

DANIELA CAROLINA PINTO E LÍCIO

**Isolamento de bactérias produtoras de
polihidroxialcanoatos e caracterização
molecular de sua PHA sintase**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/
IPT, para obtenção do Título de Mestre
em Biotecnologia.

São Paulo
2011

DANIELA CAROLINA PINTO E LÍCIO

**Isolamento de bactérias produtoras de
polihidroxialcanoatos e caracterização
molecular de sua PHA sintase**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/
IPT, para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador:
Dr. José Gregório Cabrera Gomez

Versão original

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Lício, Daniela Carolina Pinto e.

Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxicanoatos e caracterização molecular de sua PHA sintase / Daniela Carolina Pinto e Lício. -- São Paulo, 2011.

Orientador: José Gregório Cabrera Gomez.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Polihidroxicanoatos.

Versão do título para o inglês: Isolation of polyhydroxyalkanoates producing bacteria and molecular characterization of the PHA synthases.

Descritores: 1. Polihidroxicanoatos 2. Nile Red A 3. Sudan Black B 4. Isolamento de linhagens bacterianas 5. *Pseudomonas* 6. PHA sintases I. Gomez, José Gregório Cabrera II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0138/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas


Candidato(a): Daniela Carolina Pinto e Lício.


Título da Dissertação: Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos e caracterização molecular de sua PHA sintase.

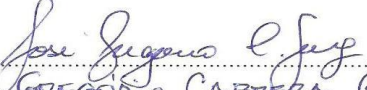
Orientador(a): José Gregório Cabrera Gomez.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a21...../.....09...../.....2011....., considerou

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome:Beny Spira.....
Instituição:ICB.....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome:Gabriel Padilla.....
Instituição:ICB.....

Presidente: Assinatura: .....
Nome:JOSE GREGORIO CABRERA GOMEZ.....
Instituição:ICB-USP.....



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 288, referente ao projeto intitulado: "*Isolamento de linhagens bacterianas produtoras de polihidroxicanoatos e detecção de PHA sintases*" sob a responsabilidade de **Daniela Carolina Pinto e Lício**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 19 de fevereiro de 2009.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Vice-Coodenador da CEPsh - ICB/USP

À minha mãe,
família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor José Gregório Cabrera Gomez pelos ensinamentos de inestimável valor e pela paciência.

À Professora Doutora Luiziana Ferreira da Silva pelo apoio e orientação.

Aos colegas do laboratório de Fisiologia de Microrganismos.

À minha mãe Maria de Fátima Pinto, porque sem sua ajuda nada disso teria acontecido, ao meu pai Sérgio Paulo Lício (*in memoriam*) e à minha família.

Aos amigos Aelson Luiz dos Santos, Johanna Katerine Bocanegra Rodriguez, Kelli Cardoso Lopes Rodrigues, Maria Normandia de Lima, Mateus Schreiner Garcez Lopes, Nathália Fernandes Gonçalves Machado, Yeimy Paola Galindo Rozo, Rafael Costa Santos Rocha e Rogério de Sousa Gomes pela amizade e cooperação diária com este trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa concedida.

Obrigada por tudo.

Eu nada espero.

RESUMO

Lício DCP. Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxicanoatos e caracterização molecular de sua PHA sintase [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Um total de 1.520 bactérias isoladas a partir de amostras de lodo de esgoto doméstico e de solo de área preservada foi avaliado para a produção de polihidroxicanoatos (PHA) com os corantes lipofílicos Nile Red A e Sudan Black B, permitindo a detecção de 261 isolados. Ensaio de produção de PHA revelaram isolados produtores de P3HB apresentando valores superiores à linhagem *Burkholderia sacchari* LFM101 e valores de produção de PHA_{MCL} superiores à linhagem *Pseudomonas* sp. LFM046, além de 6 isolados produtores da mistura de P3HB e PHA_{MCL}. Os primers RECF1/RECR permitiram a detecção específica do gene *phaC* do tipo I de três bactérias produtoras de P3HB, e os primers P613F/P613R detectaram genes *phaC* do tipo I em bactérias produtoras da mistura de polímeros. Um fragmento de DNA de 4 kpb de uma biblioteca genômica do isolado RMP1058BII, produtor da mistura de P3HB e PHA_{MCL}, foi detectado utilizando os primers P613F/P613R, e a expressão desse fragmento de DNA uma linhagem de *Pseudomonas* mutada no gene *phaC* levou à produção de pequena quantidade de P3HB.

Palavras-chave: Polihidroxicanoatos. Nile Red A. Sudan Black B. Isolamento de linhagens bacterianas. PHA sintases. *Pseudomonas*.

ABSTRACT

Lício DCP. Isolation of polyhydroxyalkanoates producing bacteria and molecular characterization of their PHA synthase. [Masters thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

A total of 1520 isolates from domestic sewage sludge or soil of preserved area were evaluated in regards of PHA production using the lipophilic Nile Red A or Sudan Black B dyes, allowing the detection of 261 isolates. PHA production experiments revealed P3HB producing isolates at higher amounts than the strain *Burkholderia sacchari* LFM101 and PHA_{MCL} production rates higher than those presented by the strain *Pseudomonas* sp. LFM046, besides 6 isolates producing P3HB and PHA_{MCL} mixtures. The RECF1/RECR primers allowed the specific type I *phaC* genes detection in three P3HB producing bacteria and the P613F/P613R primers detected type I *phaC* genes in the polymer mixture producing isolates. A 4 kbp DNA fragment from a genomic library of the isolate RMP1058BII was detected using the P613F/P613R primers. This DNA fragment expression in a *Pseudomonas* strain mutated in *phaC* gene led to the production of small amounts of P3HB.

Key words: Polyhydroxyalkanoates. Nile Red A. Sudan Black B. Isolation of bacterial strains. PHA synthases. *Pseudomonas*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema da síntese de PHA em bactérias.....	24
Figura 2. Cromatogramas exibindo o perfil da composição monomérica típica de diferentes classes de PHA.....	55
Figura 3. Comparação do número de isolados detectados por Nile Red A ou Sudan Black B.....	56
Figura 4. Variação da biomassa total (X_t), biomassa residual (X_r) e PHA produzido pelo isolado RMP1058BII no ensaio em biorreator com glicose.....	58
Figura 5. Variação da composição monomérica do PHA produzido pelo isolado RMP1058BII no ensaio em biorreator com glicose.....	59
Figura 6. Testes com os primers phaCF1/phaCR4.....	61
Figura 7. Testes com os primers I-179L/I-179R.....	61
Figura 8. Regiões flanqueadas pelos primers utilizados na detecção de PHA sintases da classe II.....	62
Figura 9. Primeira etapa da reação de semi-nested PCR com os primers DEV15L/I-179R.....	63
Figura 10. Segunda etapa da reação de semi-nested PCR com os primers I-179L/I-179R.....	63
Figura 11. Testes com os primers RECF1/RECR, desenhados para PHA sintases da classe I.....	66
Figura 12. Testes com os primers RECF2/RECR, desenhados para PHA sintases da classe I.....	67

Figura 13. Testes com os primers P613F/P613R, desenhados para PHA sintases da classe I com organização do operon <i>phaBAC</i>	69
Figura 14. Digestão do clone contendo um fragmento de cerca de 4kb da biblioteca genômica do isolado RMP1058BII.....	70
Figura 15. Testes de PCR com o clone selecionado utilizando os primers da literatura e os primers deste trabalho.....	71
Figura 16. Cromatogramas da análise dos ensaios de acúmulo de PHA pela linhagem LFM461 abrigando o plasmídeo contendo o inserto de interesse.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Potencial técnico de substituição de termoplásticos de origem petroquímica por polímeros de amido, PLA e PHA.....	19
Tabela 2 – Potencial técnico de produção de PHA para a substituição de polímeros termoplásticos e termorrígidos petroquímicos com base no consumo global para o ano de 2007.....	19
Tabela 3 – Linhagens do gênero <i>Pseudomonas</i> produtoras de misturas de P3HB e PHA _{MCL} estudadas quanto às classes de PHA sintases presentes.....	30
Tabela 4 – Primers utilizados para as reações de PCR com os isolados produtores de P3HB e PHA _{MCL}	35
Tabela 5 – Condições de reação utilizadas na PCR com o par de primers phaCF1/phaCR4.....	35
Tabela 6 – Condições de reação utilizadas na PCR com o par de primers I-179L/I-179R.....	36
Tabela 7 – Condições de reação utilizadas na PCR com o par de primers DEV15L/I-179R.....	36
Tabela 8 – Primers desenhados com base no alinhamento de sequências de genes de diferentes PHA sintase da classe I.....	37
Tabela 9 – Condições de reação utilizadas na PCR com o par de primers RECF1/RECR.....	37
Tabela 10 – Condições de reação utilizadas na PCR com o par de primers RECF2/RECR.....	37

Tabela 11 – Condições de reação utilizadas na PCR com o par de primers P613F/P613R.....	38
Tabela 12 – Testes em meio sólido contendo glicose como fonte de carbono.....	43
Tabela 13 – Testes em meio sólido contendo octanoato como fonte de carbono.....	44
Tabela 14 – Testes em meio sólido: avaliação quanto à fonte de carbono oferecida.....	44
Tabela 15 – Produção de P3HB por <i>B. sacchari</i> LFM101 e isolados.....	45
Tabela 16 – Produção de PHA _{MCL} por <i>Pseudomonas</i> sp. LFM046 e isolados.....	48
Tabela 17 – Produção de misturas de P3HB e PHA _{MCL} por isolados.....	52
Tabela 18 – Produção de PHA pela linhagem LFM461 abrigando o inserto contendo o gene putativo da PHA sintase da classe I do isolado RMP1058BII em meio contendo glicose.....	72
Tabela 19 - Produção de PHA pela linhagem LFM461 abrigando o inserto contendo o gene putativo da PHA sintase da classe I do isolado RMP1058BII em meio contendo octanoato....	73

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	16
2 OBJETIVO.....	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 Polihidroxicanoatos.....	18
3.2 Biodiversidade e produção de PHA.....	20
3.3 Metabolismo de PHA.....	23
3.4 PHA sintases.....	25
3.5 PHA sintases da classe I em <i>Pseudomonas</i>.....	26
4 MATERIAS E MÉTODOS.....	31
4.1 Isolamento de bactérias.....	31
4.2 Detecção de bactérias produtoras de PHA.....	32
4.3 Produção de PHA em ensaios com frascos agitados.....	32
4.4 Produção de PHA em biorreator.....	33
4.5 Preservação de linhagens bacterianas.....	34
4.6 Extração de DNA.....	34
4.7 Reações de PCR.....	34
4.8 Desenho de primers.....	36
4.9 Construção da biblioteca genômica dos isolados RMP824A e RMP1058BII.....	38
4.10 Clonagem do inserto contendo a PHA sintase do isolado RMP1058BII.....	39
4.11 Meios de cultura e reagentes utilizados.....	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1 Isolamento de bactérias produtoras de PHA.....	42
5.2 Produção de PHA.....	44
5.3 Reavaliação dos procedimentos qualitativos de seleção de bactérias PHA+.....	56

5.4 Ensaio em biorreator com o isolado RMP1058BII.....	57
5.5 Análise de genes da PHA sintase.....	59
<i>5.5.1 Desenho de primers para detecção específica de genes de PHA sintase da classe I.....</i>	<i>64</i>
<i>5.5.2 Clonagem do gene phaC da classe I.....</i>	<i>69</i>
<i>5.5.3 Ensaio de produção de PHA com o clone Pseudomonas sp. LFM461 pBBR1MCS-2::phbC_{RMP1058BII}.....</i>	<i>71</i>
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	75
REFERÊNCIAS.....	76
ANEXOS.....	89
ANEXO A - Tabela de produção de PHA em ensaios de acúmulo em meio líquido contendo glicose ou octanoato de sódio como única fonte de carbono.....	89
ANEXO B - Tabela com os fragmentos esperados, gerados a partir dos testes de PCR <i>in silico</i> com as sequências de genes putativos <i>phaC</i> com organização <i>phaCAB</i>.....	101
ANEXO C - Tabela com os fragmentos esperados, gerados a partir dos testes de PCR <i>in silico</i> com as sequências de operons com organização <i>phaCIZC2</i> encontrados em linhagens do gênero <i>Pseudomonas</i>.....	103
ANEXO D - Alinhamento das sequências de genes putativos <i>phaC</i> de 19 linhagens com organização <i>phaCAB</i> e posição dos primers descritos na literatura (<i>phaCF1/phaCR4</i>) e primers desenhados neste trabalho para a detecção específica de PHA sintases da classe I (<i>RECF1, RECF2 e RECR</i>).....	104
ANEXO E - Alinhamento das sequências de genes putativos <i>phaC</i> de 3 linhagens com organização <i>phaBAC</i> e posição dos primers desenhados com base neste alinhamento	106
ANEXO F - Dados do ensaio em fermentador com o isolado RMP1058BII em glicose.....	107

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A produção de polihidroxicarboxilatos (PHA) como material de reserva de carbono e energia é uma característica presente em muitas bactérias. A descoberta que poli-3-hidroxi-*n*-butirato (P3HB), o mais conhecido dos PHA, apresenta propriedades termoplásticas despertou o interesse industrial já na década de 1960. O interesse industrial aumentou com a descoberta de que diversos outros monômeros podem ser incorporados aos PHA produzidos por bactérias e que as propriedades térmicas e mecânicas do polímero são moduladas de acordo com essa composição.

Um dos fatores importantes para a síntese de PHA contendo diferentes combinações de monômeros é a especificidade da enzima PHA sintase, que cataliza a incorporação de monômeros à cadeia polimérica em formação. Dessa forma, ter acesso à diversidade de PHA sintases presentes em bactérias representa uma estratégia para o desenvolvimento de linhagens bacterianas capazes de produzir diferentes PHA com composição monomérica controlada.

Este trabalho tem por objetivo avaliar a diversidade dos isolados estudados com relação ao tipo de PHA produzido, bem como com relação à classe de PHA sintase que eles apresentam.

2 OBJETIVO

Este trabalho tem por objetivo analisar isolados bacterianos de amostras de lodo de esgoto doméstico e de solo do campus universitário com relação à produção de polihidroxialcanoatos.

Os seguintes objetivos específicos são definidos para atingir o objetivo geral acima:

- Isolar linhagens bacterianas,
- Selecionar bactérias produtoras de PHA;
- Caracterizar a produção de PHA em meio de cultura contendo excesso de fonte de carbono;
- Caracterizar as PHA sintases presentes nos isolados bacterianos selecionados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Polihidroxicanoatos

Polihidroxicanoatos (PHA) são poliésteres produzidos e armazenados por diversos microrganismos sob a forma de grânulos intracelulares (Steinbüchel e Valentin, 1995). Esses grânulos podem atingir até cerca de 80% da massa seca celular, e podem ter sua concentração intracelular aumentada sob condições nas quais há limitação de pelo menos um nutriente essencial à multiplicação celular e excesso de fonte de carbono (Anderson e Dawes, 1990). Por isso, sua função mais frequentemente atribuída é como reserva de carbono, energia e equivalentes redutores (Brandl et al., 1990). PHA são ainda materiais com propriedades termoplásticas e/ou elastoméricas despertando grande interesse industrial (Gomez e Bueno Netto, 1997). Outra grande vantagem com relação a estes polímeros é que podem ser sintetizados em grandes quantidades pelas células a partir de fontes de fácil renovação, tais como carboidratos e óleos vegetais (Braunegg et al., 1998; Ren et al., 1998).

Os monômeros constituintes de PHA são classificados em dois grandes grupos: (1) aqueles de cadeia curta (HA_{SCL} – “Hydroxyacids of Short-Chain-Length”), contendo de 3 a 5 átomos de carbono na cadeia principal, e (2) aqueles de cadeia média (HA_{MCL} – “Hydroxyacids of Medium-Chain-Length”), contendo de 6 a 16 átomos de carbono na cadeia principal. Portanto, os PHA podem ser classificados como (1) PHA_{SCL} , compostos por HA_{SCL} e (2) PHA_{MCL} , formados por HA_{MCL} (Steinbüchel e Valentin, 1995).

A composição monomérica, ao lado da massa molecular e da distribuição de massas moleculares do polímero, é responsável pelas propriedades físicas e mecânicas destes materiais. As propriedades de PHA permitem a obtenção desde materiais rígidos, como o poli-3-hidroxi-butirato (P3HB), que é um PHA_{SCL} , a materiais flexíveis, como PHA_{MCL} , que podem também se apresentar como materiais viscosos e aderentes, se contiverem uma fração expressiva de monômeros insaturados (Gomez, 2000). Os PHA_{MCL} são produzidos por diferentes espécies do gênero *Pseudomonas* e PHA_{SCL} (principalmente P3HB) são produzidos por espécies pertencentes aos mais diversos grupos bacterianos (Steinbüchel, 1991).

Os PHA têm potencial de substituição de polímeros de origem petroquímica igual ou maior do que os dois principais biopolímeros produzidos atualmente: poli(ácido láctico) e os polímeros de amido (Tabela 1). Considerando o consumo mundial de polímeros no ano de 2007, a produção de PHA poderia alcançar mais de 28 Mt anuais, se utilizado como

Tabela 1 - Potencial técnico de substituição de termoplásticos de origem petroquímica por polímeros de amido, PLA e PHA.

% de substituição	LDPE	HDPE	PP	PVC	OS	PET	PUR	PA	ABS	PC	PBT	PMMA
Polímeros de amido	8	8	8	-	8	-	8	-	-	-	-	4
PLA	-	10	10	-	10	20	-	10	-	-	-	5
PHA	20	20	10	10	20	10	10	-	10	-	-	5

Fonte: Shen et al., 2010.

LDPE-Polietileno de baixa densidade; HDPE-polietileno de alta densidade; PP-polipropileno; PVC-Poli(cloreto de vinila); OS-poliestireno; PET-Poli(tereftalato de etileno); PUR-Poliuretano; PA-Poliamida; ABS-Poli(acrilonitrila-butadieno-estireno); PC-Policarbonato; PBT-Poli(tereftalato de butireno); PMMA-Poli(metacrilato de metila); PLA-Policaprolactona; PHA-Polihidroxialcanoatos.

Tabela 2 - Potencial técnico de produção de PHA para a substituição de polímeros termoplásticos e termorrígidos petroquímicos com base no consumo global para o ano de 2007.

(1.000t)	PE	PP	PVC	OS	PET	PUR	PA	ABS	PC	PBT	PMMA	Outros	Total	% substituição
Consumo global	67.800	44.900	35.280	16.105	15.498	12.285	2.730	7.455	3.150	954	1.400	19.629	227.186	
PHA para substituição	13.560	4.490	3.528	3.221	1.550	1.228	-	746	-	-	70	-	28.393	12,50

Fonte: Shen et al., 2010.

LDPE-Polietileno de baixa densidade; HDPE-polietileno de alta densidade; PP-polipropileno; PVC-Poli(cloreto de vinila); PS-poliestireno; PET-Poli(tereftalato de etileno); PUR-Poliuretano; PA-Poliamida; ABS-Poli(acrilonitrila-butadieno-estireno); PC-Policarbonato; PBT-Poli(tereftalato de butireno); PMMA-Poli(metacrilato de metila); PLA-Policaprolactona; PHA-Polihidroxialcanoatos.

substituto dos polímeros usuais (Tabela 2). As projeções deste estudo sugerem 0,44 Mt anuais até 2013 (Shen et al., 2010). Atualmente, poucos PHA são produzidos em escala industrial, dentre eles homopolímeros de 3HB e copolímeros contendo 3HB, 3HV e/ou 4HB, comercializados com os nomes Biocycle, Biomer, Biopol, Enmat, Nodax (Jendrossek, 2009), TephafLEX (Tepha Inc. Lexington, MA, Estados Unidos), TephafELAST (Tepha Inc.) (Williams, 2008), Mirel1001 *Injection Molding Grade* (Metabolix Inc., Cambridge, MA, Estados Unidos), Mirel1002 *Injection Molding Grade* (Metabolix Inc.), Mirel2001 *Extrusion Coating Grade* (Metabolix Inc.) (Metabolix Inc., 2007).

3.2 Biodiversidade e a produção de PHA

A descoberta das propriedades termoplásticas do P3HB ocorreu no início dos anos 60 (Steinbüchel, 1991), e o interesse por essa classe de polímeros foi ampliado com a descoberta de que era possível modular suas propriedades mecânicas através de alterações em sua composição (Holmes et al., 1985). A descoberta dos PHA_{MCL} produzidos por *Pseudomonas* (De Smet et al., 1983; Lageveen et al., 1988; Brandl et al., 1988; Preusting et al., 1993) abriu a possibilidade de produção de uma grande variedade de polímeros adequados para uma ampla gama de aplicações (Kim et al., 2007).

Atualmente, cerca de 150 monômeros diferentes foram identificados como constituintes de PHA produzidos por bactérias (Rehm, 2003). Assim, acredita-se que PHA poderão se constituir em polímeros feitos sob medida para diferentes aplicações. Deve-se destacar, entretanto, que apenas um número restrito de PHA podem ser sintetizados a partir de fontes de carbono de baixo custo, uma vez que a incorporação de muitos dos monômeros depende de fontes de carbono com uma estrutura estritamente relacionada ao monômero incorporado.

PHA contendo monômeros de cadeia média (PHA_{MCL}) são produzidos por linhagens de *Pseudomonas* a partir de carboidratos, óleos vegetais ou ácidos graxos deles derivados. Estes polímeros são considerados elastômeros e apresentam valores de alongamento para ruptura superiores a 1000% (Steinbüchel, 2003). O P3HB é produzido por um grande número de bactérias a partir de diversas fontes de carbono de baixo custo (carboidratos, ácidos graxos, óleos vegetais, álcoois e poliálcoois, dentre outras) apresenta-se como um material duro e quebradiço, o que limita sua utilização em muitas das aplicações nas quais atualmente são utilizados os plásticos de origem petroquímica. P3HB possui um alongamento para ruptura de apenas 5%, ou seja, significativamente inferior ao

valor de 400% apresentado pelo polipropileno (Sudesh et al., 2000). A incorporação de unidades 3HV, obtendo-se o copolímero P3HB-*co*-3HV, é conseguida graças ao fornecimento de um co-substrato (ácido propiônico, por exemplo) que funciona como precursor de unidades 3HV juntamente com carboidratos. O P3HB-*co*-3HV com baixa incorporação de unidades 3HV é duro e quebradiço, assemelhando-se ao poliestireno; com uma média incorporação de unidades 3HV, tem flexibilidade e dureza semelhantes às do polipropileno e com altos níveis de incorporação das unidades 3HV, o polímero se assemelha ao polietileno (Holmes, 1985). Entretanto, a incorporação de unidades 3HV permite no máximo atingir valores de alongamento para ruptura de 50-60% (Holmes, 1985; Sudesh et al., 2000), ainda distante do valor obtido com polipropileno.

A capacidade de acumular PHA contendo HA_{MCL} e HA_{SCL} em uma mesma cadeia polimérica também foi observada tanto em bactérias de ocorrência natural (Kobayashi et al., 1994; Abe et al., 1994; Doi et al., 1995; Kato et al., 1996a, b) como em bactérias recombinantes (Liebergesell et al., 1993a, b; Dennis et al., 1998; Normi et al., 2005a, b; Park e Lee, 2005; Matsumoto et al., 2005; Lu et al., 2003, 2008; Nomura et al., 2005; Loo et al., 2005; Chen et al., 2006).

A combinação de P3HB e monômeros de HA_{MCL} têm permitido obter materiais com valores de alongamento para ruptura muito superiores àqueles obtidos com a incorporação de unidades 3HV. Por exemplo, Doi (1995) demonstrou que copolímeros de 3HB e 3HHx produzidos por *Aeromonas caviae* a partir de ácidos graxos ou óleos vegetais atingiam valores de alongamento para ruptura de 400% com 10 mol% de 3HHx e de 850% com 17 mol% do co-monômero. Estudos já revelaram que o copolímero P3HB-*co*-3HHx possui propriedades mecânicas similares ao polietileno de baixa densidade, e o P3HB-*co*-3HHx se torna cada vez mais maleável com o aumento de unidades 3HHx (Xie e Chen, 2007). PHA produzidos por linhagens recombinantes de *Pseudomonas* sp. 61-3 contendo P3HB e 3HA_{MCL} com cadeias carbônicas variando de 6 a 12 átomos de carbono apresentaram alongamento para ruptura de 680% quando a fração 3HA_{MCL} correspondia a 6% (Matsusaki et al., 2000; Sudesh et al., 2000). PHA contendo em sua composição 3HB e 3HA_{MCL} têm sido obtidos essencialmente utilizando óleos vegetais ou ácidos graxos (Kobayashi et al., 1994; Fukui e Doi, 1998; Kahar et al., 2003). O gênero *Aeromonas* foi descrito como o primeiro capaz de sintetizar o copolímero P3HB-*co*-3HHx a partir de ácido alcanóico e óleo vegetais (Lu et al., 2003) e tem despertado especial interesse, pois demonstra capacidade de incorporar quantidades expressivas de HA_{MCL} ao PHA (Kobayashi et al., 1994; Fukui e Doi, 1997).

Embora o Brasil seja reconhecido como um país de mega-diversidade biológica, ainda poucos trabalhos foram realizados de forma a avaliar o potencial de bactérias produtoras de polihidroxicanoatos em diferentes ambientes (Silva et al., 2007).

Em um trabalho de isolamento de microrganismos produtores de polihidroxicanoatos (Gomez, 1994, 1996) foram obtidas 75 linhagens bacterianas produtoras desses polímeros a partir de amostras de solo de canavial. Estudos mais detalhados revelaram uma linhagem bacteriana promissora para a produção industrial destes polímeros (Gomez et al., 1997; Silva et al., 2000) e que se tratava de uma espécie nova ainda não descrita (Brämer et al., 2002). Estes resultados demonstram que mesmo em ambientes bastante explorados como solos de um canavial ainda é possível encontrar novidades da biodiversidade. Esse trabalho de isolamento ainda pode ser destacado em sua importância, pois permitiu detectar bactéria produtora de P3HB e um outro monômero (3HPE-3-hidróxi-4-pentenoato) a partir de carboidratos (Rodrigues et al., 1995). Além disso, boa parte desses isolados foram capazes de utilizar xilose (Silva et al., 2004) ou mesmo óleos vegetais (Matsuda, 2009) para produção desses polímeros. Bactérias do gênero *Pseudomonas* capazes de produzir PHA_{MCL} seja a partir de carboidratos (Gomez, 2000) ou de óleos vegetais (Silva-Queiroz, 2003, 2009a, 2009b) também foram obtidas.

Lima et al. (1999) isolaram bactérias produtoras de polihidroxicanoatos a partir de amostra de solo de canavial. Embora o tipo de PHA produzido não tenha sido caracterizado, os resultados demonstraram uma grande diversidade de espécies bacterianas detectadas nesse trabalho.

Bonato et al. (2004) isolaram bactérias a partir de amostras de solo de Mata Atlântica e identificaram um isolado com atributos interessantes para produção de P3HB.

Isolados bacterianos produtores de PHA foram encontrados em amostras de solo e areia de diversos ambientes do Estado do Rio Grande do Sul (Matias et al., 2001). A análise da região do 16S foi comparada ao banco de dados do Ribossomal Database Project (RDP), e possíveis representantes dos gêneros *Streptomyces*, *Bacillus*, *Streptacidiphilus*, *Streptoalloteichus* e *Burkholderia* foram identificados (Matias et al., 2009).

A linhagem *Cupriavidus* USMAA1020 foi isolada em um estudo de diferentes amostras de solo, lama, sedimento e água na Península da Malásia, e apresentou a capacidade de acumular mais de 50% da massa seca celular do copolímero P3HB-co-4HB, ainda não reportada para a espécie. Frações de até 38 mol% de 4HB foram obtidas quando fornecida γ -butirolactona como fonte de carbono, um valor próximo aos 40 mol%

observados quando fornecido o ácido 4-hidroxiбутírico, um substrato diretamente relacionado ao 4HB, e de maior custo (Amirul et al., 2009).

A linhagem *Zobellella denitrificans* MW1 foi isolada a partir de lodo de esgoto em um estudo com amostras de diferentes ambientes da Alemanha e Egito. Após 96 horas de cultivo, foi observada produção de, aproximadamente, 87% da massa seca celular de P3HB em meio mineral contendo glicerol como fonte de carbono e alta concentração salina, condições que sugerem uma possível aplicação comercial para a utilização de glicerol residual da produção de biodiesel no processo de produção de PHA. Também apresenta acúmulo associado ao crescimento, que ocorre concomitantemente ao consumo de glicerol e fonte de nitrogênio, excluindo a necessidade de limitação deste nutriente (Ibrahim e Steinbüchel, 2009).

A linhagem *Bacillus* sp. MA3.3 foi isolada a partir de solo de mangue em um trabalho com amostras de diferentes ambientes do território nacional. A ausência de uma camada lipopolissacarídica nesta linhagem Gram-positiva representa uma vantagem para aplicações em que a biocompatibilidade do polímero é um fator essencial, como a área médica. Valores maiores do que 60% da massa seca celular de P3HB foram obtidos quando fornecida glicose ou xilose como fontes de carbono, tornando a linhagem uma candidata à produção de PHA utilizando resíduos lignocelulósicos como substrato (Lopes et al., 2009).

Os poucos resultados acima demonstram a importância de trabalhos mais sistemáticos de bioprospecção com o objetivo de detectar bactérias produtoras de PHA da biodiversidade brasileira.

3.3 Metabolismo de PHA

A síntese de PHA depende do fornecimento de uma fonte de carbono adequada que possa ser convertida a um hidroxiaçil-CoA através das vias metabólicas existentes na célula (Figura 1), bem como da presença de uma PHA sintase na bactéria capaz de incorporar este hidroxiaçil-CoA ao poliéster em formação. Ambos os fatores podem impedir a combinação de certos monômeros em uma mesma cadeia polimérica ou restringir a quantidade de um determinado monômero incorporado ao PHA (Gomez, 2000).

A síntese de P3HB ocorre a partir da condensação de duas moléculas de acetil-CoA, catalisada pela enzima β -cetotiolase (PhaA) (Slater et al., 1998); seguida pela redução da molécula de acetoacetil-CoA formada na primeira reação a (*R*)-3-hidroxi-butiril-CoA pela enzima acetoacetil-CoA redutase NADPH dependente (PhaB). Os monômeros (*R*)-3-

hidroxibutiril-CoA são incorporados à cadeia polimérica em formação pela ação da enzima PHA sintase (PhaC), com a concomitante liberação de uma molécula de Coenzima A. A incorporação de outros monômeros HASCL é obtida geralmente com o fornecimento de precursores estruturalmente relacionados a esses monômeros, como ácido valérico para a incorporação de monômeros 3HV (Steinbüchel, 1991).

A síntese de PHAMCL pode ocorrer a partir de ácidos graxos, álcoois e alcanos ou a partir de carboidratos. No primeiro caso, a fonte de carbono é metabolizada através da β -oxidação de ácidos graxos (Lageveen et al., 1988; Brandl et al., 1988; Huijberts et al., 1994), e os monômeros são fornecidos por uma enoil-CoA hidratase (Tsuge et al., 2000), acetoacetil-CoA redutase (Taguchi et al., 1999; Ren et al., 2000) ou mesmo uma epimerase (Kraak et al., 1997). A síntese de PHAMCLA a partir de carboidratos inicia-se com a formação de acetil-CoA, e a via da biossíntese de ácidos graxos gera os intermediários que serão convertidos em monômeros (Haywood et al., 1990; Timm e Steinbüchel, 1990; Huijberts et al., 1992; Huijberts et al., 1994), cujo direcionamento é catalisado pela enzima 3-hidroxiacil-CoA:ACP transacilase (Rehm et al., 1998).

