

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS COM POTENCIAL PARA USO BIOTECNOLÓGICO

Rejane Rodrigues de Sousa*

RESUMO: *A capacidade de os microrganismos degradarem compostos orgânicos é cientificamente reconhecida e utilizada em processos industriais e de tratamento biológico de efluentes líquidos e resíduos sólidos. Este trabalho teve como finalidade isolar e caracterizar microrganismos a partir de amostras de sedimentos de regiões costeiras de São Francisco do Conde – BA, ambientes extremófilos (com alta concentração de metais, sais, extremos de pH, etc.). Os meios de cultura utilizados foram idênticos a outros descritos na literatura. No caso de condições extremas de pH, os meios foram adaptados para atender às mesmas. A caracterização destes microrganismos foi realizada a partir do crescimento em meio de cultura, medida do tamanho da colônia e produção de halo. Foi isolado um fungo que cresceu em diferentes condições de temperatura e pH, com formação do halo ao redor da colônia, indicando produção enzimática. O fungo isolado degradou tanto a xilana quanto a celulose quando submetido a estes substratos, demonstrando que este microrganismo é capaz de produzir xilanases e celulases, enzimas com aplicação industrial. Estas características são importantes, pois nas produções industriais existem oscilações de pH e temperatura. Um microrganismo que se adapta a estas diferentes condições pode ser facilmente inserido nos processos de produção. O comportamento deste fungo também desperta interesse na área ambiental e biotecnológico para uso em diferentes processos industriais ou de biorremediação, entretanto faz-se necessário considerar que os testes para sua aplicabilidade final não são conclusivos.*

Palavras-chave: Microrganismos extremófilos; Biotecnologia; Biorremediação

1. INTRODUÇÃO

Vários microrganismos têm demonstrado produzir enzimas capazes de hidrolisar eficientemente substratos lignocelulósicos, sendo este processo de hidrólise de grande interesse biotecnológico para uso em diferentes indústrias. A obtenção dessas enzimas foi conseguida através de extração a partir do meio de cultura onde o microrganismo cresce.

No início dos anos 50, foram publicados estudos sobre celulase, enzima produzida por fungos e bactérias que podem decompor celulose em glicose, visando o enorme potencial de conversão de materiais lignocelulíticos em glicose e outros açúcares (COUGH, 1985; BHAT, 2000). Após estas pesquisas, foi mostrado que a bioconversão eficiente de lignocelulose a açúcares solúveis por enzimas era um processo difícil e pouco econômico (COUGH, 1985; BHAT, 2000). Porém, com o avanço das pesquisas básicas e aplicadas sobre estas enzimas, principalmente as de origem microbiana, foram verificando o enorme potencial destes catalisadores em vários processos industriais. Atualmente tais enzimas têm sido usadas nas indústrias alimentícia, têxtil, de produção de detergentes, vinho, polpa e papel, cerveja, alimentos para animais; na agricultura, aproveitamento de resíduos agro-industriais, além de uso em

* Graduanda em Ciências Biológicas da UCSal; Estagiária de Iniciação Científica – CEPEX – LEMA/UCSal; alineproenca@ig.com.br. Orientador: Eduardo Aquino Ximenes, Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Molecular). Co-orientadora: Luzimar Gonzaga Fernandez, Doutora em Biologia Molecular Estrutural pela UPC, Barcelona, Espanha; Coordenadora e Pesquisadora do LEMA/UCSal; Professora do ICS-UFBA; luzimar@ucsal.br. Apoio Financeiro: FAPESB.

pesquisas (BAYER *et al.*, 1994; BASJPAI, 1999; BHAT, 2000). Desta forma, a demanda por celulases e outras enzimas hidrolíticas vem crescendo rapidamente.

Celulose é a mais abundante fonte de carboidratos de origem vegetal, polissacarídeo constituído por unidades de glicose que forma a parte principal das paredes das células das plantas; ocorre naturalmente em produtos fibrosos como o algodão; é matéria-prima de muitos produtos manufaturados como papel e celofane (1). As enzimas envolvidas na degradação de celulose consistem principalmente de 1,4- β -D-glucana glucanohidrolase (EC 3.2.1.4, endoglucanase) e 1,4- β -D-glucana celobiohidrolase (EC 3.2.1.91, celobiohidrolase) (HENRISSAT *et al.*, 1989).

