



Isolamento de Linhagens Degradadoras de Celulose da Região dos Campos Gerais

ISOLATION OF CELLULOSE DEGRADING STRAINS IN THE CAMPOS GERAIS REGION

SILVA, Leticia Helena Vieira*, PRESTES, Rosilene Aparecida[†]

RESUMO

Este artigo apresenta um estudo que objetiva agregar valor aos resíduos de celulose, homopolissacarídeo de glicose, que se caracteriza como o principal componente da biomassa vegetal e o polímero mais abundante do mundo, tendo como auxílio à busca de microrganismos produtores de enzimas degradadoras desse componente. Deste modo, foi realizado o isolamento de linhagens microbianas a partir da atividade simbiótica destes com a espécie de cupim subterrâneo *Coptotermes gestroi*, popularmente chamado de cupim-do-pasto ou cupim-de-monte, na região dos Campos Gerais; para tal atividade realizou-se a diluição seriada (10^{-1} e 10^{-2}) das amostras com resquícios do habitat. Em seguida, fez-se a inoculação em meio mineral com carboximetilcelulose, onde se obteve culturas mistas. Culturas puras foram adquiridas a partir de dois (2) isolamentos. Seis (6) linhagens de microrganismos degradadores de celulose foram isolados por observação de características fenotípicas, assim, a próxima etapa será a identificação desses microrganismos. Portanto, esses microrganismos isolados poderão representar alto potencial biotecnológico futuro de produção de nanocelulose.

Palavras-chave: Resíduos, Celulose, Enzimas.

ABSTRACT

This paper presents a study that aims to add value to cellulose waste, glucose homopolysaccharide that is characterized as the main component of plant biomass and the most abundant polymer in the world, with the aid of the search for microorganisms that produce enzymes that degrade this component. Thus, microbial strains were isolated, from their symbiotic activity with the subterranean termite *Coptotermes gestroi*, popularly called cupim-do-pasto ou cupim-de-monte, in the Campos Gerais region. For this activity, serial dilutions (10^{-1} and 10^{-2}) of the samples were performed with remnants of the habitat. Then, inoculation was performed in mineral medium with carboxymethylcellulose, where mixed cultures were obtained. Pure cultures were acquired from two (2) isolations. Six (6) strains of cellulose degrading microorganisms were isolated by observation of phenotypic characteristics, thus the next step will be the identification of these microorganisms. Therefore, these isolated microorganisms may represent high future biotechnological potential of nanocellulose production.

Keywords: Waste, Cellulose, Enzymes.

1 INTRODUÇÃO



Nas últimas décadas o uso não consciente de recursos naturais evidenciou a necessidade de serem criados mecanismos que permitissem que a inovação das mudanças no processo deveriam iniciar desde a extração até o descarte da matéria-prima ou resíduos, tornando as etapas sustentáveis (FERREIRA; RANGEL, 2009).

A ciência e a tecnologia corroboradas auxiliaram no desenvolvimento de novas técnicas, sendo uma delas a nanoescala. Isso traz novas possibilidades de aproveitamento de resíduos de uma forma que diminui o tamanho de um polímero no momento de sua extração ou degradação, podendo com isso ser aplicado em outro material ou processo, conseqüentemente, seu impacto no meio ambiente será reduzido (PRESTES et al., 2021). A nanoescala se trata de uma técnica que envolve a manipulação da matéria em escala atômica e molecular e se pode associá-la a diversas áreas do conhecimento, como a medicina, eletrônica, ciência da computação, física, química, biologia, entre outras. A nanotecnologia pode atuar nessas áreas proporcionando a construção de estruturas e novos materiais estáveis a partir dos átomos. Uma das formas para a aplicação da nanotecnologia se dá, a partir da atividade de enzimas de classes específicas, que dentro do setor industrial, permitem melhoramento das propriedades mecânicas, químicas, físicas podendo auxiliar o aproveitamento de resíduos (BASTOS, 2006).