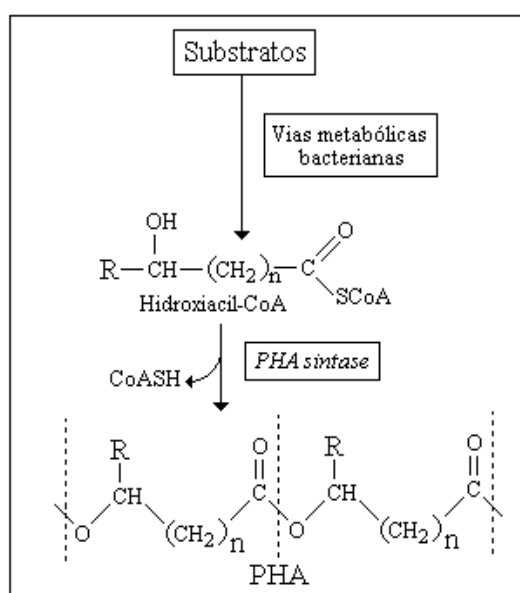


Figura 1. Esquema da síntese de PHA em bactérias.

Fonte: Gomez e Bueno Netto, 2001.

3.4 PHA sintases

PHA sintases são as enzimas chave no processo de síntese de PHA e catalisam a ligação dos monômeros por transesterificação (Witholt e Kessler, 1999). PHA sintases têm sido agrupadas em quatro classes (Steinbüchel e Valentin, 1995; Rehm, 2003). PHA sintases da classe I são encontradas em diversas bactérias, consistem de uma única unidade polipeptídica e apresentam especificidade por HA_{SCL}, raramente incorporando HA_{MCL}. A interação da PHA sintase de *Ralstonia eutropha* com superfícies hidrofóbicas estudada por Microscopia de Força Atômica indica a existência de uma região hidrofóbica na superfície predominantemente hidrofílica da proteína globular solúvel. Essa região pode ser responsável pela formação de dímeros e oligômeros, diretamente relacionados com a atividade da enzima (Sato et al., 2008).

As PHA sintases da classe II são encontradas em *Pseudomonas*, constituem-se de uma única unidade polipeptídica e apresentam especificidade por HA_{MCL}, dificilmente incorporando HA_{SCL}. A classe III de PHA sintases compreende enzimas com especificidade para HA_{SCL}, constituídas de duas subunidades polipeptídicas: (1) subunidade PhaC que contém uma seqüência de aminoácidos com similaridade de 21 a 28% das PHA sintases da classe I e II, (2) subunidade PhaE que não tem nenhuma similaridade com as PHA sintases. Uma exceção a esta classificação é a PHA sintase de *Thiocapsa pfennigii*, que, embora seja semelhante à PHA sintases da classe III, é caracterizada pela capacidade de incorporar um amplo espectro de HA_{SCL} e HA_{MCL}, que apenas foi revelada após a sua expressão em uma linhagem mutante de *P. putida* (Liebergesell et al., 1993a; Valentin et al., 1994, 1996). A clonagem e caracterização dos genes que codificam para as duas subunidades da PHA sintase da classe III da haloarchaea *Haloferax mediterranei* corroboram estudos que indicam grande disseminação desta classe de enzimas no domínio *Archaea*, além da existência de uma extremidade C-terminal da subunidade PhaC mais longa do que as encontradas em eubactérias, e diretamente relacionada com a quantidade de polímero acumulado (Lu et al., 2008).

A quarta classe de PHA sintases é encontrada em bactérias do gênero *Bacillus* sp., também são constituídas de duas subunidades polipeptídicas como as sintases de classe III, mas a subunidade PhaE é substituída pela subunidade PhaR (McCool e Cannon, 1999).

3.5 PHA sintases da classe I em *Pseudomonas*

A produção de P3HB homopolímero por *Pseudomonas* foi observada nas linhagens *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 (Ashby et al., 2002b) e *Pseudomonas* sp. 14-3 (Ayub et al., 2004). A produção de um PHA composto por misturas de P3HB homopolímero e PHA_{MCL} foi descrita para as linhagens *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-778 (Ashby et al., 2002a), *Pseudomonas* sp. GP4BH1 (Steinbüchel e Wiese, 1992), *Pseudomonas* sp. 61-3 (Matsusaki et al., 1998) e *Pseudomonas* sp. HJ-2 (Chung et al., 1999). Já para as linhagens *Pseudomonas* sp. A33 (Lee et al., 1995), *Pseudomonas nitroreducens* AS1.2343 (Yao et al., 1999), *Pseudomonas* sp. LDC-5 (Sujatha et al., 2005) e *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7925 (Singh e Mallick, 2007) não são apresentadas evidências da produção de misturas de P3HB e PHA_{MCL} ou se o PHA produzido é um copolímero contendo unidades 3HB e 3HA_{MCL}.

As linhagens *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-778 e *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 foram isoladas a partir de resíduo de óleo lubrificante (Lee e Chandler, 1941), *Pseudomonas* sp. GP4BH1 a partir de água fluvial (Steinbüchel e Wiese, 1992), *Pseudomonas* sp. A33 (Schirmer et al., 1993) e *Pseudomonas* sp. 61-3 (Abe et al., 1994) a partir de solo, *Pseudomonas* sp. HJ-2 a partir de lodo ativado (Chung et al., 1999), *Pseudomonas nitroreducens* AS1.2343 (Yao et al., 1999) e *Pseudomonas pseudoalcaligenes* YS1 (Hang et al., 2002) a partir de solo contaminado com petróleo, *Pseudomonas* sp. 14-3 a partir de água de degelo da Antártida (Ayub et al., 2004), *Pseudomonas* sp. LDC-5 a partir de solo de áreas de cultivo (Sujatha et al., 2005), *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7925 a partir de lodo (Singh e Mallick, 2007).

A linhagem *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 não foi capaz de produzir PHA_{MCL} em cultivo com octanoato como fonte de carbono, sendo produzido P3HB (Ashby et al., 2002b). A ausência do amplicon do tamanho esperado na PCR utilizando primers específicos para a detecção de PHA sintases da classe II corrobora a suposição de que esta linhagem abriga apenas genes que codificam para uma PHA sintase da classe I, e a comparação da sequência deduzida de aminoácidos do fragmento amplificado utilizando os primers descritos por Sheu et al. (2000) mostrou que esta região da PHA sintase de *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 possui similaridade com a região correspondente da PHA sintase de *Delftia acidovorans* (Solaiman e Ashby, 2005).

A linhagem *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-778 produziu PHA composto por P3HB contendo apenas traços de PHA_{MCL} tanto em cultivos com glicose como em cultivos

com octanoato. O fracionamento do PHA produzido utilizando acetona indicou a presença de P3HB homopolímero na fração insolúvel e PHA contendo apenas monômeros de cadeia média na fração solúvel, indicando a produção de uma mistura de P3HB e PHA_{MCL} e não de um copolímero contendo monômeros 3HB e 3HA_{MCL} (Ashby et al., 2002a). A existência de um operon de biossíntese de PHA com a organização típica dos genes que codificam para PHA sintases da classe II (Solaiman, 2002) e do gene que codifica para uma PHA sintase da classe I (Solaiman e Ashby, 2005) foi confirmada para a linhagem *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-778. O alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos do gene *phbC*₇₇₈ mostrou que a PHA sintase de classe I presente nesta linhagem possui apenas 42% de identidade com a PHA sintase de *R. eutropha*, e sua região N-terminal é mais curta. A busca por sequências semelhantes resultou nas PHA sintases da classe I de *Pseudomonas* sp. HJ-2 e de *Pseudomonas* sp. 61-3 com 82% e 69% de identidade, respectivamente (Solaiman e Ashby 2005).

A linhagem *Pseudomonas* sp. 14-3 produziu P3HB a partir de octanoato e não foi capaz de produzir qualquer PHA quando glicose foi suprida ao meio (Ayub et al., 2004; Ayub et al., 2006). A organização dos genes da biossíntese de P3HB encontrada nessa linhagem foi *phaBAC*, com a presença de um gene putativo regulador da transcrição *phaR*, transcrito na direção oposta e localizado à montante destes três genes. A comparação da sequência deduzida de aminoácidos da PHA sintase de *Pseudomonas* sp. 14-3 mostrou 99% de identidade com a PhaC de *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-778. A análise da sequência do gene *phaA* que codifica para uma β -cetotiolase revelou a ausência do resíduo catalítico Cys-378, e a inserção do gene *phaA* de *Azotobacter* sp. restabeleceu a capacidade de produzir P3HB a partir de carboidratos, indicando que este gene do operon de biossíntese de PHA de *Pseudomonas* sp. 14-3 não é funcional (Ayub et al., 2006).

Para as outras três linhagens do gênero *Pseudomonas* capazes de produzir P3HB, é observada a produção de PHA contendo 3HB e PHA_{MCL}, algumas vezes em frações equimolares.

A produção da mistura de polímeros pela linhagem *Pseudomonas* sp. A33 foi observada apenas no cultivo com 3-hidroxi-butirato como fonte de carbono, apresentando apenas pequena fração de P3HB no polímero produzido a partir de glicose. A análise do PHA por ressonância magnética nuclear indicou a produção de um copolímero de 3HB e HA_{MCL} por esta linhagem. A clonagem de um fragmento de aproximadamente 23 kpb contendo os prováveis genes da biossíntese de PHA de *Pseudomonas* sp. A33 na linhagem *R. eutropha* PHB⁻⁴ levou à produção de um PHA contendo principalmente P3HB a partir de

3-hidroxi-butirato e gluconato, e à produção de PHA contendo cerca de 17 mol% de 3HB e HA_{MCL} no cultivo em octanoato, sugerindo a existência de uma organização semelhante àquela encontrada em *Pseudomonas* produtoras de PHA_{MCL}, porém com uma especificidade mais ampla por substratos (Lee et al., 1995). A partir das evidências apresentadas neste trabalho, é possível relacionar a incorporação dos monômeros de cadeia curta à cadeia polimérica por uma PHA sintase com uma ampla especificidade por substratos, ao passo que a formação de misturas de P3HB homopolímero e PHA_{MCL} incorporados em cadeias poliméricas diferentes, ou ainda em grânulos separados, sejam formadas quando o microrganismo abriga além do operon da biossíntese de PHA_{MCL} também uma PHA sintase com especificidade por monômeros de cadeia curta, como observado em *Pseudomonas* sp. GP4BH1, *Pseudomonas* sp. 61-3 e *Pseudomonas* sp. 14-3.

A linhagem *Pseudomonas* sp. GP4BH1 produziu um polímero contendo mais de 85 mol% de P3HB no cultivo a partir de octanoato, sendo que no cultivo em glicose esta fração manteve-se em apenas 10 mol%. A precipitação fracionada do PHA produzido utilizando etanol como solvente indicou a presença de P3HB homopolímero formando uma mistura com PHA_{MCL} e não um copolímero (Steinbüchel e Wiese, 1992). Utilizando uma sonda baseada nas sequências dos genes *phaC* de *Ralstonia eutropha* e *Pseudomonas oleovorans* (Timm e Steinbüchel 1992), três regiões distintas do genoma de *Pseudomonas* sp. GP4BH1 foram identificadas, e os resultados obtidos com a clonagem destes fragmentos nas linhagens deficientes no acúmulo de PHA *Pseudomonas* sp. GPp104 e *Ralstonia eutropha* PHB⁻⁴ indicou a especificidade por monômeros de cadeia curta por duas das possíveis PHA sintases e a especificidade por monômeros de cadeia média por apenas uma delas (Timm et al., 1994).

Um perfil inverso ao apresentado pela linhagem *Pseudomonas* sp. GP4BH1 foi observado para a linhagem *Pseudomonas* sp. 61-3, que apresentou o acúmulo de PHA contendo 80 mol% de P3HB no cultivo em glicose e cerca de 30 mol% no cultivo em octanoato (Kato et al., 1996a, 1996b). Utilizando uma sonda de 1,8 kb contendo a sequência da PHA sintase de *R. eutropha* e outra baseada nas sequências dos genes *phaC* de *Ralstonia eutropha* e de *Pseudomonas oleovorans* (Timm e Steinbüchel, 1992), duas classes de PHA sintases localizadas em regiões distintas do genoma foram detectadas, e a clonagem destes fragmentos permitiu identificar nesta linhagem a organização *phaBAC*, além do gene putativo de um regulador transcricional *phaR* localizado à montante destes três genes no operon de biossíntese de PHA contendo uma PHA sintase da classe I cujo produto, PhbC_{Ps} apresentou 53% de identidade com a PHA sintase de *Ralstonia eutropha*.

A clonagem do fragmento contendo a PHA sintase de classe I de *Pseudomonas* sp. 61-3 em *P. putida* Gpp104 deficiente no acúmulo de PHA mostrou a especificidade desta sintase por monômeros de cadeia curta, incorporando apenas monômeros 3HB ao PHA produzido. Quando a clonagem foi realizada pela inserção de um plasmídeo contendo apenas o operon *phbBAC* sem a presença do gene *phbR*, *P. putida* Gpp104 não foi capaz de produzir qualquer tipo de PHA, enquanto que a clonagem do mesmo plasmídeo em *R. eutropha* PHB⁻⁴ levou à produção de P3HB correspondendo a 20% da massa seca celular. O estudo da sequência de nucleotídeos da região intergênica localizada entre *phbR* e *phbB* indicou a presença de múltiplas sequências putativas de regiões promotoras, e com base nestas evidências foi sugerido que a transcrição do operon *phbBAC* em *R. eutropha* ocorre a partir de um promotor que não depende da ativação pelo produto de transcrição do gene *phbR*.

A regulação positiva de um promotor localizado na região à jusante do gene *phbB* pelo produto do gene *phbR* foi confirmada pelo aumento da atividade da enzima β -galactosidase em *Pseudomonas* sp. 61-3 abrigando um plasmídeo com uma construção contendo o gene *phbR*, a região intergênica que o separa do gene *phbB* e os genes *galK*/*lacZYA* sem sua sequência promotora (Matsusaki et al., 1998).

No operon da biossíntese de PHA_{MCL}, a organização *phaC1ZC2* comum a várias espécies do gênero *Pseudomonas* foi observada. A clonagem das PHA sintases da classe II de *Pseudomonas* sp. 61-3 em *R. eutropha* PHB⁻⁴ levou à incorporação de altas frações de P3HB ao PHA produzido mesmo nos cultivos a partir de ácidos graxos, apresentando baixa especificidade em relação ao tamanho da cadeia dos monômeros que são capazes de incorporar. A análise do PHA produzido por um mutante de *Pseudomonas* sp. 61-3 com o gene *phbC_{P_s}* interrompido revelou a produção de P3HB-co-3HA no qual as unidades 3HB corresponderam a cerca de 25 mol% mas não de P3HB homopolímero, confirmando a especificidade do produto deste gene por monômeros de cadeia curta e a incorporação dos mesmos em um copolímero produzido por ambas as PHA sintases da classe II nesta linhagem, já que as clonagens independentes de *phaC1* e *phaC2* levaram à produção do copolímero (Matsusaki et al., 1998).

A produção de misturas de P3HB e PHA_{MCL} em linhagens recombinantes abrigando diferentes classes de PHA sintases também tem sido reportada. Frações equimolares de 3HB e 3HO incorporadas ao PHA produzido por *P. oleovorans* ATCC29347 abrigando os genes da biossíntese de PHA de *R. eutropha* no cultivo com octanoato correspondendo a mais de 75% da massa seca celular, enquanto que no cultivo em glicose apenas P3HB foi

produzido, correspondendo a menos de 10% da massa seca celular. A precipitação fracionada do PHA produzido por esta linhagem recombinante mostrou a formação de uma blenda de P3HB homopolímero e PHA_{MCL}, e não de um copolímero (Timm et al., 1990).

A expressão do gene *phaC* de *Ralstonia eutropha* na linhagem *Pseudomonas* sp. LFM046 levou à produção de uma mistura de P3HB e PHA_{MCL} (Gomes, 2010). Também foi observada grande variação na composição do PHA produzido por esta linhagem recombinante nos cultivos em glicose e octanoato.

Uma linhagem de *E. coli* abrigando os genes *phaC* e *phaJ* de *P. aeruginosa*, e os genes *phaA* e *phaB* de *Bacillus* sp. foi capaz de acumular um polímero formado por P3HB-co-3HV-co-HA_{MCL} constituindo cerca de 28% da massa seca celular com frações de, aproximadamente, 70 mol% de 3HB quando fornecida glicose. Quando glicose e ácidos graxos de 5, 6, 8, ou 10 carbonos na cadeia principal foram fornecidos as frações de 3HB foram de cerca de 20 mol% (Davis et al., 2008).

Tabela 3 - Linhagens do gênero *Pseudomonas* produtoras de P3HB ou misturas de P3HB e PHA_{MCL} estudadas quanto às classes de PHA sintases presentes.

Linhagem	Substrato	Composição monomérica (mol%)					PHA (%MSC)	
		C4	C6	C8	C10	C12		
<i>Pseudomonas</i> sp. GP4BH1	Gluconato 15 g/L	10,3	0,0	16,7	73,0	0,0	65,0	Steinbüchel e Wiese, 1992
	Octanoato 5 g/L	87,5	0,0	12,5	0,0	0,0	61,3	
<i>Pseudomonas</i> sp. 61-3	Glicose 10 g/L	80	3	10	7	0	11,98	Kato et al., 1996a
	Ácido octanóico 5 g/L	32	27	41	0	0	12	Kato et al., 1996b
<i>P. oleovorans</i> NRRL B-778	Glicose 5 g/L	99	0	TR	TR	0	29	Ashby et al., 2002a
	Ácido octanóico 2,5 g/L	99	0	TR	TR	TR	25	
<i>Pseudomonas</i> sp. 14-3	Glicose 3,0 g/L	0	0	0	0	0	ND	Ayub et al., 2006
	Octanoato 2,5 g/L	100	0	0	0	0	>70%	

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolamento de bactérias

Os isolados bacterianos utilizados neste trabalho são provenientes de outros trabalhos de isolamento ou foram isolados neste trabalho.

Os isolados RMP foram obtidos por cultivo direto em ágar nutriente (Peixoto, 2008), e os isolados DCL após enriquecimento em água peptonada ou meio mineral contendo óleo de soja (Matsuda, 2009), sendo ambos provenientes de amostra de lodo de esgoto doméstico da Estação de Tratamento de Esgotos do Parque Novo Mundo (São Paulo – SP).

Os isolados SCU foram obtidos por isolamento direto (SCU4 a SCU89) e por enriquecimento em meio mineral contendo glicose (SCU143 a SCU205 no primeiro ciclo e SCU224 a SCU300 no segundo ciclo de enriquecimento) ou octanoato de sódio (SCU90 a SCU130 no primeiro ciclo e SCU303 a SCU315 no segundo ciclo de enriquecimento).

As amostras de solo foram coletadas no mês de Novembro de 2009 em três pontos diferentes localizados dentro da Reserva Florestal da Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira. As amostras foram então homogeneizadas e aliqüotadas em frações de aproximadamente 5 g. Para o isolamento direto, uma alíquota foi incubada em frascos erlenmeyer de 1 L contendo 200 mL de solução salina 0,85% por 40 minutos com agitação rotativa a 30 °C e colocada em banho de ultrassom por 15 minutos, repetindo-se 3 ciclos. Após os 3 ciclos, foram feitas diluições em série da suspensão e espalhamento em placas contendo meio mineral sólido com glicose ou octanoato, sendo tomada a amostra com diluição de 10^{-1} para a recuperação dos isolados bacterianos.

Para o isolamento por enriquecimento, alíquotas foram incubadas em frascos erlenmeyer de 1 L contendo 200 mL de meio mineral e glicose 3 g/L ou octanoato 1 g/L por 24 horas com agitação rotativa a 30 °C. Após 24 horas, foram feitas diluições em série do cultivo e espalhamento em placas contendo meio mineral sólido com glicose ou octanoato, sendo tomadas as diluições de 10^{-6} para a recuperação dos isolados bacterianos. Novos cultivos foram realizados com as mesmas condições do primeiro ciclo de enriquecimento, utilizando os primeiros cultivos para inocular 10% do volume total em um segundo ciclo de enriquecimento, por mais 24 horas, sendo tomadas as diluições de 10^{-6} para a recuperação dos isolados bacterianos.

4.2 Detecção de bactérias produtoras de PHA

Para detectar bactérias produtoras de PHA, os isolados foram cultivados em meio apropriado ao acúmulo destes materiais (Gomez, 1994), adicionados do corante Nile Red A para uma concentração final de 50 µg/mL no meio, com o objetivo de detectar colônias que podem conter grânulos de PHA quando apresentam fluorescência sob luz UV (Spiekermann et al., 1999). O potencial de produzir PHA também foi detectado pela coloração azul das colônias coradas com Sudan Black B 0,02% em etanol, após serem cultivadas sob condição propícia ao acúmulo (Schlegel et al., 1970). Duas fontes de carbono foram utilizadas para avaliar o acúmulo de PHA: um carboidrato (glicose) e um ácido graxo (ácido octanóico).

4.3 Produção de PHA em ensaios com frascos agitados

Cada um dos isolados bacterianos foi estriado em ágar nutriente e cultivado por 72 horas a 30 °C. Colônias isoladas foram utilizadas para inocular 25 mL de caldo nutriente e incubadas por 24 horas em agitador rotativo modelo TE-420 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) a 30 °C. Um volume de 1,5 mL da cultura em caldo nutriente foi utilizado para inocular 25 mL de meio mineral (Ramsay et al., 1990) contendo excesso de fonte de carbono (glicose 10 g/L ou ácido octanóico 1,44 g/L) e quantidade limitada da fonte de nitrogênio ((NH₄)₂SO₄ 1 g/L quando glicose foi fornecida e 0,2 g/L quando ácido octanóico foi suprido). As células foram cultivadas em agitador rotativo a 30 °C, com amostras sendo retiradas após 72 horas de cultivo para determinar: pH, concentração de biomassa e teor e composição do polímero.

Concentração de biomassa: Um volume conhecido da suspensão celular foi centrifugado (10.600 g, 10 minutos, 10 °C) e submetido à liofilização. A massa seca celular foi determinada gravimetricamente.

pH: foi determinado no sobrenadante, após centrifugação da cultura, em potenciômetro modelo Tec-2 (Tecnal) utilizando padrões de pH 4,0 e 7,0.

Teor e composição de polímero: A quantidade e composição de PHA foram determinadas através de cromatografia de fase gasosa de propil-ésteres (Riis e Mai, 1988). Cerca de 10 a 15 mg de células liofilizadas foram transferidas para tubos, aos quais foram adicionados 2 mL de uma solução de ácido clorídrico em propanol (1:4 v/v), 2 mL de 1,2-dicloroetano e 100 µL de uma solução de ácido benzóico (40 g/L) em propanol. Os tubos

foram fechados fortemente, agitados e submetidos à propanólise por 3 horas a 100 °C, com agitação após os primeiros 30 minutos. Após resfriamento, foram adicionados aos tubos 4 mL de água destilada, agitando-os vigorosamente por 30 segundos. Após separação, a fase aquosa (superior) foi descartada e a fase orgânica (inferior) utilizada para análise. Um volume de 1 µL da fase orgânica foi analisado após fracionamento da amostra (“split” 1:20) em cromatógrafo gasoso HP7890 Series GC System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos) equipado com uma coluna HP-5 (5% fenil-metilsiloxano, comprimento 30 m, diâmetro 0,25 mm, espessura do filme 0,25 µm) (Agilent Technologies). A análise foi conduzida nas seguintes condições: Gás de arraste: Hélio (0,8 mL/min); Temperatura do injetor: 250 °C; Temperatura do detector: 300 °C; Sistema de detecção: ionização de chama (FID); Programa de temperaturas do forno: 100 °C por 1 minuto, elevação da temperatura até 210 °C a 8 °C/min e 210 °C por 15 minutos. Ácido benzóico foi utilizado como padrão interno. Polímeros produzidos por *P. oleovorans* ou *P. putida* a partir de diferentes fontes de carbono ou P3HB e P3HB-co-3HV (Aldrich) foram utilizados como padrões para a geração das curvas de calibração. O PHA total foi calculado somando-se as quantidades dos constituintes 3HB (3-Hidroxibutirato), 3HV (3-Hidroxivalerato), 3HHx (3-Hidroxihexanoato), 3HHp (3-Hidroxieptanoato), 3HO (3-Hidroxioctanoato), 3HN (3-Hidroxinonanoato), 3HD (3-Hidroxidecanoato) e 3HDD (3-Hidroxidodecanoato).

4.4 Produção de PHA em biorreator

O isolado RMP1058BII foi selecionado para cultivo em biorreator Biostat B (B. Braun Biotech International, Melsungen, HE, Alemanha) em meio mineral com glicose como única fonte de carbono e limitado na fonte de nitrogênio ((NH₄)₂SO₄). O volume inicial do cultivo foi de 2,5 litros, sendo realizadas adições de glicose com o objetivo de manter sua concentração no meio em torno de 10 g/L.

As amostras retiradas foram tratadas com a mesma metodologia utilizada no tratamento das amostras finais dos ensaios de acúmulo de PHA.

A dosagem de glicose foi realizada por HPLC Ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) com detector por Índice de Refração (Shodex, Kawasaki, Kanagawa, Japan) a 35 °C, coluna HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos) a 45 °C, fase móvel de H₂SO₄ 5 mM com fluxo de 0,6 mL/min. e volume de injeção de 20 µL. Padrões foram preparados nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 g/L utilizando (D)-

glicose e as amostras foram diluídas até concentrações compreendidas no intervalo da curva de calibração construída.

4.5 Preservação de linhagens bacterianas

Cada uma das linhagens bacterianas foi cultivada em caldo nutriente por 24 horas e, em seguida, 5 mL de cada uma das culturas foi diluída em 5 mL de uma solução aquosa de glicerol a 20%. A suspensão de células na solução de glicerol foi distribuída em tubos de microcentrífuga (500 µL por tubo), que foram mantidos em congelador de refrigerador doméstico por 20 minutos e finalmente congelados em freezer a -80 °C.

Para a preservação das linhagens bacterianas por liofilização, 40 mL de uma cultura em caldo nutriente (24 horas) foram centrifugados e as células ressuspensas em 2 mL de solução aquosa de leite desnatado (10%) e glutamato de sódio (5%). A suspensão de células no lioprotetor foi distribuída em ampolas de vidro (0,2 mL por ampola), congelada lentamente até -35 °C e liofilizada em aparelho Labconco Triad (Labconco, Kansas City, MO, Estados Unidos). As ampolas foram fechadas a vácuo e estocadas em refrigerador doméstico (4-8 °C).

4.6 Extração de DNA

A extração de DNA foi feita utilizando os kits de extração de DNA plasmidial QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos), e o kit de extração de DNA genômico DNeasy Blood e Tissue Kit (Qiagen) conforme as instruções do fabricante, após o cultivo das linhagens bacterianas por 12 horas em caldo nutriente ou meio Luria Bertani (LB).

4.7 Reações de PCR

Os primers utilizados para a detecção de PHA sintases nos testes da PCR foram sintetizados conforme descritos na literatura (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), e são apresentados na Tabela 4.

A amplificação foi realizada em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) utilizando o kit GoTaq Master Mix (Promega, Madison, WI, Estados

Unidos). Foram utilizados entre 50 e 250 ng de DNA molde, entre 0,1 e 1,0 mM de cada um dos primers.

A programação de temperaturas utilizada para os pares de primers phaCF1/phaCR4 (Sheu et al., 2000), I-179L/I-179R (Solaiman et al., 2000) e DEV15L/I-179R (Solaiman, 2002) são apresentadas nas Tabelas 5, 6 e 7, respectivamente.

Tabela 4 - Primers utilizados para as reações de PCR com os isolados produtores de P3HB e PHA_{MCL}.

Primers	Sequência	Fragmento	Referência
phaCF1/phaCR4	phaCF1 5' - ATCAACAA (G/A) T (T/A) CTAC (A/G) TC (C/T) T (C/G) GACCT - 3' phaCR4 5' - AGGTAGTTGT (T/C) GAC (C/G) (A/C) (A/C) (G/A) TAG (T/G) TCCA - 3'	496 pb	Sheu et al., 2000
I-179L/I-179R	I-179L 5' - ACAGATCAACA AGTTCTACATCTTCGAC - 3' I-179R 5' - GTGTTGTCGTTG TTCCAGTAGAGGATGTC - 3'	540 pb	Solaiman et al., 2000
I-179L/DEV15R	I-179L 5' - ACAGATCAACAAG TTCTACATCTTCGAC - 3' DEV15R 5' - CCAGG TGCGCCGATGCC - 3'	1,3 kpb	Solaiman, 2002
DEV15L/I-179R	DEV15L 5' - CCGATCA TCATGAAGTT (C/T) C - 3' I-179R 5' - GTGTTGTCGTTG TTCCAGTAGAGGATGTC - 3'	1,5 kpb	Solaiman, 2002

Tabela 5 - Condições de reação utilizadas na PCR com o par de primers phaCF1/phaCR4.

Temperatura de desnaturação inicial	95 °C	3 min.	} 35 ciclos
Temperatura de anelamento inicial	57 °C	2 min.	
Temperatura de extensão inicial	72 °C	2 min.	
Temperatura de desnaturação	95 °C	1 min.	
Temperatura de anelamento	57 °C	1 min.	
Temperatura de extensão	72 °C	1 min.	
Temperatura final de extensão	72 °C	5 min.	

Tabela 6 - Condições de reação utilizadas na PCR com o par de primers I-179L/I-179R.

Temperatura de desnaturação inicial:	95 °C	3 min.	} 35 ciclos
Temperatura de desnaturação:	95 °C	40 seg.	
Temperatura de anelamento:	57 °C	40 seg.	
Temperatura de extensão:	72 °C	40 seg.	
Temperatura final de extensão	72 °C	5 min.	

Tabela 7 - Condições de reação utilizadas na PCR com o par de primers DEV15L/I-179R.

Temperatura de desnaturação inicial:	95 °C	3 min.	} 35 ciclos
Temperatura de desnaturação:	95 °C	40 seg.	
Temperatura de anelamento:	57 °C	40 seg.	
Temperatura de extensão:	72 °C	1 min. e 50 seg.	
Temperatura final de extensão	72 °C	5 min.	

4.8. Desenho de primers

Sequências de nucleotídeos de genes ortólogos ao gene *phbC* de *Ralstonia eutropha* H16 e de genes ortólogos ao gene *phbC* de *Pseudomonas* sp. 61-3 foram recuperadas utilizando a base de dados do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

As regiões conservadas entre as sequências de nucleotídeos de genes *phaC* alinhadas foram escolhidas para o desenho de primers tendo como parâmetro não só a conservação entre as sequências como as combinações de primers sugeridas pelo programa FastPCR (Kalendar et al., 2009). Para este fim, a sequência do gene *phaC* de *R. eutropha* foi utilizada para obter as combinações de primers que deram origem aos primers RECF1, RECF2 e RECR, e a sequência do gene *phaC* de *Pseudomonas* sp. 61-3 foi utilizada para obter as combinações de primers que deram origem aos primers P613F/P613R.

Tabela 8 - Primers desenhados com base no alinhamento de seqüências de genes de diferentes PHA sintases da classe I.

Primers	Seqüência	Fragmento
RECF1/RECR	RECF1 5' - TGTTCAGTACAAGCCGCTGA - 3' RECR 5' - GGCACGATATGGTC - 3'	778 pb
RECF2/RECR	RECF2 5' - CTGATGGTGCCGCCGTGCATC - 3' RECR 5' - GGCACGATATGGTC - 3'	731 pb
P613F/P613R	P613F 5' - TCGCGGGCACCCCTGTTGAGC - 3' P613R 5' - TGCTGTTCTGGAATAACGACAG - 3'	325 pb

A programação de temperaturas utilizada para os pares de primers RECF1/RECR, RECF2/RECR e P613F/P613R são apresentadas nas Tabelas 9, 10 e 11, respectivamente.

