

AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE CELULOSE A PARTIR DE AÇÃO BACTERIANA

CAMILA RIOS PIECHA¹; YOHANA MELANIA LÓPEZ HERNÁNDEZ²; JEAN DE OLIVEIRA LOUZADA³; LURIAN PORTO PERES⁴ ANELISE VICENTINI KUSS⁵

¹*Universidade Federal de Pelotas – camilapiecha@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – yohanalopez6@gmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas-masonja.jl@gmail.com*

⁴*Universidade Federal de Pelotas- lurianporto@gmail.com*

⁵*Universidade Federal de Pelotas – anelisevk@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

Dentre os grupos de micro-organismos, as bactérias degradadoras de celulose apresentam uma grande importância e um alto diferencial quanto ao seu papel na natureza para degradar a matéria orgânica, considerando que as condições e características físicas, químicas, biológicas, bioquímicas e ecológicas, variam para cada espécie de acordo com seu lugar de origem. (HERNÁNDEZ, 2016)

A base metodológica para estudar a utilização de celulose microbiana é considerada em relação à quantificação de células e enzimas na presença de substratos sólidos, na descrição quantitativa de hidrólise da celulose em relação às enzimas, às taxas de hidrólise enzimática, utilização bioenergética da celulose microbiana, estudos cinéticos na utilização de celulose microbiana em comparação à cinética de substratos solúveis (SALAMONE, 2011)

As enzimas utilizadas para a degradação da celulose possuem um amplo mercado industrial, desde o uso na indústria de papel reciclado, bem como para a produção de vinagres e chás na indústria alimentícia, produção de bioetanol, biodiesel e biomassa na indústria energética, enzimas para limpeza de superfícies na indústria de produtos de limpeza e até mesmo na área de inovações tecnológicas, como na biomedicina, onde estas são estudadas para a produção de scafolds para vasos sanguíneos artificiais (KLEMM et al., 2001), recuperação de ferimentos e queimaduras (CIECHAŃSKA, 2004) biomaterial para córnea (WANG et al., 2010) entre outras diversas aplicações.

Assim, este estudo visa isolar novas bactérias degradadoras de celulose, a partir de testes de degradação, utilizando metodologia do papel filtro padronizado e da formação de halos de consumo em meios de cultura contendo carboximetilcelulase (CMC). Os resultados permitem inferir a potencialidade de cada isolado para a produção de enzimas como Endo β -endoglucanases, Exo β -glucanases e β -glucosidases, as quais são responsáveis pela quebra da celulose em seus monômeros, verificando assim, bactérias que possuam uma maior capacidade degradativa e uma maior produção destas enzimas.

2. METODOLOGIA

As amostras de solo foram coletadas em dois ecossistemas distintos: em fragmento da floresta amazônica, na cidade de Belém do Pará (Estado de Pará), e em agroecossistemas familiares sob o sistema de integração Lavoura-Pecuária e de campo aberto rural em Arroio do Padre e Canguçu (Estado de Rio Grande do Sul). Os isolados promissores para degradação de celulose foram BC1, BC2, BC9

e BC10(Canguçu), BC3, BC4, BC5, BC7 (Floresta Amazônica) e BC6 e BC8 (Arroio do Padre).

As amostras foram coletadas utilizando pá de corte em uma camada de aproximadamente 0,00-0,20cm de profundidade. Posteriormente, elas foram condicionadas em sacos plásticos e levadas para o Laboratório de Microbiologia Ambiental, do Instituto de Biologia da UFPEL. A partir das amostras coletadas obtiveram-se 10 isolados, os quais foram analisados quanto a sua capacidade de degradar a celulose analisada a partir de dois testes. O da degradação de papel filtro e o da degradação de carboximetilcelulase (CMC) em placas.

Para o teste de degradação do papel filtro os isolados foram padronizados em 10^8 UFC ml⁻¹, sob densidade ótica de OD600, incubados a 37°C sob agitação de 100rpm em meio mineral. Aos tubos foram adicionados pedaços de papel filtro Whatman Nº 1, padronizados no tamanho de 1x6cm e 12,5mg de peso seco. O controle negativo consistiu de solução salina a 0,8% como inoculo. Após 10 dias de incubação os papeis filtro foram pesados e comparados com seu peso seco inicial, verificando assim a capacidade de cada isolado para degradar o polímero de celulose. (GUPTA, 2012).