Hodiernamente empresas utilizam para produção de nanocelulose processos químicos e mecânicos, que acabam produzindo resíduos como resultado do processo, configurando um problema ambiental que nos leva a pensar: de que maneira poderíamos produzir nanocelulose sem uso de processos químicos e mecânicos? Na produção de nanocelulose por meio da atividade de enzimas, não há a produção de resíduos posteriores, estimulando um aproveitamento maior da matéria-prima. Portanto, neste projeto a problematização é de como auxiliar a nanotecnologia a produzir nanoestruturas de forma limpa sem agredir o meio ambiente, pensando nesta questão estudou-se uma forma de agregar valor aos resíduos de celulose, tendo como auxílio à busca de microrganismos produtores de enzimas degradadoras deste componente, pois esse polímero natural se caracteriza como um dos compostos orgânicos de maior interesse do mercado industrial, consistindo em até 50 % da composição da madeira, citando como um dos exemplos (DELATORRE, 2010).

A celulose é um homopolissacarídeo de glicose, que se caracteriza como o principal componente da biomassa vegetal e o polímero mais abundante do mundo. Considerado um polissacarídeo beta glucano, formado apenas por D-glicoses que se ligam entre si por intermédio de uma ligação covalente específica chamada de ligação glicosídica. Além do seu uso mais corriqueiro dentro do setor têxtil e do seu uso natural garantindo rigidez, sustentação e formato a parede celular vegetal. O uso da celulose se estende para a fabricação de plásticos, produtos químicos, filmes, etanol de segunda geração ou bioetanol, apresentando importância socioambiental muito relevante (DELATORRE, 2010).

Deste modo, neste trabalho o objetivo foi realizar o isolamento de linhagens microbianas a partir da atividade simbiótica destas com a espécie de cupim subterrâneo *Cornitermes cumulans*, popularmente chamado de Cupim-do-pasto ou cupim-de-monte, na região dos Campos Gerais, com o propósito posterior de identificar as linhagens microbianas com maior capacidade de produção de enzimas celulases, responsáveis pela degradação da celulose. O Cupim-do-pasto ou cupim-de-monte, pertence a classe Insecta, ordem Isoptera, família dos termitídeos, comumente encontrados no Sul do Brasil, formam ninhos em forma de montículo. Também pode ser encontrado nas pastagens da região Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste do Brasil, considerado praga devido aos danos que causam atacando raízes de várias plantas, mas enquanto consumidores primários e decompositores possuem grande importância nos ecossistemas (NEVES, 1998).

Outra vertente para este estudo aborda as enzimas celulases como o nome indica, são enzimas que promovem a degradação da celulose, principal composto presente nas células vegetais, podem ser



classificadas em três grandes grupos de acordo com o local de atuação do substrato, as endoglucanases (EnG), que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases (ExG), atuam na região externa da celulose; e b-glicosidases (BG), hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose. Estas proteínas são biocatalisadores altamente específicos e agem em processos de grande interesse industrial. Começaram a ser estudadas durante a Segunda Guerra Mundial, devido à grande ocorrência de deterioração de fardas, barracas, bolsas e produtos fabricados de algodão, com isso, um grupo de 8 jovens, liderado pelo pesquisador Dr. Elwyn T. Reese, identificou um fungo filamentos, denominado a posteriori como *Trichoderma viride*. Após seu isolamento, o grupo observou que o fungo possuía uma particularidade, ao excretar liberam enzimas capazes de degradar celulose (CASTRO, 2009).