Tabela 9 - Condições de reação utilizadas na PCR com o par de primers RECF1/RECR.

Temperatura de desnaturação inicial:	95 °C	3 min.	} 35 ciclos
Temperatura de desnaturação:	95 °C	50 seg.	
Temperatura de anelamento:	52 a	50 s. ou 50 s. -	
	58 °C	1 seg./ciclo	
Temperatura de extensão:	72 °C	50 seg.	
Temperatura final de extensão	72 °C	5 min.	

Tabela 10 - Condições de reação utilizadas na PCR com o par de primers RECF2/RECR.

Temperatura de desnaturação inicial:	95 °C	3 min.	} 35 ciclos
Temperatura de desnaturação:	95 °C	50 seg.	
Temperatura de anelamento:	55 a	50 s. ou 50 s.	
	61 °C	-1 seg./ciclo	
Temperatura de extensão:	72 °C	50 seg.	
Temperatura final de extensão	72 °C	5 min.	

Tabela 11 - Condições de reação utilizadas na PCR com o par de primers P613F/P613R.

Temperatura de desnaturação inicial:	95 °C	3 min.	} 35 ciclos
Temperatura de desnaturação:	95 °C	40 seg.	
Temperatura de anelamento:	57 a	40 s. ou 40 s. -	
	61 °C	1 seg./ciclo	
Temperatura de extensão:	72 °C	40 s. ou 40 s. -	
		1 seg./ciclo	
Temperatura final de extensão	72 °C	5 min.	

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 1% (m/v) em TAE1X aplicando-se uma corrente de 60 mA por 2 horas utilizando a fonte de eletroforese modelo LPS-300V (Loccus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) e corados com brometo de etídeo por 15 minutos. Foi utilizado o sistema de fotodocumentação Multidoc-It Digital Imaging System (UVP, Upland, CA, Estados Unidos) para a visualização das bandas com luz UV.

4.9 Construção da biblioteca genômica dos isolados RMP824A e RMP1058BII

O DNA total do isolado RMP824A foi extraído e digerido com a enzima de restrição *Hind*III (Fermentas, Waltham, MA, Estados Unidos), bem como o plasmídeo pBBR1MCS-2 (Kovach et al., 1985). A reação de ligação foi realizada com o uso da enzima T4 DNA ligase (Fermentas) e o produto de ligação foi utilizado para transformar as linhagens *E. coli* XL1-Blue (Bullock et al., 1987) e *E. coli* S17-1 (Simon et al., 1983), pelo método de obtenção de células quimiocompetentes e transformação por choque térmico descrito por Sambrook et al. (1989).

Os clones da linhagem *E. coli* XL1-Blue foram selecionados em meio LB contendo 50 µg/mL de canamicina, IPTG e X-Gal, e foram cultivados em placas de 24 poços sendo cada clone posicionado em um poço contendo 1 mL de meio LB com canamicina na concentração de 50 µg/mL. O DNA plasmidial total de cada placa foi extraído e testado por PCR com os primers phaCF1/phaCR4 para a presença de genes que codificam para PHA sintases em geral.

Os clones da linhagem *E. coli* S17-1 foram cultivados em meio LB contendo 50 µg/mL de canamicina e testados nos meios minerais contendo glicose 5 g/L ou octanoato de

sódio 1,44 g/L e 10 µg/mL de canamicina, com relação à capacidade de estabelecer acúmulo de PHA no mutante *Pseudomonas* sp. LFM461 (Gomez, 2000).

Para o isolado RMP1058BII, o produto de ligação foi utilizado para transformar apenas a linhagem *E. coli* XL1-Blue e testados por PCR com os primers P613F/P613R para a presença de genes que codificam para PHA sintases semelhantes à PHA sintase de classe I de *Pseudomonas* sp. 61-3. Após o resultado positivo na PCR tendo como DNA molde o DNA plasmidial total de uma das placas de 24 poços testada, cada linha da placa foi testada e em seguida cada poço foi testado individualmente, até o clone positivo ser localizado e isolado dos demais.

O plasmídeo contendo o inserto foi digerido e o tamanho do fragmento foi visualizado por eletroforese em gel de agarose, além de ser testado em PCR com todos os primers utilizados no trabalho.

4.10 Clonagem do inserto contendo a PHA sintase do isolado RMP1058BII

O plasmídeo contendo o gene que codifica para uma provável PHA sintase da classe I foi transferido para a linhagem *E. coli* S17-1 quimiocompetente por transformação com choque térmico. Os clones obtidos foram cultivados em meio LB contendo canamicina e um dos clones foi selecionado para a transferência do plasmídeo para a linhagem *Pseudomonas* sp. LFM461 (Gomez, 2000) deficiente no acúmulo de PHA por conjugação.

A conjugação foi realizada por repiques de um cultivo desta linhagem sobre um tapete do clone de *E. coli* S17-1 carregando o plasmídeo com o inserto em meio mineral com 10 g/L de glicose e 10 µg/mL de canamicina, e três repiques sucessivos em meio mineral com glicose contendo 50 µg/mL de canamicina foram realizados para o clone selecionado. Controles realizados previamente à conjugação mostraram a linhagem *E. coli* S17-1 não é capaz de crescer em meio mineral com glicose com ou sem canamicina, e também não foi capaz de crescer em meio LB com 10 µg/mL de canamicina. A linhagem *Pseudomonas* sp. LFM461 foi submetida aos mesmos testes, sendo capaz de crescer apenas no teste com meio mineral sem o antibiótico.

Também foi realizada a transferência por conjugação do plasmídeo pBBR1MCS-2 sem qualquer inserto, para ser utilizado como controle nos experimentos para avaliar a produção de PHA pela linhagem recombinante. Os transconjugantes foram submetidos a três repiques sucessivos em meio mineral com glicose contendo 50 µg/mL de canamicina para confirmar a transferência do plasmídeo.

4.11 Meios de cultura e reagentes utilizados

Meio Luria Bertani (LB)

NaCl	5 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
Triptona	10 g/L

Meio Caldo Nutriente

Extrato de carne	3 g/L
Peptona	5 g/L

Meio Mineral (Ramsay et al., 1990)

Na ₂ HPO ₄	3,5 g/L
KH ₂ PO ₄	1,5 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	60 mg/L (meio mineral sólido)
(NH ₄) ₂ SO ₄	200 mg/L (meio mineral líquido com octanoato)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g/L (meio mineral líquido com glicose)
MgSO ₄ .7H ₂ O	200 mg/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	10 mg/L
Citrato férrico amoniacal	60 mg/L
H ₃ BO ₃	0,3 mg/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,2 mg/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1 mg/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,03 mg/L
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,03 mg/L
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,02 mg/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01 mg/L

Meio Mineral do ensaio em biorreator

KH ₂ PO ₄	400 mg/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	300 mg/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	20 mg/L
Citrato férrico amoniacal	60 mg/L
NaCl ₂	1,0 g/L
H ₃ BO ₃	0,6 mg/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,4 mg/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,2 mg/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,06 mg/L
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,06mg/L
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,04 mg/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,02 mg/L

Solução estoque de Nile Red A

Nile Red A	5 mg
Dimetilsulfóxido	q.s.p. 10 mL

Solução estoque Sudan Black B

Sudan Black B	0,2 g
Etanol 96%	q.s.p. 1 L

Tampão TAE50X

Tris(hidroximetil)aminometano	242 g/L
EDTA 500mM pH8	100 mL/L
Ácido acético glacial P.A.	57,1 mL/L

Tampão de transformação

Tris-HCl pH8	1,21 g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	5,5 g/L
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,24 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,2 g/L

Soluções para células quimiocompetentes

MgSO ₄ .7H ₂ O	246,47 g/L
MgCl ₂ .6H ₂ O	203,31 g/L

Solução de brometo de etídeo

Brometo de etídeo solução comercial 10 mg/mL	10 µL
Tampão TAE1X	100 mL

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento de bactérias produtoras de PHA

Um total de 1.520 isolados foi testado em meio mineral sólido contendo glicose ou octanoato como fonte de carbono e utilizando Nile Red A ou Sudan Black B como métodos qualitativos para detecção da produção de PHA.

Dos 1.200 isolados provenientes de amostras de lodo de esgoto doméstico (ETE Pq. Novo Mundo), 161 isolados, correspondendo a 13,4% dos isolados analisados, foram considerados como produtores de PHA em pelo menos uma das fontes de carbono avaliadas.

Um total de 320 isolados foi obtido no isolamento realizado a partir de amostras de solo do Campus Universitário (Reserva Florestal da Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira). Destes, 100 isolados foram detectados como produtores de PHA em pelo menos uma das fontes avaliadas, correspondendo a 31,25% dos isolados analisados.

No total, 261 isolados detectados como produtores de PHA com base nos métodos de coloração com Sudan Black B ou Nile Red A foram selecionados. Estes isolados foram avaliados quanto à produção de PHA em experimentos em frascos agitados utilizando glicose ou octanoato como fonte de carbono.

Os resultados apresentados na Tabela 12 demonstram que o Nile Red A e Sudan Black B permitiram detectar o mesmo número de isolados como produtores de PHA. Entretanto, apenas cerca de metade dos clones foram detectados com o uso de ambos os corantes. Apenas para o grupo de isolados de Matsuda (2009), foi possível detectar um número maior de isolados produtores de PHA utilizando o corante Nile Red A. O corante Sudan Black B permitiu a detecção de um número maior de isolados como produtores de PHA a partir de octanoato (Tabela 5). Posteriormente, quando analisada a produção de PHA por estes isolados se verificou que muitos deles produziam PHA_{MCL}. Resultados típicos de nosso laboratório têm demonstrado que bactérias produtoras de PHA_{MCL} coram-se mais intensamente com o corante Sudan Black B. Assim, era esperado que a partir de octanoato (uma fonte de carbono bastante adequada para produção de PHA_{MCL}) um número maior de isolados fosse detectado.

A literatura (Spiekermann et al., 1999) indica que o corante Nile Red A seria mais sensível e permitiria a detecção de quantidades menores de PHA acumulado. Esperava-se dessa forma que com esse corante fosse detectado um número muito maior de bactérias

produtoras de PHA do que utilizando o corante Sudan Black B. Os resultados apresentados nas Tabelas 13 e 14 demonstram que um número maior de isolados foi detectado como produtor de PHA utilizando Sudan Black B quando comparado a Nile Red A. Deve ser destacado, entretanto, que mais da metade dos isolados produtores de PHA foram detectados com ambos os corantes.

Qualquer fluorescência nas colônias coradas com Nile Red A ou qualquer tom levemente azulado em colônias coradas com Sudan Black B foi motivo para considerar a colônia como positiva para produção de PHA. Este critério de seleção foi adotado para evitar a perda de qualquer isolado potencialmente produtor de PHA, mas pode ter levado à seleção de alguns clones falsos positivos.

Tabela 12 - Testes em meio sólido contendo glicose como fonte de carbono.

ORIGEM DOS ISOLADOS	ISOLADOS AVALIADOS	PHA POSITIVOS			TOTAL	PERCENTUAL
		Nile Red A	AMBOS	Sudan Black B		
Lodo de esgoto (Peixoto, 2008)	832	42	30	56	68	8,17%
Lodo de esgoto (Matsuda, 2009)	368	72	42	46	76	20,65%
Solo de campus universitário (este trabalho)	320	45	15	52	82	25,62%
TOTAL	1520	159	87	154	226	14,87%

Tabela 13 - Testes em meio sólido contendo octanoato como fonte de carbono.

ORIGEM DOS ISOLADOS	ISOLADOS AVALIADOS	PHA POSITIVOS			TOTAL	PERCENTUAL
		Nile Red A	AMBOS	Sudan Black B		
Lodo de esgoto (Peixoto, 2008)	832	74	61	61	74	8,89%
Lodo de esgoto (Matsuda, 2009)	368	20	15	65	70	19,02%
Solo de campus universitário (este trabalho)	320	63	45	63	81	25,31%
TOTAL	1520	157	121	189	225	14,80%

Tabela 14 - Testes em meio sólido: avaliação quanto à fonte de carbono fornecida.

ORIGEM DOS ISOLADOS	ISOLADOS AVALIADOS	PHA POSITIVOS			TOTAL	PERCENTUAL
		Glicose	AMBOS	Octanoato		
Lodo de esgoto (Peixoto, 2008)	832	68	61	74	81	9,70%
Lodo de esgoto (Matsuda, 2009)	368	76	66	70	80	21,74%
Solo de campus universitário (este trabalho)	320	82	63	81	100	31,25%
TOTAL	1520	226	190	225	261	17,17%

5.2 Produção de PHA

Dos 261 isolados detectados como produtores de PHA com os corantes lipofílicos Nile Red A ou Sudan Black B, 108 não detectou-se a produção de qualquer PHA quando cultivados em meio mineral líquido contendo glicose ou octanoato como únicas fontes de carbono. Para 66 isolados foi detectada a produção de pequena quantidade de PHA (<5% da massa seca celular). No ANEXO A, são apresentados todos os resultados obtidos com os 261 isolados em experimentos de produção de PHA.

A Tabela 15 apresenta os resultados de bactérias nas quais se detectou a produção de P3HB maior do que 5% da massa seca celular. A linhagem *Burkholderia sacchari* LFM 101 foi utilizada como modelo de bactéria com esse perfil. *B. sacchari* produziu, a partir de glicose, P3HB correspondendo a mais de 50% da massa seca celular (Tabela 15). Em octanoato, o PHA produzido por *B. sacchari* LFM 101 correspondeu a mais de 30% da massa seca celular e foi detectada pequena fração do monômero 3-hidroxihexanoato (3HHx). A produção de copolímeros de P3HB-co-3HHx foi detectada anteriormente em cultivos *B. sacchari* suprida com glicose e ácido hexanóico, mas não com glicose e ácido octanóico (Mendonça, 2010). Nos cultivos deste trabalho, em que se utilizou ácido octanóico como única fonte de carbono, foi possível detectar pequenas frações de 3HHx. Presumivelmente, o 3HHx é derivado de intermediários obtidos após um ciclo de β -oxidação do ácido octanóico. Sua detecção no PHA produzido por *B. sacchari* LFM 101 corroboram trabalhos que indicam que a PHA sintase desta bactéria tem especificidade não só por 3HB e 3HV (Silva et al., 2000), mas também por 3HHx.

Tabela 15 - Produção de P3HB por *B. sacchari* LFM101 e isolados.

Isolado	Fonte de carbono	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
				3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDD	
LFM101	Glicose	4,76	6,51	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	53,8
		5,05	6,46	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	50,8
		4,75	6,45	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	52,4
	Média	4,85	6,47	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	52,3
	desvio-padrão	±0,17	±0,03	±0,0	±0,0	±0,0	±0,0	±0,0	±1,5
	Octanoato	1,39	7,57	99,6	0,4	0,0	0,0	0,0	38,7
		1,68	7,51	99,6	0,4	0,0	0,0	0,0	42,5
		1,55	7,51	99,5	0,5	0,0	0,0	0,0	40,3
	Média	1,54	7,53	99,6	0,4	0,0	0,0	0,0	40,5
	desvio-padrão	±0,15	±0,03	±0,1	±0,1	±0,0	±0,0	±0,0	±1,9
RMP959B	Glicose	0,40	6,77	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	29,2
		0,86	6,81	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	30,6
		0,91	7,00	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	47,8
	Média	0,72	6,86	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	35,9
	Desvio-padrão	±0,28	±0,12	±0,0	±0,0	±0,0	±0,0	±0,0	±10,4
RMP988	Octanoato	Sem crescimento							
	Glicose	1,23	6,50	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,9
	Octanoato	1,13	7,02	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

MSC – Massa seca celular; 3HB- 3-hidroxibutirato; 3HHx- 3-hidroxihexanoato; 3HO- 3-hidroxioctanoato; 3HD- 3-hidroxidecanoato; 3HDDd- 3-hidroxidodecanoato; PHA- Polihidroxialcanoato.

Tabela 15 - Produção de P3HB por *B. sacchari* LFM101 e isolados.

(conclusão)

Isolado	Fonte de carbono	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
				3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	
DCL272	Glicose	2,67	5,90	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	35,5
		2,53	6,29	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	33,6
	Média	2,60	6,10	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	34,6
	Desvio-padrão	±0,10	±0,28	±0,0	±0,0	±0,0	±0,0	±0,0	±1,3
	Octanoato	0,82	7,14	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,6
		0,69	7,21	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,7
	Média	0,76	7,18	100,0	0,0	0,0	0,0	6,7	
	desvio-padrão	±0,09	±0,05	±0,0	±0,0	±0,0	±0,0	±0,1	
SCU29	Glicose	4,37	6,41	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	43,6
	Octanoato	1,47	7,33	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	49,3
SCU31	Glicose	3,23	6,42	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	50,1
	Octanoato	1,59	7,60	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	55,3
SCU39	Glicose	2,63	6,46	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Octanoato	1,55	7,39	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	48,7
SCU42	Glicose	0,00	6,30	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Octanoato	0,99	7,60	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	42,7
SCU63	Glicose	5,40	6,49	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	56,4
	Octanoato	1,64	7,53	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	55,4
SCU66	Glicose	5,51	6,50	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	55,0
	Octanoato	1,89	7,57	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	57,8
SCU74	Glicose	3,70	6,45	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	42,0
	Octanoato	1,08	7,52	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	39,8
SCU85	Glicose	0,00	6,44	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Octanoato	0,63	7,56	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	39,5
SCU86	Glicose	3,33	6,39	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	34,0
	Octanoato	1,51	7,53	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	47,5
SCU89	Glicose	2,47	6,32	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	37,3
	Octanoato	1,54	7,36	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	53,3
SCU157	Glicose	2,97	6,37	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	27,9
	Octanoato	2,38	7,82	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	46,4
SCU177	Glicose	0,21	7,03	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3
	Octanoato	2,00	7,73	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	50,4
SCU180	Glicose	1,29	3,07	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	26,0
	Octanoato	2,43	7,60	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	45,0

MSC – Massa seca celular; 3HB- 3-hidroxi butirato; 3HHx- 3-hidroxi hexanoato; 3HO- 3-hidroxi octanoato; 3HD- 3-hidroxi decanoato; 3HDDd- 3-hidroxi dodecanoato; PHA- Polihidroxi alcenoato.

Em 17 isolados foi detectada a produção de P3HB. Um desses isolados não foi capaz de crescer utilizando octanoato como única fonte de carbono e dois utilizando glicose. Um isolado (RMP988) cresceu em octanoato, mas não produziu P3HB, embora tenha produzido esse polímero a partir de glicose. De modo inverso, o isolado SCU39 cresceu em glicose, mas não produziu P3HB, embora tenha produzido este polímero a partir de octanoato. A incapacidade de produzir P3HB a partir de glicose, mas não de octanoato, poderia ser explicada pela ausência de genes *phaA* e/ou *phaB*, cujos produtos permitem a biossíntese de

3HB-CoA a partir de acetil-CoA, enquanto que, utilizando octanoato, o 3HB-CoA poderia ser obtido diretamente a partir de intermediários da β -oxidação. Exemplo semelhante a este é o que ocorre com bactérias do gênero *Aeromonas*, que são capazes de produzir PHA a partir de ácidos graxos ou óleos vegetais, mas não a partir de carboidratos (Matsuda, 2009). A incapacidade de produzir P3HB a partir de octanoato, mas não de glicose, poderia ser explicada pela ausência do gene *phaJ*, cujo produto realiza a canalização de intermediários da β -oxidação de ácidos graxos para a biossíntese de PHA (Tsuge et al., 2000).

Um grande número de isolados acumulou P3HB correspondendo a mais que 40% da massa seca celular. Destacam-se os isolados SCU63 e SCU66 que atingiram massas secas celulares superiores a 5 g/L e contendo P3HB correspondendo a mais que 55% tanto a partir de glicose como de octanoato. A concentração de P3HB produzida por esses isolados atingiu cerca de 3,0 e 1,0 g/L a partir de glicose e octanoato, respectivamente. Estes valores são superiores àqueles atingidos pela linhagem controle, *B. sacchari* LFM101 (2,5 e 0,6 g/L a partir de glicose e octanoato, respectivamente).

Gomez et al. (1996) relataram o isolamento de um grande número de bactérias eficientes na produção de P3HB a partir de carboidratos derivados da cana-de-açúcar. Entretanto, os isolados foram obtidos após o enriquecimento de amostras de solo provenientes do cultivo da cana-de-açúcar utilizando meio mineral contendo sacarose, glicose e frutose como fonte de carbono. Assim, nesse caso em particular, a estratégia de enriquecimento, assim como o ambiente do qual se originaram os isolados, podem ter favorecido a seleção de bactérias eficientes na utilização de carboidratos para a produção de P3HB. A análise inicial de isolados obtidos em outros trabalhos, não permitiu detectar linhagens eficientes na produção de P3HB. Assim, o isolamento de bactérias a partir de amostra de solo do campus universitário foi realizado diretamente a partir da amostra, bem como após cultivos de enriquecimento em meio mineral contendo glicose ou octanoato como fontes de carbono. Os isolados apresentados na Tabela 15 e que apresentaram boa eficiência na produção de P3HB, foram obtidos tanto por isolamento direto como a partir do cultivo de enriquecimento em meio mineral com glicose. Deste modo, não se pode associar o isolamento de bactérias eficientes na produção de P3HB com o cultivo de enriquecimento. É interessante destacar que nenhum dos isolados produtores de P3HB foi obtido a partir do enriquecimento em octanoato.

A Tabela 16 apresenta os resultados de produção de PHA por isolados que produziram polihidroxialcanoatos contendo monômeros de cadeia média (PHA_{MCL}) correspondendo a mais que 5% da massa seca celular em pelo menos uma das fontes de

carbono. A linhagem *Pseudomonas* sp. LFM 046 foi utilizada como modelo de bactéria produtora desses polímeros.

Pseudomonas sp. LFM 046 produziu PHA correspondendo a mais de 35% da massa seca celular e contendo 3-hidroxidecanoato (3HD) como principal constituinte a partir de glicose. A partir de octanoato, o teor de PHA acumulado foi superior a 25% de massa seca celular e 3-hidroxi octanoato (3HO) foi o principal monômero detectado. A composição do PHA produzido a partir de glicose ou octanoato correspondeu àquela descrita na literatura para essas fontes de carbono (Silva-Queiroz et al., 2009).

Tabela 16 - Produção de PHA_{MCL} por *Pseudomonas* sp. LFM046 e isolados.

Isolado	Fonte de carbono	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
				3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDD	
LFM046	Glicose	3,39	6,48	0,6	2,9	31,4	58,8	2,7	37,8
		3,51	6,44	0,3	2,7	31,0	59,0	3,2	39,2
		3,39	6,39	0,3	2,6	31,0	59,1	3,2	41,8
	Média	3,43	6,44	0,4	2,7	31,1	59,0	3,0	39,6
	desvio-padrão	±0,07	±0,05	±0,2	±0,2	±0,2	±0,2	±0,3	±2,1
	Octanoato	1,28	7,59	1,2	15,1	69,5	11,5	1,6	30,2
		1,16	7,59	1,3	14,9	71,4	9,2	2,3	29,5
		1,23	7,50	1,2	15,6	71,9	9,2	1,4	28,8
		Média	1,22	7,56	1,2	15,2	70,9	10,0	1,8
	desvio-padrão	±0,06	±0,05	±0,0	±0,3	±1,2	±1,3	±0,5	±0,7
RMP651	Glicose	2,33	5,17	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Octanoato	0,85	7,5	3,8	15,1	74,2	3,2	3,7	11,8
RMP714	Glicose	1,75	6,68	Tr	0,0	Tr	44,4	55,7	1,3
	Octanoato	0,46	7,48	6,4	15,7	65,4	5,6	6,9	7,0
RMP802	Glicose	0,60	6,23	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Octanoato	0,70	6,60	Tr	1,9	93,5	2,0	2,5	18,7
RMP822	Glicose	1,96	5,75	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Octanoato	2,49	7,46	Tr	9,3	86,0	2,8	1,9	18,2
RMP830	Glicose	1,42	6,98	0,0	0,0	28,3	71,8	0,0	1,1
	Octanoato	0,99	7,45	0,0	13,2	81,9	3,3	1,7	22,6
RMP851A	Glicose	0,87	6,34	3,0	2,6	14,9	64,3	8,2	14,2
	Octanoato	1,86	7,73	0,0	9,0	86,2	2,9	1,9	18,7
RMP1064BII	Glicose	1,44	6,56	0,0	0,0	13,6	73,9	12,5	5,5
	Octanoato	0,40	7,44	Tr	5,6	83,9	7,5	3,1	15,9
RMP1091	Glicose	1,91	6,40	Tr	0,0	12,7	63,0	16,1	6,9
	Octanoato	1,38	7,58	0,0	3,3	90,6	3,6	2,6	14,9
RMP1108	Glicose	0,89	6,32	Tr	0,0	0,0	38,5	61,5	1,4
	Octanoato	0,31	7,52	0,0	0,0	0,0	30,8	69,2	1,2
RMP1338	Glicose	0,81	6,48	0,0	2,5	20,7	62,6	8,4	11,8
	Octanoato	0,16	7,41	0,0	8,7	86,3	2,7	2,3	20,4

MSC – Massa seca celular; 3HB- 3-hidroxibutirato; 3HHx- 3-hidroxihexanoato; 3HO- 3-hidroxi octanoato; 3HD- 3-hidroxidecanoato; 3HDDd- 3-hidroxidodecanoato; PHA- Polihidroxialcanoato.

Tabela 16 - Produção de PHA_{MCL} por *Pseudomonas* sp. LFM046 e isolados.

(continuação)

Isolado	Fonte de carbono	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
				3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDD	
RMP1362	Glicose	0,32	6,51	0,0	0,0	7,4	51,9	40,7	1,8
	Octanoato	1,37	7,12	0,0	3,3	88,1	4,6	4,0	12,7
RMP1388	Glicose	0,23	6,53	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Octanoato	0,91	7,46	0,0	4,1	89,4	3,3	3,2	11,0
DCL2	Glicose	1,33	6,36	2,5	1,6	15,3	64,1	10,3	10,7
	Octanoato	1,01	7,53	1,5	10,9	75,0	6,6	3,4	13,4
DCL6	Glicose	1,62	6,36	2,3	2,0	16,4	64,0	9,3	15,2
	Octanoato	0,54	7,53	1,5	10,1	75,3	6,6	3,6	14,7
DCL7	Glicose	1,01	6,21	0,0	1,1	9,3	72,5	8,8	24,2
	Octanoato	1,13	7,58	1,2	11,3	76,4	6,4	2,9	17,1
DCL8	Glicose	2,18	6,39	1,5	1,2	16,2	68,0	7,4	24,6
	Octanoato	0,95	7,55	0,0	10,4	76,5	7,4	3,8	12,1
DCL9	Glicose	1,34	5,93	0,0	0,0	10,7	68,2	12,0	10,8
	Octanoato	1,07	7,25	0,0	8,2	60,9	14,7	9,9	5,6
DCL10	Glicose	1,33	7,01	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Octanoato	0,71	7,28	0,0	6,3	71,6	10,2	11,9	5,1
DCL11	Glicose	2,42	6,33	1,3	1,5	16,8	68,0	7,2	23,9
	Octanoato	0,92	7,51	0,0	9,8	71,2	5,0	3,3	7,4
DCL14	Glicose	1,34	6,22	1,5	1,2	11,2	68,4	10,1	18,2
	Octanoato	0,99	7,49	0,0	7,4	50,0	20,0	13,6	4,5
SCU5	Glicose	2,72	6,47	0,0	0,9	8,1	43,6	29,7	2,72
	Octanoato	1,09	7,57	0,0	7,5	86,3	3,2	2,3	21,1
SCU10	Glicose	1,02	6,52	1,1	2,1	6,4	41,6	28,1	1,02
	Octanoato	1,12	7,58	0,0	7,6	86,1	3,1	2,7	22,2
SCU11	Glicose	2,55	6,25	1,2	1,2	6,9	42,5	30,8	2,55
	Octanoato	1,18	7,57	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU19	Glicose	0,00	6,89	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Octanoato	1,21	7,14	4,1	14,1	76,8	3,0	1,6	22,2
SCU26	Glicose	0,00	6,91	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Octanoato	1,14	7,57	4,0	14,4	77,5	2,7	1,5	23,8
SCU60	Glicose	2,91	6,49	9,3	1,2	6,2	40,7	25,0	12,3
	Octanoato	0,90	7,57	4,1	14,6	76,9	2,5	1,4	24,9
SCU90	Glicose	2,50	6,49	1,5	1,2	9,2	63,4	14,5	4,8
	Octanoato	1,24	7,52	0,0	4,0	92,0	2,7	1,4	17,7
SCU91	Glicose	3,44	6,41	0,9	1,5	8,2	60,9	16,9	8,9
	Octanoato	1,29	7,43	0,6	12,0	84,9	1,4	1,1	25,7
SCU94	Glicose	2,44	6,42	0,0	0,8	6,9	62,9	20,6	5,0
	Octanoato	1,30	7,48	0,0	7,4	89,8	1,5	1,3	23,9
SCU95	Glicose	2,44	6,46	1,7	1,3	6,5	60,4	21,8	4,4
	Octanoato	1,18	7,51	0,0	5,8	86,2	2,3	3,7	36,7
SCU99	Glicose	3,59	6,43	2,0	2,0	11,3	57,6	13,0	15,0
	Octanoato	1,35	7,54	2,2	13,5	79,3	3,0	1,6	20,1
SCU100	Glicose	2,41	5,26	1,4	1,6	11,6	60,2	14,4	10,2
	Octanoato	1,42	7,51	0,3	6,4	45,6	47,3	0,5	59,6
SCU101	Glicose	3,47	6,51	0,7	1,4	10,9	65,1	10,9	13,5
	Octanoato	1,24	7,46	1,2	12,6	79,2	3,9	2,1	23,7

MSC – Massa seca celular; 3HB- 3-hidroxi butirato; 3HHx- 3-hidroxi hexanoato; 3HO- 3-hidroxi octanoato; 3HD- 3-hidroxi decanoato; 3HDDd- 3-hidroxi dodecanoato; PHA- Polihidroxi alcanoato.

Tabela 16 - Produção de PHA_{MCL} por *Pseudomonas* sp. LFM046 e isolados.

