



## ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS CELULOLÍTICAS DE SERRAPILHEIRA DA CAATINGA

JONATHAN S. GIOVEDY<sup>1</sup>; ELKE S.D. VILELA<sup>2</sup>; MARCIA M. PARMA<sup>3</sup>; CÉLIA  
M.M.S SILVA<sup>4</sup>; ITAMAR S. MELO<sup>5</sup>.

Nº 11408

### RESUMO

O bioma Caatinga, ainda pouco estudado quanto a biodiversidade microbiana e bioprospecção, pode representar uma nova frente para descoberta de microrganismo de interesse biotecnológico. Dentro desse enfoque, este trabalho teve por finalidade isolar e caracterizar bactérias celulolíticas da Caatinga visando uma possível aplicação na indústria. Após isolamento em meio sólido, foi realizada seleção das linhagens com capacidade de degradar celulose. Em seguida, após obtenção a melhor linhagem bacteriana, foi realizada a determinação da atividade de celulase total (FPase) adicionando papel filtro como substrato e atividade de endoglucanase (CMCase) com CMC como substrato. Um total de 73 bactérias foram isoladas e, destas, 34% apresentaram halo de degradação da celulose. O isolado 6.1 bac-15 foi o que apresentou o maior halo de degradação de celulose (29,5 mm ± 0,288). Com relação à atividade de celulase total, a linhagem apresentou alta atividade enzimática (0,043 U.ml<sup>-1</sup>). Para a endoglucanase, o pico de atividade também foi observado após 4 horas, com valor de 0,80 U.ml<sup>-1</sup>. Após identificação do isolado por sequenciamento da região 16S DNA e otimização do processo, o isolado poderá servir futuramente para aplicações em processos industriais.

<sup>1</sup>Bolsista CNPq: Graduação em Eng. Ambiental, FAJ Jaguariúna-SP, jonathangiovedy@yahoo.com.br.

<sup>2</sup>Colaborador: Analista do Laboratório de Microbiologia Ambiental, Embrapa Meio Ambiente

<sup>3</sup>Colaborador: Analista do Laboratório de Microbiologia Ambiental, Embrapa Meio Ambiente

<sup>4</sup>Colaborador: Professora. FAJ Jaguariúna-SP

<sup>5</sup>Orientador: Pesquisador; Embrapa Meio Ambiente; Jaguariúna-SP

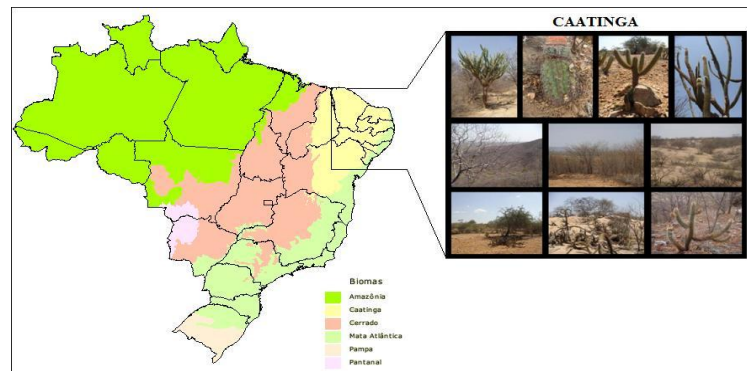
## ABSTRACT

The Bioma Caatinga (white forest) which can be useful for biotechnological purposes can harbor thermotolerant microorganism by use biotechnology. This study was conducted to isolate and evaluate bacteria able to degrade cellulose obtained from semiarid region, in northeast Brazil. After the isolation, it was conducted the screening of strains for their ability to degrade cellulose in solid medium with carboxymethylcellulose (CMC). After the selection of the best isolate; the determination of total cellulase activity in filter paper (FPase) and endoglucanase (CMCase) on CMC as substrate was performed. A total of 73 bacteria were isolated and among them, 34% showed degradation of the polymer when stained with Gram iodine solution. The isolate 6.1 bac-15, showed the largest cellulose degradation halo ( $29,5 \text{ mm} \pm 0,288$ ). Regarding activity of the total cellulase, after a 4 hour-period incubation, the highest enzyme activity was observed ( $0,043 \text{ U.ml}^{-1}$ ). For endoglucanase, the highest activity was also observed after 4 hours, with value of  $0,80 \text{ U.ml}^{-1}$ . After the identification of the strain by sequencing of 16S DNA and optimization of the process, this bacterial stain could serve for future applications in industrial processes.