2 MÉTODO

2.1. Material animal

O cupim-do-pasto, *Cornitermes cumulans*, foi coletado em julho de 2021 na Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Câmpus Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. O cupim foi coletado de um único cupinzeiro com resquícios adjacentes de seu habitat natural, da região dos Campos Gerais. A amostra retirada do cupinzeiro foi acondicionada em saco plástico individual e levada ao laboratório. Após foram imediatamente moídas em almofariz com pistilo autoclavado em autoclave (PRISMATEC). Aproximadamente 9,5 g de amostra foi colocada em frasco Erlenmeyer com 150 mL de água peptonada 1 %, e a seguir agitada manualmente e deixada em repouso por 30 minutos para realização de diluição seriada (10^{-1}). Foi retirado desta dispersão um (1) mL de amostra, sendo colocada em um tubo de ensaio com 9 mL de água peptonada, considerada diluição 10^{-2} . Todos os procedimentos foram realizados em triplicata e todas as vidrarias foram autoclavadas.

2.2. Preparo do meio de cultura e inoculação

Para este experimento foi utilizado meio de cultura mineral com carboximetilcelulose (CMC), como única fonte de carbono. Estando seus compostos nas seguintes proporções: NaNO_3 : 3,0 g/L-1; MnSO_4 : 0,001 g/L-1; MgSO_3 : 0,5 g/L-1; KCl : 0,5 g/L-1; FeSO_4 : 10,0 mg/L-1; CaCl_2 : 0,04 g/L-1; Tampão Fosfato de Potássio: 1,36 g; CMC: 0,010 g; Agar: 15,0 g/L-1 e na sequência todo o material devidamente embalado em papel kraft e autoclavado.

Na inoculação 100 microlitros de amostra da diluição seriada 10^{-1} (apresentada no item 2.1) foi inoculada em placas Petri com meio mineral utilizando alça Drigalsk. O procedimento foi repetido para a diluição seriada 10^{-2} . As inoculações foram realizadas em triplicata. Nos meios as placas foram identificadas, viradas para baixo, embaladas com papel kraft e incubadas a 25 °C durante 96 horas.

2.3. Isolamento

Para o isolamento, o primeiro passo foi higienizar com álcool a cabine de segurança biológica (PACHANE, modelo pa70 Eco), deixando a mesma fechada durante 20 minutos para esterilização em luz

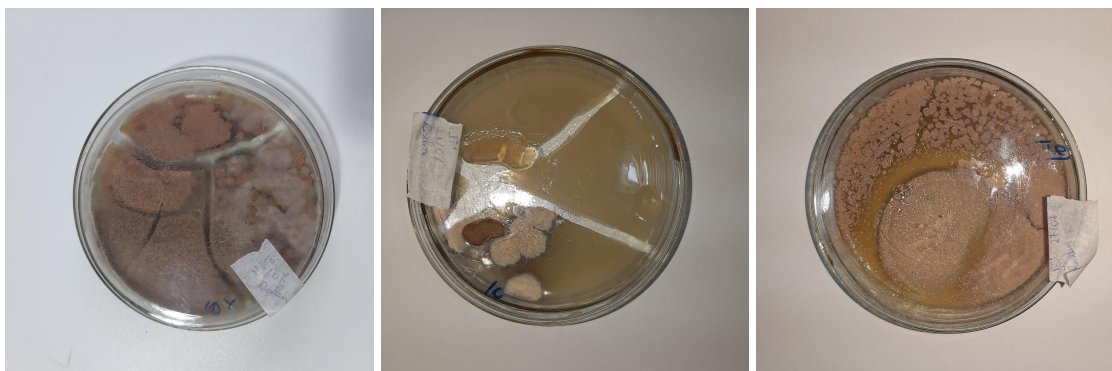
ultravioleta. Na sequência os materiais (placas e meio de cultura) foram colocados na cabine de segurança, retirando o papel kraft destes. Nas placas, foram colocados o meio de cultura mineral previamente esterilizados em autoclave, foi aguardado o esfriamento do material. Com auxílio de cabo de Kollé e alça de platina foi realizado o isolamento dos microrganismos que tinham crescido nas placas preparadas no item 2.2. Na tentativa de evitar contaminação, passou-se o material das placas de petri de inoculação para as placas de isolamento, utilizando a metodologia das estrias (zigzag). Ao fim do isolamento, as placas foram novamente revestidas em papel kraft, identificadas e armazenadas na estufa em temperatura de 30 °C. Foram realizados 2 isolamentos para se conseguir culturas puras.

