



ENEPEX

ENCONTRO DE ENSINO,
PESQUISA E EXTENSÃO

8° ENEPE UFGD • 5° EPEX UEMS

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO A PARTIR DE SOLO DO CERRADO.

Ludmila Vilela Rezende^{1*}; Letícia Kleinhans Pinheiro¹; Danielle Marques Vilela²

¹Acadêmica de Biotecnologia pela FCBA/UFGD, aluna de Iniciação Científica PIVIC/UFGD;

²Professora adjunta II da FCBA/UFGD, Orientadora do Projeto de Pesquisa PIVIC/UFGD.

[*ludmilavrezende@hotmail.com](mailto:ludmilavrezende@hotmail.com)

RESUMO

O Cerrado por ser um enorme bioma contém muitas espécies microbianas, no entanto, essa diversidade ainda é pouco explorada. O solo representa um excelente substrato para o crescimento e desenvolvimento microbiano, o que justifica o interesse cada vez maior pela bioprospecção de micro-organismos desse meio. Uma vez que a concentração de matéria orgânica em solos de biomas, tal como o cerrado, é representativa, a tendência desses micro-organismos secretarem enzimas como pectinases e celulases é elevada. Os micro-organismos são as fontes mais comuns de enzimas comerciais, devido às suas propriedades fisiológicas e bioquímicas, condições de fácil cultivo e facilidade de manipulação de células. Dentre essas enzimas estão as pectinases e celulases, as quais possuem grande potencial e têm grande importância na área biotecnológica atual, devido às suas variadas aplicações. Este trabalho teve como objetivo a bioprospecção de bactérias e leveduras com potencial para produção de pectinases e celulases. Duas amostras compostas de solo do cerrado foram coletadas na comunidade de Picadinha, localizado nas imediações da cidade de Dourados-MS. Diluições decimais seriadas das amostras foram plaqueadas em meio YEPG com e sem cloranfenicol e incubadas a 37°C, por 24 e 48h. Após a purificação os isolados bacterianos foram classificados em Gram positivos e negativos através da técnica de coloração de Gram e preservados em meio YEPG líquido acrescido de glicerol 40%. Todos os isolados foram testados qualitativamente quanto à produção de pectinases em meio contendo pectina cítrica, e produção de celulase em meio contendo carboximetilcelulase e tampão acetato de sódio. Todos os isolados apresentaram resultado positivo para pectinase, e resultado negativo para produção de celulase.

Palavras-chave: Leveduras; Cerrado; Biotecnologia

INTRODUÇÃO

O Cerrado é um dos biomas de maior diversidade do planeta, chegando a ocupar uma área de 1,8 milhão de km² (cerca de 21% do território brasileiro). Esse bioma é considerado como o segundo maior, sendo superado em área apenas pela Amazônia (AGUIAR et al., 2004). Ocorre na zona tropical do continente sul-americano, e suas fronteiras vão desde os limites inferiores da Amazônia até os estados de São Paulo e Paraná; possui também algumas pequenas áreas no Leste boliviano e Nordeste Paraguai. Seu cenário exuberante abrange os estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, Tocantins, Piauí e Distrito Federal (RIBEIRO & WALTER, 2008). O clima característico é o tropical úmido, onde o verão é chuvoso e a estação seca de abril a setembro é respectiva ao inverno. Os diferentes locais podem ser fatores de variação das precipitações pluviométricas, que podem variar de 1100 a 1850 mm anuais com temperaturas médias anuais que variam de 19° a 24°C (GOLFARI, 1975; KLINK & MACHADO, 2005).

Considerado a savana brasileira, o cerrado reúne uma imensa paisagem com mais de 15 mil espécies de plantas e 1570 espécies de animais, além de uma grande biodiversidade de microrganismos (DIANESE et. Al., 1997). Apesar de essa região possuir uma grande diversidade de microrganismos esses são poucos conhecidos e explorados cientificamente. Porém isso vem mudando, devido aos últimos avanços tecnológicos, muitas pesquisas têm sido estimuladas com o intuito de descobrir mais a respeito desses seres microscópicos.

As leveduras, que pertencem ao reino *Fungi*, possuem características típicas dos fungos, como parede celular rígida e ausência de pigmentos fotossintetizantes, sendo assim, heterótrofas, que obtém seu alimento através da absorção de nutrientes, não tem mobilidade e realizam reprodução sexuada via células especializadas, denominadas esporos. Algumas das características que as diferenciam dos demais fungos é o fato de possuírem um talo que é predominante unicelular, reproduzirem assexuadamente por brotamento ou fissão binária e não formarem corpos de frutificação (KURTZMAN & FELL, 1998). Possuem representantes nos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*, características como estruturas sexuadas, aspectos fisiológicos e moleculares são importantes para a distinção das leveduras dos dois grupos, como também na identificação de gêneros anamórficos, cuja fase de vida sexuada do ciclo é desconhecida (SPERADIO, 2012). São encontradas em diversos ambientes, como no solo, água de rios, lagos e mares, nas superfícies de órgãos dos vegetais, principalmente em flores e frutos, no trato intestinal de animais, em líquidos açucarados, e em mais uma série de outros locais.