## INTRODUÇÃO

A Caatinga é o único ecossistema exclusivamente brasileiro com extensão territorial de  $734.478 \text{ km}^2$ , correspondendo a cerca de 10% do território nacional, englobando os estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Alagoas, Bahia, Piauí e norte de Minas Gerais (GIULLIETTI, 2006) (Figura 1).

O clima semi-árido apresenta grande variedade de paisagens, relativa riqueza biológica e endemismo. Os microrganismos existentes nesse bioma são adaptados a estresses ambientais, tais como altas temperaturas, salinidade, altas incidência de radiação solar, e estresse hídrico. A ocorrência de secas estacionais e periódicas estabelece regimes intermitentes aos rios e deixa a vegetação com características específicas conhecidas como caducifólia o que provoca um depósito espesso de folhas sobre o solo, formando uma camada de serrapilheira.



**FIGURA 1.** Mapa de distribuição do bioma caatinga com fotos de alguns locais no período de seca e vegetação predominante. Fonte: Mapa modificado de IBGE e figura modificada por Kavamura (2010).

Uma das funções primordiais dos microrganismos é a decomposição de matéria orgânica, mecanismo responsável pela devolução de macro e micronutrientes para o ecossistema. Os principais fatores que controlam os processos de transformação da matéria orgânica do solo (MSO) são a quantidade e a qualidade do material, o ambiente físico e químico e os organismos decompositores, os quais possuem um arcabouço enzimático para tal função (TOLEDO, 2003; LEJON et al., 2005). Estas enzimas são utilizadas em várias aplicações industriais e a demanda por enzimas mais estáveis, altamente ativas e específicas, tem crescido rapidamente. Em 1995, o mercado mundial de enzimas superou 1 bilhão de dólares, enquanto espera-se para 2005, a comercialização de 1,7 a 2 bilhões. Cerca de 60% das indústrias que vendem enzimas encontram-se na Europa, as outras 40% estão nos Estados Unidos e no Japão. A aplicação de enzimas como celulases e xilanases começou na década de 80, primeiro em rações animais, seguida pela adição em alimentos e posteriormente em indústrias têxtil e de papel. Atualmente, essas enzimas juntamente com as pectinases, são responsáveis por 20% do mercado mundial (BHAT, 2000).

O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar bactérias celulolíticas visando a obtenção de linhagens eficientes na degradação do bagaço de cana-de-açúcar, com vista a sua utilização na produção de etanol de segunda geração.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Isolamento e seleção de bactérias degradadores de celulose**

A coleta de amostras de serrapilheiras foi realizada em 11 pontos da região semi-árida do nordeste brasileiro. O isolamento das linhagens bacterianas com capacidade de degradar celulose foi realizado por meio de diluições seriadas e

plaqueamento em meio CMC (carboximetilcelulose). As placas foram incubadas à 30°C, por 4 dias e, após esse período de crescimento, os isolados bacterianos foram purificados e crescidos novamente em meio CMC para verificar a formação de halo de degradação de celulose, repicando as novamente em seu meio de cultivo contendo CMC. Após 48 horas de incubação a 30°C, as culturas foram coradas com solução de Gram iodo (2g KI; 1g iodo; 300 mL água destilada) por três minutos (KASANA et al., 2008). Após coloração, foram medidos os halos formados pela degradação da celulose (mm). Este ensaio foi repetido duas vezes e o delineamento foi inteiramente casualizados com quatro repetições.

#### **Determinação da atividade de celulase total**

Para avaliação da produção de celulase total, inoculou-se 1mL da suspensão bacteriana (10% de inóculo de solução com Abs = 1,0) em 10 mL de caldo sintético, segundo Ruegger et al. (2004). O caldo sintético continha papel de filtro como única fonte de carbono, do qual foram retiradas alíquotas de 1mL da suspensão bacteriana nos períodos de 0, 2, 4, 7, 14, 24 e 48 h, centrifugadas a 9 000 rpm por 15 minutos e efetuada a dosagem da atividade enzimática pelo método DNS (RUEGGER et al., 2004) utilizando espectrofotômetro no comprimento de onda 540 nm. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi expressa como a quantidade de enzima necessária para produzir  $1\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$  de açúcares redutores por ml de extrato por 1 minuto.

