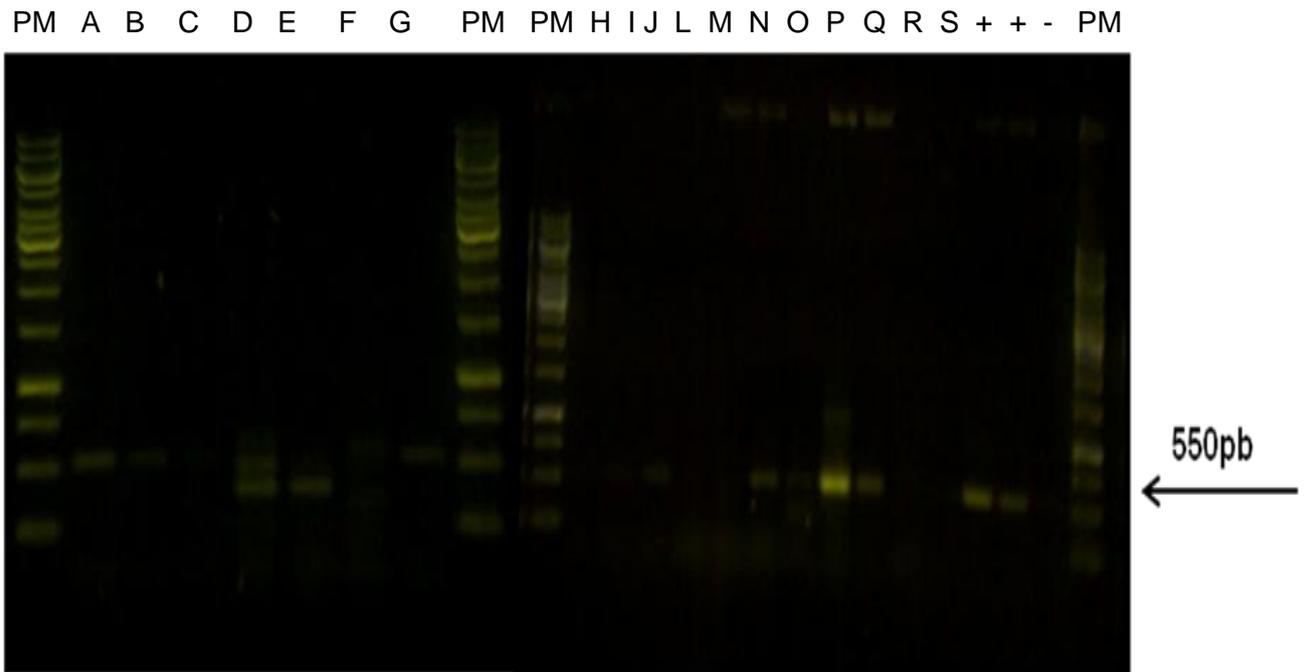


Figura 2.1. Eletroforese em gel de agarose a 1% do Nested - PCR de colônia, evidenciando produtos de amplificação de 550pb, correspondentes às amostras positivas (A – Bac. 1; B – Bac. 4; D – Bac.19; E – 30; G – Bac.99; N – Bac. F; P – Bac. H; Q – Bac. C) controles positivos (+ *Cupriavidus necator* e *Pseudomonas putida*), negativo (- mix sem DNA) (seta). Nas extremidades observa-se o padrão de peso molecular 1kb (PM).