Leveduras do tipo fermentativas vêm sendo exploradas há milhares de anos, na produção de cerveja, vinho e na fermentação do pão, embora, somente no século XIX tenha sido reconhecida a natureza biológica dos agentes responsáveis por tais processos. Suas aplicações na indústria e na agricultura são muito amplas, dentre as principais, podemos citar: agentes da fermentação alcoólica, na produção do álcool industrial e de

todas as bebidas alcoólicas destiladas ou não destiladas; utilizadas na panificação; importante fonte de proteína e de fatores de crescimento, utilizada na alimentação animal e até mesmo humana; podem também ter importância ecológica, já que degradam moléculas orgânicas. Como são agentes de fermentação, acabam sendo prejudiciais à conservação de frutos, e de sucos vegetais, tendo algumas espécies patogênicas a plantas, animais e ao homem. O principal agente da fermentação alcoólica, *Saccharomyces cerevisiae*, uma levedura ascomicética, é largamente usada em escala industrial, principalmente alimentícia, e mais recentemente na produção de bioetanol.

As enzimas apresentam capacidade de reagir com determinados constituintes das células, denominados substratos, formando complexos, e esse fato é denominado atividade biológica (KIELING et al., 2002). A vida em geral depende da realização de inúmeras reações químicas que ocorrem nas células, e todas essas reações dependem da catalisação de determinadas enzimas específicas. Isso justifica a importância da constante busca por novas enzimas ou novos potenciais em enzimas já conhecidas, pois sua importância nas atividades metabólicas pode ser relacionada ao mercado comercial de diversas formas, incluindo, por exemplo, a indústria alimentícia.

Os avanços biotecnológicos possibilitaram a descoberta de uma vasta biodiversidade de microrganismos e leveduras em diversos tipos de solo. O setor sucroalcooleiro brasileiro tem o desafio de aumentar a produção de etanol para atender às demandas interna e de exportação, e é por isso que novos meios de aumentar e melhorar a produção são objetos constantes de estudo. Além disso, a necessidade de reduzir a dependência da utilização de petróleo impulsionou estudos voltados para o desenvolvimento de novas alternativas na produção de combustíveis (FRANCISCO et al., 2008). Estes fatos tornam importante o estudo de leveduras isoladas em busca daquelas que possam ter potencial para a produção de bioetanol, biocombustível obtido através da fermentação controlada e da destilação de resíduos vegetais (como o bagaço da cana-de-açúcar), e que justamente por ser renovável já é e será ainda mais de grande demanda comercial e importância ambiental.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo, o isolamento e a purificação de micro-organismos com potencial para produção de enzimas com interesse biotecnológico, tais como pectinases e celulases.

MATERIAL E MÉTODOS

Duas amostras compostas de solo do cerrado foram coletadas na comunidade de Picadinha, localizada nas imediações da cidade de Dourados-MS. Foram coletadas 10 amostras simples à profundidade de 0-20 cm (A, B, C, D e E) por região, totalizando 2 amostras compostas.

Vinte gramas de amostra foram colocadas assepticamente em erlenmeyers contendo 180 ml de água peptonada estéril (1% de peptona), os quais foram agitados em Shaker por 5 minutos, a 100rpm e 37°C. A partir do extrato obtido realizaram-se diluições decimais de 10^{-1} a 10^{-4} .

Para obter colônias cultiváveis, diluições decimais seriadas das amostras foram plaqueadas em meio YEPG sólido (pH 3,5; sem e com cloranfenicol, adicionando-se 1000 mg/L), por espalhamento em superfície, com auxílio de alça de Drigalski, sendo então incubadas a 37° por um período de 24 a 72 horas.

As colônias encontradas foram caracterizadas quanto ao tamanho, à forma, à elevação, à cor, à textura e ao bordo (DIAS; SCHWAN, 2010). Repicagens sucessivas dos isolados obtidos foram realizadas com o objetivo de purificação das colônias. Em seguida, foram preparadas lâminas a fresco, para certificação da pureza dos isolados, sendo os isolados bacterianos submetidos à coloração diferencial de Gram.