O seu uso para fins biotecnológicos tem sido verificado em diferentes aplicações industriais. Assim nas indústrias de detergentes, têxteis e de remoção de tintas, há uma demanda por celulases que removam porções específicas. Já no caso das indústrias de alimentação animal, se faz desejável o uso de enzimas que hidrolisem de forma mais completa a celulose e, de forma geral, material de origem vegetal a açúcares que possam ser mais facilmente digeridos. Uma demanda importante por celulases mais eficientes se faz fortemente presente para a hidrólise de celulose à glicose, em processos de conversão de biomassa a combustíveis alternativos e outros produtos químicos (LJUNGDAHL *et al.*, 1999; SCHWARZ, 2001).

As hemicelulases polissacarídeos, presentes também em grande quantidade na parede celular de plantas, vêm sendo testadas quanto ao seu potencial de uso em diferentes processos industriais. Por exemplo, as xilanases que são enzimas chaves na degradação de xilana, que é o principal tipo de hemicelulose e o maior polissacarídeo hemicelulósico presente na parede celular das plantas, é, portanto, a mais abundante fonte de carbono presente na madeira e nos resíduos agrícolas (2). As xilanases têm sido empregadas no pré-tratamento de polpa de celulose durante a produção de papel (FILHO, 1998; KULKARNI *et al.*, 1999). Polpas de celulose tratadas com estas enzimas apresentam uma diminuição na quantidade de hemicelulose contaminante, o que caracteriza a obtenção de uma polpa mais pura e, conseqüentemente, mais branca, com redução no consumo de compostos poluentes durante o processo (YANG & ERIKSSON, 1992; CHRISTOV & PRIOR, 1996). Xilanases são também utilizadas nas indústrias de alimentos (YANG *et al.*, 1989; HESPELL & WHITEHEAD, 1990; BHAT, 2000) e, além disso, tem-se destacado o potencial dessas enzimas no processamento de materiais lignocelulósicos para a produção de combustíveis líquidos e de reagentes (KULKARNI *et al.*, 1999). A conversão enzimática de xilana a seus componentes requer a participação de várias enzimas, incluindo, xilanases, β -xilosidades, α -L-arabinofuranosidasas, α -glucuronidasas, acetil xilana esterases e *p*-cumaroil e *p*-feruloil esterases (LI & LJUNGDAHL, 1994).

Os microrganismos encontram ainda grande potencial de aplicação em processos de biorremediação. A biorremediação surgiu como uma alternativa de remediação de locais impactados com poluentes orgânicos e se baseia na utilização de populações microbianas que possuem a habilidade de metabolizar determinados poluentes. A capacidade de microrganismos de degradar compostos orgânicos é cientificamente reconhecida e vem sendo utilizada ao longo do tempo em processos de tratamento biológico de efluentes líquidos e resíduos sólidos. Graças a essa habilidade, têm sido desenvolvidos processos biotecnológicos destinados a diversas finalidades, dentre as quais destaca-se degradação de poluentes, lixiviação de minerais, a desobstrução de poços de petróleo e a recuperação de locais contaminados – solos, águas superficiais e subterrâneas. Tais microrganismos podem ser encontrados no próprio ambiente impactado, sendo, na maioria das vezes, os responsáveis pelo desaparecimento dos contaminantes (2). Os fungos são considerados mais eficientes sob condições adversas: solos com valores extremos de pH, temperatura, limitação de nutrientes e com baixo teor de umidade. Um microrganismo que se adapta a estas diferentes condições pode ser facilmente inserido no processo de produção.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como finalidade isolar e caracterizar microrganismos a partir de amostras de sedimentos de regiões costeiras de São Francisco do Conde – BA, a fim de verificar o potencial biotecnológico destes organismos de ambientes extremófilos no que se refere ao crescimento em diferentes faixas de pH e temperatura.