Tabela 2.3. 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>Microvirga 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%

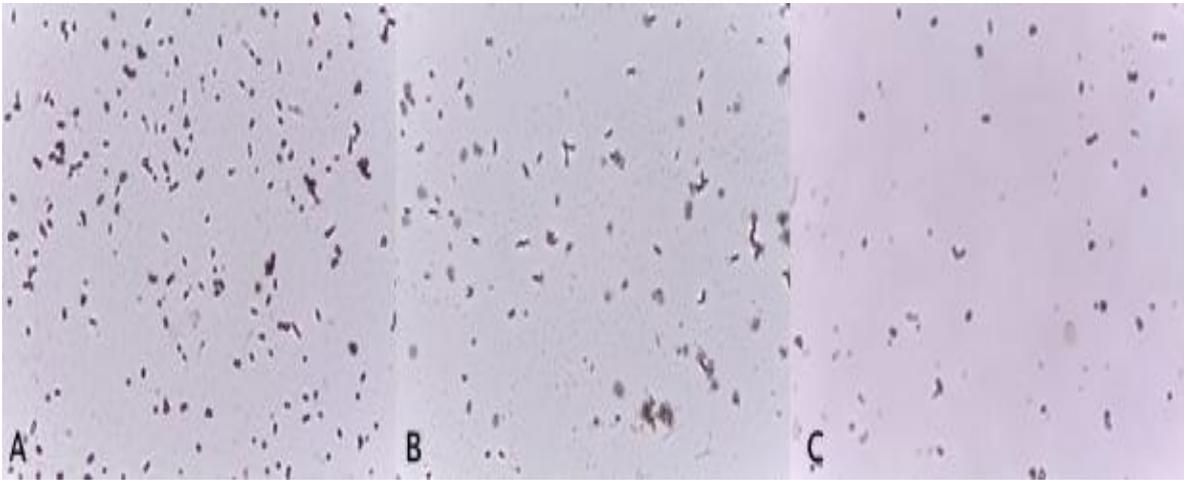


Figura 2.2. Bactéria 30 (*Microvirga flocculans*) positiva na coloração de Sudan Black nos tempos de 6 hs (A), 12 hs (B) e 24 hs (C), ao microscópio ótico (100x).

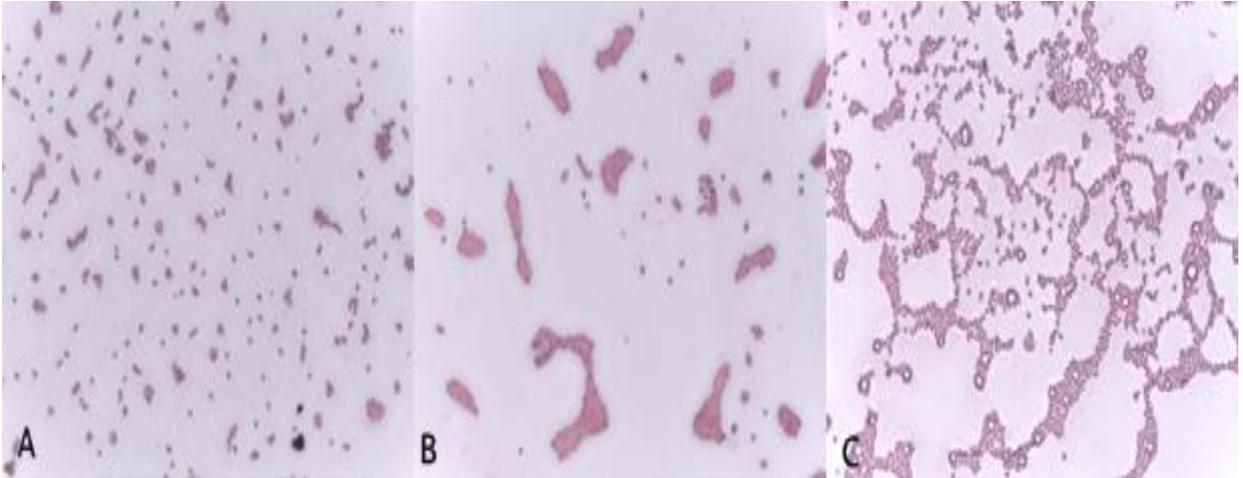


Figura 2.3. Bactéria 113, negativa em coloração de Sudan Black nos tempos de 6 hs (A), 12 hs (B) e 24 hs (C), ao microscópio ótico (100x).