(continuação)

Isolado	Fonte de carbono	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
				3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	
SCU104	Glicose	2,06	4,16	0,0	2,2	6,5	58,1	29,5	2,9
	Octanoato	1,18	7,54	0,0	6,6	88,3	3,2	1,9	14,1
SCU107	Glicose	2,36	6,44	1,6	1,1	5,6	58,4	23,2	4,3
	Octanoato	0,87	7,32	0,0	3,4	92,5	2,4	1,7	17,9
SCU108	Glicose	2,92	6,40	1,0	1,4	8,2	61,4	17,3	8,6
	Octanoato	1,46	7,51	0,0	11,2	86,5	1,2	1,1	23,7
SCU109	Glicose	2,99	6,44	1,1	1,4	7,5	59,5	20,2	8,3
	Octanoato	1,43	7,59	0,7	9,9	85,1	1,7	1,7	34,0
SCU110	Glicose	3,78	6,48	3,2	1,3	8,3	58,5	16,0	8,5
	Octanoato	1,56	7,43	3,1	11,8	78,1	4,3	2,7	13,2
SCU112	Glicose	3,78	6,43	3,5	1,1	7,8	57,8	17,2	7,1
	Octanoato	1,62	7,51	2,7	12,3	78,4	4,1	2,5	12,8
SCU113	Glicose	3,10	6,51	0,9	1,9	13,6	67,1	9,3	9,4
	Octanoato	1,41	7,56	0,8	9,8	85,5	2,2	1,8	15,9
SCU114	Glicose	2,64	6,44	1,7	1,0	5,6	61,2	22,5	4,1
	Octanoato	1,03	7,44	0,0	5,1	91,3	2,1	1,5	18,6
SCU115	Glicose	3,09	6,45	0,9	1,7	9,9	62,6	15,2	11,3
	Octanoato	1,51	7,52	0,5	11,2	86,2	1,1	1,0	25,5
SCU116	Glicose	0,40	6,97	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Octanoato	1,96	7,76	0,5	9,9	87,7	1,0	0,9	18,8
SCU117	Glicose	3,20	6,51	1,2	1,4	7,2	60,4	20,1	6,0
	Octanoato	1,72	7,77	0,4	11,0	86,6	1,0	0,9	30,3
SCU127	Glicose	3,04	6,50	0,8	1,7	8,5	61,2	17,8	7,3
	Octanoato	1,62	7,75	0,4	11,1	86,1	1,2	1,3	23,2
SCU143	Glicose	1,68	4,84	6,1	3,2	7,2	51,4	25,3	2,9
	Octanoato	1,51	7,79	0,0	4,7	91,5	2,3	1,2	22,0
SCU145	Glicose	2,18	6,54	2,8	1,6	5,9	60,5	21,0	4,4
	Octanoato	1,44	7,79	0,0	4,8	93,0	1,3	0,9	27,4
SCU164	Glicose	3,71	6,54	2,2	1,2	10,3	64,1	10,8	15,7
	Octanoato	0,69	7,62	1,7	14,6	72,1	4,2	4,8	37,8
SCU176	Glicose	1,23	4,56	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Octanoato	1,50	7,80	0,6	3,6	92,7	1,8	1,1	22,6
SCU179	Glicose	2,21	4,16	2,6	0,0	3,5	64,1	22,7	4,0
	Octanoato	1,63	7,76	0,0	4,3	93,7	1,3	0,8	26,2
SCU183	Glicose	1,54	3,93	0,0	0,0	5,8	71,0	16,5	2,3
	Octanoato	1,26	7,71	0,0	4,1	90,6	3,6	1,4	20,3
SCU304	Glicose	2,35	6,29	1,1	1,2	15,1	64,9	12,8	12,2
	Octanoato	0,30	7,56	2,3	6,4	74,0	8,1	9,2	6,3
SCU306	Glicose	2,48	6,26	0,0	2,3	17,2	57,3	20,2	6,3
	Octanoato	0,85	7,51	0,9	6,3	87,2	3,1	2,6	21,7
SCU307	Glicose	1,67	6,46	2,5	2,6	12,3	61,5	17,5	6,2
	Octanoato	0,92	7,60	0,0	6,9	86,9	3,7	2,5	23,6
SCU308	Glicose	1,49	5,49	0,0	0,0	12,9	58,3	21,0	9,6
	Octanoato	0,71	7,62	2,1	6,9	84,8	3,4	2,8	46,2
SCU309	Glicose	1,21	4,30	0,0	0,0	4,9	53,3	41,8	3,1
	Octanoato	0,60	7,54	0,0	6,4	84,4	4,2	5,0	15,6

MSC – Massa seca celular; 3HB- 3-hidroxi butirato; 3HHx- 3-hidroxi hexanoato; 3HO- 3-hidroxi octanoato; 3HD- 3-hidroxi decanoato; 3HDDd- 3-hidroxi dodecanoato; PHA- Polihidroxi alcenoato.

Tabela 16 - Produção de PHA_{MCL} por *Pseudomonas* sp. LFM046 e isolados.

Isolado	Fonte de carbono	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
				3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDD	
SCU311	Glicose	2,15	6,39	2,7	1,2	7,0	52,2	21,4	9,2
	Octanoato	0,78	7,43	2,4	10,9	75,4	3,6	5,9	16,9
SCU312	Glicose	1,78	5,51	0,0	0,0	6,1	49,6	44,4	2,1
	Octanoato	0,66	7,56	0,0	6,3	82,6	3,6	5,4	25,6
SCU313	Glicose	0,84	6,30	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Octanoato	0,92	7,55	0,0	6,4	84,8	4,3	4,5	21,0
SCU314	Glicose	2,19	5,87	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Octanoato	1,11	7,61	1,7	13,0	78,8	2,9	2,3	29,3
SCU315	Glicose	2,55	5,60	0,0	2,3	12,6	57,8	20,9	6,2
	Octanoato	0,99	7,49	0,0	5,6	89,8	2,6	1,9	27,0

MSC – Massa seca celular; 3HB- 3-hidroxi butirato; 3HHx- 3-hidroxi hexanoato; 3HO- 3-hidroxi octanoato; 3HD- 3-hidroxi decanoato; 3HDD- 3-hidroxi dodecanoato; PHA- Polihidroxi alcanoato.

Em 11 isolados, foi detectada a produção do polímero apenas a partir de octanoato, e não em glicose. Esse comportamento é similar àquele observado em *P. oleovorans* (Timm et al., 1990). Nessa bactéria, embora o gene *phaG* esteja presente ele não é expresso (Hoffmann et al., 2000), resultando na incapacidade de direcionar intermediários da biossíntese de ácidos graxos para a biossíntese de PHA. Um isolado produziu PHA_{MCL} a partir de glicose, mas não de octanoato. Embora comportamento similar a esse não tenha sido descrito na literatura, uma explicação possível para esse fenótipo seria a ausência do gene *phaJ*, que direciona intermediários da β -oxidação de ácidos graxos para a biossíntese de PHA.

Apenas 3 isolados (DCL7, DCL8 e DCL11) atingiram teores de PHA_{MCL} superiores a 20% da massa seca celular a partir de glicose, mas nenhum isolado atingiu valor semelhante àquele obtido com *Pseudomonas* sp. LFM 046 (> 35% da massa seca celular).

Por outro lado, a partir de octanoato, 31 isolados produziram PHA_{MCL} correspondendo a mais de 20% e 6 apresentaram acúmulo superior à linhagem controle (> 29% da massa seca celular), chegando ao valor de 59,6% para o isolado SCU100.

Embora por vezes monômeros 3HB sejam detectados em bactérias produtoras de PHA_{MCL}, a quantidade desses monômeros é pequena (< 5 mol%). A Tabela 17 apresenta resultados de isolados para os quais foi detectada a produção de PHA contendo frações molares expressivas de 3HB, bem como monômeros 3HA_{MCL} (3HHx, 3HO, 3HD ou 3HDD), sugerindo a produção de uma mistura de dois polímeros distintos: P3HB e PHA_{MCL}.

Uma bactéria que poderia ser utilizada como modelo para a produção simultânea de P3HB e PHA_{MCL} é a linhagem *Pseudomonas* sp. 61-3 (Abe et al., 1994). Nessa bactéria, foram detectadas duas classes de PHA sintases: duas da classe II, responsáveis pela síntese de PHA_{MCL}, e uma da classe I, que utiliza 3HB-CoA como principal substrato.

Pseudomonas sp. 61-3 está depositada apenas em uma coleção de culturas japonesa, deste modo não foi possível obtê-la para ser utilizada como modelo da produção deste tipo de polímero.

Tabela 17 - Produção de misturas de P3HB e PHA_{MCL} por isolados.

Isolado	Fonte de carbono	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
				3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDD	
RMP690	Glicose	2,04	6,21	0,0	TR	14,9	68,2	11,5	14,1
		2,54	6,23	TR	1,2	11,0	65,5	16,5	9,0
		2,67	6,19	TR	1,1	10,9	66,0	16,3	9,2
	Média	2,42	6,21	0,0	1,2	12,3	66,6	14,7	10,8
	desvio-padrão	±0,33	±0,02	±0,0	±0,1	±2,2	±1,4	±2,8	±2,9
	Octanoato	0,99	7,44	85,8	0,7	9,8	2,6	1,1	27,2
		0,93	7,46	85,8	0,7	9,9	2,5	1,1	28,4
		1,64	7,49	91,9	0,3	5,7	0,9	1,3	35,9
	Média	1,19	7,46	87,8	0,6	8,5	2,0	1,1	30,5
	desvio-padrão	±0,39	±0,03	±3,5	±0,2	±2,4	±1,0	±0,1	±4,7
RMP782	Glicose	1,84	5,87	98,5	0,0	1,5	0,0	0,0	19,2
	Octanoato	2,90	7,53	2,6	1,9	92,6	1,4	1,5	24,1
RMP824A	Glicose	0,83	6,28	49,5	TR	6,4	26,4	17,7	3,9
		0,42	6,23	44,0	1,2	7,1	28,9	17,6	4,4
		0,66	6,15	65,4	TR	2,4	12,5	15,5	6,0
	Média	0,64	6,22	53,0	1,2	5,3	22,6	17,0	4,8
	desvio-padrão	±0,21	±0,07	±11,1	±0,0	±2,5	±8,9	±1,2	±1,1
	Octanoato	0,91	7,61	81,4	1,7	17,0	0,0	0,0	24,6
		0,73	7,54	74,0	1,7	24,3	Tr	0,0	26,8
		0,84	7,51	37,5	3,8	55,1	2,2	1,4	27,6
	Média	0,83	7,55	64,3	2,4	32,1	1,1	0,5	26,4
	desvio-padrão	±0,09	±0,05	±23,5	±1,2	±20,3	±1,6	±0,8	±1,6
RMP997	Glicose	1,62	6,67	64,9	0,0	Tr	14,6	20,5	1,8
		2,88	6,37	61,7	0,0	Tr	16,4	22,0	1,7
		1,73	6,33	61,3	0,0	Tr	14,9	23,8	2,3
	Média	2,08	6,46	62,6	0,0	0,0	15,3	22,1	1,9
	desvio-padrão	±0,70	±0,19	±2,0	±0,0	±0,0	±0,9	±1,6	±0,3
	Octanoato	0,84	7,55	79,3	0,0	20,7	0,0	0,0	1,5
		0,72	7,50	43,6	5,9	22,0	12,9	15,6	2,7
		0,89	7,44	45,2	5,9	22,7	10,6	15,5	2,5
	Média	0,82	7,50	56,1	3,9	21,8	7,8	10,4	2,2
	desvio-padrão	±0,09	±0,06	±20,2	±3,4	±1,0	±6,9	±9,0	±0,6
RMP1058BII	Glicose	2,48	3,86	32,2	0,7	7,7	44,1	11,1	15,6
		2,37	3,49	32,6	0,7	7,5	44,2	10,9	15,5
		1,59	3,64	29,4	1,2	4,1	37,1	22,5	7,8
	Média	2,15	3,66	31,4	0,9	6,4	41,8	14,8	13,0
	desvio-padrão	±0,49	±0,19	±1,8	±0,3	±2,0	±4,1	±6,6	±4,4
	Octanoato	1,12	7,54	90,7	0,5	7,1	1,0	0,7	36,9
		1,44	7,56	90,1	0,5	7,7	1,1	0,7	37,0
		1,32	7,42	91,1	0,3	6,0	0,7	1,4	38,8
	Média	1,29	7,51	90,6	0,4	6,9	0,9	0,9	37,6
	desvio-padrão	±0,16	±0,08	±0,5	±0,1	±0,9	±0,2	±0,4	±1,1

MSC – Massa seca celular; 3HB- 3-hidroxibutirato; 3HHx- 3-hidroxihexanoato; 3HO- 3-hidroxioctanoato; 3HD- 3-hidroxidecanoato; 3HDDd- 3-hidroxidodecanoato; PHA- Polihidroxialcanoato; TR-Traços.

Tabela 17 - Produção de misturas de P3HB e PHA_{MCL} por isolados.

Isolado	Fonte de carbono	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
				(conclusão)					
RMP1347AII	Glicose	2,34	6,16	0,0	0,0	Tr	45,3	54,7	1,6
		2,48	6,17	0,0	0,0	Tr	44,7	55,3	1,5
		2,52	3,45	0,0	0,0	Tr	49,3	50,7	2,1
	Média	2,45	5,26	0,0	0,0	0,0	46,4	53,6	1,7
	desvio-padrão	±0,09	±1,57	±0,0	±0,0	±0,0	±2,5	±2,5	±0,3
	Octanoato	1,17	7,49	44,2	2,7	47,8	3,5	1,9	19,0
		1,15	7,49	44,5	2,6	47,7	3,3	1,8	20,0
		1,22	7,56	69,3	1,2	25,2	2,2	2,0	15,8
		Média	1,18	7,51	52,7	2,2	40,2	3,0	1,9
	desvio-padrão	0,04	±0,04	±14,4	±0,8	±13,0	±0,7	±0,1	±2,2
SCU92	Glicose	2,37	4,86	17,8	0,0	3,1	53,1	20,2	3,1
	Octanoato	1,41	7,41	1,6	4,1	91,6	1,6	1,1	22,3

MSC – Massa seca celular; 3HB- 3-hidroxibutirato; 3HHx- 3-hidroxihexanoato; 3HO- 3-hidroioctanoato; 3HD- 3-hidroxidecanoato; 3HDDd- 3-hidroxidodecanoato; PHA- Polihidroxialcanoato; TR-Traços.

Em 7 isolados foi detectada a produção de PHA contendo 3HB como principal constituinte e PHA_{MCL} (Tabela 17). Apenas 3 isolados acumularam PHA correspondendo a mais que 5% da massa seca celular a partir de glicose. RMP690 e RMP1347AII acumularam um PHA contendo quase exclusivamente monômeros HA_{MCL}. Para os demais isolados a fração molar de 3HB variou entre 17 e quase 100%. O isolado RMP1058BII acumulou um polímero contendo misturas de P3HB e PHA_{MCL} correspondendo, respectivamente, a cerca de 30 e 70 mol%.

A partir de octanoato, os isolados RMP690 e RMP1058BII acumularam um PHA contendo mais que 85% de P3HB em sua composição.

Em alguns dos cultivos, a composição do polímero foi bastante variável. Gomes (2010) construiu linhagens recombinantes de *Pseudomonas* sp. LFM 046 abrigando genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha*. Algumas dessas linhagens recombinantes produziam simultaneamente P3HB e PHA_{MCL}, e também foi observada grande variação na composição desses PHA. Gomes sugeriu uma competição entre as duas PHA sintases pelos monômeros para explicar essa grande variação. Timm et al. (1990) construíram uma linhagem recombinante de *Pseudomonas oleovorans* abrigando os genes de biossíntese de P3HB de *R. eutropha*. A produção de uma mistura de P3HB e PHA_{MCL} a partir de ácido octanóico por essa linhagem recombinante ficou evidenciada em cultivo em biorreator que claramente demonstrou que a fração molar de 3HB e 3HA_{MCL} variava ao longo do cultivo. Ou seja, no início do cultivo a quantidade de PHA_{MCL} era superior a de P3HB, entretanto, ao longo do cultivo foi aumentando gradativamente a fração molar de P3HB ao ponto de superar a quantidade de PHA_{MCL}.

A Figura 2 apresenta os cromatogramas referentes a análises de PHA produzidos a partir de glicose ou octanoato pelas linhagens *B. sacchari* LFM101 e *Pseudomonas* sp. LFM046, bem como pelo isolado RMP1058BII. Esta figura ilustra mais claramente porque os sete isolados, aqui exemplificados pelo isolado RMP158BII, devem produzir uma mistura de P3HB/PHA_{MCL}. A linhagem *B. sacchari* LFM101 apresenta PHA sintase da classe I, ou seja, é capaz de produzir um polímero contendo essencialmente monômeros 3HB. Eventualmente, esta PHA sintase incorpora monômeros 3HA_{MCL}, embora em pequena quantidade. Isso é o que se observa na Figura 2B, pois quando octanoato foi fornecido como fonte de carbono, monômeros 3HHx foram incorporados, entretanto, representando uma pequena fração do PHA. Por outro lado, a linhagem *Pseudomonas* sp LFM046 apresenta apenas PHA sintases da classe II, que incorporam essencialmente monômeros 3HA_{MCL}. Assim, embora 3HB seja detectado, esse representa apenas uma pequena fração do PHA produzido (Figura 2C e 2D). A produção de mistura de P3HB/PHA_{MCL} fica evidenciada para o isolado RMP1058BII, pois as frações molares de 3HB e 3HA_{MCL} são igualmente elevadas. Além disso, se for excluída a fração molar de 3HB, fica claro que os demais monômeros respeitam aquela mesma proporção verificada em PHA_{MCL} produzidos a partir de diferentes fontes de carbono. Ou seja, a partir de glicose, 3HD é o principal constituinte e 3HO um constituinte secundário, enquanto que, a partir de octanoato, 3HO é o principal constituinte e 3HHx o componente secundário.

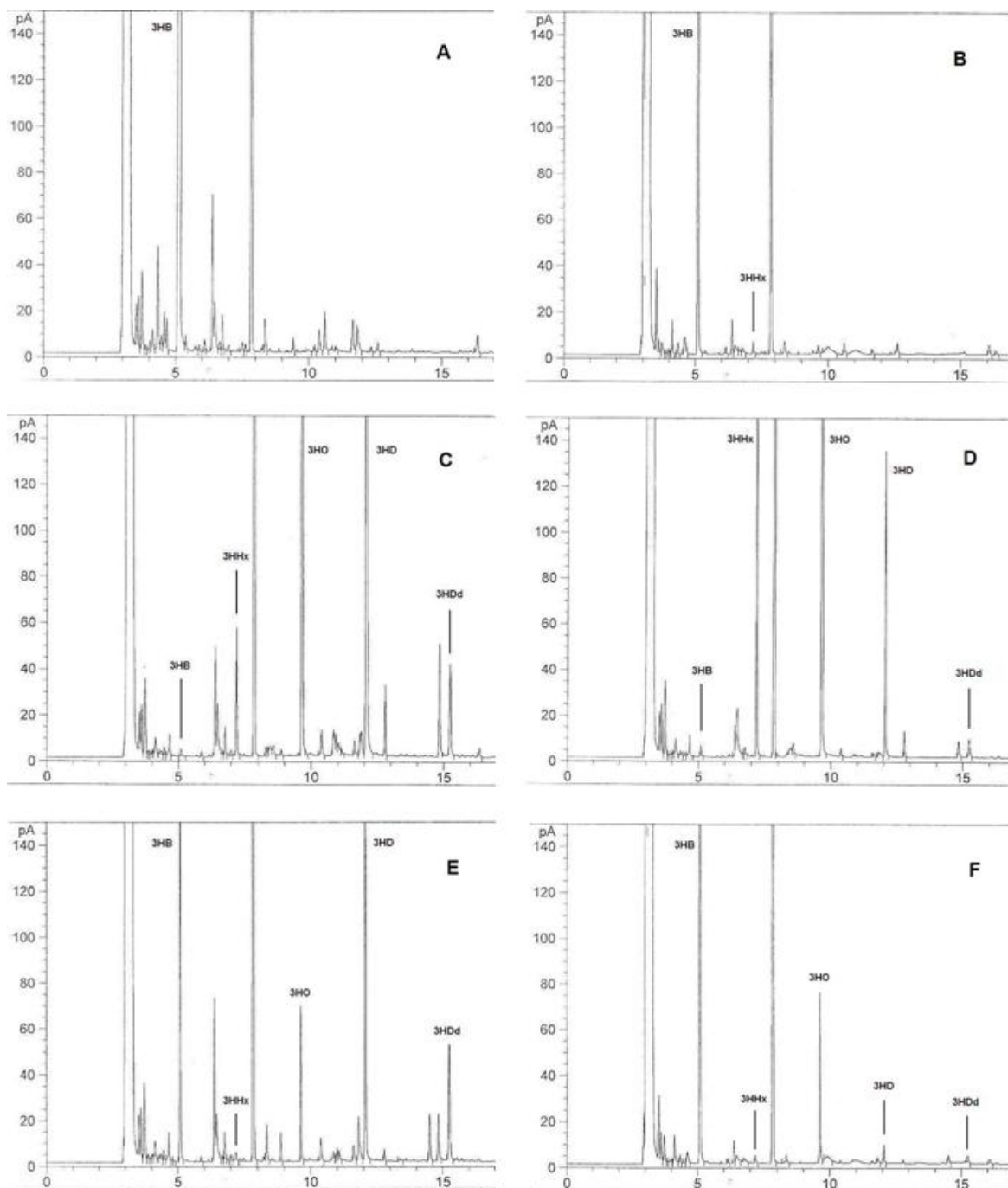


Figura 2. Cromatogramas exibindo o perfil de composição monomérica de diferentes tipos de PHA: A-P3HB, LFM 101 cultivada com glicose; B-P3HB e P3HHx, LFM 101 cultivada com octanoato; C-PHA_{MCL}, LFM 046 cultivada com glicose; D-PHA_{MCL} LFM 046 cultivada com octanoato; E-P3HB e PHA_{MCL}, RMP 1058BII cultivada com glicose; F-P3HB e PHA_{MCL}, RMP 1058BII cultivada com octanoato.

5.3 Reavaliação dos procedimentos qualitativos de seleção de bactérias PHA+.

Com o objetivo de reavaliar a eficiência do procedimento qualitativo para detecção de bactérias produtoras de PHA utilizando os corantes Nile Red A e Sudan Black B, foram revistas as qualificações dos isolados como produtores ou não PHA e a efetiva confirmação da produção de PHA após a análise por cromatografia gasosa a partir dos cultivos em meio líquido (Figura 3).

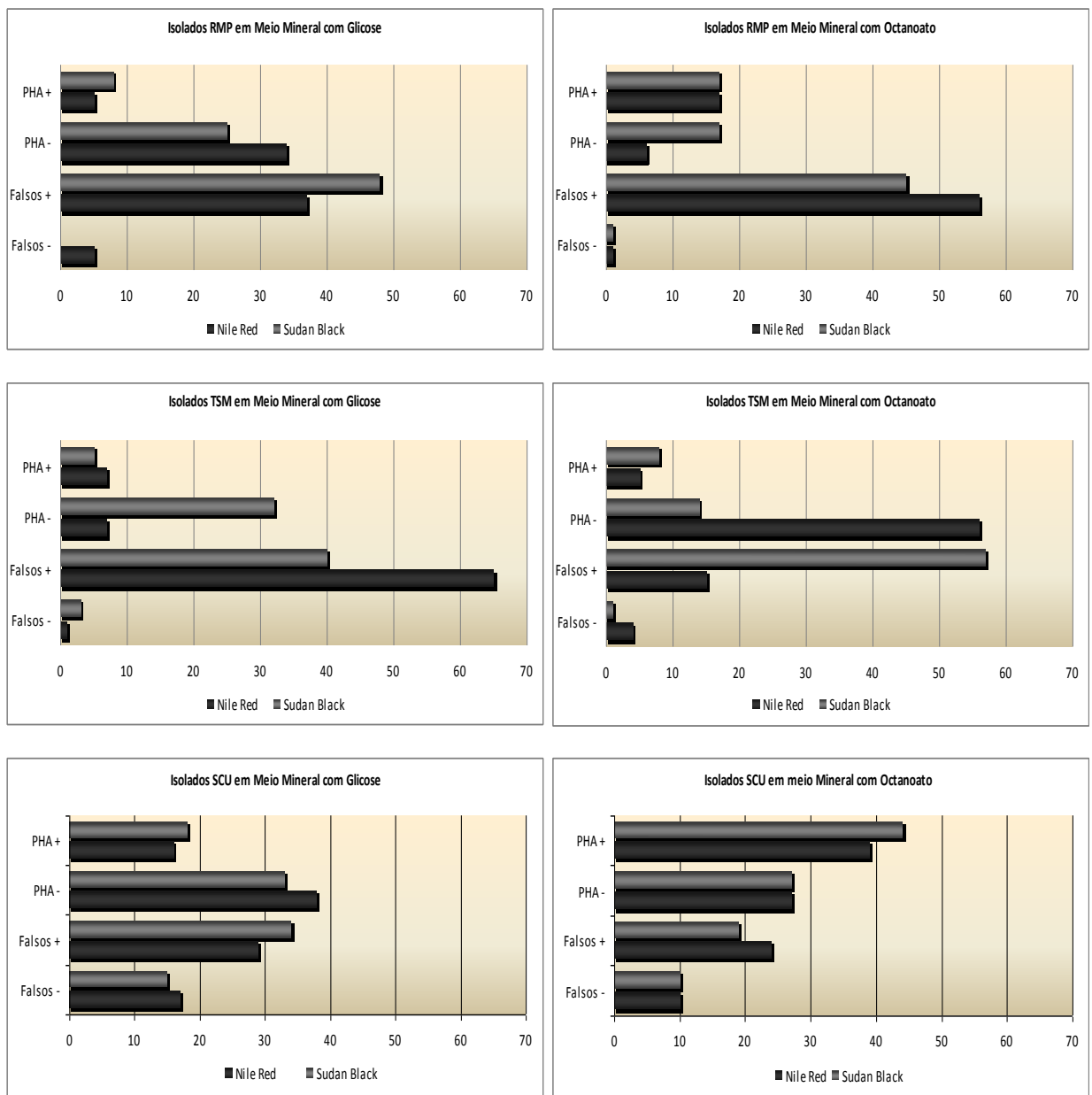


Figura 3. Comparação do número de isolados detectados por Nile Red A ou Sudan Black B. PHA+: Detecção e produção confirmada; PHA-: Não-detecção e não-produção; Falsos+: Detecção e não-produção; Falsos-: Não-detecção e produção confirmada.

Como se observa na Figura 3, para uma parcela significativa dos isolados, o resultado da análise qualitativa foi confirmado na análise quantitativa (Figura 3, isolados classificados como PHA+ ou PHA-). O número de isolados falsos positivos também foi bastante elevado, mas como informado anteriormente qualquer leve coloração ou fluorescência era considerada como positivo, uma vez que a produção ou não de PHA poderia ser confirmada posteriormente. Assim, também era esperado um número elevado de falsos positivos.

5.4 Ensaio em biorreator com o isolado RMP1058BII

Dentre os isolados que apresentaram acúmulo de misturas de P3HB e PHA_{MCL}, o isolado RMP1058BII foi o único capaz de acumular mais de 5% da massa seca celular de um PHA composto por cerca de 30 mol% de 3HB, e PHA_{MCL} composto principalmente por monômeros 3HD, a composição típica de PHA_{MCL} produzido em cultivos com glicose. Além disso, nos cultivos em octanoato, este isolado apresentou a maior porcentagem de PHA acumulado, contendo cerca de 90 mol% de 3HB, confirmando assim sua capacidade de acumular este polímero a partir de fontes de carbono com estrutura diretamente relacionadas com a estrutura dos monômeros produzidos.

Desta forma, este isolado foi selecionado para avaliar a cinética de acúmulo de PHA em cultivo realizado em biorreator sendo fornecida glicose como única fonte de carbono e limitado na fonte de nitrogênio ((NH₄)₂SO₄). Adições de glicose foram realizadas com o objetivo de manter sua concentração no meio em torno de 10 g/L e suprir fonte de carbono em excesso para proporcionar o acúmulo mais expressivo de PHA.

Durante a fase de crescimento celular (não limitado na fonte de nitrogênio – até cerca de 68 horas de cultivo), a biomassa residual aumentou até atingir quase 10 g/L (Figura 4). Esse valor é bastante elevado se for considerada a quantidade de fonte de nitrogênio (nutriente limitante da multiplicação celular) suprida e indica a produção de algum componente celular formado exclusivamente a partir de outros nutrientes. Um produto que pode estar sendo formado seria alginato que é produzido por algumas linhagens de *Pseudomonas*. De fato foi observada a produção de um polissacarídeo durante o cultivo. A fase exponencial de crescimento se estendeu de 18 a 56 horas do cultivo e a velocidade específica máxima de crescimento atingida foi de 0,047 h⁻¹.

Durante a fase de crescimento celular, observou-se o acúmulo de algum PHA. Teores de PHA superiores a 1% da massa seca celular só foram observados após 15 horas de cultivo. O teor de PHA manteve-se inferior a 5% da massa seca celular até 72 horas. Após a exaustão

da fonte de nitrogênio, observou um acúmulo mais expressivo de PHA, entretanto, mesmo após 64 horas de cultivo o teor de PHA na célula iniciou a se elevar. Esse fato indica que não é necessária a exaustão completa da fonte de nitrogênio para que ocorra o acúmulo de PHA, mas quando esse nutriente se torna limitante do crescimento celular, o acúmulo de PHA pode ocorrer (Figura 4). Ao final de 96 horas de cultivo, o teor de PHA atingiu cerca de 20% da massa seca celular, correspondendo a pouco menos de 3 g/L de PHA.

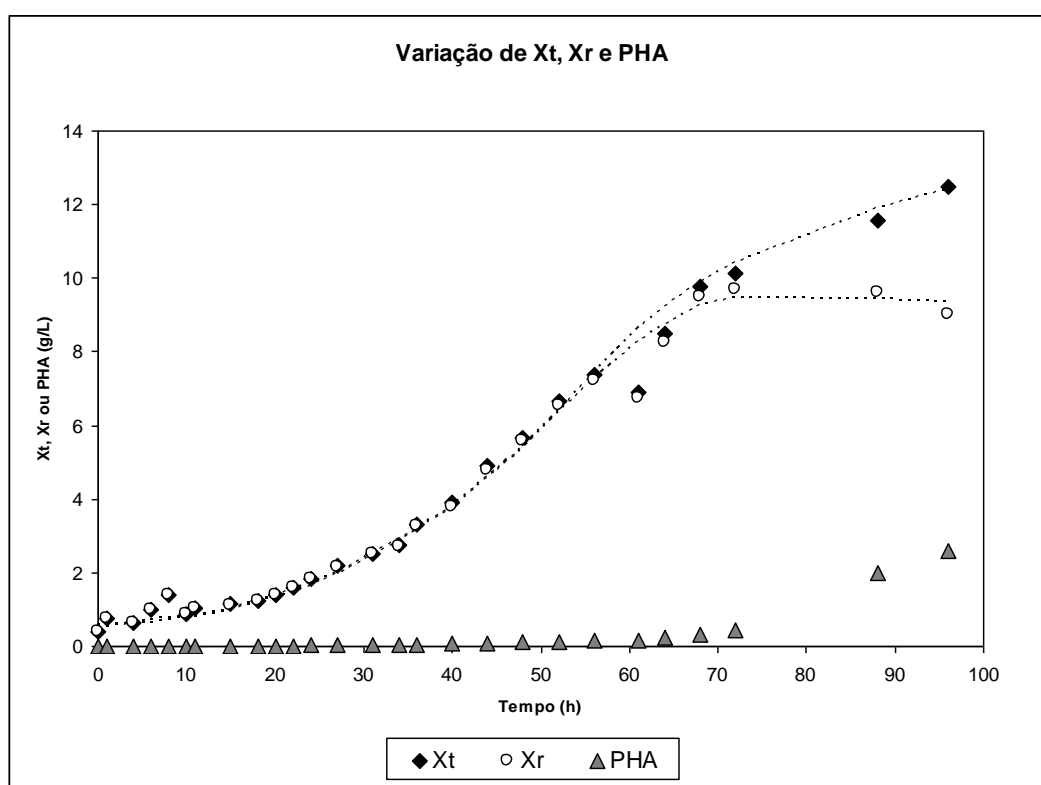


Figura 4. Variação da concentração de biomassa total (X_t), biomassa residual (X_r) e PHA produzido pelo isolado RMP1058BII no ensaio em biorreator com glicose.

