



ENEPEX

ENCONTRO DE ENSINO,
PESQUISA E EXTENSÃO

8° ENEPE UFGD • 5° EPEX UEMS

ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS A PARTIR DO PROCESSO DE COMPOSTAGEM DE LIXO ORGÂNICO DOMÉSTICO

Letícia Kleinhans Pinheiro¹; Ludmila Vilela Rezende¹; Danielle Marques Vilela²

UFGD/FCBA. Rodovia Itahum, km 12 – Caixa Postal 533 – CEP: 798.804-970. Dourados-MS. E-mail:
leticiakpinheiro@hotmail.com

¹ Acadêmica de Biotecnologia pela FCBA/UFGD, aluna PIVIC/UFGD; ² Professora adjunta II da
FCBA/UFGD, Orientadora do Projeto de Pesquisa.

RESUMO

A compostagem tem como finalidade a degradação de resíduos orgânicos derivados de lixo, que tem como produto final o composto orgânico, que utilizado corretamente no solo traz vários benefícios, como aprimoramento de suas características físico-químicas e biológicas. A produção é muito viável, além de reduzir os impactos ambientais que esses resíduos provocariam no meio ambiente. Durante o processo de compostagem ocorre o crescimento e desenvolvimento de uma diversidade de micro-organismos, os quais ainda são pouco estudados e explorados. Estes micro-organismos são determinados em grande parte por sua capacidade de secreção de enzimas extracelulares, dentre elas as pectinases e celulasas. Este trabalho teve como objetivo a bioprospecção de micro-organismos com potencial biotecnológico para a produção de pectinases e celulasas, a partir do processo de compostagem de resíduos orgânicos provenientes de lixo doméstico. Foram coletadas duas amostras compostas durante o processo de compostagem de resíduos orgânicos em um restaurante na cidade de Dourados-MS. As amostras foram submetidas a diluições seriadas e plaqueadas em meio YEPG, sendo incubadas a 37°C por 24 e 48h. Após purificação dos isolados obtidos, os mesmos foram classificados em Gram-positivos e Gram-negativos através da técnica de coloração de Gram. Todos os isolados foram testados qualitativamente

quanto à produção de pectinases e celulases. Foram obtidos 37 isolados bacterianos e apenas um isolado leveduriforme. Dentre os isolados bacterianos, 22 foram classificados como Gram-negativos e 15 como Gram-positivos, incluindo diferentes formas celulares, sendo que 11 isolados apresentaram formas de bacilos Gram-positivos e 4 de cocos Gram-positivos, enquanto 2 apresentaram formas de bacilos Gram-negativos e 20 de cocos Gram-negativos. Todos os trinta e oito isolados apresentaram resultados positivos nos testes qualitativos para a produção de pectinases, representando portanto, potenciais secretores dessas enzimas de grande interesse biotecnológico. Entretanto, nos testes qualitativos para a produção de celulases todos os isolados apresentaram resultados negativos.

Palavras-chave: Microbiota, Lixo Orgânico, Fermentação.

INTRODUÇÃO

A compostagem é um processo natural de decomposição biológica de resíduos orgânicos, que promove a desinfecção do resíduo pelo efeito da elevação de temperatura, originando um composto estabilizado como produto final. Os componentes orgânicos biodegradáveis passam por etapas sucessivas de transformação sob a ação de diversos grupos de micro-organismos. (Fernandes *et. Al*). Os resíduos orgânicos são comumente depositados em aterros, formando lixiviados e biogás, ou seja, sendo responsáveis por poluição e mau cheiro, além da propagação de vetores de doenças como ratos e insetos. A compostagem, portanto, representa uma forma de eliminar metade do problema dos Resíduos Sólidos Urbanos, dando um destino útil aos resíduos orgânicos, evitando a sua acumulação em aterros, melhorando a estrutura e devolvendo os nutrientes do solo, aumentando a sua capacidade de retenção de água, permitindo o controle da erosão e evitando o uso de fertilizantes sintéticos. (Fialho, 2003).

Durante o processo de compostagem, há o crescimento e desenvolvimento microbiano, uma vez que o composto oferece condições ambientais e nutrientes para o desenvolvimento de micro-organismos. Os principais grupos de micro-organismos envolvidos são bactérias, actinomicetos e fungos.