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Inhame, macaxeira e batata-doce são vegetais importantes no Nordeste brasileiro. O solo da rizosfera desses tubérculos é um ambiente rico em bactérias que podem produzir metabólitos com diversas aplicações biotecnológicas, a exemplo de polihidroxicanoatos (PHAs), polímeros biodegradáveis produzidos a partir da hidrólise do amido e utilizados na produção de plásticos. Não existe na literatura dados de isolamento e identificação de bactérias de rizosfera dos três vegetais supracitados, bem como não havia sido explorada ainda o solo aderido às túberas, o que torna esse trabalho inédito, aplicando metodologias reconhecidas como eficazes para seleção e identificação de bactérias, tais como: coloração com Sudan Black, PCR de colônia e seqüenciamento do gene 16S rRNA.

Sendo assim, os resultados obtidos com esse trabalho permitiram concluir que:

Apesar do solo de rizosfera apresentar maior diversidade bacteriana após semeio, as bactérias produtoras de PHA foram isoladas do solo aderido à superfície da túbera para os três vegetais em estudo;

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;

Dentre as bactérias positivas na PCR e Sudan Black, oito foram identificadas por seqüenciamento ao nível de gênero ou espécie, tais 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 esta característica, sendo isolada do solo aderido à superfície da túbera de batata-doce.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, Lyn. **Soil biology basics**. 2005; Disponível em: <www.dpi.nsw.gov.au>. Acesso em: 12 jan. 2013.
- ANDRADE, G. P. **Diagnóstico fitossanitário da cultura do inhame (*dioscorea spp.*) em áreas produtoras do nordeste do Brasil**. 2007. 88f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.
- ARAUJO, F. F.; HENNING, A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 21, p. 1639-1645, 2005.
- ARAUJO, M. C.. **Detecção de micotoxina patulina em inhame com podridão verde**. 2011. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2011.
- BAIS, H. P et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annu Rev. Plant Biol**, n. 57, p.234-266, 2006.
- BARREIRA, P. **Batata-doce: uma das doze mais importantes culturas do mundo**. São Paulo: Editora Ícone, 1986. 92 p.
- BERWANGER, A. L. S.. **Produção e caracterização de biopolímero sintetizado por *Sphingomonas capsulata***. 2005. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Uri - Campus Erechim, Rio Grande do Sul, 2005.
- CAETANO, A. C. G.; MADALENO, L. L.. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. **Ciência & Tecnologia**, Jaboticabal, v. 2, n. 1, p.27-37, 2011.

CARMINATTI, C. et al. Produção de Polihidroxicanoatos (PHAs). Boletim técnico. **Centro tecnológico** – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

CHASATEIN, Onuma; URAIRONG, Hathairat; RODTONG, Sureelak. Development of cultivation media for polyhydroxyalkanoates accumulation in bacterial cells isolated from cassava pulp. **Research Journal Of Biological Sciences**, Tailândia, n. 7, p.31-37, 2012.

COSTA, M. R. et al. Similaridade Genética de Cultivares de Mandioca (*Manihot esculenta*) por Meio de Marcadores Rápidos. **Ciênc. agrotec.**, Lavras. V.27, n.1, p.158-164, jan./fev., 2003.

COURSEY, D. G. **Descriptors for yam** (*Dioscorea* sp.), Rome, IBPGR Secretariat, 19p, 1980.

DANTAS, J. S et al. Interações entre grupos de microorganismos com a rizosfera. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v. 2, n. 2, 2009.

DEGELAU, M. A. et. al. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalysis A: General**. 281 (1-2): 225-23. 1995

DOOMBOS, R. F. LOON, L. C. V. BAKKER, P. A. H. M. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review **Agron. Sustain. Dev.** (2012) 32:227–243

EMBRAPA. **Rizosfera**. Disponível em: <<http://www.cnpma.embrapa.br/>>. Acesso em: 19 ago. 2012.