A composição do polímero sofreu mudanças ao longo do tempo: P3HB só pode ser detectado após 64 horas de cultivo, ou seja, a partir do momento em que o cultivo estava limitado na fonte de nitrogênio. Até este momento do cultivo, apenas $3HA_{MCL}$ haviam sido detectados. Ao final do cultivo a composição do PHA observada foi: 3HB 5,92 mol%, 3HHx 0,77 mol%, 3HO 12,31 mol%, 3HD 60,56 mol%, 3HDd 9,67 mol% e 3HDd Δ_5 10,76 mol%. Durante a fase de acúmulo, observou-se a produção tanto de monômeros HA_{MCL} como 3HB (Figura 5), entretanto, a quantidade de 3HB aumenta numa taxa menor do que os monômeros $3HA_{MCL}$, compatível com a produção de uma mistura de dois polímeros

Baseando-se nos resultados dos ensaios em frascos agitados, a produção de um polímero contendo maior fração de P3HB seria observada se octanoato fosse suprido como

fonte de carbono, porém deve-se levar em conta para ensaios futuros o fato de que o octanoato de sódio pode inibir o crescimento em concentrações relativamente baixas.

A partir dos dados obtidos neste ensaio, pode-se concluir que, nestas condições, a velocidade específica de crescimento do isolado RMP1058BII é baixa se comparada a outros microrganismos, e sugere-se um ensaio com reformulação do meio de cultura com menor concentração de fonte de nitrogênio, para que a extensão da fase de crescimento seja reduzida, permitindo acompanhar a cinética de acúmulo de PHA por mais tempo.

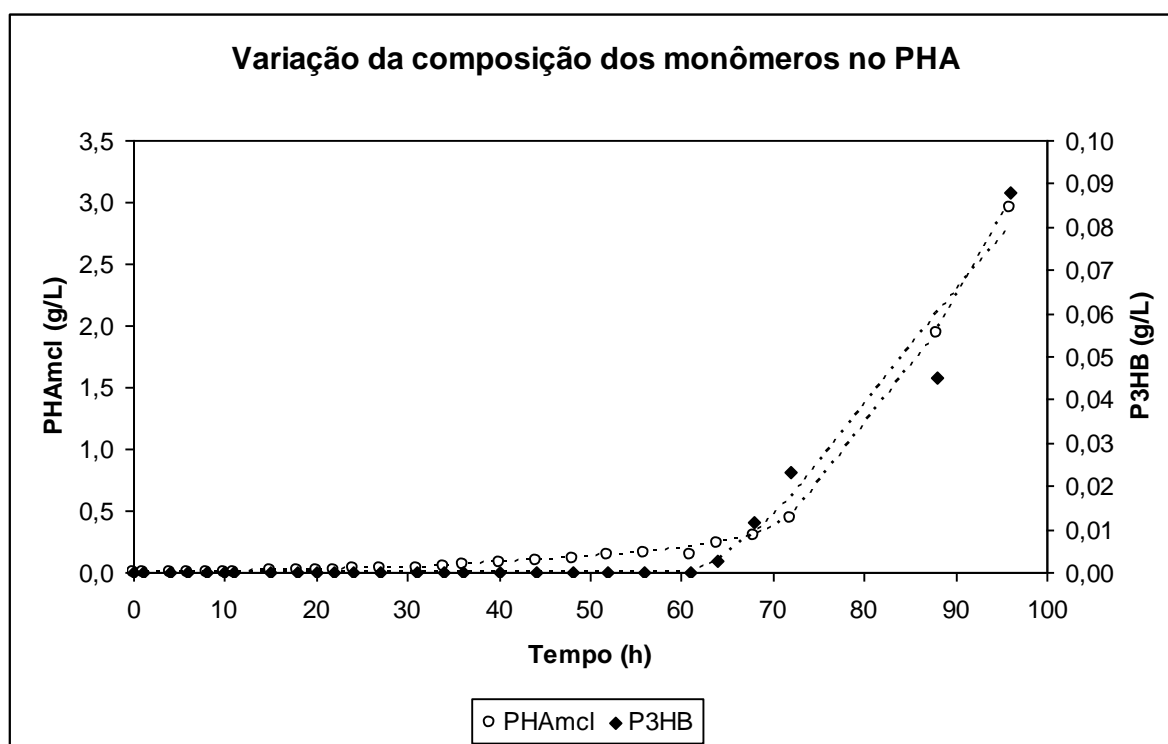


Figura 5. Variação da composição monomérica do PHA produzido pelo isolado RMP1058BII no ensaio em biorreator com glicose.

5.5 Análise de genes de PHA sintase

Para a investigação dos genes de PHA sintase foram escolhidos os isolados nos quais se detectou a produção simultânea de P3HB e PHA_{MCL}. Esses isolados foram escolhidos uma vez que devem apresentar genes de PHA sintases das classes I e II, representando dessa forma um desafio interessante para que os primers sejam capazes de diferenciar esses dois tipos de genes.

Inicialmente, foram realizados testes com primers descritos na literatura. Foram utilizados os pares de primers phaCF1/phaCR4 (Sheu et al., 2000) e I-179L/I-179R ou

DEV15R/DEV15L (Solaiman, 2002). Como controles para genes que codificam para PHA sintases da Classe I foram utilizados: o plasmídeo pJM9131 (Kidwell et al., 1995), que abriga o operon de biossíntese de P3HB de *R. eutropha*; bem como o DNA total de *R. eutropha* LFM026 ou *B. sacchari* LFM101, ambas produtoras de P3HB. Como controles para genes que codificam para PHA sintases da Classe II foram utilizados: o plasmídeo pBHR71 (Langenbach et al., 1997), que abriga o gene *phaCI* de *Pseudomonas aeruginosa*, bem como DNA total de *Pseudomonas* sp. LFM046.

O uso do par de primers phaCF1/phaCR4 deve gerar um amplicon de cerca de 500 pb. Foram observados amplicons do tamanho esperado tanto quando o plasmídeo pJM9131 como quando o plasmídeo pBHR71 foram utilizados (Figura 6). Quando o DNA total de bactérias foi utilizado, observou-se uma banda de fraca intensidade para os controles *R. eutropha* LFM026, *Pseudomonas* sp. LFM046 e *B. sacchari* LFM101 representando o amplicon do tamanho esperado (Figura 6A). Esses resultados indicam claramente que os primers phaCF1/phaCR4 geram amplicons tanto a partir de genes de PHA sintase da classe I como da classe II. Quando foi utilizado o DNA genômico de isolados obtidos neste trabalho, não se conseguiu uma boa amplificação para nenhum dos isolados (Figura 6B). Apenas bandas fracas foram observadas para os isolados RMP782, RMP1058BII e RMP1347AII (Figura 6B). Para os outros isolados é difícil afirmar que qualquer amplicon tenha sido obtido.

O par de primers I-179L/I-179R deve gerar um amplicon de cerca de 500 pb. Como pode ser observado na Figura 7, o amplicon esperado foi observado para os controles que possuem genes de PHA sintases da classe II (pBHR71 e DNA total de *Pseudomonas* sp. LFM046) e não para aqueles que possuem genes de PHA sintase de classe I (pJM9131, *R. eutropha* LFM026 e *B. sacchari* LFM101) (Figura 7A). Para todos os isolados produtores de P3HB/PHA_{MCL} analisados foi observado o amplicon no tamanho esperado, e para os isolados SCU63 e SCU66, produtores de P3HB, nenhum amplicon foi gerado (Figura 7B).

Os resultados indicam que os primers I-179L/I-179R são específicos para a detecção de genes de PHA sintases da classe II; e que, por outro lado, os primers phaCF1/phaCR4 permitem a detecção de genes tanto de PHA sintases da classe I como de PHA sintases da classe II. Além disso, esses primers podem falhar quando DNA genômico é utilizado como molde. De fato, quando Sheu et al. (2000) desenharam os iniciadores phaCF1/phaCR4, foram alinhadas seqüências de PHA sintases das classes I e II para a definição das regiões conservadas.

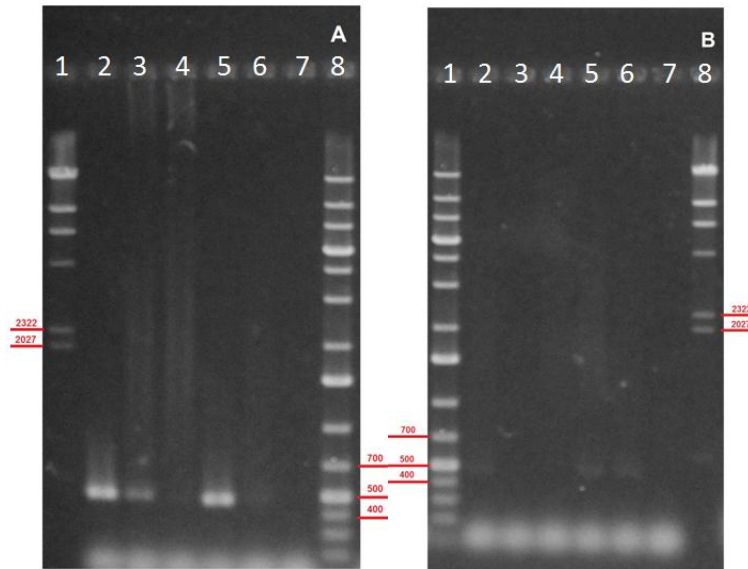


Figura 6. Testes com os primers phaCF1/phaCR4. A: *Linha 1:* Marcador de peso molecular λ HindIII; *Linha 2:* pJM9131; *Linha 3:* *R.eutropha* LFM026; *Linha 4:* *B. sacchari* LFM101; *Linha 5:* pBHR71; *Linha 6:* *Pseudomonas* sp. LFM046; *Linha 7:* Sem DNA; *Linha 8:* Marcador de peso molecular 1kb Plus. B: *Linha 1:* Marcador de peso molecular 1kb Plus; *Linha 2:* RMP782; *Linha 3:* RMP824A; *Linha 4:* RMP997; *Linha 5:* RMP1058BII; *Linha 6:* RMP1347AII; *Linha 7:* Sem DNA; *Linha 8:* Marcador de peso molecular λ HindIII.

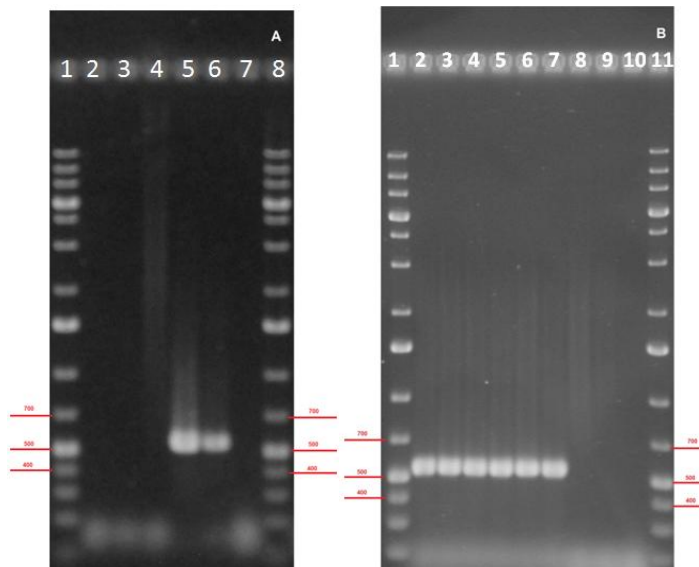


Figura 7. Testes com os primers I-179L/I-179R. A: *Linha 1:* Marcador de peso molecular 1kb Plus; *Linha 2:* pJM9131; *Linha 3:* *R.eutropha* LFM026; *Linha 4:* *B. sacchari* LFM101; *Linha 5:* pBHR71; *Linha 6:* *Pseudomonas* sp. LFM046; *Linha 7:* Sem DNA; *Linha 8:* Marcador de peso molecular 1kb Plus. B: *Linha 1:* Marcador de peso molecular 1kb Plus; *Linha 2:* RMP690; *Linha 3:* RMP782; *Linha 4:* RMP824A; *Linha 5:* RMP997; *Linha 6:* RMP1058BII; *Linha 7:* 1347AII; *Linha 8:* SCU63 *Linha 9:* SCU66; *Linha 10:* Sem DNA; *Linha 11:* Marcador de peso molecular 1kb Plus.

A Figura 8 apresenta a organização dos genes de PHA sintase da classe II (*phaC1* e *phaC2*) em espécies de *Pseudomonas*, que flanqueiam o gene que codifica uma PHA despolimerase (*phaZ*). Os primers desenhados por Solaiman (2002) permitem a realização de uma reação de PCR semi-nested, ou seja, inicialmente podem ser gerados amplicons utilizando as combinações de primers I-179L/DEV15R ou DEV15L/I-179R, que são utilizados como DNA molde em uma segunda reação de PCR utilizando os primers I-179L/I-179R. A reação semi-nested garante um melhor resultado de amplificação e permite confirmar a presença do gene *phaZ* flanqueado pelos genes *phaC1* e *phaC2*.



Figura 8. Regiões flanqueadas pelos primers utilizados na detecção de PHA sintases da classe II.
Fonte: Solaiman e Ashby, 2005.

A PCR com o par de primers I-179L/DEV15R mostrou-se inespecífica nas condições de reação utilizadas, apresentando várias bandas além daquela de tamanho esperado, de aproximadamente 1,3 kb (dados não apresentados). Assim, a estratégia semi-nested utilizando esses primers foi abandonada.

A primeira reação semi-nested também foi realizada utilizando os primers DEV15L/I-179R (Figura 9A). Dentre os DNA controle, apenas com o DNA total de *Pseudomonas* sp. LFM046 foi observado amplicon nesta reação e apresentando o tamanho esperado (1,5 kb), correspondendo a uma banda bastante forte. Quando a segunda reação semi-nested foi realizada utilizando os primers I-179L/I-179R, a banda de tamanho esperado foi observada (Figura 10A).

A primeira reação semi-nested utilizando os primers DEV15L/ I-179R também foram realizadas utilizando o DNA total de isolados produtores de P3HB/PHA_{MCL} (Figura 9B). Na primeira reação do semi-nested foram obtidos amplicons do tamanho esperado, exceto para o isolado RMP997 que apresentou um amplicon um pouco menor que os demais isolados. Na segunda reação semi-nested, também foram observados amplicons únicos para os isolados produtores de misturas de P3HB e PHA_{MCL}, e nenhum amplicon foi gerado na reação com os isolados SCU63 e SCU66, produtores de P3HB, mostrando a especificidade por PHA sintases da classe II averiguada nos testes com os controles (Figura 10B). Além disso, os resultados

indicam que os genes associados a biossíntese de PHA_{MCL} devem se encontrar na disposição frequentemente encontrada em linhagens de *Pseudomonas* (*phaC1phaZphaC2*).

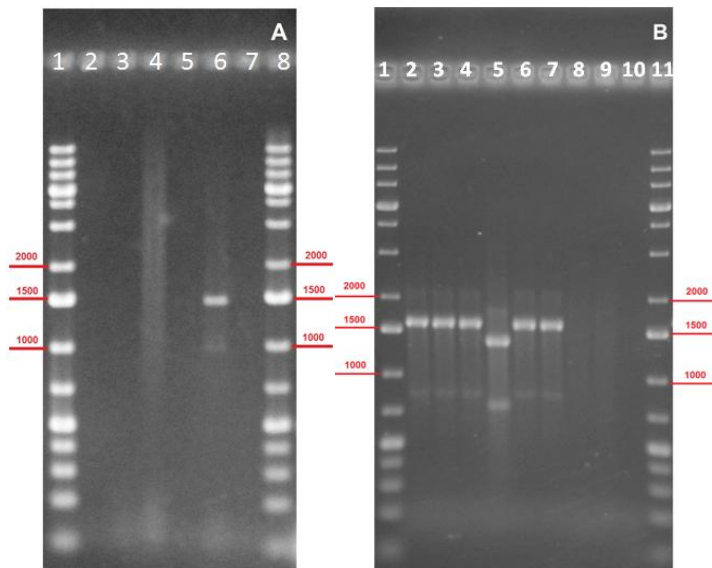


Figura 9. Primeira etapa da reação de semi-nested PCR com os primers DEV15L/I-179R. A: *Linha 1*: Marcador de peso molecular 1kb Plus; *Linha 2*: pJM9131; *Linha 3*: *R.eutropha* LFM026; *Linha 4*: *B. sacchari* LFM101; *Linha 5*: pBHR71; *Linha 6*: *Pseudomonas* sp. LFM046; *Linha 7*: Sem DNA; *Linha 8*: Marcador de peso molecular 1kb Plus. B: *Linha 1*: Marcador de peso molecular 1kb Plus; *Linha 2*: RMP690; *Linha 3*: RMP782; *Linha 4*: RMP824A; *Linha 5*: RMP997; *Linha 6*: RMP1058BII; *Linha 7*: 1347AII; *Linha 8*: SCU63 *Linha 9*: SCU66; *Linha 10*: Sem DNA; *Linha 11*: Marcador de peso molecular 1kb Plus.

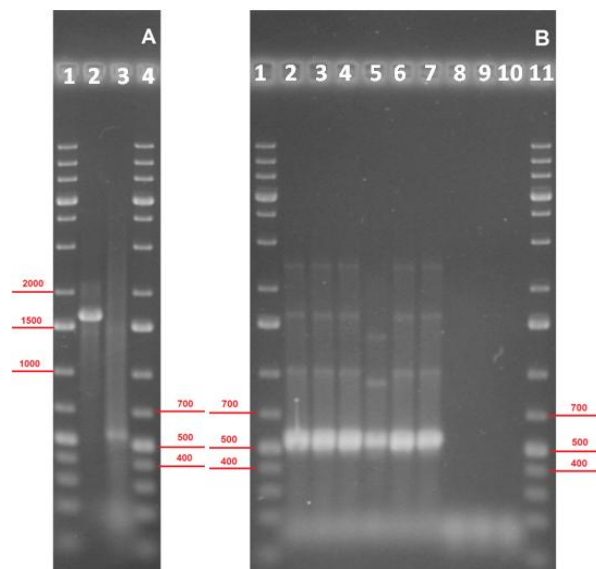


Figura 10. Segunda etapa da reação de semi-nested PRC com os primers I-179L/I-179R. A: *Linha 1*: Marcador de peso molecular 1kb Plus; *Linha 2*: *Pseudomonas* sp. LFM046 com os primers DEV15L/I-179R; *Linha 3*: produto da reação da linha 2 com os primers I-179L/I-179R. B: *Linha 1*: Marcador de peso molecular 1kb Plus; *Linha 2*: RMP690; *Linha 3*: RMP782; *Linha 4*: RMP824A; *Linha 5*: RMP997; *Linha 6*: RMP1058BII; *Linha 7*: 1347AII; *Linha 8*: SCU63 *Linha 9*: SCU66; *Linha 10*: Sem DNA; *Linha 11*: Marcador de peso molecular 1kb Plus.

5.5.1 Desenho de primers para detecção específica de genes de PHA sintase da classe I

Como relatado no item anterior, fica claro que os primers desenhados por Sheu et al. (2000) não são específicos para a detecção de genes que codificam PHA sintases da classe I, pois também geram amplicons a partir de genes que codificam PHA sintases da classe II.

Com o objetivo de desenhar primers que permitam a detecção específica de genes que codificam PHA sintases da classe I, a sequência de nucleotídeos do gene *phbC* de *Ralstonia eutropha* H16 foi utilizada para recuperar sequências de genes ortólogos em genomas sequenciados na base de dados do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). A sequência de genes ortólogos a *phaC* foram recuperadas a partir de 98 linhagens bacterianas.

A organização *phbCAB*, encontrada em *R. eutropha* H16, foi observada em 32 desses ortólogos compreendendo, principalmente, linhagens dos gêneros *Burkholderia* e *Ralstonia*, dois representantes do gênero *Acidovorax*, e representantes únicos dos gêneros *Delftia*, *Comamonas* e *Methylibium*.

A mesma organização foi encontrada em 10 representantes dos gêneros *Burkholderia*, *Leptothrix*, *Polaromonas* e *Rhodiferax*, porém nestes casos foi observada a presença de um segundo gene *phaC* em outra localização no genoma, ou seja, um gene parálogo.

A organização *phaCA* foi observada em *Variovorax*, *Verminefrobacter* e *Chromobacterium*, com um representante de cada gênero, sendo que a mesma organização foi observada em dois representantes do gênero *Acidovorax* porém contendo um outro gene parálogo de *phaC*.

A organização *phaCB* foi observada em quatro representantes do gênero *Bordetella*. A presença do gene *phaC* isolado foi observada com uma cópia em 20 linhagens, com duas cópias em 22 linhagens e com três cópias em três linhagens, sendo que estas últimas pertencem ao gênero *Bradyrhizobium*.

Apenas duas linhagens contendo a organização *phaBAC*, como observada no operon da biossíntese de PHA do isolado *Pseudomonas* sp. 61-3, foram encontradas, sendo uma linhagem do gênero *Pseudomonas* e outra do gênero *Azotobacter*.

As sequências de genes *phaC* putativamente codificando PHA sintases da classe I encontradas em 98 linhagens bacterianas foram alinhadas com o objetivo de identificar regiões conservadas e que pudessem ser utilizadas no desenho de primers para detecção específica de genes *phaC* da classe I por PCR. Entretanto, não foi possível identificar nenhuma região que permitisse o desenho desses primers. Assim, um número menor de sequências foi selecionada para atingir essa finalidade. Mesmo o alinhamento das 32

sequências de genes *phaC* organizados em operons *phaCAB*, como é observado em *R. eutropha* H16, não permitiu estabelecer regiões para o desenho de primers. Com base em dados de uma árvore filogenética gerada a partir das sequências *phaC* organizados em operons *phaCAB*, foi selecionado então um grupo de genes *phaC*, que se reuniam em um mesmo ramo da árvore juntamente com o gene *phaC* de *R. eutropha*, correspondendo a 19 linhagens bacterianas (ANEXO D).

A partir dessas seqüências foi possível desenhar os primers RECF1, RECF2 e RECR, utilizados para realização de testes de PCR *in silico*. Os resultados dos testes *in silico* obtidos indicaram que amplicons do tamanho esperado deveriam ser produzidos para 31 genes *phaC* organizados em operons *phaCAB* (27 gerariam amplicons com os primers RECF1/RECR e 30 com os primers RECF2/RECR). Apenas o gene *phaC* de *Acidovorax* sp. JS42 não produziria amplicon com qualquer dos dois pares de primers. Além disso, testes *in silico* utilizando genes *phaC* de 13 linhagens de *Pseudomonas*, ou seja, codificando PHA sintases da classe II, indicaram que nenhum amplicon deveria ser formado. Os testes *in silico* foram realizados ainda com os primers phaCF1/phaCR4 (Sheu et al., 2000) e I-179L/I-179R (Solaiman et al., 2000). Os testes *in silico* foram compatíveis com aqueles observados neste trabalho, uma vez que os primers phaCF1/phaCR4 produziram amplicons em 24 de 31 genes *phaC* da classe I e 12 de 13 genes *phaC* da classe II. Por outro lado, os primers I-179L/I-179R não produziram qualquer amplicon em *phaC* da classe I e gerariam amplicons em 9 de 13 genes de *phaC* da classe II (ANEXOS B e C).

Os primers RECF1, RECF2 e RECR foram sintetizados e utilizados em PCR. Os resultados estão apresentados nas Figuras 11 e 12.

Na PCR utilizando os primers RECF1/RECR foram testadas diferentes estratégias de amplificação, sendo avaliadas diferentes temperaturas de anelamento (52-58 °C), bem como a redução no tempo de anelamento e extensão a cada ciclo de amplificação. Os melhores resultados de amplificação estão apresentados na Figura 11 e foram obtidos utilizando temperatura de anelamento de 53°C e demais condições apresentadas no item material e métodos. Foram observadas amplicons únicos e do tamanho esperado para as linhagens *B. sacchari* LFM101, SCU63 e SCU66, indicando que os primers RECF1/RECR são adequados para detecção do gene de PHA sintase da classe I dessas bactérias. Um amplicon único também foi observado com o DNA genômico do isolado RMP997, entretanto com um tamanho um pouco superior àquele esperado. Para as demais amostras de DNA, ou não foi observado nenhum amplicon, ou os amplicons observados apresentaram tamanhos maiores que o esperado, ou ainda vários amplicons foram observados. Esses resultados sugerem que os

primers RECF1/RECR não são adequados para detecção do gene de PHA sintase da classe I presente em várias das linhagens analisadas, mesmo após diferentes estratégias de amplificação terem sido avaliadas. É surpreendente que não foram observados amplicons com o plasmídeo pJM9131 ou com o DNA genômico de *R. eutropha*, uma vez que a sequência do gene *phaC* presentes nessas amostras foi a base para a construção dos primers.

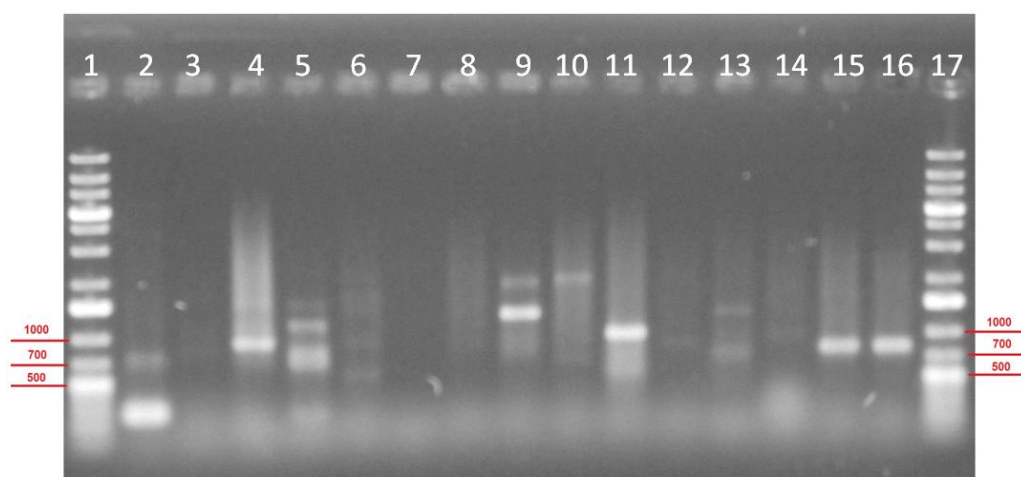


Figura 11. Testes com os primers RECF1/RECR desenhados para PHA sintases da classe I. A: *Linha 1:* Marcador de peso molecular 1kb Plus; *Linha 2:* pJM9131; *Linha 3:* *R. eutropha* LFM026; *Linha 4:* *B. sacchari* LFM101; *Linha 5:* pBHR71; *Linha 6:* *Pseudomonas* sp. LFM046; *Linha 7:* Sem DNA; *Linha 8:* RMP690; *Linha 9:* RMP782; *Linha 10:* RMP824A; *Linha 11:* RMP997; *Linha 12:* RMP1058BII; *Linha 13:* RMP1347AII; *Linha 14:* SCU92; *Linha 15:* SCU63; *Linha 16:* SCU66; *Linha 17:* Marcador de peso molecular 1kb Plus.

Na PCR utilizando os primers RECF2/RECR foram testadas diferentes estratégias de amplificação, sendo avaliadas diferentes temperaturas de anelamento (55-61 °C), bem como a redução no tempo de anelamento e extensão a cada ciclo de amplificação. Os melhores resultados de amplificação estão apresentados na Figura 12 e foram obtidos utilizando temperatura de anelamento de 56 °C e demais condições apresentadas no item material e métodos. Foram observados amplicons únicos apenas quando o plasmídeo pBHR71 ou o DNA genômico de *Pseudomonas* sp. LFM046 foram utilizados como molde, entretanto, com um tamanho muito maior que o valor esperado (731 pb) para *Pseudomonas* sp. LFM046 e um pouco menor para o plasmídeo pBHR71. Considerando que essas amostras de DNA abrigam genes de PHA sintases da classe II, as amplificações não são as desejadas, ou seja, especificamente genes de PHA sintase da classe I. Para as demais amostras de DNA, ou não se observou a geração de nenhum amplicon, ou vários amplicons foram observados. Em alguns casos um dos vários amplicons apresentou o tamanho próximo ao esperado. Isso foi observado para os DNA das linhagens RMP782, RMP824A, RMP997 e RMP1347AII,

entretanto, caso se trate realmente de um amplicon correspondendo a parte do gene *phaC* da classe I dessas bactérias, as condições da PCR deverão ser ainda melhoradas especificamente para essas linhagens.

Os resultados obtidos até o momento como os pares de primers RECF1/RECR e RECF2/RECR demonstram que eles podem ser utilizados para detectar genes de PHA sintase da classe I de algumas bactérias. Entretanto, de forma alguma esse primers podem ser considerados universais para detecção de todos os genes de PHA sintase da classe I. Assim, primers mais específicos deverão ser desenhados para detecção dos diferentes genes de PHA sintase da classe I presentes nos diversos isolados. Considerando-se a baixa similaridade entre as sequências de nucleotídeos de PHA sintases das diferentes classes (Rehm, 2003), sugere-se que o desenho de primers específicos deva ser baseado em grupos, formados por PHA sintases da classe I que possuam entre si maior similaridade do que a compartilhada por todas as que se encaixam nesta classificação.

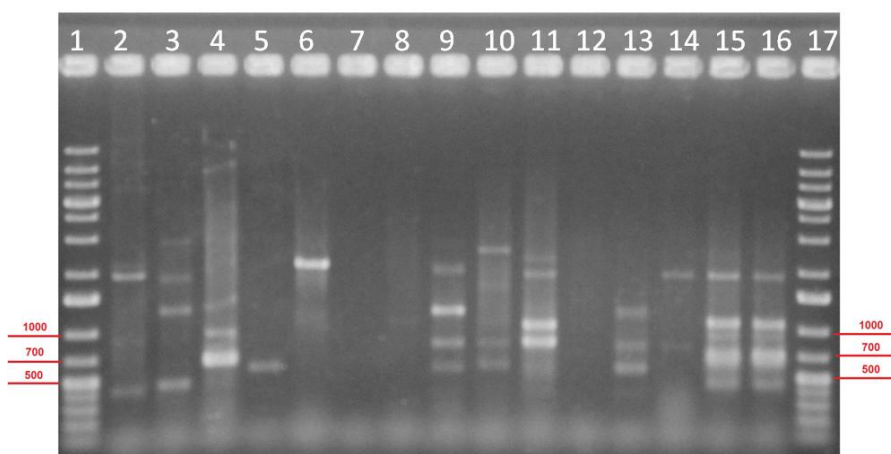


Figura 12. Testes com os primers RECF2/RECR desenhados para PHA sintases da classe I. A: *Linha 1:* Marcador de peso molecular 1kb Plus; *Linha 2:* pJM9131; *Linha 3:* *R. eutropha* LFM026; *Linha 4:* *B. sacchari* LFM101; *Linha 5:* pBHR71; *Linha 6:* *Pseudomonas* sp. LFM046; *Linha 7:* Sem DNA; *Linha 8:* RMP690; *Linha 9:* RMP782; *Linha 10:* RMP824A; *Linha 11:* RMP997; *Linha 12:* RMP1058BII; *Linha 13:* RMP1347AII; *Linha 14:* SCU92; *Linha 15:* SCU63; *Linha 16:* SCU66; *Linha 17:* Marcador de peso molecular 1kb Plus.

A linhagem *Pseudomonas* sp. 61-3 é capaz de produzir uma mistura de polímeros P3HB/PHA_{MCL} (Abe et al., 1994). Os genes *phaC* dessa bactérias foram clonados e seqüenciados. Nessa bactéria, o gene *phaC* da classe I está organizado em um operon *phaBAC* (Matsusaki et al., 1998). Como o objetivo deste trabalho é o desenho de primers para detecção de genes de PHA sintase da classe I em bactérias produtoras de P3HB/PHA_{MCL}, os genes *phaC* da classe I de duas linhagens bacterianas que apresentaram a organização

phaBAC foram alinhados com o gene *phbC* do isolado *Pseudomonas* sp. 61-3 com o objetivo de desenhar primers específicos para esse gene. Os primers P613F e P613R foram desenhados (ANEXO E). Nos testes *in silico* realizados, este par de primers foi eficiente na amplificação do fragmento esperado para a *phaC* das três linhagens utilizadas no alinhamento e não foi observada amplificação para os demais genes *phaC* das classes I e II das sequências estudadas.