Foram realizados testes bioquímicos para identificar quais isolados apresentaram potencial para a produção de algumas enzimas de interesse biotecnológico, tais como pectinases e celulases. A produção de pectinase foi testada qualitativamente em meio contendo 1% de pectina cítrica como fonte de carbono, em metodologia desenvolvida por Hankin et al. (1971). O meio de cultivo tinha em sua composição ágar, pectina cítrica, extrato de levedura e solução de sais. Em um litro de meio a solução de sais continha 2g de (NH₄)SO₄, 4g de KH₂PO₄, 6g de Na₂HPO₄, 0,2g de FeSO₄.7H₂O, 1mg de CaCl₂, 10µg de H₃BO₃, 10µg de MnSO₄, 70µg de ZnSO₄, 50µg de CuSO₄ e 10µg de MoO₃. 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 celulases, 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 o isolamento e purificação dos isolados os mesmos foram preservados em meio YEPG líquido acrescido de glicerol 40%.

Dos quinze micro-organismos obtidos, dois foram isolados leveduriformes e treze isolados bacterianos. Dentre os isolados bacterianos, cinco foram classificados como Gram positivos e oito como Gram negativos, incluindo diferentes formas celulares. No grupo das bactérias gram-positivas, quatro isolados apresentaram formas celulares de bacilos e um de cocos; enquanto que no grupo das bactérias gram-negativas todos apresentaram formas celulares de cocos. Todos os quinze isolados apresentaram resultado positivo no teste qualitativo para a produção de pectinases, representando portanto, potenciais secretores dessas enzimas de grande interesse biotecnológico. Entretanto, nenhum dos isolados teve resultado positivo para produção de celulases.

Todos os isolados serão identificados por sequenciamento de regiões intergênicas do rDNA. Testes quantitativos para identificar a atividade pectinolítica e desses isolados serão realizados como o intuito de caracterizar a aplicação biotecnológica dessas enzimas secretadas.

CONCLUSÃO

Através do presente trabalho, foi possível constatar que o solo do cerrado é um excelente substrato para crescimento e desenvolvimento de micro-organismos produtores de enzimas com interesse industrial. O presente estudo representou a execução das primeiras etapas de um bioprocesso, por meio de um microrganismo selecionado de acordo com seu potencial enzimático e a otimização de seu cultivo. Todos os isolados das amostras deste solo apresentaram capacidade de produção de pectinase. Novas análises serão realizadas a fim de caracterizar a produção dessas enzimas por esses isolados, bem como a aplicação biotecnológica das mesmas.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L.M.S., R.B. MACHADO & J. MARINHO-FILHO. 2004. A diversidade biológica do Cerrado. In: L.M.S. Aguiar & A. Camargo(eds.). **Ecologia e caracterização do Cerrado**. pp. 19-42. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Cerrados), Planaltina, Brasil.
- DIANESE, J. C. 2000. Microdiversidade associada a plantas nativas do Cerrado. In: T. B. Cavalcanti; B. M. T. Walter (Org.) **Tópicos atuais em Botânica**. 1ed, Brasília: Sociedade Brasileira de Botânica, EMBRAPA, p. 109-115.
- DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Isolamento e identificação de leveduras. In: MOREIRA, F. M. S., HUISING, E. J., BIGNELL, D. E. (Org.). **Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade**. Lavras: UFLA, 2010, p. 227-277.
- DINGLE, T., REID, W. W., AND SOLOMONS, G. L. 1953 The enzymatic degradation of pectin and other polysaccharides.II. Application of the "cup-plate" assay to the estimation of enzymes. **J. Sci. Food Agr.**, 3, 149-155.
- ESPERANGIO, E. M.; 2012. **Ocorrência, diversidade e potencial biotecnológico de leveduras associadas a plantas do cerrado – UNB**. FIT - Mestrado em Fitopatologia (Dissertações)
- GOLFARI, L. 1975. **Zoneamento ecológico do estado de Minas Gerais para reflorestamento**. PNUD/FAO/IBDF - BRA/71/545. 65 p (Série Técnica no 3)
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A. 2005. **Conservação do Cerrado Brasileiro**. Megadiversidade. v1, p-147-155.
- HANKIN L, ZUCKER M, SANDS DC. **Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria**. Appl Microbiol. 1971 Aug;22(2):205–209
- KURTZMAN, C.P. 1998. Summary of species characteristics. In: **The Yeasts, A Taxonomic Study**, 4th edn. C.P. Kurtzman and J.W. Fell, (eds.) pp. 915-947. Elsevier Science B.V., Amsterdam.

LECHNER, A.; MAYR, R.; FRANCIS, K. P.; PRUB, B.M.; KAPLAN, T.; WIEBNER-GUNKEL E.; STEWART GSAB E SCHERER, S. 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. **Int J SystEvolMicrobiol** 48:1373–1382

MASOUD, W.; JESPERSEN, L. 2006. Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. **Int J Food Microbiol** 110:291–296

RIBEIRO, J.F. & WALTER, B.M.T. 2008. As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado. In **Cerrado: ecologia e flora** (S.M. Sano, S.P. Almeida & J.F. Ribeiro, eds.). Embrapa Cerrados, Planaltina. p.151 -212.

SOUZA, H. Q.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; **Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico**. Ciência e Tecnologia de Alimentos.