EMBRAPA. **Sistema de Produção da Batata-Doce**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Batata-doce/SistemaProducaoBatata-doce/index.htm>>. Acesso em: 21 nov. 2012.

FAO. **FAOSTAT, DATABASE, CROP PRIMARY**. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 16 dez. 2011.

FONSECA, G. G. **Produção de polihidroxicanoatos por *Escherichia coli* recombinante**. 2003. 120 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

FOX, M. E.; HOWLETT, B. J.. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. **Current Opinion In Microbiology**, n. 11, p.481-487, 2008.

FRISVAD, J. C; A SAMSON, R.. Polyphasic taxonomic of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies In Mycology**, n. 49, p.1-174, 2004.

GALANTE, A. **Alimentos Fontes de Energia**. Disponível em: <www.folha.com.br>. Acesso em: 30 dez. 2012.

GARCÍA, F. Resistencia bacteriana a antibióticos. **Acta Médica Costarricense**, Costa Rica, n. , p.1-3, 2001.

GARRIDO, M. D. S. **Manejo agroecológico da cultura do inhame**: produtividade, qualidade, controle de nematóide e manchas foliares. 2005. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, Cruz Das Almas, Bahia, 2005.

GASSER, I.; MULLER, H.; BERG, G.. Ecology and characterization of polyhydroxyalkanoate-producing microorganisms and its plants. **Fems Microbiol. Ecol**, n. 70, p.142-150, 2009.

GLAZER A.N.; NIKAIDO, H. **Microbial Biotechnology**: Fundamentals of Applied Microbiology, 2a Edição. New York: Cambridge University Press, 2007, 577p.

GOMEZ, J. G. C.; BUENO-NETTO, C. L.. **Biotecnologia industrial**: processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

KIRIACHEK, Soraya Gabriela et al. Regulação do desenvolvimento de micorrizas arbusculares. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, São Paulo, v. 33, n. , p.1, 2009.

KRUEGER, Cristhiane L.. Bioconversion of cassava starch by-product into *Bacillus* and related bacteria polyhydroxyalkanoates. **Electronic Journal Of Biotechnology**, Chile, v. 15, p.1-13, 2012.

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

KUNG, S.S. et al. Isolation of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria using a combination of phenotypic and genotypic approach. **Letters In Applied Microbiology**, Taiwan, n. 44, p.364-371, 2007.

HARVEY,P.J.; BOULTER,D. isolation and characterization of the storage protein of yam tubers (*Dioscorea rotundata*). **Phytochemistry**. n.22:1687-1683, 1983.

HECK, M. G.. **Produção de Compostos Antimicrobianos Provenientes do Metabolismo de *Streptomyces* sp. Linhagem 2S.** 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

HOU , W.C. et al. Antioxidant activities of dioscorin, the storage protein of yam (*Dioscorea batatas* Decne) tuber. **Journal of Agric. and Food Chemistry**. n.49: 4956-4960, 2001.

HSU, F. L et al. Both dioscorin the tuber storage protein of yam (*Dioscorea alata* cv. Tainong n.1) and its peptic hydrolases exhibited angiotensin converting enzyme inhibitory activities. **Journal Of Agric. And Food Chemistry**, n. 50, p.6109-61013, 2002.

IBGE, Instituto de Geografia e Estatística -. **Produção Agrícola Municipal:** culturas temporárias e permanentes. Rio de Janeiro: IBGE, 2010.

IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola:** Pesquisa Mensal de Previsão e Acompanhamento das Safras Agrícolas no Ano Civil. 2. ed. Rio de Janeiro: Printed In Brazil, 2012.

LEE, S. Y.. Plastic bacteria: progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Trends Biotechnol**, v. 14, n. , p.431-438, 1996.