#### **Determinação da atividade da enzima endoglucanase**

Preparou-se 20 mL do meio mínimo de Vogel (1956) com adição de 0,06 g de extrato de levedura e 0,2 g de farelo de trigo em substituição ao 0,2 g de *Walsathcellulose*. Após autoclavagem, foram inoculados (10% v/v) de bactérias na concentração de  $10^7$  células em meio contendo farelo de trigo 4,5 g; extrato de malte 1,5 g; glicose 1,0 g; cloreto de amônia 0,5g; H<sub>2</sub>O 900 mL; solução salina KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O; CaCl<sub>2</sub>2H<sub>2</sub>O; KCl 0,5g; H<sub>2</sub>O 1L). Após 24 h de incubação, foi feita a avaliação de crescimento e as dosagens enzimáticas nos períodos de 0, 2, 4, 7, 14, 24 e 48 h, utilizando espectrofotômetro no comprimento de onda 540 nm. A atividade de endoglucanase obtida para o sobrenadante da cultura foi determinada de acordo com Chellapandi et al. (2008). Uma unidade (U) de atividade enzimática foi expressa como a quantidade de enzima necessária para produzir  $1\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$  de açúcares redutores por ml de extrato por 1 minuto.

### **Identificação do isolado pela análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular, MIDI.**

A linhagem bacteriana selecionada quanto a capacidade celuloítica foi identificada pelo perfil dos ácidos graxos da membrana celular (Sasser, 1990) utilizando o cromatógrafo gasoso com injetor automático e detector Flame Ionization Detector (FID), marca Agilent, modelo 6850. A interface foi obtida pelos programas ChemStation A0901[1206] e Sherlock 4.0. A biblioteca selecionada foi a TSBA6.0.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Isolamento e seleção de bactérias degradadoras de celulose**

Um total de 73 linhagens bacterianas isoladas foram avaliadas para produção de enzimas celulolíticas, sendo que destas, 34% apresentaram halo de degradação de celulose (Figura 2). Uma linhagem bacteriana 6.1 - bac-15 se destacou por produzir halo de degradação de (29,5 mm± 0,288), e foi selecionada para determinação quantitativa de celulase total e endoglucanase.



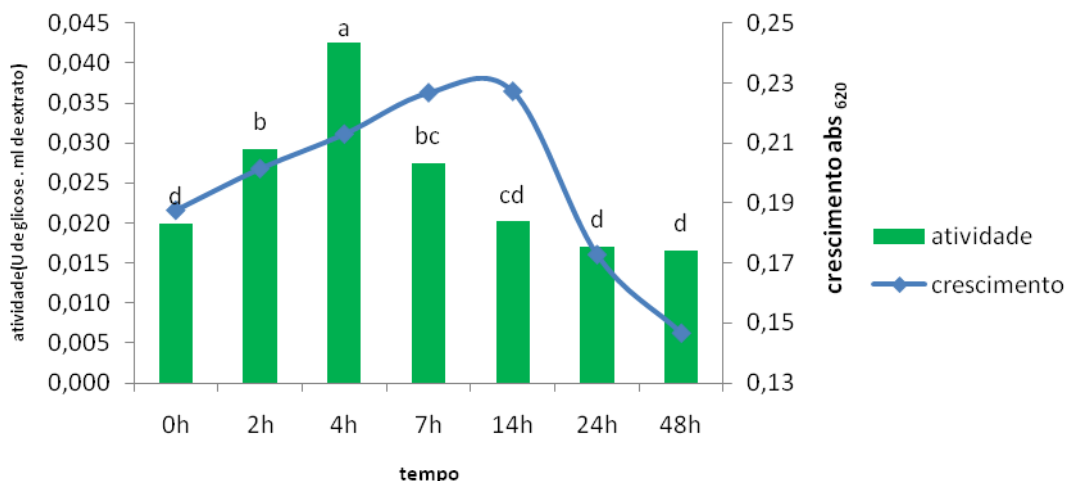
**FIGURA 2.** Degradação de celulose pelo isolado 6.1 bac 15. Observe o halo de degradação (coloração mais clara ao redor da colônia) em quadruplicata.

