

## Comparação de técnicas de coloração com o Preto de Sudão para seleção de microrganismos produtores de polihidroxicanoatos.

Amanda Lys S. Silva (PG)<sup>1</sup>; Ítalo Almeida P. dos Santos\* (IC)<sup>1</sup>; Ana Maria Queijeiro Lopez (PQ)<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Alagoas, \*[italo.almeida@live.com](mailto:italo.almeida@live.com)

Palavras Chave: *bioplástico, Sudan Black, Azocorante.*

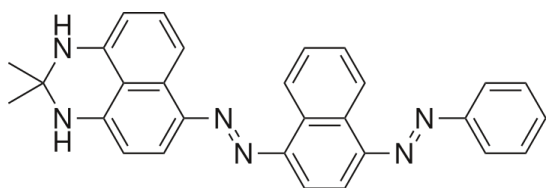
### Introdução

Os plásticos sintéticos são materiais utilizados em diversas atividades humanas e, ao serem descartados no meio ambiente, causam preocupação por serem recalcitrantes e acumularem-se no ambiente. A pesquisa de materiais ecológicos para substituir os plásticos convencionais, têm gerado diferentes plásticos biodegradáveis, quer por incorporação de polímeros naturais nos convencionais, por síntese química, por isolamento e extração a partir de seres vivos dos diferentes ecossistemas, ou por fermentação microbiana. Dentre esses materiais, destacam-se os polihidroxicanoatos (PHA's) 100% biodegradáveis e sintetizados por bactérias e armazenados em suas inclusões citoplasmáticas.

Usualmente, a detecção de bactérias produtoras de PHA's ocorre pela coloração do grânulo por corantes lipofílicos como o Preto de Sudão (2,2-dimetil-1,3-dihidroperimidin-6-il)-(4-fenilazo-1-naftil) diazeno). Este trabalho visou comparar duas metodologias de coloração com Preto de Sudão para selecionar bactérias produtoras de PHA's.

### Resultados e Discussão

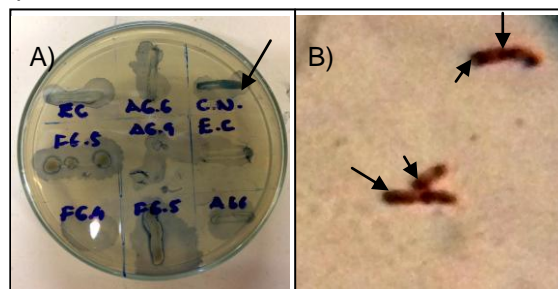
Da bacterioteca do Laboratório de Bioquímica do Parasitismo e Microbiologia Ambiental (LBPMA-UFAL), foram selecionados 22 microrganismos oriundos de diferentes tipos de solo ou lodo de lagoas de tratamento de efluentes agrícolas, capazes de crescer em meio líquido mínimo contendo glicose como única fonte de carbono. Como apenas o crescimento (turbidez) nesse meio não é suficiente para comprovar a síntese de PHAs, comparou-se dois métodos utilizando coloração com Preto de Sudão (**Figura 1**): a reação macroscópica<sup>1</sup> da colônias das bactérias em culturas sólidas, conferindo cor negro azulada, e a reação microscópica<sup>2</sup> de esfregaços de células.



**Figura 1.** Estrutura do Preto de Sudão.

Para isso, as bactérias foram cultivadas em ágar nutriente por 24 h a 28±2°C, e, então, inoculadas em meio mínimo sólido, limitado em nitrogênio, a fim de favorecer a produção dos PHAs. Após 72 h de incubação a 25±2°C, procedeu-se os dois tipos de coloração e observou-se o resultado diretamente ou sob microscopia óptica (aumento 1600 X)

Na metodologia macroscópica, 10 isolados apresentaram resultado positivo em relação à produção do bioplástico (**Figura 2A**), e destes, apenas 5 apresentaram resultado positivo para PHAs na coloração microscópica (**Figura 2B**).. Alguns autores já reportaram inconsistência de resultados quando os microrganismos são corados com preto de Sudão e outros corantes<sup>1</sup>.



**Figura 2.** A) Avaliação macroscópica do acúmulo de PHAs-Preto de Sudão (a seta indica a colônia de *Cupriavidus necator*, controle positivo do experimento). B) Detecção microscópica dos grânulos (setas) de PHA do isolado bacteriano D6.2 corados com Preto de Sudão, e contracorados com Safranina (aumento de 1000X, objetiva de imersão).

### Conclusões

- Dentre as 22 bactérias testadas, 5 responderam positivamente aos dois testes de seleção de produção de PHAs, de modo que estas serão submetidas ao processo de síntese, extração, purificação e identificação dessas substâncias.
- Não é conveniente que se utilize apenas uma das metodologias de coloração com o Preto de Sudão, visto que ambas apresentam respostas cumulativas, podendo ser ou não detectadas.

### Agradecimentos

A UFAL e CAPES pelas bolsas concedidas.

<sup>1</sup>LEGAT, A. et al. Identification of polyhydroxyalkanoates in Halococcus and other haloarchaeal species. Springerlink, v. 87, p 1119-1127, 2010.

<sup>2</sup>REHMAN S. et. al. Characterization and optimization of antibiotic resistant bacterial strain for polyhydroxyalkanoates (PHAS) production. Pakistan, v. 19, No 4, 2006.