O teste de degradação em meio sólido foi realizado em placas contendo o meio Luria-Bertani acrescido de 0,2%de CMC e incubado a 30°C por três dias. Após este período as placas foram mergulhadas em uma solução reveladora de lugol (1 mg mL⁻¹) por 3 minutos. Observou-se um halo de degradação nas placas contendo isolados com capacidade de degradar celulose. (REINHOLD-HUREK et al., 1993).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o teste de degradação do papel filtro, apenas o isolado,BC5, apresentou diferença significativa em relação ao controle. A porcentagem de degradação de BC5 foi de 10,71 % como é possível visualizar na Tabela 1.

Tabela 1
Porcentagem de degradação do papel filtro(peso seco) para cada isolado.

Bactéria	Degradação (%)
BC1	3,6 ns
BC2	3,6 ns
BC3	0 ns
BC4	7,14 ns
BC5	10,71*
BC6	7,15 ns
BC7	3,6 ns
BC8	0 ns
BC9	0 ns
BC10	0 ns

ns Sem significância comparado com o controle e * com significância, teste de Tuckey com $p \leq 0,05$.

Quanto ao teste de degradação em meio sólido foi calculado o diâmetro da colônia e do halo de degradação da CMC nas placas. O isolado BC6 apresentou o maior diâmetro de colônia 6,55mm, seguido do isolado BC9 com 2,45mm. E

para o halo de degradação o isolado com melhor diâmetro foi também o isolado BC6, o qual atingiu 7,85mm.

Foi realizada, também, a estimativa da produção de enzima extracelular no meio sólido a partir de uma relação entre o diâmetro da colônia e o halo de degradação, a partir do seguinte cálculo: Diâmetro da colônia + Halo de degradação/ Diâmetro da colônia.

Tabela 2

Estimativa do diâmetro das colônias, halos de degradação do CMC e índice enzimático de cada isolado.

Bactéria	Diâmetro da colônia (mm)	Diâmetro do Halo (mm)	Índice enzimático (IE)
BC1	0,65±0,12 ^{1/}	1,55±0,10	3,55±0,33
BC2	0,97±0,35	3,35±0,25	5,33±0,90
BC3	1,87±0,08	4,10±0,04	3,20±0,08
BC4	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
BC5	1,75±0,18	3,80±0,08	3,25±0,25
BC6	6,55±0,16	7,85±0,09	2,20±0,03
BC7	1,80±0,40	4,25±0,25	3,68±0,48
BC8	1,62±0,02	3,92±0,02	3,42±0,04
BC9	2,45±0,14	4,42±0,05	2,82±0,10
BC10	1,55±0,28	3,35±0,43	3,23±0,12

^{1/} Average (±standard error), teste de Tukey com p≤0,05 e Dunnett test p ≤ 0,05.

4. CONCLUSÕES

Com este estudo foi possível isolar bactérias de diferentes lugares do país e verificar a diferença metabólica para a produção enzimática. Para o teste de degradação em papel filtro o isolado BC5 apresentou o melhor resultado, com 10,71% a mais em comparação ao controle. No teste de degradação do CMC em meio sólido, para a formação de colônias e diâmetro do halo o melhor isolado foi o BC6 com 6,55mm e 7,85mm respectivamente. Assim, depois de estudos mais aprofundados nestes isolados, espera-se o melhoramento de suas condições de produção enzimática, seja de forma molecular ou otimização de características físico-químicas como temperatura, ph e afins; aumentando sua produção e possível interesse e competitividade nas diversas indústrias da área.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HERNÁNDEZ, Y.M.L. **Bioprospecção de micro-organismos do solo degradadores de celulose.** 2016. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) – Curso de pós graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas.

SALAMONE, I. E. Microorganismos del suelo y sustentabilidad de los agroecosistemas. **Revista Argentina de Microbiología** v43, p1-3, 2011.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. Bacterial synthesized cellulose artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, v. 26, n. 9, 1561-1603, 2001.

CIECHAŃSKA, D. Multifunctional Bacterial Cellulose/Chitosan Composite Materials for Medical Applications. **Fibres & Textiles in Eastern Europe**, v. 12, n. 4, 48, 2004.

WANG, C.; WANG, C.; CEN, L.; YIN, S.; LIU, Q.; LIU, W.; CAO, Y.; CUI L . A small diameter elastic blood vessel wall prepared under pulsatile conditions from polyglycolic acid mesh and smooth muscle cells differentiated from adipose-derived stem cells. **Biomaterials**, v. 31, n. 4, 621-630, 2010.

GUPTA, PK.. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. **International journal of microbiology**, 1-5.2012.

REINHOLD-HUREK, B. Cloning, expression in *escherichia coli* and characterization of cellulolytic enzymes *azoarcus* sp. A rootin-vading diazotroph. **Journal of bacteriology**, 175, 52 pp.7056-7065. 1993.