LÍCIO, D. C. P.. **Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos e caracterização molecular de sua PHA sintase.** 2011. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

LIMA, T. C. S.; GRISI, B. M.; BONATO, M. C. M.. Bacteria isolated from a sugarcane agroecosystem: their potential production of polyhydroxyalcanoates and resistance to antibiotics. **Revista de Microbiologia**, João Pessoa, n. 30, p.214-224, 1999.

MACRE, R. M.; WILKINSON, J. F.. The influence of culture conditions of poly-3-hydroxybutyrate extracted from different bacteria. **J. Bacteriol**, n. 89, p.245-251, 1958.

MARQUES, J. A. et al. Avaliação da Mandioca e Seus Resíduos Industriais em Substituição ao Milho no Desempenho de Novilhas Confinadas. **Rev. Bras. Zootec.**, Maringá, v. 5, n. 29, p.1528-1536, 2000.

MATSUDA, T. S.. **Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos de cadeia curta e média a partir de óleos vegetais.** 2009. 84 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Departamento de Instituto Butantan/ipt, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MESQUITA, A. S. Inhame na Bahia: A produção no caminho da competitividade. **Inhame e Taro. Sistemas de Produção Familiar:** INCAPER, Vitória do Espírito Santo, p.279, 2002.

MIRANDA, J. E. C. **A Cultura da Batata- doce.** Brasília: EMBRAPA-SPI, p. 75-77, 1995.

MOTA, R. A. et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal Of Veterinary Research And Animal Science**, São Paulo, v. 42, n. , p.1, 2005.

MUELLER, S.; BLEY, T.; BABEL, W.. Adaptive responses of *Ralstonia eutropha* to feast and famine conditions analysed by flow cytometry. **J. Biotechnol**, n. 75, p.81-97, 1999.

NAVAL, Liliana Pena. **Aplicação de esgoto para irrigação de cultivares de batata-doce para produção de biomassa.** Disponível em: <http://www.finep.gov.br/prosab/4_esgoto_uft.htm#resumo>. Acesso em: 21 nov. 2012.

NODA, T.; TAKAHATA, Y.; NAGATA, T. Developing changes in properties of sweet potato starches. **Starch/Stärke**, v. 44, n. 11, p. 405-409, 1992.

OLIVEIRA, F. C. et al. Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, Rio de Janeiro, p.633-638, 2007.

OLIVEIRA, I. S.; MOURA, R. M.; MAIA, L. C.. Considerações sobre a cultura do inhame da costa e podridão-verde, principal causa de perdas durante o armazenamento. **Anais da Academia Pernambucana de Ciências Agrônômicas**, Recife, v. 2, n. , p.90-106, 2005.

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; GRABOGGINI, F. F.. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. **Multiciência**, Campinas, v. 7, p.01, out. 2006.

PEIXOTO, N.; MIRANDA, J. E. C. de. **O cultivo da batata-doce em Goiás**. Goiânia. ENGOPADDI, 1984. 24 p.

PERES, Lázaro E. P.. **Metabólito Secundário**. Disponível em: <<http://www.daneprairie.com>>. Acesso em: 12 set. 2012.

RAMSAY, B.A. Physiological factor affecting PHA production. Physiology, kinetics, production and use of biopolymers. **Proceedings**, Austria, p.9-17, 1994.

REHM, B. H. Polyester synthases: natural catalyst for plastics. **Journal of Biochemical**, set. 2003, 58p. Disponível em: <http://www.biochemj.org/bj/imps_x/pdf/BJ20031254.pdf>. Acessado em 12, março 2013.

ROMO, D. M. R. et al. A most effective method for selecting a broad range of short and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate producing microorganisms. **Electronic J. Biotechnology**, n. 10, p.348-357, 2007.

ROSA, D. S.; FRANCO, B. L. M.; CALIL, M. R.. Biodegradabilidade e Propriedades Mecânicas de Novas Misturas Poliméricas. **Ciência & Tecnologia**, São Paulo, v. 11, n. 2, p.82-88, 2001.