Testes de PCR *in silico* com a PHA sintase da classe I de *Pseudomonas* sp. 61-3 não indicaram a formação de qualquer amplicon com a utilização dos primers phaCF1/phaCR4 ou I-179L/I-179R, bem como com os primers RECF1/RECR e RECF2/RECR. Quando o operon contendo as PHA sintases da classe II de *Pseudomonas* sp. 61-3 foi testado, os resultados de PCR *in silico* sugerem que somente os primers phaCF1/phaCR4 seriam capazes de gerar amplicons a partir dos genes de PHA sintases presentes neste operon.

Nas PCR utilizando os primers P613F/P613R foram testadas diferentes estratégias de amplificação, sendo avaliadas diferentes temperaturas de anelamento (57-61 °C), bem como a redução no tempo de anelamento e extensão a cada ciclo de amplificação. Os melhores resultados de amplificação estão apresentados na Figura 13 e foram obtidos utilizando temperatura de anelamento de 57 °C e demais condições apresentadas no item material e métodos. Amplicons únicos e do tamanho esperado (325 pb) foram obtidos utilizando como molde o DNA total dos isolados RMP782, RMP1058BII e RMP1347AII. Para os demais isolados não foi observado nenhum amplicon. É interessante que justamente as linhagens para as quais se observou amplicon utilizando os primers P613F/P613R, são aquelas que se observou bandas fracas quando utilizando os primers phaCF1/phaCR4 (Figura 6B).

Os resultados obtidos até o momento revelam que o par de primer RECF1/RECR poderia ser utilizado para detectar os genes de PHA sintase da classe I de *B. sacchari* LFM101, bem como dos isolados SCU63 e SCU66. O par de primers P613F/P613R poderia ser utilizado para detectar genes de PHA sintase da classe I dos isolados RMP782, RMP1058BII e RMP1347AII. O par de primers RECF1/RECR talvez permita a detecção do gene de PHA sintase da classe I do isolado RMP997, enquanto que o par de primers RECF2/RECR talvez permita a detecção de genes de PHA sintase da classe I dos isolados RMP782, RMP824A, RMP997 e RMP1347AII, entretanto, será necessário confirmar essa capacidade utilizando esses primers. Os resultados no geral deixam clara a dificuldade no desenho de primer gerais para detecção de genes de PHA sintase da classe I e demonstram que primers específicos para diferentes grupos bacterianos serão necessários.

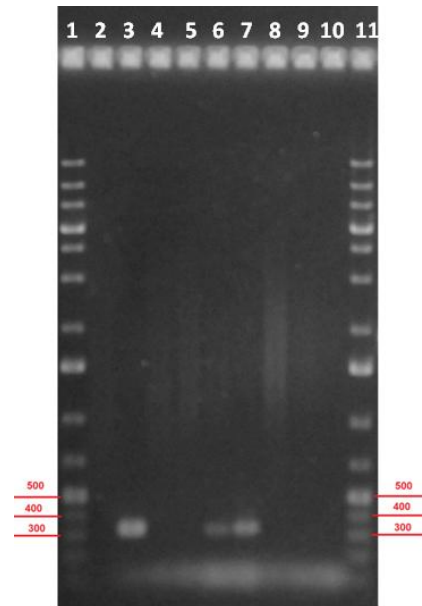


Figura 13. Testes com os primers P613F/P613R desenhados para PHA sintases da classe I com organização do operon *phaBAC*. *Linha 1:* Marcador de peso molecular 1kb Plus; *Linha 2:* RMP690; *Linha 3:* RMP782; *Linha 4:* RMP824A; *Linha 5:* RMP997; *Linha 6:* RMP1058BII; *Linha 7:* 1347AII; *Linha 8:* SCU63 *Linha 9:* SCU66; *Linha 10:* Sem DNA; *Linha 11:* Marcador de peso molecular 1kb Plus.

5.5.2 Clonagem do gene *phaC* da classe I

Com base nos resultados apresentados acima, e com o objetivo de caracterizar genes da PHA sintase da classe I do isolado RMP1058BII, foi montada uma biblioteca do DNA genômico deste isolado, pela digestão do DNA total com a enzima de restrição λ HindIII ligação dos fragmentos ao plasmídeo pBBR1MCS-2, chegando ao número de 441 clones em *E. coli* XL1-Blue. A detecção da presença do gene *phaC* da classe I nos clones da biblioteca foi realizada com o par de primers P613F/P613R, a partir do DNA plasmidial total de cada placa de 24 poços em que os clones foram previamente cultivados.

Dos 441 clones testados, 1 clone apresentou resultado positivo na PCR com os primers P613F/P613R. O DNA plasmidial deste clone foi extraído e digerido com a enzima de restrição HindIII. Foram observadas duas bandas por análise eletroforética (Figura 14): uma banda de cerca de 5 kb, correspondendo ao plasmídeo pBBR1MCS-2, e outra de 4 kb, correspondendo ao inserto de DNA clonado.

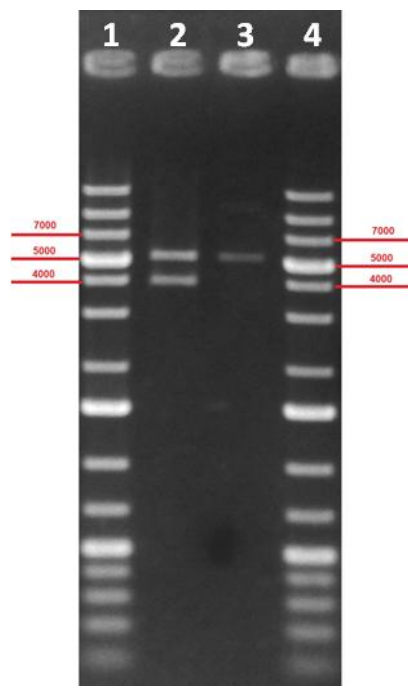


Figura 14. Digestão do clone contendo um fragmento de cerca de 4kb da biblioteca genômica do isolado RMP 1058BI. *Linha 1:* Marcador de peso molecular 1kb Plus; *Linha 2:* digestão do plasmídeo pBBR1MCS-2 contendo o inserto de 4kb; *Linha 3:* digestão do plasmídeo pBBR1MCS-2; *Linha 4:* Marcador de peso molecular 1kb Plus.

O plasmídeo contendo o inserto de interesse foi utilizado como molde em PCR utilizando os primers previamente apresentados (Figura 15). Não foi obtida a amplificação de bandas do tamanho esperado para nenhum dos primers da literatura (phaCF1/phaCR4 e I179L/I179R), apenas para o par de primers I-179L/I179R na segunda reação do semi-nested foi observada uma banda, mas não do tamanho esperado. Utilizando os primers desenhados para as PHA sintases de classe I neste trabalho, apenas bandas inespecíficas mais fracas. A amplificação de uma banda forte e do tamanho esperado foi somente observada na PCR utilizando o par de primers P613F/P613R, o mesmo que detectou a presença deste clone dentre os demais na biblioteca. Esses resultados demonstram que a detecção da PHA sintase da classe I da linhagem RMP 1058BII pode ser obtida apenas com os primers P613F/P613R desenhados neste trabalho, e que a banda fraca observada na amplificação com os primers phaCF1/phaCR4 apresentada na figura 6B provavelmente representa a amplificação de um fragmento correspondendo a uma PHA sintase da classe II deste isolado.

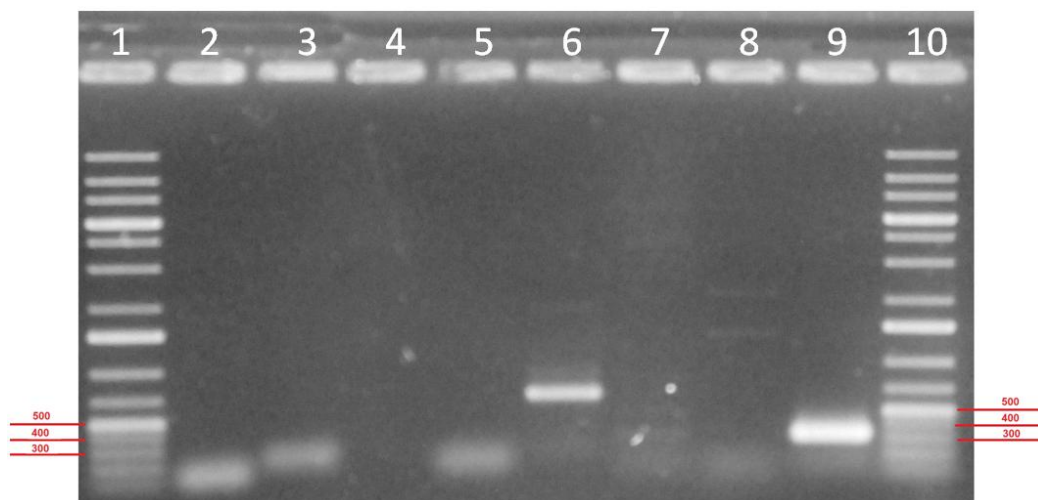


Figura 15. Testes de PCR com o clone selecionado utilizando os primers da literatura e os primers deste trabalho. *Linha 1:* Marcador de peso molecular 1kb Plus; *Linha 2:* primers phaCF1/phaCR4; *Linha 3:* primers I-179L/I-179R; *Linha 4:* primers DEV15L/I-179R; *Linha 5:* produto da reação da Linha 4 com os primers CF1/CR4; *Linha 6:* produto da reação da linha 4 com os primers I-179L/I-179R; *Linha 7:* primers RECF1/RECR; *Linha 8:* primers RECF2/RECR; *Linha 9:* primers P613F/P613R; *Linha 10:* Marcador de peso molecular 1kb Plus.

5.5.3 Ensaio de produção de PHA com o clone *Pseudomonas sp. LFM461 pBBR1MCS-2::phbC_{RMP1058BII}*

Com o objetivo de confirmar se o inserto contido no plasmídeo pBBR1MCS-2 da biblioteca genômica do isolado RMP1058BII contém um gene putativo da PHA sintase da classe I, foi realizado experimento quantitativo de produção com a linhagem *Pseudomonas sp. LFM461* abrigando esse plasmídeo. Novamente, como controle foi utilizada essa linhagem abrigando apenas o vetor pBBR1MCS-2. Foi avaliada a produção de PHA tanto a partir de glicose como de octanoato (Tabelas 18 e 19).

Após um período de cultivo de 72 horas, observou-se o acúmulo de P3HB correspondendo a cerca de 1% massa seca celular tanto no cultivo com glicose como em octanoato, sendo que LFM461 abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-2 sem inserto não apresentou acúmulo de qualquer PHA. A mesma linhagem abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-2 contendo o gene que codifica para a PHA sintase de *R. eutropha* apresentou acúmulo de PHA correspondendo a aproximadamente 11% da massa seca celular nos cultivos com glicose e aproximadamente 33% da massa seca celular nos cultivos com octanoato, sendo que neste caso também foram observados os monômeros 3HHx e 3HO.

Tabela 18 - Produção de PHA pela linhagem LFM461 abrigando o inserto contendo o gene putativo da PHA sintase da classe I do isolado RMP1058BII em meio contendo glicose.

Linhagem	pH	MSC (g/L)	C4	C6	C8	PHA (%MSC)
LFM461	6,55	2,28	0,00	0,00	0,00	0,00
pBBR1MCS-2	6,53	2,25	0,00	0,00	0,00	0,00
	6,51	2,33	0,00	0,00	0,00	0,00
Média	6,53	2,29	0,00	0,00	0,00	0,00
Desvio-padrão	±0,02	±0,04	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00
LFM461	6,32	1,60	100,00	0,00	0,00	1,10
pBBR1MCS-2::phbC _{RMP1058BII}	6,25	1,59	100,00	0,00	0,00	1,08
	6,35	2,14	100,00	0,00	0,00	1,35
Média	6,31	1,77	100,00	0,00	0,00	1,17
Desvio-padrão	0,05	±0,31	±0,00	±0,00	±0,00	±0,15
LFM461	4,26	1,63	100,00	0,00	0,00	11,67
pBBR1MCS-2::phbC _{Re}	4,15	1,62	100,00	0,00	0,00	5,91
	4,22	1,63	100,00	0,00	0,00	11,32
Média	4,21	1,63	100,00	0,00	0,00	9,64
Desvio-padrão	0,06	±0,01	±0,00	±0,00	±0,00	±3,23

MSC – Massa seca celular; 3HB- 3-hidroxibutirato; 3HHx- 3-hidroxihexanoato; 3HO- 3-hidroxioctanoato; 3HD- 3-hidroxidodecanoato; 3HDDd- 3-hidroxidodecanoato; PHA- Polihidroxialcanoato; TR-Traços.

O trabalho de Matsusaki et al. (1998) demonstra que, além dos genes do operon *phbBAC*. é necessária a presença do gene *phbR*, localizado a montante deste operon, para o acúmulo de P3HB em linhagens recombinantes de *Pseudomonas putida* GPp104.

A sequência de nucleotídeos do inserto de 4kb detectado positivamente a partir da biblioteca genômica do isolado RMP1058BII ainda não foi determinada, não sendo possível saber os genes que estão presentes. Considerando-se que o gene desta PHA sintase seja localizada num operon da biossíntese de PHA semelhante ao encontrado em *Pseudomonas* sp. 61-3, a ausência do gene *phaR* ou a presença de apenas parte de sua sequência pode ser a causa do baixo acúmulo observado.

A Figura 16 apresenta a análise de propil-ésteres obtidas com a *Pseudomonas* sp. LFM461 abrigando apenas o vetor ou vetor e inserto. Pela presença de um pico com tempo de retenção de aproximadamente 4,6 minutos, é possível observar a produção de P3HB quando o inserto está presente, mas não na sua ausência.

Tabela 19 - Produção de PHA pela linhagem LFM461 abrigando o inserto contendo o gene putativo da PHA sintase da classe I do isolado RMP1058BII em meio contendo octanoato.

Linhagem	pH	MSC (g/L)	C4	C6	C8	PHA (%MSC)
LFM461	7,69	0,87	0,00	0,00	0,00	0,00
pBBR1MCS-2	7,60	0,96	0,00	0,00	0,00	0,00
	7,67	0,93	0,00	0,00	0,00	0,00
Média	7,65	0,92	0,00	0,00	0,00	0,00
Desvio-padrão	±0,05	±0,05	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00
LFM461	7,64	0,87	100,00	0,00	0,00	1,33
pBBR1MCS-	7,68	0,95	100,00	0,00	0,00	1,41
2:: <i>phbC</i> _{RMP1058BII}	7,71	0,97	100,00	0,00	0,00	1,44
Média	7,68	0,93	100,00	0,00	0,00	1,39
Desvio-padrão	±0,04	±0,06	±0,00	±0,00	±0,00	±0,06
LFM461	7,58	1,15	95,07	3,58	1,35	30,97
pBBR1MCS-	7,54	1,05	94,70	3,76	1,54	30,14
2:: <i>phbC</i> _{Re}	7,60	1,26	95,08	3,57	1,35	31,27
Média	7,57	1,16	94,95	3,64	1,42	30,79
Desvio-padrão	±0,03	±0,11	±0,22	±0,10	±0,11	±0,59

MSC – Massa seca celular; 3HB- 3-hidroxi butirato; 3HHx- 3-hidroxi hexanoato; 3HO- 3-hidroxi octanoato; 3HD- 3-hidroxi decanoato; 3HDDd- 3-hidroxi dodecanoato; PHA- Polihidroxi alcanoato.

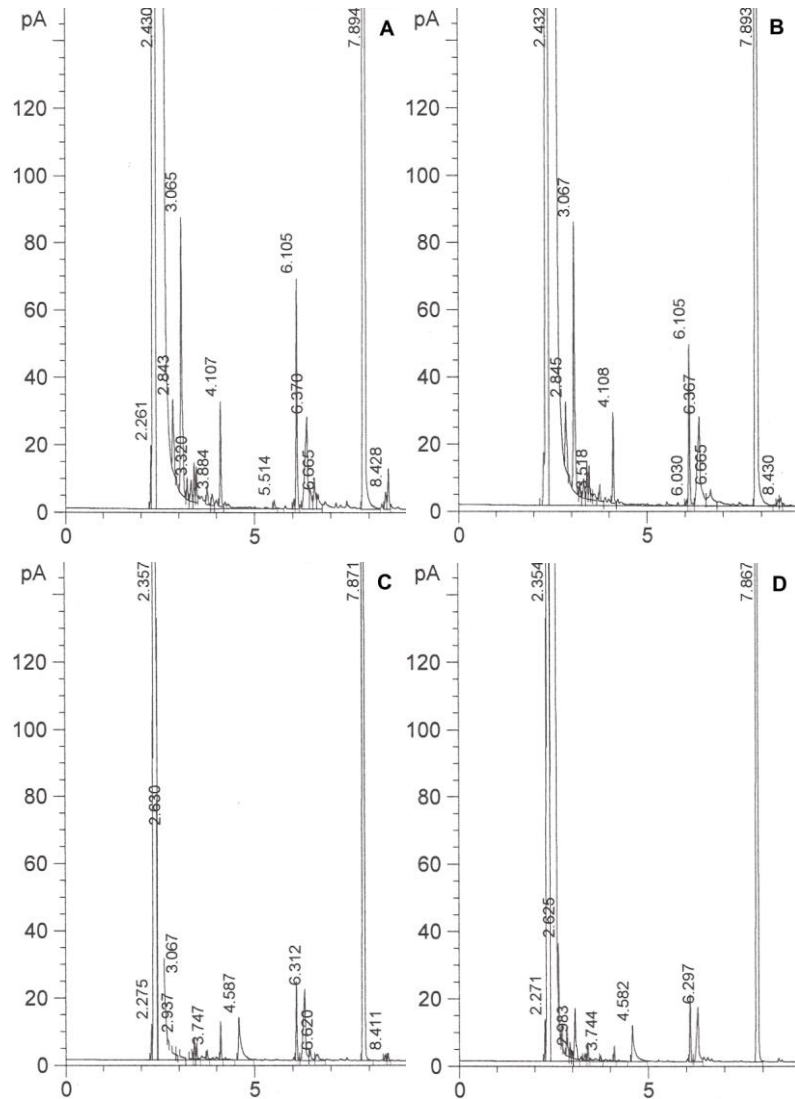


Figura 16. Cromatogramas da análise dos ensaios de acúmulo de PHA pela linhagem LFM461 abrigando o plasmídeo contendo o inserto de interesse. A. LFM461 pBBR1MCS-2 no cultivo em glicose; B. LFM461 pBBR1MCS-2 no cultivo em octanoato; C. LFM461 pBBR1MCS-2::*phbC*_{RMP1058BII} no cultivo em glicose; D. LFM461 pBBR1MCS-2::*phbC*_{RMP1058BII} no cultivo em octanoato.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados apresentados neste trabalho permitiram as seguintes conclusões:

O corante Nile Red não se apresentou como mais eficiente para detecção de bactérias produtoras de PHA quando comparado ao corante Sudan Black.

O grande número de falsos negativos observado com pelo menos um dos corantes lipofílicos desperta preocupação com o uso desses corantes para detecção universal de bactérias produtoras de PHA.

Foi possível isolar bactérias produtoras de P3HB ou PHA_{MCL} capazes de produzir maiores quantidades desses polímeros em comparação às linhagens de referência *B. sacchari* LFM101 e *Pseudomonas* sp. LFM046.

Os primers de Solaiman são específicos para detecção de genes de PHA sintase da classe II, enquanto os primers de Sheu detectam tanto genes de PHA sintase da classe I como da classe II.

PCR utilizando os primers de Solaiman demonstraram a organização típica de genes de PHA sintases da classe II em isolados produtores da mistura P3HB/PHA_{MCL}.

Dois pares de primers desenhados neste trabalho permitiram a detecção específica de genes de PHA sintases da classe I em cinco isolados. Entretanto, devido à grande diversidade dos genes *phaC* do tipo I, não foi possível o desenho de primers capazes de detectar esse genes em todas as bactérias.

O gene *phaC* do tipo I de três dos isolados produtores da mistura P3HB/PHA_{MCL} foi detectado utilizando primers desenhados com base em genes *phaC* presentes em operons *phaBAC*. Uma vez que, essa organização está presente apenas em *Azotobacter* e algumas *Pseudomonas*, sugere-se que a capacidade de sintetizar PHA_{SCL} por isolados de *Pseudomonas* foi adquirida por transferência horizontal a partir de *Azotobacter*.

A expressão de fragmento contendo o gene *phaC* do tipo I de um dos isolados produtores de P3HB/PHA_{MCL} levou à produção de P3HB em mutante de *Pseudomonas* sp. LFM461.

Como perspectiva futura para este trabalho é indicado:

A partir dos resultados deste trabalho, com o uso de primers para detecção de diferentes genes de PHA sintases das classes I ou II, esses genes poderão ser clonados e sua expressão em linhagens heterólogas avaliada quanto ao tipo de PHA produzido. Deste modo, abrindo perspectivas para detecção de PHA sintases com especificidade diferenciada e com potencial para produção de PHA com características adequadas para diferentes aplicações.

REFERÊNCIAS¹

Abe H, Doi Y, Fukushima T, Eya H. Biosynthesis from gluconate of a random copolyester consisting of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas* sp 61-3. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1994;16:115-9

Amirul AA, Ahmad RMY, Sudesh K, Azizan MNM, Majid MIA. Isolation of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) producer from Malaysian environment using γ -butyrolactone as carbon source. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2009;25:199-206.

Anderson AJ, Dawes EA. Occurrence metabolism metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*. 1990;54:450-72.

Ashby RD, Solaiman DKY, Foglia TA. Poly(ethylene glycol)-mediated molar mass control of short-chain- and medium-chain-length poly(hydroxyalkanoates) from *Pseudomonas oleovorans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002a;60:154-9.

Ashby RD, Solaiman DKY, Foglia TA. The synthesis of short- and medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) mixtures from glucose- or alkanolic acid-grown *Pseudomonas oleovorans*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2002b;28:147-53.

Ayub ND, Pettinari J, Ruiz JA, López NI A Polyhydroxybutyrate-Producing *Pseudomonas* sp. Isolated from Antarctic Environments with High Stress Resistance. *Current Microbiology*. 2004;49(3):170-4.

Ayub ND, Pettinari J, Méndez BS, López NI. Impaired polyhydroxyalkanoate biosynthesis from glucose in *Pseudomonas* sp. 14-3 is due to a defective β -ketothiolase gene. *FEMS Microbiology Letters*. 2006;264:125,31.

Bonatto D, Matias F, Lisboa MP, Bogdawa HM, Henriques JAP. Production of short side chain-poly(hydroxyalkanoate) by a newly isolated *Ralstonia pickettii* strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2004;20(4):395-403.

¹ De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Disponível em: <http://www.icmje.org> [2011 Ago 04].

Brämer CO, Silva LF, Gomez JCG, Priefert H, Steinbüchel A. Identification of the 2-methylcitrate pathway involved in the catabolism of propionate in the polyhydroxyalkanoate-producing strain *Burkholderia sacchari* IPT101 and analysis of a mutant accumulating a copolyester with higher 3-hydroxyvalerate content. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002;68(1):271-9.

Brandl H, Gross RA, Lenz RW, Fuller RC. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential application as and biodegradable polyesters. *Applied and Environmental Microbiology*. 1988;54:1977-82.

Brandl H, Gross RA, Lenz RW, Fuller RC. Plastics from bacteria and for bacteria: Poly(β -hydroxyalkanoates) as natural biocompatible and biodegradable polyesters. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*. 1990;41:77-93.

Braunegg G, Lefebvre G, Genser KF. Polyhydroxyalkanoates biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*. 1988;65:127-61.

Bullock WO, Fernandez JM, Short JM. XL1 Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Journal of Biotechnology*. 1987;5:376-9.

Chen JY, Song G, Chen GQ. A lower specificity PhaC2 synthase from *Pseudomonas stutzeri* catalyses the production of copolyesters consisting of short-chain-length and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2006;89:157-67.

Chung, Chung-Wook, Yoon Seok K, Young-Baek K, Kyung-Sook B, Young-Ha R. Isolation of a *Pseudomonas* sp. Strain exhibiting unusual behavior of poly(3-hydroxyalkanoates) biosynthesis and characterization of synthesized polyesters. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1999;9(6)847-53.

Davis R, Anilkumar PK, Chandrashekar A, Shamala TR. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates co-polymer in *E. coli* using genes from *Pseudomonas* and *Bacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2008;94:207-16.

De Smet MJ, Eggink G, Witholt B, Kingma J, Wynberg H. Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. *Journal of Bacteriology*. 1983;154:870-8.

Dennis D, McCoy M, Stangl A, Valentin HE, Wu Z. Formation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by PHA synthase from *Ralstonia eutropha*. *Journal of Biotechnology*. 1998;64:177-86.

Doi Y. Microbial synthesis, physical properties and biodegradability of polyhydroxyalkanoates. *Macromolecular Symposia*. 1995;98(1):585-99.

Fukui T, Doi Y. Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. *Journal of Bacteriology*. 1997;179:4821-30.

Fukui T, Doi Y. Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1998;49:333-6.

Gomes RS. Obtenção de mutantes deficientes no acúmulo de PHA e construção de linhagens recombinantes para o controle da sua composição monomérica. [tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 2010.

Gomez JGC. Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1994.

Gomez JGC, Rodrigues MFA, Alli RCP, Torres BB, Bueno Netto CL, Oliveira MS, Silva LF. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1996;45:785-91.

Gomez JGC, Fontolan V, Alli RCP, Rodrigues MFA, Bueno Netto CL, Silva LF, Simões DA. Production of P3HB-co-3HV by soil isolated bacteria able to use sucrose. *Revista de Microbiologia*; 1997;28(1):43-8.

Gomez JGC, Bueno Netto CL. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. *Revista Brasileira de Engenharia Química*. 1997;17:24-9.

Gomez JGC. Produção por *Pseudomonas* de polihidroxialcanoatos contendo monômeros de cadeia média a partir de carboidratos: avaliação da eficiência modificação da composição e obtenção de mutantes. [tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2000.

Gomez JGC, Bueno-Netto CL. Produção de poliésteres bacterianos. In: Lima UA, Aquarone E, Borzani W, Schmidell W, editores. Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgard Blucher; 2001. vol. 3. p. 219-48.

Hang X, Lin Z, Chen J, Wang G, Hong K, Chen G. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* YS1. FEMS Microbiology Letters. 2002;212:71-5.

Haywood GW, Anderson AJ, Ewing DF, Dawes EA. Accumulation of polyhydroxyalkanoate containing primarily 3-hydroxydecanoate from simple carbohydrate substrates by *Pseudomonas* sp. Strain NCIMB 40135. Applied Environment Microbiology. 1990;56:3354-9.

Hoffman N, Steinbüchel A, Rehm BHA. The *Pseudomonas aeruginosa phaG* gene product is involved in the synthesis of polyhydroxyalkanoic acid consisting of medium-chain-length constituents from non-related carbon sources. FEMS Microbiology Letters. 2000;184:253-9.

Holmes PA. Applications of PHB - microbial produced biodegradable thermoplastic. Physics Technology. 1985;16:32-6.

Huijberts GNM, Eggink G, De Waard P, Huisman GW, Witholt B. *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturate and unsaturated monomers. Applied Environment Microbiology. 1992;58:536-44.

Huijberts GNM, De Rijk TC, De Waard P, Eggink G. ¹³C Nuclear magnetic resonance studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. Journal of bacteriology. 1994;176:1661-6.

Ibrahim MHA, Steinbüchel A. *Zobellella denitrificans* strain MW1 a newly isolated bacterium suitable for poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol. Journal of Applied Microbiology. 2009;108:214-25.

Jendrossek D. Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). Journal of Bacteriology. 2009;191(10):3195-202.

Kahar P, Tsuge T, Taguchi K, Doi Y. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. Polymer Degradation and Stability. 2003;83:79-86.

Kalendar R, Lee D, Schulman AH. FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. *Genes, Genomes and Genomics*. 2009;3(1):1-14.

Kato M, Bao HJ, Kang CK, Fukui T, Doi Y. Production of a novel copolyester of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids by *Pseudomonas* sp. 61-3 from sugars. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1996a;45:363-70.

Kato M, Fukui T, Doi Y. Biosynthesis of polyester blends by *Pseudomonas* sp. 61-3 from alkanolic acids. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 1996b;69:515-20.

Kraak MN, Kessler B, Witholt B. *In vitro* activities of granule-bound poly[(R)-3-hydroxyalkanoate] polymerase C1 of *Pseudomonas oleovorans* Development of an activity test from medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoate) polymerases. *European Journal of Biochemistry*. 1997;250:432-9.

Kidwell J, Valentin HE, Dennis D. Regulated expression of the *Alcaligenes eutrophus* pha biosynthesis genes in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995;61(4):1391-8.

Kim DY, Kim HW, Chung MG, Rhee YH. Biosynthesis modification and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. *The Journal of Microbiology*. 2007;45(2):87-97.

Kobayashi G, Shiotani T, Shima Y, Doi Y. Biosynthesis and Characterization of Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from oils and fats by *Aeromonas* sp. OL-338 and *Aeromonas* sp. FA-440. *Biodegradable Plastics and Polymers*. 1994;410-16.

Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, Peterson KM. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*. 1995;166(1):175-6.

Lageveen RG, Huisman GW, Preusting H, Ketelaar P, Eggink G, Witholt B. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. *Applied and Environmental Microbiology*. 1988;54:2924-32.

Langenbach S, Rehm BHA, Steinbüchel A. Functional expression of the PHA synthase gene *phaC1* from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* results in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. *FEMS Microbiology Letters*. 1997;150:303-9.

Lee EY, Jendrossek D, Schirmer A, Choi CY, Steinbüchel A. Biosynthesis of copolyesters consisting of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from 1,3-butanediol or from 3-hydroxybutyrate by *Pseudomonas* sp. A33. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1995;42:901-9.

Lee M, Chandler AC. A study of the nature, growth and control of bacteria in cutting compounds. *Journal of bacteriology*. 1941;1:373-86.

Liebergessel M, Steinbüchel A. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxybutyric acid) biosynthesis genes of *Thiocystis violacea*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1993a;38:493-501.

Liebergessel M, Mayer F, Steinbüchel A. Analysis of polyhydroxyalkanoic acid-biosynthesis genes of anoxygenic phototrophic bacteria reveals synthesis of a polyester exhibiting an unusual composition. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1993b;40:292-300.

Lima TCS, de Grisi BM, Bonato MCM. Bacteria isolated from a sugarcane agroecosystem: their potential production of polyhydroxyalkanoates and resistance to antibiotics. *Revista de Microbiologia*. 1999;30:214-24.

Loo CY, Lee WH, Tsuge T, Doi Y, Sudesh K. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from palm oil products in a *Wautersia eutropha* mutant. *Biotechnology Letters*. 2005;27:1405-10.

Lopez MSG, Rocha RCS, Zanotto SP, Gomez JGC. Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. *World Journal of Microbiology e Biotechnology*. 2009;25:1751-6.

Lu X, Zhang J, Wu Q, Chen GQ. Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) via manipulating the fatty acid β -oxidation pathway in *E. coli*. *FEMS Microbiology Letters*. 2003;221:97-101.