3. METODOLOGIA

Foi realizada a coleta na região de São Francisco do Conde-BA em ambientes considerados extremófilos (com alta concentração de metais, sais, extremos de pH, etc.). Os microrganismos provenientes do material coletado foram isolados e selecionados a fim de obter organismos resistentes a condições ambientais extremas. Os meios de cultura utilizados foram idênticos a outros descritos por XIMENES (1994). No caso de condições extremas de temperatura, os meios foram adaptados para atender às mesmas. As colônias obtidas foram repicadas várias vezes.

Os microrganismos foram cultivados em meio sólido, contendo glicose como única fonte de carbono (0,5%), para a avaliação da faixa de temperatura ideal para crescimento e caracterização fisiológica. O mesmo procedimento foi utilizado para avaliar a capacidade de degradação de dos substratos, celulose e xilana, porém os meios de cultura foram preparados, contendo 0,5% de tais substratos como única fonte de carbono. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, permanecendo em estufa por 72 horas. A produção enzimática foi avaliada após adição do corante vermelho congo e formação ou não de halo.

4. RESULTADOS

O crescimento do microrganismo isolado foi avaliado em diferentes temperaturas (tabela 1). Os halos formados foram medidos em centímetro através do diâmetro da colônia. Os microrganismos isolados foram identificados com números (1, 2, 3, 4 e 5). O isolado 1 não cresceu a temperatura de 40°C, porém teve um grande crescimento à 50°C (5,3 cm). Os isolados 2 e 3 não se desenvolveram a 60°C, porém a 40°C tiveram uma pequena diferença entre eles em termos de tamanho da colônia (apenas 0,1 cm).

Tabela 1 - Avaliação do crescimento dos microrganismos isolados a 40°C, 50°C e 60°C. Os valores correspondem ao diâmetro da colônia em centímetro.

ISOLADO	Diâmetro da colônia (cm)		
	Temperatura		
	40°C	50°C	60°C
1	-	5,30	1,80
2	0,60	-	-
3	0,70	0,70	-
4	0,55	0,50	-
5	0,80	0,40	-

O isolado 2 cresceu com diâmetro da colônia correspondente a 0,6 cm e o isolado 3 com 0,7 cm nesta temperatura. A temperatura 50°C não foi apropriada para isolado 2, enquanto o isolado 3 apresentou o mesmo resultado nas temperaturas de 40°C e 50°C (0,7 cm). Quanto ao isolado 4, verificou-se valores próximos no que diz respeito ao desenvolvimento da colônia nas temperaturas 40°C e 50°C. O isolado 5 demonstrou maior afinidade à temperatura de 40°C, em comparação com as demais temperaturas analisadas. Nesta temperatura, a colônia atingiu 0,8 cm de diâmetro, já a 50°C, houve um decréscimo de 0,4 cm no tamanho do diâmetro do halo. Apenas o isolado 1 obteve resultado positivo (1,8 cm) a 60°C.

Os resultados referentes ao substrato utilizado nos meios de cultura (tabela 2) demonstram que o desenvolvimento é diretamente proporcional à degradação do substrato. Os isolados 1 e 4 degradaram tanto xilana quanto celulose e formaram halos (figura 1), portanto são capazes de produzir xilanases e celulases. Já os isolados 2 e 3 degradaram a celulose, mas não foram capazes de catabolizar o substrato xilana. O oposto ocorreu com o isolado 5 que degradou a xilana e não degradou a celulose.

Tabela 2 - Resultado do comportamento dos isolados em meios de cultura contendo os substratos xilana e celulose.

ISOLADO	SUBSTRATO	
	XILANA	CELULOSE
1	Degradou	Degradou
2	Não degradou	Degradou
3	Não degradou	Degradou
4	Degradou	Degradou
5	Degradou	Não degradou

Esta capacidade de degradação diferenciada de xilana e celulose e também de desenvolvimento em diferentes temperaturas é uma importante característica, pois as produções industriais em geral envolvem várias etapas nas quais há oscilação de pH e temperatura e de substratos. Um microrganismo que se adapta a estas diferentes condições pode ser facilmente inserido nos processos de produção.