ROSAS, O. R. et al. Production and characterization of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 from glucose, an unrelated carbon source. **Microbiology**, Canadá, n. 53, p.840-851, 2007.

SANTOS, E. S. Inhame (*Dioscorea* spp.): Aspectos básicos da cultura. **Sebrae**: EMEPA-PB, João Pessoa, p.158, 2002.

SANTOS, Es.. Inhame (*Dioscorea* spp.): aspectos básicos da cultura. Emepa-pb: **Sebrae**, 1996.

SCHULTZ, A.R. **Introdução ao estudo da botânica sistemática**. 3 ed.. Porto Alegre; Globo, 1968. v. 2.

SHEU, D. S. et al. Rapid detection of polyhydroxyalkanoateaccumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. **Microbiology**, n. 146, p.2019-2025, 2000.

SILVA, G. K. C. **Avaliação da ação de diferentes antibióticos sobre o crescimento de micro-organismo contaminantes do processo fermentativo para obtenção do etanol**. 2010. 51 f. Monografia (Graduação) - Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, Araçatuba, 2010

SILVA, L. F. et al. Produção biotecnológica de polihidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**, n. 30, p.1732-1743, 2007.

SOARES, T.K.; MELO, A.S.; MATIAS, E.C.; **Cultura da Batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.)** , disponível em<http://www.emepa.org.br/batata_doce.php>, acesso em 15/04/2007.

STEINBUCHER, A.; FUCHTENBUSCH, B.. Bacterial and other biological systems for polyester production. **Trends Biotechnol**, v. 16, p.419-427, 1998.

STRELEC, T.. **Isolamento de bactérias produtoras de biossurfactantes ramnolipídios e polihidroxialcanoatos e avaliação da relação metabólica no processo de síntese**. 2006. 120 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

TAKAHASHI, Rodrigo Yoji Uwamori. **Bioprospecção de bactérias marinhas para a produção de polihidroxicanoato**. 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2012.

TAKAKI, Galba Maria de Campos et al. Characterization of chromobacterium violaceum isolated from Pace River, Pernambuco, Brazil. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Recife, n. 1, p.1-9, 2006.

TYO, K.E.; ZHOU, H; STEPHANOPOULOS, G. N. 2006. High-throughput screen for poly-3-hydroxybutyrate in *Escherichia coli* and *Synechocystis sp.* strain PCC6803. **Applied and Environmental Microbiology**. 72 (5): 3412-3417

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TURTLEBIO. **PHA**. Disponível em: <<http://www.turtlebio.com/br/bioplasticos/pha/>>. Acesso em: 19 dez. 2012.

UREN, N. C.. Types, amounts and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil grown plants. **LLC**, New York, p.19-40, 2000.

VIEIRA, Fabiana do Carmo. **Efeito do tratamento com calor e baixa umidade sobre características físicas e funcionais dos amidos de mandioca-salsa, batata-doce e gengibre**. 2004. 122 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

VINHAS, G. M. et al. Estudo das propriedades e biodegradabilidade de blendas de poliéster/amido submetidas ao ataque microbiano. **Química Nova**, Recife, v. 30, n. 7, p.1584-1588, 2007.

WALKER, Travis S. et al. Root Exudation and Rhizosphere Biology. **Plant Physiology**, Ohio, p.44-51, maio 2003.

ZINN, M.; WITHOLT, B.; EGLI, T.. Occurrence, synthesis and medical applications of bacterial polyhydroxyalkanoate. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, n. 53, p.5-21, 2001.

ANEXO – NORMAS DA REVISTA

Submission checklist for *Letters in Applied Microbiology*

Required information

- Are all persons named in the manuscript entitled to authorship and have they each approved the final version of the submitted manuscript?
- All authors must warrant that they have the authority to publish the material.
- All authors must warrant that the paper, or one substantially the same, has neither been published previously, nor is being considered for publication elsewhere.
- Can you suggest at least two possible reviewers (not belonging to your institution) for your manuscript?
- Have you prepared your covering letter?
- Are you referencing material from a paper in press? (If so, please supply the proof electronically with your manuscript files.)