Lu X, Zhang W, Jian J, Wu Q, Chen GQ. Molecular cloning and functional analysis of two polyhydroxyalkanoate synthases from two strains of *Aeromonas hydrophyla* ssp.. FEMS Microbiology Letters. 2005;243:149-55.

Lu Q, Han J, Zhou L, Xiang H. Genetic and biochemical characterization of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) synthase in *Haloferax mediterranei*. Journal of Bacteriology. 2008;190(12):4173-80.

Matias F, Lisbôa MP, Bonatto D, Henriques JAP. Analysis and characterization of new PHA-producing actinomycetes strains from different types of soils. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia; Foz do Iguaçu. 2001; Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Microbiologia; 2001. p. 251.

Matias F, Bonatto D, Padilla G, Rodrigues MFA, Henriques JAP. Polyhydroxyalkanoates production by Actinobacteria isolated from soil. Canadian Journal of Microbiology. 2009;55:790-800.

Matsuda TS. Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos de cadeia curta e média a partir de óleos vegetais. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Matsumoto K, Takase K, Aoki E, Doi Y, Taguchi S. Synergistic Effects of Glu130asp substitution in the type II polyhydroxyalkanoate (PHA) sintase: Enhancement of PHA production and alteration of polymer molecular weight. Biomacromolecules. 2005;6(1):99-104.

Matsumoto K, Takase K, Yamamoto Y, Doi Y, Taguchi S. Chimeric enzyme composed of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases from *Ralstonia eutropha* and *Aeromonas caviae* enhances production of PHAs in recombinant *Escherichia coli*. Biomacromolecules. 2009;10:682-5.

Matsusaki H, Manji S, Taguchi K, Kato M, Fukui T, Doi Y. Cloning and Molecular Analysis of the Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) Biosynthesis Genes in *Pseudomonas* sp. strain 61-3. Journal of Bacteriology. 1998;180(24):6459-67.

Matsusaki H, Abe H, Doi Y. Biosynthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant strains of *Pseudomonas* sp. 61-3. Biomacromolecules. 2000;1:17-22.

McCull GJ, Cannon MC. Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology*. 1999;181:585-92.

Mendonça TT. Avaliação do potencial de *Burkholderia sacchari* produzir o copolímero biodegradável poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) [P(3HB-co-3HHX)] [Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Metabolix Inc. Mirel Information. [homepage on the internet]. Massachusetts: Mirel Inc.; 2007. Available from: <http://www.metabolix.com/natures%20plastic/mirel.html>. [2008 Mar 25].

Nomura CT, Taguchi K, Gan ZH, Kuwabara K, Tanaka T, Takase K, Doi Y. Expression of 3-ketoacyl-acyl carrier protein reductase (fabG) genes enhances production of polyhydroxyalkanoate copolymer from glucose in recombinant *Escherichia coli* JM109. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71:4297-306.

Normi YM, Hiraishi T, Taguchi S, Sudesh K, Najimudin N, Doi Y. Site-directed saturation mutagenesis at residue F420 and recombination with another beneficial mutation of *Ralstonia eutropha* polyhydroxyalkanoate synthase. *Biotechnology Letters*. 2005a;27:705-12.

Normi YM, Hiraishi T, Taguchi S, Abe H, Sudesh K, Najimudin N, Doi Y. Characterization and properties of G4X mutants of *Ralstonia eutropha* PHA synthase for poly (3-hydroxybutyrate) biosynthesis in *Escherichia coli*. *Macromolecular Bioscience*. 2005b;5:197-206.

Park SJ, Lee SY. Systems biological approach for the production of various polyhydroxyalkanoates by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Macromolecular Symposia*. 2005;224:1-9.

Peixoto RM. Isolamento de bactérias do gênero *Pseudomonas* produtoras de biossurfactantes. Dissertação [dissertação (Mestrado Microbiologia)]. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Preusting H, Van Houten R, Hoefs A, Van Langenberghe EK, Favre-Bulle O, Witholt B. High cell density cultivation of *Pseudomonas oleovorans*: growth and production of poly(3-hydroxyalkanoates) in two-liquid phase batch and fed-batch systems. *Biotechnology and Bioengineering*. 1993;41:550-6.

Ramsay BA, Lomaliza K, Chavarie C, Dube B, Batille P, Ramsay JA. Production of poly- β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric acids. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990;56:2093-8.

Rehm BHA, Krüger N, Steinbüchel A. A new metabolic link between fatty acid *de novo* synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998;273:24.044-51.

Rehm BHA, Steinbüchel A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1999;25:3-19.

Rehm BHA. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal*. 2003;376:15-33.

Ren Q, Kessler B, Van der Leij F, Witholt B. Mutants of *Pseudomonas putida* affected in poly-3-hydroxyalkanoate synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1998;49:743-50.

Riis V, Mai W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *Journal of Chromatography*. 1988;445:285-9.

Rodrigues MFA, Silva LF, Gomez JGC, Valentin HE, Steinbüchel A. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid co-3-hydroxy-4-pentenoic acid) from unrelated substrates by *Burkholderia* sp.. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1995;43:880-6.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Sato S, Ono Y, Mochiyama Y, Sivaniah E, Kikkawa Y, Sudesh K, Hiraishi T, Doi Y, Abe H, Tsuge T. Polyhydroxyalkanoate film formation and synthase activity during *in vitro* and *in situ* polymerization on hydrophobic surfaces. *Biomacromolecules*. 2008;9(10):2811-8.

Schirmer A, Jendrossek D, Schlegel H. Degradation of poly(3-hydroxyalkanoic acid) (P[3HO]) by bacteria: purification and properties of a P(3HO) depolymerase from *Pseudomonas fluorescens* GK13. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993;59(4):1220-7.

Schlegel HG, Lafferty R, Krauss I. The isolation of mutants not accumulating poly- β -hydroxybutyric acid. *Archives of Microbiology*. 1970;71:283-94.

Shen L, Worrel E, Patel M. Present and future development in plastics from biomass. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*. 2010;4:25-40.

Sheu D, Wang Y, Lee C. Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. *Microbiology*. 2000;146:2019–25.

Silva LF, Gomez JGC, Oliveira MS, Alterthum F. Freeze-drying of industrial yeast strains: influence of growth conditions cooling rates and suspending media on the viability of recovered cells. *Revista de Microbiologia*. 1992;23(2):117-22.

Silva LF, Gomez JGC, Oliveira MS, Torres BB. Propionic acid metabolism and poly-3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate (P3HB-*co*-3HV) production by *Burkholderia* sp. *Journal of Biotechnology*. 2000;76:165-74.

Silva LF, Taciro MK, Michelin-Ramos ME, Carter JM, Pradela JGC, Gomez JGC. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2004;31:245-54.

Silva LF, Gomez JGC, Rocha RCS, Taciro MK, Pradela JGC. Produção biotecnológica de polihidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. *Química Nova*. 2007;30:1732-43.

Silva-Queiroz SR. Biossíntese de polihidroxialcanoatos de cadeia média (PHA_{MCL}) por bactérias a partir de óleos vegetais. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2003

Silva-Queiroz SR, Silva LF, Pradella JGC, Pereira EM, Gomez JGC. PHA_{MCL} biosynthesis systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* strains show differences on monomer specificities. *Journal of Biotechnology*. 2009a;143:111-8.

Silva-Queiroz SR. Estudo do metabolismo de ácidos graxos em *Pseudomonas putida* visando à modulação da composição monomérica de elastômero biodegradável. [tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009b.

Simon R, Priefer U, Pühler A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Nature Biotechnology*. 1983;1:784-91.

Singh AK, Mallick N. Enhanced production of SCL-LCL-PHA co-polymer by sludge-isolated *Pseudomonas aeruginosa* MTCC7925. *Letter in Applied Microbiology*. 2007;46:350-7.

Slater S, Houmiel KL, Tran M, Mitsky TA, Taylor NB, Padgett SR, Gruys KJ. Multiple β -ketothilases mediate poly(β -hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. 1998;180:1979-87.

Solaiman DKY, Ashby RD, Foglia TA. Rapid and specific identification of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate synthase gene by polymerase chain reaction. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2000;53:690-4.

Solaiman DKY. Polymerase-chain-reaction-based detection of individual polyhydroxyalkanoates synthase *phaC1* and *phaC2* genes. *Biotechnology Letters*. 2002;24:245-250.

Solaiman DKY, Ashby RD. Genetic characterization of the Poly(hydroxyalkanoate) synthases of various *Pseudomonas oleovorans* strains. *Current Microbiology*. 2005;50:329-33.

Spiekermann P, Rehm BHA, Kalscheuer R, Baumeister D, Steinbüchel A. A sensitive viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Archives of Microbiology*. 1999;171:73-80.

Steinbüchel A. Polyhydroxyalkanoic acids. In: Byrom D, editor. *Biomaterials novel materials from biological sources*. New York: Macmillan Publishers Basingstoke. 1991. p. 123-213.

Steinbüchel A, Wiese S. A *Pseudomonas* strain accumulating polyesters of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1992;73:691-7.

Steinbüchel A, Valentin HE. Diversity for bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters*. 1995;128:219-28.

Steinbüchel A. Production of rubber-like polymers by microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*. 2003;6:261-70.

Sudesh K, Abe H, Doi Y. Synthesis structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. 2000;25:1503-55.

Sujatha K, Shenbagarathai R, Mahalakshmi A. Analysis of PCR products for PHB production in indigenous *Pseudomonas* sp. LDC-5. *Indian Journal of Biotechnology*. 2005;4:323-5.

Taguchi K, Aoyagi Y, Matsusaki H, Fukui T, Doi Y. Coexpression of 3-ketoacyl-ACP reductase and polyhydroxyalkanoate synthase genes induces PHA production in *E. coli* HB101 strain. *FEMS Microbiology Letters*. 1999;176:183-90.

Tim A, Byrom D, Steinbüchel A. Formation of blends of various poly(3-hydroxyalkanoic acids) by a recombinant strain of *Pseudomonas oleovorans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1990;33:296-301.

Tsuge T, Fukui T, Matsusaki H, Taguchi S, Kobayashi G, Ishizaki A, Doi Y. Molecular cloning of two (*R*)-specific enoyl CoA-hydratase genes from *Pseudomonas aeruginosa* and their use for polyhydroxyalkanoate synthesis. *FEMS Microbiology Letters*. 1999;184:193-8.

Valentin HE, Lee EY, Choi CY, Steinbüchel A. Identification of 4-hydroxyhexanoic acid as a new constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1994;40:710-6.

Valetin HE, Schönenbaum A, Steinbüchel A. Identification of 5-hydroxyhexanoic acid 4-hydroxyheptanoic acid and 4-hydroxyoctanoic acid as new constituents of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1996;46:261-7.

Williams SF. Letter from the President [homepage on the internet]. Massachusetts: Tepha Inc Newsletter; 2008. Available from: <http://www.tepha.com/publications> [2008 Mar 25].

Witholt B, Kessler B. Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates) a versatile set of bacterial bioplastics. *Current Opinion in Biotechnology*. 1999;10(3):279-85.

Xie WP, Chen GQ. Production and characterization of terpolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) by recombinant *Aeromonas hydrophila* 4AK4 harboring genes phaPCJ. *Biochemical Engineering Journal*. 2007;38:384-9.

Yao J, Zhang G, Wu Q, Chen Z, Zhang R. Production of polyhydroxykanoates by *Pseudomonas nitroreducens*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1999;73:345-9.

ANEXOS

ANEXO A - Tabela de produção de PHA em ensaios de acúmulo em meio líquido contendo glicose ou octanoato de sódio como única fonte de carbono.

(continua)

Isolado	F.C.	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
				3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDD	
RMP630	G			Sem crescimento					
	O	1,19	7,17	56,3	0,0	0,0	14,5	29,2	1,7
RMP651	G	2,33	5,17	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,85	7,50	3,8	15,1	74,2	3,2	3,7	11,8
RMP668	G	1,79	5,10	0,0	0,0	0,0	39,6	60,4	1,4
	O	0,47	7,31	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
RMP690	G	2,42	6,21	0,0	1,2	12,3	66,6	14,7	10,8
	O	1,19	7,46	87,8	0,6	8,5	2,0	1,1	30,5
RMP711	G	0,32	6,80	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,12	6,91	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
RMP712	G	1,82	6,63	0,0	0,0	0,0	14,5	85,5	3,7
	O			Sem crescimento					
RMP713	G	2,73	5,71	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,80	7,54	0,0	14,2	61,8	9,6	14,4	3,4
RMP714	G	1,75	6,68	Tr	0,0	Tr	44,4	55,7	1,3
	O	0,46	7,48	6,4	15,7	65,4	5,6	6,9	7,0
RMP715	G	2,72	5,70	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,14	6,59	0,0	14,8	64,1	8,5	12,6	3,9
RMP716	G	1,86	6,54	0,0	0,0	0,0	38,9	61,1	1,2
	O	0,11	6,98	0,0	0,0	63,7	0,0	36,3	1,3
RMP717	G			Sem crescimento					
	O	1,09	7,14	0,0	0,0	0,0	35,4	64,6	1,2
RMP721B	G	0,70	4,89	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
	O	0,43	7,42	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2
RMP753	G			Sem crescimento					
	O	1,11	7,15	37,5	0,0	0,0	18,8	43,8	1,4
RMP761A	G	0,69	6,89	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,22	6,78	0,00	12,0	53,2	0,0	0,0	4,4
RMP761B	G	1,21	5,47	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,70	7,58	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
RMP782	G	1,84	5,87	98,5	0,0	1,5	0,0	0,0	19,2
	O	2,90	7,53	2,6	1,9	92,6	1,4	1,5	24,1
RMP802	G	0,60	6,23	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,70	6,60	Tr	1,9	93,5	2,0	2,5	18,7
RMP813	G			Sem crescimento					
	O	0,91	6,99	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
RMP822	G	1,96	5,75	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	2,49	7,46	Tr	9,3	86,0	2,8	1,9	18,2
RMP824A	G	0,64	6,22	53,0	1,2	5,3	22,6	17,0	4,8
	O	0,83	7,55	64,3	2,4	32,1	1,1	0,5	26,4
RMP830	G	1,42	6,98	0,0	0,0	28,3	71,8	0,0	1,1
	O	0,99	7,45	0,0	13,2	81,9	3,3	1,7	22,6

MSC – Massa seca celular; 3HB- 3-hidroxi butirato; 3HHx- 3-hidroxi hexanoato; 3HO- 3-hidroxi octanoato; 3HD- 3-hidroxi decanoato; 3HDDd- 3-hidroxi dodecanoato; PHA- Polihidroxi alcanoato.

ANEXO A - Tabela de produção de PHA em ensaios de acúmulo em meio líquido contendo glicose ou octanoato de sódio como única fonte de carbono.

(continuação)

Isolado	F.C.	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)	
				3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDD		
RMP833A	G	0,85	4,65	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,6	
	O	0,84	7,13	0,00	0,0	100,0	0,0	0,0	2,4	
RMP838	G	1,08	5,44	0,0	0,0	0,0	59,7	40,3	1,9	
	O	1,31	7,08	0,0	0,0	50,2	17,1	32,7	1,7	
RMP851A	G	0,87	6,34	3,0	2,6	14,9	64,3	8,2	14,2	
	O	1,86	7,73	0,0	9,0	86,2	2,9	1,9	18,7	
RMP874	G	1,60	6,45	0,0	0,0	0,0	44,6	55,4	1,8	
	O	1,28	7,06	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
RMP876	G	1,38	6,29	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	O	0,14	6,88	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
RMP878	G	0,73	4,73	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	O	0,10	6,57	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
RMP909	G	1,20	6,57	0,0	0,0	0,0	42,1	57,9	1,5	
	O	1,02	7,15	0,0	11,3	42,0	16,2	30,6	2,4	
RMP910	G	1,58	6,33	0,0	0,0	0,0	36,7	63,3	1,3	
	O	0,56	6,81	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,3	
RMP959B	G	0,72	6,86	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	35,9	
	O				Sem crescimento					
RMP988	G	1,23	6,50	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,9	
	O	1,13	7,02	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
RMP993	G				Sem crescimento					
	O	0,89	7,32	0,0	0,0	0,0	32,4	67,6	1,1	
RMP994	G	1,32	6,60	0,0	0,0	0,0	44,5	55,5	0,6	
	O	0,52	7,48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
RMP997	G	2,08	6,46	62,6	0,0	0,0	15,3	22,1	1,9	
	O	0,82	7,50	56,1	3,9	21,8	7,8	10,4	2,2	
RMP1047	G				Sem crescimento					
	O	0,37	7,36	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,7	
RMP1048	G	1,75	6,93	16,9	0,0	0,0	35,6	47,4	2,5	
	O	1,09	7,08	0,0	0,0	0,0	34,8	65,2	1,3	
RMP1058BII	G	2,15	3,66	31,4	0,9	6,4	41,8	14,8	13,0	
	O	1,29	7,51	90,6	0,4	6,9	0,9	0,9	37,6	
RMP1061A	G	1,58	6,30	14,3	0,0	0,0	35,7	50,0	1,8	
	O	1,36	7,23	91,2	Tr	Tr	3,1	5,7	5,7	
RMP1064BII	G	1,44	6,56	0,0	0,0	13,6	73,9	12,5	5,5	
	O	0,40	7,44	Tr	5,6	83,9	7,5	3,1	15,9	
RMP1067	G	0,57	5,04	0,0	0,0	59,1	0,0	40,9	0,9	
	O	1,09	7,10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
RMP1077	G	1,09	6,81	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	O	1,16	7,06	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
RMP1091	G	1,91	6,40	Tr	0,0	12,7	63,0	16,1	6,9	
	O	1,38	7,58	0,0	3,3	90,6	3,6	2,6	14,9	
RMP1108	G	0,89	6,32	Tr	0,0	0,0	38,5	61,5	1,4	
	O	0,31	7,52	0,0	0,0	0,0	30,8	69,2	1,2	

MSC – Massa seca celular; 3HB- 3-hidroxibutirato; 3HHx- 3-hidroxihexanoato; 3HO- 3-hidroxi octanoato; 3HD- 3-hidroxidecanoato; 3HDDd- 3-hidroxidodecanoato; PHA- Polihidroxialcanoato.

ANEXO A - Tabela de produção de PHA em ensaios de acúmulo em meio líquido contendo glicose ou octanoato de sódio como única fonte de carbono.

(continuação)

Isolado	F.C.	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
				3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	
RMP1116	G	1,85	6,52	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	1,50	7,16	0,0	0,0	0,0	90,5	9,5	9,6
RMP1159	G	0,14	4,09	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	1,34	7,10	0,0	0,0	0,0	35,8	64,1	1,2
RMP1163B	G	0,85	6,29	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	Sem crescimento							
RMP1170	G	0,53	6,59	0,0	0,0	0,0	44,7	55,3	0,7
	O	1,40	7,40	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
RMP1171	G	1,59	6,50	36,9	0,0	0,0	26,6	36,4	1,7
	O	1,20	7,15	32,6	0,0	0,0	23,6	43,8	1,6
RMP1172A	G	Sem crescimento							
	O	1,18	7,14	0,0	0,0	0,0	31,4	68,6	1,5
RMP1176	G	1,39	6,56	0,0	0,0	0,0	38,3	61,7	1,4
	O	1,60	7,15	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,8
RMP1179	G	Sem crescimento							
	O	0,98	7,15	0,0	0,0	25,7	26,0	48,3	1,6
RMP1189	G	1,83	6,47	0,0	0,0	0,0	42,3	57,7	1,4
	O	1,11	7,13	0,0	0,0	0,0	34,5	65,5	1,3
RMP1199	G	1,48	6,73	36,0	0,0	9,0	19,0	36,0	2,0
	O	1,13	7,12	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
RMP1202B	G	1,38	5,26	41,0	0,0	0,0	20,4	38,6	1,8
	O	0,48	6,88	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
RMP1252	G	1,09	6,65	0,0	0,0	0,0	41,7	58,3	0,7
	O	0,47	7,43	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	3,5
RMP1275B	G	Sem crescimento							
	O	0,05	6,39	0,0	39,7	60,3	0,0	0,0	1,3
RMP1303	G	1,57	6,53	0,0	0,0	0,0	40,3	59,7	1,3
	O	1,08	7,13	0,0	0,0	0,0	34,0	66,0	1,2
RMP1315	G	Sem crescimento							
	O	1,06	7,15	0,0	0,0	0,0	44,7	55,3	1,6
RMP1316	G	1,16	6,35	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	2,1
	O	1,37	7,10	0,0	0,0	0,0	37,7	62,3	1,5
RMP1321	G	Sem crescimento							
	O	0,89	6,58	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
RMP1325	G	Sem crescimento							
	O	0,63	7,41	87,6	0,0	0,0	4,3	8,1	4,7
RMP1326	G	Sem crescimento							
	O	0,50	7,36	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
RMP1338	G	0,81	6,48	0,0	2,5	20,7	62,6	8,4	11,8
	O	0,16	7,41	0,0	8,7	86,3	2,7	2,3	20,4
RMP1340	G	Sem crescimento							
	O	0,61	7,32	0,00	20,89	55,32	8,44	15,35	3,62
RMP1347AII	G	2,45	5,26	0,0	0,0	0,0	46,4	53,6	1,7
	O	1,18	7,51	52,7	2,2	40,2	3,0	1,9	18,3

MSC – Massa seca celular; 3HB- 3-hidroxibutirato; 3HHx- 3-hidroxihexanoato; 3HO- 3-hidroxioctanoato; 3HD- 3-hidroxidecanoato; 3HDDd- 3-hidroxidodecanoato; PHA- Polihidroxialcanoato.

ANEXO A - Tabela de produção de PHA em ensaios de acúmulo em meio líquido contendo glicose ou octanoato de sódio como única fonte de carbono.

(continuação)

Isolado	F.C.	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
				3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	
RMP1347B	G	1,54	6,91	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,63	6,86	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
RMP1362	G	0,32	6,51	0,0	0,0	7,4	51,9	40,7	1,8
	O	1,37	7,12	0,0	3,3	88,1	4,6	4,0	12,7
RMP1365	G	1,18	6,96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	1,10	6,97	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
RMP1369	G	0,59	6,37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	Sem crescimento							
RMP1370	G	1,00	6,99	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	1,07	6,96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
RMP1378	G	Sem crescimento							
	O	0,85	7,49	0,0	15,4	60,2	0,0	24,4	1,8
RMP1387	G	0,00	6,51	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,65	6,98	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
RMP1388	G	0,23	6,53	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,91	7,46	0,0	4,1	89,4	3,3	3,2	11,0
RMP1402A	G	1,60	5,82	0,0	0,0	0,0	34,9	65,1	1,6
	O	0,74	7,50	0,00	0,00	41,31	0,00	58,69	0,98
RMP1413	G	Sem crescimento							
	O	0,04	7,02	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6
RMP1414	G	Sem crescimento							
	O	0,49	7,19	89,3	4,4	0,0	0,0	0,0	1,5
RMP1428A	G	2,01	6,45	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,54	6,97	0,0	14,6	68,9	6,8	9,7	4,2
RMP1446B	G	1,04	6,68	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,41	7,43	0,0	0,0	0,0	39,1	60,9	1,3
RMP1465B	G	1,53	6,42	13,8	0,0	0,0	33,9	39,4	4,7
	O	1,20	7,05	0,0	11,2	69,9	6,9	12,0	4,6
DCL2	G	1,33	6,36	2,5	1,6	15,3	64,1	10,3	10,7
	O	1,01	7,53	1,5	10,9	75,0	6,6	3,4	13,4
DCL6	G	1,62	6,36	2,3	2,0	16,4	64,0	9,3	15,2
	O	0,54	7,53	1,5	10,1	75,3	6,6	3,6	14,7
DCL7	G	1,01	6,21	0,0	1,1	9,3	72,5	8,8	24,2
	O	1,13	7,58	1,2	11,3	76,4	6,4	2,9	17,1
DCL8	G	2,18	6,39	1,5	1,2	16,2	68,0	7,4	24,6
	O	0,95	7,55	0,0	10,4	76,5	7,4	3,8	12,1
DCL9	G	1,34	5,93	0,0	0,0	10,7	68,2	12,0	10,8
	O	1,07	7,25	0,0	8,2	60,9	14,7	9,9	5,6
DCL10	G	1,33	7,01	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,71	7,28	0,0	6,3	71,6	10,2	11,9	5,1
DCL11	G	2,42	6,33	1,3	1,5	16,8	68,0	7,2	23,9
	O	0,92	7,51	0,0	9,8	71,2	5,0	3,3	7,4
DCL13B	G	0,51	6,83	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,51	7,22	0,0	0,0	44,6	24,1	31,3	1,8

MSC – Massa seca celular; 3HB- 3-hidroxi butirato; 3HHx- 3-hidroxi hexanoato; 3HO- 3-hidroxi octanoato; 3HD- 3-hidroxi decanoato; 3HDDd- 3-hidroxi dodecanoato; PHA- Polihidroxi alcanoato.

ANEXO A - Tabela de produção de PHA em ensaios de acúmulo em meio líquido contendo glicose ou octanoato de sódio como única fonte de carbono.

(continuação)

Isolado	F.C.	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
				3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDD	
DCL14	G	1,34	6,22	1,5	1,2	11,2	68,4	10,1	18,2
	O	0,99	7,49	0,0	7,4	50,0	20,0	13,6	4,5
DCL18A	G	1,25	4,56	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,15	7,01	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	1,0
DCL18B	G	1,19	4,82	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,17	7,06	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL22A	G	0,13	5,12	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,24	7,15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL22B	G	1,34	5,11	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	1,18	7,09	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL49A	G	0,83	4,80	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O			Sem crescimento					
DCL49B	G	1,08	7,01	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,69	7,41	14,8	0,0	33,0	21,0	31,1	1,8
DCL89A	G	0,61	7,03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,34	7,11	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL89B	G	0,40	6,38	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,19	7,04	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL90	G	0,36	6,70	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O			Sem crescimento					
DCL99A	G	0,15	6,26	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O			Sem crescimento					
DCL99B	G	0,10	6,14	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O			Sem crescimento					
DCL150A	G	0,33	5,98	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,54	6,88	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL165	G	1,06	6,69	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3
	O	0,77	7,44	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL170	G	0,67	6,23	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3
	O	0,20	7,05	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL172A	G	0,54	6,32	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,08	7,07	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL172B	G	0,48	6,88	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,23	7,13	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL181	G	0,24	5,52	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,32	7,03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL182A	G	1,84	4,90	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,05	7,08	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL182B	G	0,36	6,38	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,10	6,89	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL186A	G	0,57	6,32	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,13	7,06	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL186B	G	0,66	6,79	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,40	7,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL187	G	0,60	7,01	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,34	7,12	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

MSC – Massa seca celular; 3HB- 3-hidroxibutirato; 3HHx- 3-hidroxihexanoato; 3HO- 3-hidroxi octanoato; 3HD- 3-hidroxidcanoato; 3HDDd- 3-hidroxidodecanoato; PHA- Polihidroxialcanoato.

ANEXO A - Tabela de produção de PHA em ensaios de acúmulo em meio líquido contendo glicose ou octanoato de sódio como única fonte de carbono.

(continuação)

Isolado	F.C.	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
				3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	
DCL188	G	0,28	5,99	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,18	7,24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL189	G	1,50	5,93	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,07	7,07	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL205	G	0,19	5,78	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,12	6,78	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL209A	G	2,02	3,71	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,20	6,81	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL209B	G	1,20	3,95	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,23	6,94	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL211	G	0,51	5,41	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,57	6,98	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL216	G	3,34	6,27	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	1,28	7,22	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL217	G	2,76	6,27	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,76	7,15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL218	G	0,66	6,29	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,38	7,05	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL219	G	0,24	6,16	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,32	7,10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL220	G	2,57	6,13	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,29	7,04	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL221	G	2,41	6,23	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,36	7,08	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL222	G	1,39	4,20	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,18	6,69	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL225	G	0,22	6,40	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,25	7,35	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL226	G	2,53	6,38	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	1,24	7,42	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL227	G	2,19	6,34	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	1,02	7,25	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL229	G	1,28	6,05	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,16	7,11	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL230	G	0,77	6,08	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,24	7,03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL231	G	0,11	7,01	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,34	7,03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL232	G	0,16	6,85	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,44	7,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL233	G	1,79	5,84	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,21	7,12	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL234A	G	0,18	6,42	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,46	7,13	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL234B	G	2,72	6,42	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,14	7,09	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

MSC – Massa seca celular; 3HB- 3-hidroxibutirato; 3HHx- 3-hidroxihexanoato; 3HO- 3-hidroxiocetanoato; 3HD- 3-hidroxidecanoato; 3HDDd- 3-hidroxidodecanoato; PHA- Polihidroxialcanoato.

ANEXO A - Tabela de produção de PHA em ensaios de acúmulo em meio líquido contendo glicose ou octanoato de sódio como única fonte de carbono.

(continuação)

Isolado	F.C.	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
				3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	
DCL236	G	0,11	6,08	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,13	7,15	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,8
DCL237	G	1,67	6,20	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,04	7,05	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL238	G	1,49	6,13	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,34	7,11	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL239	G	1,27	3,26	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,21	6,79	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL240	G	2,44	6,20	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,18	7,04	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL241	G	2,18	4,10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,07	6,91	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL255A	G	0,56	6,25	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O			Sem crescimento					
DCL255B	G			Sem crescimento					
	O	0,27	7,07	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL256A	G	0,54	6,05	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,27	7,09	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL256B	G	0,77	6,89	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,26	7,03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL263A	G	0,38	6,10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,23	6,91	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL263B	G	0,43	7,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,28	7,12	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL264	G	0,13	5,86	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,11	6,50	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL266A	G	0,68	6,90	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,10	7,01	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL266B	G	0,30	5,72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,06	6,69	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL267	G	0,28	7,02	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,22	7,09	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL268	G	0,25	6,22	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,31	6,98	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL270A	G	0,35	6,12	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,21	6,98	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL270B	G	0,39	7,01	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,15	7,05	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL271A	G	0,64	7,04	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,23	7,14	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL271B	G	0,72	6,18	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,19	7,04	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL272	G	2,60	6,10	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	34,6
	O	0,76	7,18	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,7
DCL273	G			Sem crescimento					
	O	0,18	7,09	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

MSC – Massa seca celular; 3HB- 3-hidroxibutirato; 3HHx- 3-hidroxihexanoato; 3HO- 3-hidroxiocetanoato; 3HD- 3-hidroxidecanoato; 3HDDd- 3-hidroxidodecanoato; PHA- Polihidroxialcanoato.

ANEXO A - Tabela de produção de PHA em ensaios de acúmulo em meio líquido contendo glicose ou octanoato de sódio como única fonte de carbono.