### **Identificação taxonômica**

Por meio da identificação do perfil dos ácidos graxos, a linhagem 6.1-bac-15 foi identificada como *Curtobacterium pusillum*, entretanto o índice de similaridade obtido foi baixo (0,30), então é necessário realizar o seqüenciamento da região 16S do DNA para confirmação da espécie. Também foi isolada de *Rhizophora mangle* uma espécie de *Curtobacterium SP*, produtora de endoglucanase (SÁ, 2008).

### Crescimento e Determinação da atividade de celulase total

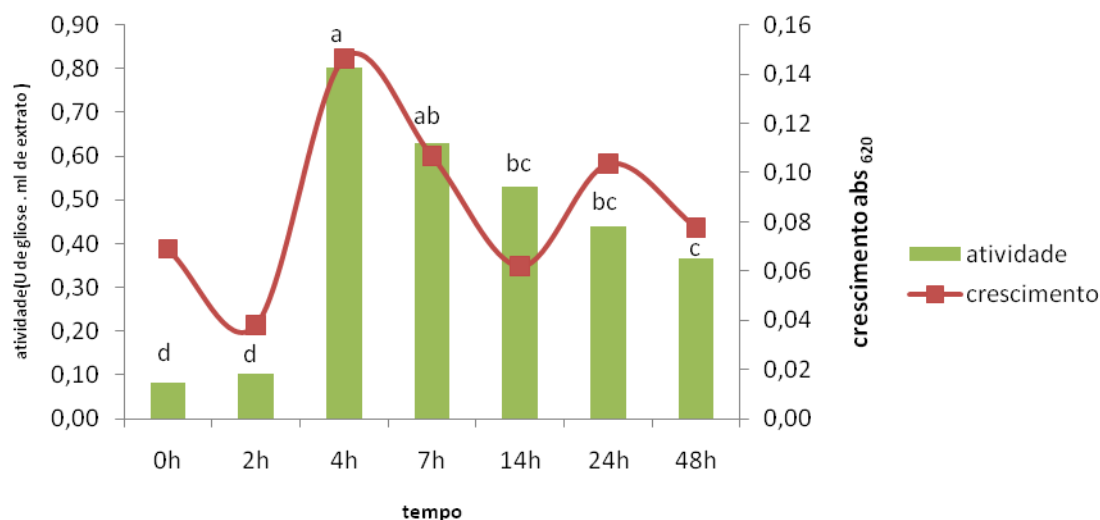
A linhagem 6.1 bac 15 apresentou uma alta produção de celulase total após 4 horas de incubação, com sua atividade de  $(0,043 \text{ U.ml}^{-1})$  diferindo estatisticamente dos demais períodos avaliados ( $p \leq 0,05$ ). (Figura 3).



**FIGURA 3.** Atividade celulolítica da linhagem 6.1 bac 15 e taxa de crescimento a 30°C. Análise estatística realizada pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

O gênero *Curtobacterium* sp. normalmente está associado a doenças de plantas (COLLINS & JONES, 1983) e humanos (FUNK et al., 2005). Neste trabalho, observou-se que espécies de *Curtobacterium* são potenciais produtoras de enzimas celulolíticas, tornando-se alvo para usos industriais. Deste modo, no presente estudo, foi observada a atividade celulolítica de *Curtobacterium* sp, que foi também verificado por Sá (2008). Este autor isolou *Curtobacterium* a partir de manguezais. Krottilaganandh (2000) obteve 77 isolados bacterianos termotolerantes em meio CMC, observando alta atividade enzimática para o isolado CMU4-4, não identificado. A linhagem isolada de serrapilheira da Caatinga, obtida neste estudo, produziu níveis de celulase total variando de  $0,020$  à  $0,044 \text{ U.ml}^{-1}$  dentro de 4 horas. Krairitthichai e Thongwai (2008) obtiveram produção entre  $0,00$  a  $0,14 \text{ U.ml}^{-1}$  de celulase total.