A população total de micro-organismos não varia significativamente durante a compostagem, e sua contagem se deve principalmente à sucessão das espécies em cada

fase do processo que é dependente do substrato e das condições ambientais (Tuomela *et. Al*, 2000).

Os micro-organismos transformam a matéria orgânica em CO₂, biomassa, calor e produto final semelhante a húmus. Os principais componentes da matéria orgânica são carboidratos, proteínas, lipídeos e lignina. A capacidade da microbiota para assimilar matéria orgânica depende da sua habilidade para produzir as enzimas necessárias para a degradação do substrato (Tuomela *et. Al*, 2000).

A microbiota durante o processo de compostagem de lixo orgânico doméstico ainda é pouco estudada. Portanto, é de grande importância a identificação da biodiversidade dos micro-organismos que participam desse processo, além da bioprospecção de isolados com potencial biotecnológico ainda não explorados, como a secreção de enzimas industriais.

Este trabalho teve como objetivo o isolamento e a purificação de isolados microbianos com potencial biotecnológico para a produção de pectinases e celulases, a partir do processo de compostagem de resíduos orgânicos provenientes de lixo orgânico doméstico.

MATERIAL E MÉTODOS

Uma leira de compostagem utilizando lixo orgânico proveniente de um restaurante de Dourados-MS foi montada na área experimental da Universidade Federal da Grande Dourados. Vinte gramas de material compostado foram coletados aleatoriamente nos dias iniciais e finais do processo de compostagem de lixo orgânico doméstico. As amostras foram colocadas assepticamente em sacos plásticos contendo 180 ml de água peptonada estéril (1% de peptona), os quais foram agitados por 5 minutos a velocidade média em Stomacher®. A partir do extrato obtido realizaram-se diluições decimais de 10⁻¹ a 10⁻⁴.

Para avaliar o crescimento dos micro-organismos o meio utilizado foi meio YEPG (glicose 2%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, ágar 1,5%, m/v), realizou-se então o plaqueamento por espalhamento em superfície, com auxílio de alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 37°C e avaliadas após 24 e 48 horas.

A partir da contagem total foi selecionada, para análise da morfologia de colônia, uma placa de cada meio e diluição cuja contagem estivesse entre 30 e 300

colônias. O número de isolados selecionados para identificação foi determinado pela raiz quadrada do número total de isolados contados, conforme mencionado em Bacteriological Manual for Foods (Food Drugs Administration - FDA, 1972). A análise de morfologia de colônia incluiu a observação dos seguintes atributos: tamanho da colônia (análise comparativa com outras colônias presentes naquele meio), forma, elevação, cor, textura e bordo. Foi realizada a purificação dos isolados (meio YEPG - pH 3,5), repicando-as e observando-as no microscópio com lâminas a fresco para obtenção de colônias puras.

Os isolados foram submetidos a testes de coloração diferencial de Gram a fim de separá-los nos dois grupos (Gram positivos e Gram negativos) e analisados em microscópio ótico quanto à forma e ao arranjo das células. A preservação dos isolados foi feita em criotubos contendo YEPG líquido acrescido de glicerol, para uma concentração final de 20%. Os isolados purificados foram submetidos a testes bioquímicos para identificação de seus potenciais para produção de enzimas de interesse biotecnológico, tais como pectinases e celulasas.

A produção de pectinase foi testada qualitativamente em meio contendo 1% de pectina cítrica como fonte de carbono, em metodologia desenvolvida por Hankin, Zucker e Sands, 1971. O meio de cultivo tinha em sua composição ágar, pectina cítrica, extrato de levedura e solução de sais. A solução de sais continha 2g de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 4g de KH_2PO_4 , 6g de Na_2HPO_4 , 0,2g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1mg de CaCl_2 , 10 μg de H_3BO_3 , 10 μg de MnSO_4 , 70 μg de ZnSO_4 , 50 μg de CuSO_4 e 10 μg de MoO_3 . Os isolados foram inoculados e incubados a 37°C por 72 horas. O resultado positivo para produção de pectinases foi indicado pelo crescimento dos micro-organismos no meio de cultivo.