(continuação)

Isolado	F.C.	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
				3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	
DCL274A	G	0,42	6,87	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,27	7,02	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL274B	G	2,64	6,29	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,95	7,22	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DCL276	G	1,01	6,46	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
	O	0,29	7,18	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU4	G	2,04	6,33	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,90	7,62	0,0	0,0	27,7	26,4	45,9	1,1
SCU5	G	2,72	6,47	0,0	0,9	8,1	43,6	29,7	6,9
	O	1,09	7,57	0,0	7,5	86,3	3,2	2,3	21,1
SCU6	G	1,79	4,13	0,0	0,0	3,5	41,9	44,1	1,6
	O	1,01	7,20	0,0	12,7	49,3	12,6	16,1	3,0
SCU10	G	1,02	6,52	1,1	2,1	6,4	41,6	28,1	11,3
	O	1,12	7,58	0,0	7,6	86,1	3,1	2,7	22,2
SCU11	G	2,55	6,25	1,2	1,2	6,9	42,5	30,8	8,3
	O	1,18	7,57	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU12	G	2,74	6,51	0,0	1,7	5,6	43,4	32,8	4,9
	O				Sem crescimento				
SCU19	G				Sem crescimento				
	O	1,21	7,14	4,1	14,1	76,8	3,0	1,6	22,2
SCU26	G				Sem crescimento				
	O	1,14	7,57	4,0	14,4	77,5	2,7	1,5	23,8
SCU28	G	1,37	6,91	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,86	7,49	0,0	12,2	72,9	7,8	7,1	4,9
SCU29	G	4,37	6,41	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	43,6
	O	1,47	7,33	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	49,3
SCU31	G	3,23	6,42	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	50,1
	O	1,59	7,60	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	55,3
SCU39	G	2,63	6,46	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	1,55	7,39	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	48,7
SCU42	G				Sem crescimento				
	O	0,99	7,60	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	42,7
SCU46	G				Sem crescimento				
	O	0,23	7,14	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU60	G	2,91	6,49	9,3	1,2	6,2	40,7	25,0	12,3
	O	0,90	7,57	4,1	14,6	76,9	2,5	1,4	24,9
SCU63	G	5,40	6,49	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	56,4
	O	1,64	7,53	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	55,4
SCU66	G	5,51	6,50	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	55,0
	O	1,89	7,57	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	57,8
SCU74	G	3,70	6,45	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	42,0
	O	1,08	7,52	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	39,8
SCU85	G				Sem crescimento				
	O	0,63	7,56	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	39,5
SCU86	G	3,33	6,39	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	34,0
	O	1,51	7,53	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	47,5

MSC – Massa seca celular; 3HB- 3-hidroxi butirato; 3HHx- 3-hidroxi hexanoato; 3HO- 3-hidroxi octanoato; 3HD- 3-hidroxi decanoato; 3HDDd- 3-hidroxi dodecanoato; PHA- Polihidroxi alcanoato.

ANEXO A - Tabela de produção de PHA em ensaios de acúmulo em meio líquido contendo glicose ou octanoato de sódio como única fonte de carbono.

(continuação)

Isolado	F.C.	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
				3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDD	
SCU89	G	2,47	6,32	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	37,3
	O	1,54	7,36	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	53,3
SCU90	G	2,50	6,49	1,5	1,2	9,2	63,4	14,5	4,8
	O	1,24	7,52	0,0	4,0	92,0	2,7	1,4	17,7
SCU91	G	3,44	6,41	0,9	1,5	8,2	60,9	16,9	8,9
	O	1,29	7,43	0,6	12,0	84,9	1,4	1,1	25,7
SCU92	G	2,37	4,86	17,8	0,0	3,1	53,1	20,2	3,1
	O	1,41	7,41	1,6	4,1	91,6	1,6	1,1	22,3
SCU94	G	2,44	6,42	0,0	0,8	6,9	62,9	20,6	5,0
	O	1,30	7,48	0,0	7,4	89,8	1,5	1,3	23,9
SCU95	G	2,44	6,46	1,7	1,3	6,5	60,4	21,8	4,4
	O	1,18	7,51	0,0	5,8	86,2	2,3	3,7	36,7
SCU99	G	3,59	6,43	2,0	2,0	11,3	57,6	13,0	15,0
	O	1,35	7,54	2,2	13,5	79,3	3,0	1,6	20,1
SCU100	G	2,41	5,26	1,4	1,6	11,6	60,2	14,4	10,2
	O	1,42	7,51	0,3	6,4	45,6	47,3	0,5	59,6
SCU101	G	3,47	6,51	0,7	1,4	10,9	65,1	10,9	13,5
	O	1,24	7,46	1,2	12,6	79,2	3,9	2,1	23,7
SCU104	G	2,06	4,16	0,0	2,2	6,5	58,1	29,5	2,9
	O	1,18	7,54	0,0	6,6	88,3	3,2	1,9	14,1
SCU107	G	2,36	6,44	1,6	1,1	5,6	58,4	23,2	4,3
	O	0,87	7,32	0,0	3,4	92,5	2,4	1,7	17,9
SCU108	G	2,92	6,40	1,0	1,4	8,2	61,4	17,3	8,6
	O	1,46	7,51	0,0	11,2	86,5	1,2	1,1	23,7
SCU109	G	2,99	6,44	1,1	1,4	7,5	59,5	20,2	8,3
	O	1,43	7,59	0,7	9,9	85,1	1,7	1,7	34,0
SCU110	G	3,78	6,48	3,2	1,3	8,3	58,5	16,0	8,5
	O	1,56	7,43	3,1	11,8	78,1	4,3	2,7	13,2
SCU111	G	3,19	6,51	1,9	1,6	11,7	64,9	13,5	4,7
	O	1,38	7,51	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU112	G	3,78	6,43	3,5	1,1	7,8	57,8	17,2	7,1
	O	1,62	7,51	2,7	12,3	78,4	4,1	2,5	12,8
SCU113	G	3,10	6,51	0,9	1,9	13,6	67,1	9,3	9,4
	O	1,41	7,56	0,8	9,8	85,5	2,2	1,8	15,9
SCU114	G	2,64	6,44	1,7	1,0	5,6	61,2	22,5	4,1
	O	1,03	7,44	0,0	5,1	91,3	2,1	1,5	18,6
SCU115	G	3,09	6,45	0,9	1,7	9,9	62,6	15,2	11,3
	O	1,51	7,52	0,5	11,2	86,2	1,1	1,0	25,5
SCU116	G	0,40	6,97	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	1,96	7,76	0,5	9,9	87,7	1,0	0,9	18,8
SCU117	G	3,20	6,51	1,2	1,4	7,2	60,4	20,1	6,0
	O	1,72	7,77	0,4	11,0	86,6	1,0	0,9	30,3
SCU126	G	1,90	6,36	0,0	0,0	8,5	56,7	26,2	4,6
	O	0,77	7,23	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU127	G	3,04	6,50	0,8	1,7	8,5	61,2	17,8	7,3
	O	1,62	7,75	0,4	11,1	86,1	1,2	1,3	23,2

MSC – Massa seca celular; 3HB- 3-hidroxi butirato; 3HHx- 3-hidroxi hexanoato; 3HO- 3-hidroxi octanoato; 3HD- 3-hidroxi decanoato; 3HDDd- 3-hidroxi dodecanoato; PHA- Polihidroxi alcanoato.

ANEXO A - Tabela de produção de PHA em ensaios de acúmulo em meio líquido contendo glicose ou octanoato de sódio como única fonte de carbono.

(continuação)

Isolado	F.C.	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
				3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	
SCU128	G	2,50	6,11	0,0	0,0	0,0	50,4	49,6	1,5
	O	0,96	7,34	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU129	G	2,02	6,40	0,0	0,0	8,3	56,8	25,9	4,9
	O			Sem crescimento					
SCU130	G	1,10	6,65	0,0	0,0	0,0	55,3	44,7	1,4
	O	1,26	7,32	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU143	G	1,68	4,84	6,1	3,2	7,2	51,4	25,3	2,9
	O	1,51	7,79	0,0	4,7	91,5	2,3	1,2	22,0
SCU145	G	2,18	6,54	2,8	1,6	5,9	60,5	21,0	4,4
	O	1,44	7,79	0,0	4,8	93,0	1,3	0,9	27,4
SCU157	G	2,97	6,37	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	27,9
	O	2,38	7,82	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	46,4
SCU163	G	1,99	6,41	0,0	4,2	10,8	56,0	19,6	3,5
	O	1,00	7,41	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU164	G	3,71	6,54	2,2	1,2	10,3	64,1	10,8	15,7
	O	0,69	7,62	1,7	14,6	72,1	4,2	4,8	37,8
SCU176	G	1,23	4,56	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	1,50	7,80	0,6	3,6	92,7	1,8	1,1	22,6
SCU177	G	0,21	7,03	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3
	O	2,00	7,73	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	50,4
SCU179	G	2,21	4,16	2,6	0,0	3,5	64,1	22,7	4,0
	O	1,63	7,76	0,0	4,3	93,7	1,3	0,8	26,2
SCU180	G	1,29	3,07	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	26,0
	O	2,43	7,60	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	45,0
SCU183	G	1,54	3,93	0,0	0,0	5,8	71,0	16,5	2,3
	O	1,26	7,71	0,0	4,1	90,6	3,6	1,4	20,3
SCU185	G	1,75	3,91	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	1,58	7,85	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU186	G	4,98	6,48	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	42,2
	O	2,51	7,84	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	45,4
SCU190	G	1,97	5,05	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,48	7,18	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU193	G	2,74	5,16	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,29	7,17	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU196	G	1,69	4,33	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,74	7,44	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU197	G	2,43	5,02	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,32	7,05	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU204	G	1,48	4,34	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O			Sem crescimento					
SCU205	G	1,41	4,52	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	1,27	7,41	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU224	G	4,29	6,34	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	1,32	7,52	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU226	G	1,24	4,16	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	1,28	7,41	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

MSC – Massa seca celular; 3HB- 3-hidroxi butirato; 3HHx- 3-hidroxi hexanoato; 3HO- 3-hidroxi octanoato; 3HD- 3-hidroxi decanoato; 3HDDd- 3-hidroxi dodecanoato; PHA- Polihidroxi alcanoato.

ANEXO A - Tabela de produção de PHA em ensaios de acúmulo em meio líquido contendo glicose ou octanoato de sódio como única fonte de carbono.

(continuação)

Isolado	F.C.	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
				3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	
SCU233	G	1,50	5,08	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	Sem crescimento							
SCU235	G	2,23	5,34	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	Sem crescimento							
SCU236	G	1,08	6,38	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,12	6,92	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU237	G	2,95	6,46	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,38	7,19	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU243	G	1,88	4,42	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	Sem crescimento							
SCU246	G	2,26	4,83	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	Sem crescimento							
SCU253	G	1,71	4,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	Sem crescimento							
SCU275	G	2,58	6,33	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	1,00	7,47	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU276	G	0,71	4,18	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,89	7,59	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU278	G	1,81	4,65	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,00	7,08	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU279	G	2,03	4,72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	Sem crescimento							
SCU280	G	1,97	4,73	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,41	7,05	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU282	G	1,91	4,85	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,33	7,11	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU284	G	1,38	4,78	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	Sem crescimento							
SCU285	G	2,66	6,45	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,22	7,13	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU289	G	2,85	6,29	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	1,13	7,44	0,0	0,0	10,3	20,5	46,6	1,5
SCU290	G	2,30	3,76	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	1,39	7,47	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU291	G	4,00	6,45	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,15	7,20	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU297	G	1,39	4,13	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,81	7,43	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU298	G	1,32	4,53	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,43	6,96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU299	G	1,46	4,31	0,0	0,0	20,2	42,2	29,6	2,6
	O	0,94	7,44	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SCU300	G	0,86	4,58	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	Sem crescimento							
SCU303	G	1,54	5,31	0,0	1,8	8,8	57,0	29,3	3,7
	O	1,24	7,53	0,0	4,9	56,3	15,8	23,0	3,0

MSC – Massa seca celular; 3HB- 3-hidroxi butirato; 3HHx- 3-hidroxi hexanoato; 3HO- 3-hidroxi octanoato; 3HD- 3-hidroxi decanoato; 3HDDd- 3-hidroxi dodecanoato; PHA- Polihidroxi alcanoato.

ANEXO A - Tabela de produção de PHA em ensaios de acúmulo em meio líquido contendo glicose ou octanoato de sódio como única fonte de carbono.

Isolado	F.C.	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
				3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDD	
SCU304	G	2,35	6,29	1,1	1,2	15,1	64,9	12,8	12,2
	O	0,30	7,56	2,3	6,4	74,0	8,1	9,2	6,3
SCU306	G	2,48	6,26	0,0	2,3	17,2	57,3	20,2	6,3
	O	0,85	7,51	0,9	6,3	87,2	3,1	2,6	21,7
SCU307	G	1,67	6,46	2,5	2,6	12,3	61,5	17,5	6,2
	O	0,92	7,60	0,0	6,9	86,9	3,7	2,5	23,6
SCU308	G	1,49	5,49	0,0	0,0	12,9	58,3	21,0	9,6
	O	0,71	7,62	2,1	6,9	84,8	3,4	2,8	46,2
SCU309	G	1,21	4,30	0,0	0,0	4,9	53,3	41,8	3,1
	O	0,60	7,54	0,0	6,4	84,4	4,2	5,0	15,6
SCU310	G	1,63	5,67	3,3	0,0	6,1	51,0	39,5	3,0
	O	0,47	7,50	9,0	6,6	60,8	10,2	13,4	4,9
SCU311	G	2,15	6,39	2,7	1,2	7,0	52,2	21,4	9,2
	O	0,78	7,43	2,4	10,9	75,4	3,6	5,9	16,9
SCU312	G	1,78	5,51	0,0	0,0	6,1	49,6	44,4	2,1
	O	0,66	7,56	0,0	6,3	82,6	3,6	5,4	25,6
SCU313	G	0,84	6,30	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	0,92	7,55	0,0	6,4	84,8	4,3	4,5	21,0
SCU314	G	2,19	5,87	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	O	1,11	7,61	1,7	13,0	78,8	2,9	2,3	29,3
SCU315	G	2,55	5,60	0,0	2,3	12,6	57,8	20,9	6,2
	O	0,99	7,49	0,0	5,6	89,8	2,6	1,9	27,0

MSC – Massa seca celular; 3HB- 3-hidroxi butirato; 3HHx- 3-hidroxi hexanoato; 3HO- 3-hidroxi octanoato; 3HD- 3-hidroxi decanoato; 3HDDd- 3-hidroxi dodecanoato; PHA- Polihidroxi alcanoato.

ANEXO B - Tabela com os fragmentos esperados, gerados a partir dos testes de PCR *in silico* com as sequências de genes putativos *phaC* com organização *phaCAB*.

(continua)

Linagem	phaCF1/phaCR4	I-179L/I-179R	RECF1/RECR	RECF2/RECR
<i>Ralstonia eutropha</i> H16	497pb	-	778pb	731pb
<i>Cupriavidus taiwanensis</i> str. LMG19424	497pb	-	778pb	731pb
<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	488pb	-	769pb	722pb
<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	497pb	-	778pb	731pb
<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000	497pb	-	778pb	-
<i>Burkholderia glumae</i> BGR1	497pb	-	778pb	731pb
<i>Burkholderia multivorans</i> ATCC 17616	497pb	-	778pb	731pb
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1710b	497pb	-	778pb	731pb
<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243	497pb	-	778pb	731pb
<i>Burkholderia pseudomallei</i> MSHR346	497pb	-	778pb	731pb
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106a	497pb	-	778pb	731pb
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 668	497pb	-	778pb	731pb
<i>Burkholderia mallei</i> NCTC 10247	497pb	-	778pb	731pb
<i>Burkholderia mallei</i> NCTC 10229	497pb	-	778pb	731pb
<i>Burkholderia mallei</i> SAVP1	497pb	-	778pb	731pb
<i>Burkholderia mallei</i> ATCC 23344	497pb	-	778pb	731pb
<i>Burkholderia thailandensis</i> E264	497pb	-	778pb	731pb
<i>Ralstonia pickettii</i> 12J	-	-	778pb	731pb
<i>Ralstonia pickettii</i> 12D	-	-	778pb	731pb
<i>Burkholderia ambifaria</i> MC40-6	497pb	-	778pb	731pb
<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	497pb	-	778pb	731pb
<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD	497pb	-	-	731pb
<i>Burkholderia cenocepacia</i> MC0-3	497pb	-	778pb	731pb
<i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424	497pb	-	778pb	731pb

ANEXO B - Tabela com os fragmentos esperados, gerados a partir dos testes de PCR *in silico* com as sequências de genes putativos *phaC* com organização *phaCAB*.

Linhagem	phaCF1/phaCR4	I-179L/I-179R	RECF1/RECR	(conclusão)
				RECF2/RECR
<i>Burkholderia cenocepacia</i> AU 1054	497pb	-	778pb	731pb
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4	497pb	-	-	731pb
<i>Delftia acidovorans</i> SPH-1	-	-	-	839pb
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	-	-	778pb	731pb
<i>Comamonas testosteroni</i> CNB-2	-	-	-	815pb
<i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1	-	-	763pb	716pb
<i>Acidovorax</i> subsp. <i>Citrulli</i> AA 000-1	-	-	763pb	716pb
<i>Acidovorax</i> sp. JS42	-	-	-	-

ANEXO C - Tabela com os fragmentos esperados, gerados a partir dos testes de PCR *in silico* com as sequências de operons com organização *phaC1ZC2* encontrados em linhagens do gênero *Pseudomonas*.

Linhagem	phaCF1/phaCF4	179(a)L/179(a)R	RECF1/RECR	RECF2/RECR
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	479/3475/482	538/3534/541	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58	479/3475/482	538/3534/541	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14	479/3475/482	538/3534/541	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA7	479/3472/482	538/3531/541	-	-
<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp	479/3381/ -	538/3440/ -	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	479/3261/482	- / - / -	-	-
<i>Pseudomonas entomophila</i> L48	479/3159/ -	- /3218/541	-	-
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	479/3125/482	- / - /541	-	-
<i>Pseudomonas putida</i> GB-1	479/3129/482	- / - / -	-	-
<i>Pseudomonas putida</i> F1	482/3125/ -	- / - /541	-	-
<i>Pseudomonas putida</i> W619	479/3131/ -	- /3190/541	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25	479/3241/482	- / - / -	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1	- / - / -	- / - / -	-	-

ANEXO D - Alinhamento das sequências de genes putativos *phaC* de 19 linhagens com organização *phaCAB* e posição dos primers descritos na literatura (*phaCF1/phaCR4*) e primers desenhados neste trabalho para a detecção específica de PHA sintases da classe I (*RECF1*, *RECF2* e *RECR*).

(continua)

	RECF1	RECF2	phaCF1				
<i>Ralstonia eutropha</i> H16 chromosome 1	TTCGAGAACGAGTACTTCCAGC	GTTCGAGTACAAGCGCGTGA	CCGACAAGGTGCACGCGCCCGCTG	CTGATGGTGGCCGCGTGCATC	ACAAGTACTACATCTGGACCT	GCAGCCGGAGAGCTCGCTGGTGGCCCA	791
<i>Cupriavidus taiwanensis</i> str. LMG19424	TTCGAGAACGAGTACTTCCAGC	GTTCGAGTACAAGCGCGTGA	CCGCCAAGGTCCATGCGCGCCCGCTG	CTGTTGGTGGCCGCGTGGATC	AACAAGTACTACATCTGGACCT	GCAGCCGGAAAAGCTCGCTGGTGGCCCA	803
<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	TTCGAAAACGAATCTTCCAGC	GTCTGCAATACAAGCGCGTGA	CGGACAAGGTCTATACGCGTCCGCTG	CTGCTGGTGGCCGCGTGGATC	AACAAGTCTACATCTTCGACCT	GCAGCCGGAAAGCTCGCTGGTGGCCCA	806
<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	TACGAGAACGAGTATTTCCAGC	TCTTGCAGTACAAGCCTCTGA	CCGACAAGGTCTACGAGCGCCCGCTG	CTGATGGTGGCCGCGTGGATC	AACAAGTCTACATCTTCGACCT	GCACCCCGAGAGCTCGCTGGTGGCTCA	1112
<i>Ralstonia pickettii</i> 12J	TTCGAGAACGACTACTTCCAGC	TATCCAGTACAAGCGCGTGA	CAGCCAAGGTGCATGCGCGCCCGCTG	CTGCTGGTGGCCGCGTGGATC	AACAAGTACTATATCTCGATCT	GCAGCCGGCAAATTCGCTCGTCCGCTA	815
<i>Ralstonia pickettii</i> 12D	TTCGAGAACGACTACTTCCAGC	TATCCAGTACAAGCGCGTGA	CAGCCAAGGTGCATGCGCGCCCGCTG	CTGCTGGTGGCCGCGTGGATC	AACAAGTACTACATCTCGATCT	GCAGCCGGCAAATTCGCTCGTCCGCTA	815
<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000	TTCGAGAACGACTACTTCCAGC	TATCCAGTACAAGCGCGTGA	CGGCCAAGGTGCATGCGCGCCCGCTG	CTGCTGGTGGCCGCGTGGATC	AACAAGTACTACATCTGGATCT	GCAGCCGGCCAACTCGCTGGTGGCTA	818
<i>Burkholderia ambifaria</i> MC40-6	TACGAGAACGACCTGATCCAGC	TATCCAGTATTCACCGAAGA	CGGACAAGGTGTTTCGAGCGGCCGCTG	CTGATCGTGGCCGCGTGGATC	AACAAGTCTACATCTCGATCT	GCAGCCGGAGAATTCGCTCGTCCGCTA	809
<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD	TACGAGAACGACCTGATCCAGC	TATCCAGTACTCGCGGAAGA	CGGACAAGGTGTTTCGAGCGGCCGCTG	CTGATCGTGGCCGCGTGGATC	AACAAGTCTACATCTCGACCT	GCAGCCGGAGAATTCGCTCGTCCGCTA	893
<i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424	TACGAGAACGACCTGATCCAGC	TATCCAGTACTCGCGGAAGA	CGGACAAGGTGTTTCGAGCGGCCGCTG	CTGATCGTGGCCGCGTGGATC	AACAAGTCTACATCTCGACCT	GCACCCGAGAATTCGCTCGTCCGCTA	884
<i>Burkholderia cenocepacia</i> AU 1054	TACGAGAACGACCTGATCCAGC	TATCCAGTACTCGCGGAAGA	CGGACAAGGTGTTTCGAGCGGCCGCTG	CTGATCGTGGCCGCGTGGATC	AACAAGTCTACATCTCGACCT	GCAGCCGGAGAATTCGCTCGTCCGCTA	884
<i>Burkholderia cenocepacia</i> MC0-3	TACGAGAACGACCTGATCCAGC	TATCCAGTACTCGCGGAAGA	CGGACAAGGTGTTTCGAGCGGCCGCTG	CTGATCGTGGCCGCGTGGATC	AACAAGTCTACATCTCGACCT	GCACCCGAGAATTCGCTCGTCCGCTA	884
<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	TACGAGAACGACCTGATCCAGC	TATCCAGTACTCGCGGAAGA	CGGACAAGGTGTTTCGAGCGGCCGCTG	CTGATCGTGGCCGCGTGGATC	AACAAGTCTACATCTCGACCT	GCAGCCGGAGAATTCGCTCGTCCGCTA	884
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4	TACGAGAACGACCTGATCCAGC	TATCCAGTACTCGCGGAAGA	CGGACAAGGTGTTTCGAGCGGCCGCTG	CTGATCGTGGCCGCGTGGATC	AACAAGTCTACATCTCGACCT	GCAGCCGGAGAATTCGCTCGTCCGCTA	893
<i>Burkholderia multivorans</i> ATCC 17616	TACGAGAACGACCTGATCCAGC	TATCCAGTACTCGCGGAAGA	CGGACAAGGTGTTTCGAGCGGCCGCTG	CTGATCGTGGCCGCGTGGATC	AACAAGTCTACATCTCGACCT	GCAGCCGGAGAATTCGCTCGTCCGCTA	884
<i>Burkholderia glumae</i> BGR1	TTCGAGAACGCGTGTGCAACT	GATCCAGTACAACCGGTC	CGCCGAGCGTCTACGAGCGGCCGCTG	CTGATCGTGGCCGCGTGGATC	AACAAGTCTACATCTCGATCT	GCAGCCGGAGAATTCGCTCGTCCGCTA	920
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	TTCGAAAACGAGTGTCCAGC	TATCCAGTACAAGCGCGTGA	CGCGACCGTGTGCGTGGAGCGGCCGCTG	CTCATCGTGGCCGCGTGGATC	AACAAGTCTACATCTCGATCT	GCACCCGGAGAATTCGCTGGTCCGCTA	815
<i>Delftia acidovorans</i> SPH-1	TTCGAGAACGAGTGTTCAGC	TATCGAATAACAAGCGCGTGA	CGGACAAGGTGCACGAGCGGCCCTTC	CTCATGGTGGCCGCGTGGATC	AACAAGTCTACATCTGGATCT	GCAGCCGCAACTTCGCTGATCCGCTA	800
<i>Comamonas testosteroni</i> CNB-2	TTCGAGAACGAGTGTTCAGC	TATCGAATAACAAGCGCGTGA	CTGCCAAGTATTCGAGAAACCTTTT	CTGATGGTGGCCGCGTGGATC	AACAAGTCTACATCTGGACTT	GCAGCCGGCAATTCGCTGATTCGCTA	821

	phaCR4	
<i>Ralstonia eutropha</i> H16 chromosome 1	TGGAACTACGTGGTTCGACAACCTACCT	GAAGGGCAACACGCCGCTGCGCTTCGACCTGCTGTTCTTGGAAACGGCGGACGC
<i>Cupriavidus taiwanensis</i> str. LMG19424	TGGAACTACGTGGTTCGACAACCTACCT	GAAGGGCAATACCCCGGTACCGTTCGACCTGCTGTTCTTGGAAATGGCGACGC
<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	TGGAACTACGTGGTTCGACAACCTACCT	GAAGGGCAACACGCCGCTGCGCTTCGACCTGCTGTTCTTGGAAACGGCGGACGC
<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	TGGAACTACGTGGTTCGACAACCTACCT	CAAGGGCAACACGCCGCGTTCGCTTCGACCTGTTGTTCTTGGAAATGGCGGACGC
<i>Ralstonia pickettii</i> 12J	TGGAACTACGTGGTTCGACAACCTACCT	GAAGGGCAAGACGCCCGCGCGTTCGACCTGCTGTACTGGAAACGGCGGATTC
<i>Ralstonia pickettii</i> 12D	TGGAACTACGTGGTTCGACAACCTACCT	GAAGGGCAAGACGCCCGCGCGTTCGACCTGCTGTACTGGAAACGGCGGATTC
<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000	TGGAACTACGTGGTTCGACAACCTACCT	GAAGGGCAAGACGCCCGCGCGTTCGACCTGCTGTACTGGAAACGGCGGATTC
<i>Burkholderia ambifaria</i> MC40-6	TGGAACTACGTGGTTCGACAACCTACCT	GAAGGGCCGACGCCCGCGCGTTCGACCTGCTGTACTGGAAACGGCGGACTC
<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD	TGGAACTACGTGGTTCGACAACCTACCT	GAAGGGCCGACGCCCGCGCGTTCGACCTGCTGTACTGGAAACGGCGGACTC
<i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424	TGGAACTACGTGGTTCGACAACCTACCT	GAAGGGCCGACGCCCGCGCGTTCGACCTGCTGTACTGGAAACGGCGGATTC
<i>Burkholderia cenocepacia</i> AU 1054	TGGAACTACGTGGTTCGACAACCTACCT	GAAGGGCCGACGCCCGCGCGTTCGACCTGCTGTACTGGAAACGGCGGATTC
<i>Burkholderia cenocepacia</i> MC0-3	TGGAACTACGTGGTTCGACAACCTACCT	GAAGGGCCGACGCCCGCGCGTTCGACCTGCTGTACTGGAAACGGCGGATTC
<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	TGGAACTACGTGGTTCGACAACCTACCT	GAAGGGCCGACGCCCGCGCGTTCGACCTGCTGTACTGGAAACGGCGGATTC
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4	TGGAACTACGTGGTTCGACAACCTACCT	GAAGGGCCGACGCCCGCGCGTTCGACCTGCTGTACTGGAAACGGCGGACTC
<i>Burkholderia multivorans</i> ATCC 17616	TGGAACTACGTGGTTCGACAACCTACCT	GAAGGGCCGACGCCCGCGCGTTCGACCTGCTGTACTGGAAACGGCGGATTC
<i>Burkholderia glumae</i> BGR1	TGGAACTACGTGGTTCGACAACCTACCT	GAAGGGCCGACGCCCGCGCGTTCGACCTGCTGTACTGGAAACGGCGGACTC
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	TGGAACTACGTGGTTCGACAACCTACCT	CAAAGGGGTCACGCCGCGTTCGACCTGCTGTACTGGAAACGGCGGACTC
<i>Delftia acidovorans</i> SPH-1	TGGAACTACGTGGTTCGACAACCTACCT	CAAGGGCCGACGCCCGCGCGTTCGACCTGCTGTACTGGAAACGGCGGACTC
<i>Comamonas testosteroni</i> CNB-2	TGGAACTACGTGGTTCGACAACCTACCT	CAAGGGCCGACGCCCGCGCGTTCGACCTGCTGTACTGGAAACGGCGGACTC

ANEXO F. Dados do ensaio em fermentador com o isolado RMP1058BII em glicose.

Tempo (h)	V reator (mL)	Xt (g/L)	Ln (MSC)	PHA (%MSC)	PHB (%MSC)	PHAmcl (%MSC)	PHA (g/L)	P3HB (g/L)	PHAmcl (g/L)	Xr (g/L)	Alimentação (g)	Alimentação (mL)	Glicose (g/L)	NH4+ (g/L)
0	2494	0,41	-0,89	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,41	62,6	73,82	13,83	0,56
1	2454	0,76	-0,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,76			14,29	0,54
4	2380	0,65	-0,43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,65			14,19	0,56
6	2333	0,98	-0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,98			14,02	0,56
8	2280	1,40	0,34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	1,40			13,46	0,54
10	2230	0,88	-0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,88			13,86	0,56
11	2205	1,05	0,05	0,36	0,00	0,36	0,00	0,00	0,0	1,05			13,38	0,58
15	2180	1,14	0,13	1,06	0,00	1,06	0,01	0,00	0,0	1,13			12,64	0,51
18	2157	1,25	0,22	1,09	0,00	1,09	0,01	0,00	0,0	1,24			11,56	0,51
20	2133	1,41	0,34	1,05	0,00	1,05	0,01	0,00	0,0	1,40			11,94	0,49
22	2113	1,61	0,48	1,07	0,00	1,07	0,02	0,00	0,0	1,59			11,13	0,50
24	2091	1,85	0,62	1,30	0,00	1,30	0,02	0,00	0,0	1,83			11,12	0,45
27	2064	2,20	0,79	1,51	0,00	1,51	0,03	0,00	0,0	2,17			10,15	0,47
31	2039	2,53	0,93	1,31	0,00	1,31	0,03	0,00	0,0	2,50			8,84	0,40
34	2010	2,75	1,01	1,45	0,00	1,45	0,04	0,00	0,0	2,71			7,61	0,39
36	1972	3,32	1,20	1,75	0,00	1,75	0,06	0,00	0,1	3,26			6,12	0,39
40	1947	3,89	1,36	2,08	0,00	2,08	0,08	0,00	0,1	3,81			4,19	0,35
44	1925	4,89	1,59	1,85	0,00	1,85	0,09	0,00	0,1	4,80	62,6	73,82	1,91	0,31
48	1865	5,68	1,74	1,96	0,00	1,96	0,11	0,00	0,1	5,57			14,14	0,26
52	1841	6,66	1,90	2,08	0,00	2,08	0,14	0,00	0,1	6,52			9,75	0,19
56	1818	7,38	2,00	2,20	0,00	2,20	0,16	0,00	0,2	7,22			4,97	0,15
61	1796	6,89	1,93	2,03	0,00	2,03	0,14	0,00	0,1	6,75			10,28	0,09
64	1775	8,51	2,14	2,87	0,03	2,84	0,24	0,00	0,2	8,27			5,66	0,01
68	1753	9,79	2,28	3,20	0,12	3,08	0,31	0,01	0,3	9,48	62,7	73,94	2,95	0,00
72	1731	10,14	2,32	4,50	0,23	4,27	0,46	0,02	0,4	9,68			14,82	0,00
88	1708	11,58	2,45	17,10	0,39	16,71	1,98	0,05	1,9	9,60	62,6	73,82	0,53	0,00
96	1683	12,50	2,72	20,04	0,58	19,46	2,60	0,09	3,0	9,00			0,32	0,00