### Cinética de crescimento e Determinação da atividade da endoglucanase



**FIGURA 4.** Atividade da endoglucanase da 6.1 bac 15 e crescimento a 30°C. Análise estatística foi realizada pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Na quantificação e análise estatística para a enzima endoglucanase, o pico de crescimento e atividade foram no mesmo período de 4 h correspondendo à fase log de crescimento (Figura 4). A atividade da endoglucanase, obtida no presente estudo (0,80 U.ml<sup>-1</sup>), foi superior aos níveis observados por Silva e Gouveia (2008). Este autor avaliou a produção de endoglucanase por linhagens de *Streptomyces* utilizando como substrato, bagaço de cana-de-açúcar, sob diferentes temperaturas e valores de pH, obtendo maior nível da enzima para linhagem SC 08 (1) na temperatura de 60°C (0,524 U.ml<sup>-1</sup>), enquanto que para a temperatura utilizada no presente estudo (30°C), o autor obteve níveis ainda menores (0,202 U.ml<sup>-1</sup>).

### CONCLUSÃO

No presente trabalho foi possível identificar uma linhagem bacteriana obtida de serrapilheira da Caatinga capaz de produzir altos níveis das enzimas celulase total e endoglucanase, demonstrando o grande potencial desse bioma na busca de microrganismos termotolerantes que poderão ser de utilidade em processo biotecnológico.



## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica, PIBIC e a Embrapa Meio Ambiente pelo suporte e estrutura para a realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology: review. **Biotechnology Advances**, 18:355-383. 2000
- CHELLAPANDI, P.; HIMANSHU, M.J. Production of endoglucanase by the native strains of *Streptomyces* isolates in submerged fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 122-127. 2008
- COLLINS, M.D.; JONES, D. Reclassification of *Corynebacterium flaccumfaciens*, *Corynebacterium betae*, *Corynebacterium oortii* and *Corynebacterium poinsettiae* in the genus *Curtobacterium*, as *Curtobacterium flaccumfaciens* comb.nov. **Journal of General Microbiology**. v.129, p.3545–3548, 1983.
- FUNK, G.; ARAVENA-ROMAN, M.; FRODL, R. FIRST Description of *Curtobacterium* spp. Isolated from human Clinical Specimens. **Journal of clinical Microbiology**, v.43,n.3,p.1032-1036,2005.
- GIULIETTI, A.N. **Diversidade e caracterização das fanerógamas do Semi-Árido Brasileiro**. Recife, Associação Plantas do Nordeste. v.1, 488p., 2006.
- IBGE. Disponível em: <http://mapas.ibge.gov.br/website/biomas2/viewer.htm>
- KASANA, C.R.; et al., A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. **Science Business Media**, LLC 2008.
- KRAIRITTHICHAJ, S; THONGWAI, N. Isolation and screening for cellulase producing bacteria. **34th Congress on Science and Technology of Thailand**. p. 1-6. Volume 34. 2008
- KROTDILAGANANDH J. Isolation and selection of thermotolerant bacteria capable of producing cellulase. **Chiang Mai: Chiang Mai University Press**, 20-21, 2000.
- LEJON, D.P.H.; et al. Microbial community structure and density under different tree species in an acid forest (Morvan, France). **Microbiology Ecology**, 50:614-625, 2005.
- QUEIROZ, L.P.; RAPINI, A.; GIULIETTI, A.M. (Eds). Towards Greater Knowledge of the Brazilian Semi-Arid Biodiversity. Ministério de Ciência e Tecnologia, MCT, Brasília, mar. 2006.
- RUEGGER, M.J.S.; TAUK-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins. **Revista Brasileira de Botânica**, n.2, v.27, p.205-211, 2004.
- SÁ, B. L. A. **Diversidade de Rizobactérias Endoglucolíticas Isoladas de Mangue Vermelho. (Rhizophoramangle)**. Dissertação de mestrado. Tese de defendida pelo Programa de pós graduação em Biotecnologia, Universidade de São Paulo. 2008, p.61.
- SASSER, M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. **Technology Note** 101, 1990.
- SILVA, J.C e GOUVEIA. Algumas propriedades de endoglucanases produzidas por *Streptomyces* spp. em meio à base de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de tecnologia**, v.02, n. 02: p. 60-70, 2008
- TOLEDO, L.O. **Aporte de serrapilheira, fauna edáfica e taxa de decomposição em áreas de floresta secundária no Município de Pinheiral, RJ**. Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2003. 80p. (Tese de Mestrado).
- VOGEL, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Microbial Genetic**, v. 13, pp. 42-43, 1956.