O mesmo teste foi realizado para produção de celulasas, em meio de cultivo com ágar-carboximetilcelulose (CMC) e Tampão Acetato de sódio 0,1M pH 0,5, em metodologia desenvolvida por Dingle, Teid e Solomons, 1953. A carboximetilcelulose foi dissolvida em 200 mL de solução Tampão, em agitador magnético. Após a dissolução, adicionou-se o restante da solução Tampão. Os isolados foram inoculados e incubados a 37°C por 72 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após serem isolados e purificados, 97% dos isolados apresentaram características bacterianas, e foram classificados em Gram positivos e negativos através

da técnica de coloração de Gram, sendo posteriormente preservados em meio YEPG líquido acrescido de glicerol 20%.

Foram obtidos 38 micro-organismos, sendo 16 isolados referentes ao primeiro plaqueamento (dias iniciais do processo de compostagem) e 22 ao segundo plaqueamento (dias finais do processo de compostagem). Dentre os isolados, apenas um foi leveduriforme (no primeiro plaqueamento), sendo os demais isolados bacterianos.

Os isolados bacterianos foram classificados pelo teste de coloração de Gram, sendo 15 deles classificados como Gram positivos e 22 como Gram negativos, incluindo diferentes formas celulares. No grupo das bactérias Gram positivas, quatro isolados apresentaram formas celulares de cocos e onze de bacilos, enquanto no grupo das bactérias Gram negativas vinte apresentaram formas celulares de cocos e dois de bacilos.

Todos os isolados bacterianos apresentaram resultados positivos aos testes qualitativos para a produção de pectinases, representando potenciais secretores dessas enzimas de grande interesse biotecnológico. Entretanto, nenhum dos isolados teve resultado positivo para produção de celulasas.

Todos os isolados serão identificados por sequenciamento de regiões intergênicas do rDNA. Testes quantitativos para identificar a atividade pectinolítica desses isolados serão realizados como o intuito de caracterizar a aplicação biotecnológica das enzimas secretadas. Os resultados obtidos serão apresentados em forma de pôster no 16º Simpósio e Exposição Internacional de Biotecnologia, em Setembro de 2014.

CONCLUSÃO

A partir da pesquisa realizada, notou-se a importância do estudo da diversidade de micro-organismos que se desenvolvem durante o processo de compostagem, que podem apresentar aplicações importantes, principalmente na área biotecnológica, como por exemplo, na produção de enzimas industriais. Estudos futuros devem ser realizados para a seleção de inóculo microbiano para ser utilizado como cultura iniciadora no processo de compostagem de lixo orgânico doméstico, o que possibilitará a padronização e a maior aplicabilidade dessa técnica.

REFERÊNCIAS

AVALLONE, S.; BRILLOUET, J-M.; GUYOT, B.; OLGUIN, E.; GUIRAUD, J-P. **Involvement of pectinolytic microorganisms in coffee fermentation.** International Journal of Food Science and Technology, v. 37, 2002, 191p.

Caderno de apoio ao professor. **Compostagem Doméstica e Hortas Biológicas.**
Acessado em agosto/2014 pelo link:
<http://www.amism.pt/Portals/1/pdf/Guia%20Compostagem.pdf>

FERNANDES, FERNANDO; MÁRCIA, SANDRA CESÁRIO PEREIRA DA SILVA. **Manual prático para compostagem de Biossólidos.** PROSAB – Programa de Pesquisa em saneamento básico. UEL – Universidade Estadual de Londrina. Acessado em agosto/2014 pelo link:
<http://www.finep.gov.br/prosab/livros/Livro%20Compostagem.pdf>

FIALHO, M. de O. Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente. **Identificação e caracterização de actinomicetos isolados do processo de compostagem.** Porto Alegre - RS, Março de 2003. 42 p.

FOOD DRUGS ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual.** EUA, ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). International, 1972. 187 p.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos.** 3.ed. São Paulo, 1985. v. 1, 330 p.

PEREIRA, V. M. Dissertação como parte do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização da produção de celulases por *Aspergillus sulphureus* (Fresen.) Wehmer.** Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2012. 55 p.

TUOMELA, M. et al. **Biodegradation of lignin in a compost environment: a review.** Bioresource Technology, Amsterdam, 2000. 169 p.