Figura 1 - Placa com Isolado 4 em meio de cultura contendo celulose. A formação do halo ao redor da colônia indica produção enzimática.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os isolados submetidos aos testes de degradação de xilana e celulose obtiveram resultado positivo pelo menos em um desses substratos. Isto mostra que estes microrganismos são capazes de produzir xilanases e celulasas. Enzimas que podem ter aplicação industrial e biotecnológica.

O comportamento destes isolados também desperta interesse na área ambiental. A sua ampla capacidade adaptativa a diferentes temperaturas e substratos permite a inserção destes seres em ambientes extremófilos para biodegradação. Faz-se necessário alertar os testes realizados para sua aplicabilidade final não são conclusivos.

6. REFERÊNCIAS

MACEDO, R. C.; BERBERT, V.H.C.; LEMOS, J.L.S.; TRINDADE P.V.O.; RIZZO, A.C.L. **Biorremediação de Solos Impactados por Óleo Cru Utilizando Fungos Filamentosos**, 2002.

RIFAI, H. S. and FIORENZA, S. **Review of MTBE Biodegradation and Biorremediation**.

XIMENES, E. A., C. J. ULHOA, and C. R. FELIX. 1994. **Production of Cellulases by *Aspergillus fumigatus* Fresenius and Characterization of One Beta-Glucosidase**. *Current Microbiology* 32:119-123.

COUGHLAN M. P. 1985. **Cellulases production, properties and applications**. *Biochem. Soc. Trans.* 13: 405-6.

BAYER, E. A., E. morag, and R. Lamed. 1994. **The cellulosome – a treasure trove for biotechnology**. *Trends Biotechnol.* 12:379-386.

HENRISSAT, B, H. DRIGUEZ, C. VIET, AND M. SCHULEIN. 1985. **Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose**. *Biotechnology* 3: 722-726.

LJUNGDAHL, L. G., D. L. BLUM, H. Z. CHEN, Y. HE, I. KATAEVA, X. -L. LI, E. A. XIMENES. 1999. **The cellulose/hemicellulose system of the anaerobic fungus *Orpinomyces* and aspects of further cellulose research**. In: Genetics, Biochemistry and Ecology of cellulose degradation, Ohmyia, K., K. Hayashi, K. Skka, Y. Kobayashi, S. Sarita, and T. Kimiura (eds), *Mie Bioforum* 98, Uni Plubischers Co., Ltd, Tokyo, Japan, pp 495-506.

FILHO, E. X. F. 1998. **Hemicellulases and biotechnology**, p.165-176. In: S.G. Pandalai(ed.), *Recent research developments in microbiology*. Research Signpost. Trivarium, India.



KULKARNI, N., A. SHENDYE, AND M. RAO. 1999. **Molecular and biotechnological aspects of xylanases.** FEMS Microbiol. Rev. 23:318-324.

YANG, J. L., Eriksson.1992. **The impact of xylanase on bleaching of kraft pulps.** TAPPI J.12:95-101.

YANG, R. C. A., C. R. MCKENZIE, D. BILOUS, AND S.A. NARANG. 1989. **Hyperexpression of Bacillus circulans Xylanase gene in Escherichia coli and characterization of the gene product.** Appl. Environ.Microbiol.55:1192-1195.

KULKARNI, N., A. SENDYE, AND M. RAO. 1999. **Molecular and biotechnological aspects of xylanases.** FEMS Microbiol. Ver. 23:318-324. et al.,1999).

LI, X.-L., AND L. G. LJUNGDAHL.1994. **Cloning, sequencing, and regulation of a xylanase gene from the fungus A ureobasidium p ullulans Y- 2311-1.** A ppl. E nviron. Microbiol. 60: 3160-3166.

(1) Glossário de Energia / CTEEP – Estante Virtual

Disponível em <http://www.cteep.com.br/informacoes/centro_inf_ref/glossario/glossario_energ/glossario_c.htm>. Acesso em: 12 de maio de 2004.

(2) Caracterização bioquímica das enzimas do complexo xilanolítico de Scutalidium tbermophilum. USP/SIBi - DEDALUS

Disponível em <<http://dedalus.usp.br:4500/ALEPH/POR/USP/USP/TES/FULL/1212341>>.

Acesso em 12 de maio de 2004.