The manuscript

- Is the text double-spaced, with continuous line numbering and pages numbered?
- Does the structure of your manuscript comply with the author guidelines, as follows: Significance and Impact of the Study (max. 100 words); Abstract (max. 200 words); Introduction; Results and Discussion; Materials and Methods; Acknowledgements; References; Supporting Information; Tables; Figures.
- Is your manuscript under the **word limit** of 4000 words (including references, and taking into account the space required for tables and figures)?
- On the front page have you included the **title**, **name(s) of author(s)** and **place(s)** where the work was done, an **abbreviated running headline** not exceeding 35 letters and spaces and the **name and complete contact details** of the corresponding author?
- Are SI units used with negative indices e.g. ml⁻¹ not /ml, mol l⁻¹ not M or N? Note that the centrifugation unit should be given as *g* not rpm.
- Have you included relevant ethical statements and cited authorisation number/certificates as appropriate?

References

- Does the style of references comply with the author guidelines?
- In the text, multiple references should be cited in chronological order.
- In the text, use 'and' not '&' (e.g. Smith and Jones 1990).
- In the References section, journal titles should be abbreviated according to the *Index Medicus*.
- In the References section, references should not be numbered.

Figures and tables

- Are tables and table legends placed after the References section and numbered with an Arabic number (e.g. Table 1)?
- Are figures either placed after the References section or provided as separate files, and numbered with an Arabic number (e.g. Figure 1)?
- Have you checked that figures do not contain data labels and these are instead included in the legend?
- Have you checked that a list of figure legends is included after the References section?

- Have you prepared the original figures in electronic form and at high enough resolution? Wiley- Blackwell recommends 600 dpi Encapsulated PostScript (EPS) for line art, and 300 dpi TIFF for continuous tone, but figures can also be set from Word (.doc) and other formats.

Supporting information

- Have you included the files for any relevant supporting information?
- Are legends/explanations provided for these files, and labelled as e.g. Table S1, Video S1?

-  Save to My Profile
-  Get Sample Copy
-  Recommend to Your Librarian

JOURNAL MENU

[Journal Home](#)

FIND ISSUES

[Current Issue](#)
[All Issues](#)
[Virtual Issues](#)

FIND ARTICLES

[Early View](#)
[Accepted Articles](#)

GET ACCESS

[Subscribe / Renew](#)

FOR CONTRIBUTORS

[OnlineOpen](#)
[Author Guidelines](#)
[Submit an Article](#)

ABOUT THIS JOURNAL

[Society Information](#)
[News](#)
[Overview](#)
[Editorial Board](#)
[Permissions](#)
[Advertise](#)
[Contact](#)

Letters in Applied Microbiology

© 2013 The Society for Applied Microbiology



Edited By: J.-Y. Maillard

Impact Factor: 1.622

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2011: 78/114 (Microbiology); 101/158 (Biotechnology & Applied Microbiology)

Online ISSN: 1472-765X

Associated Title(s): [Journal of Applied Microbiology](#)

Author Guidelines

Letters in Applied Microbiology provides for the rapid publication of short, high quality papers in the broad field of applied microbiology, including environmental, food, agricultural, medical, pharmaceutical, veterinary, soil, antimicrobials, water and biodeterioration. Advances in rapid methodology are a particular feature. The Journal reflects developments in biotechnology in such fields as applied microbial genetics, immunodiagnosis and fermentation science.

In May 2012, *Letters in Applied Microbiology* changed its focus to emphasise the significance and impact of the work presented. [Click here to read the Editorial announcing the new focus.](#)

CONTACTS AND QUICK LINKS

[Author submission checklist](#)

[Contact the Managing Editor](#)