3 RESULTADOS

Inoculação e isolamento

Neste trabalho de isolamento de linhagens extraídas do cupinzeiro e do cupim *Cornitermes cumulans* (Figura 1) foi feita a inoculação de seis (6) placas, sendo elas três (3) a diluição 10^{-1} e três (3) a diluição 10^{-2} . Nas placas, utilizando a diluição 10^{-1} (figura 1). Nesta figura observa-se a triplicata da amostra onde percebeu-se nas placas a presença de culturas mistas de microrganismos, confirmada pelas alterações de coloração que vão desde a tonalidade marrom mais escuro a claro. As formas destes, também foram expressivas e diferentes em termos de formato, desde formas arredondadas grandes e pequenas a formas espessas, sem formato definido. Nesta visualização das características fenotípicas pode-se relatar em torno de quatro (4) microrganismos distintos.

Figura 1 – Cultura mista de linhagens isoladas do cupinzeiro e cupim *Cornitermes cumulans*, diluição seriada (10^{-1}).



Fonte: Autoria própria (2021)

Nas placas a diluição 10^{-2} (Figura 2) também foi visualizada a presença de culturas mistas de microrganismos. Nesta visualização das características fenotípicas pode-se relatar em torno de cinco (5) microrganismos distintos, vale ressaltar a presença de alguns microrganismos já presentes na diluição a 10^{-1} . Não houveram diferenças significativas em relação a quantidade ou forma de microrganismos quando comparadas às placas a diluição 10^{-1} .

Figura 2 – Cultura mista de linhagens isoladas do cupinzeiro e cupim *Cornitermes cumulans*, diluição seriada 10^{-2} .



Fonte: Autoria própria (2021)

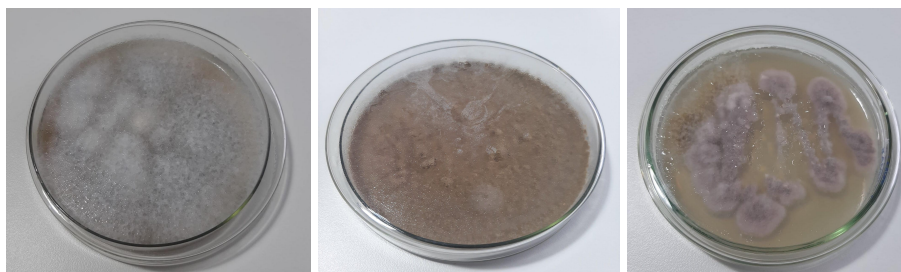
A partir da inoculação de culturas mistas de microrganismos do cupinzeiro e cupim-do-pasto, *Cornitermes cumulans*, fez-se 2 isolamentos para chegar às culturas puras. Ainda, a tonalidade das imagens pode variar devido a diferença de iluminação dos registros fotográficos. Com o isolamento obteve-se cultura pura de um microrganismo tonalidade marrom claro, apresentando formas arredondadas, um microrganismo de tonalidade marrom levemente mais escuro, em formato de pequenos círculos (Figura 3), um de tonalidade branca, espesso, sem forma definida, disperso por toda a placa de petri, um microrganismo marrom, também espesso, sem forma definida e disperso em toda a placa (Figura 4).

Figura 3 – Isolamento de linhagens do cupinzeiro e cupim *Cornitermes cumulans*.



Fonte: Autoria Própria (2021)

Figura 4 – Isolamento de linhagens do cupinzeiro e cupim *Cornitermes cumulans*.



Fonte: Autoria própria (2021)



No entanto, uma das placas de isolamento, apresentou mais de um microrganismo, assim, fez-se um segundo isolamento desta placa. A partir desse isolamento obteve-se a cultura pura de um microrganismo de tonalidade levemente violeta/rosa, de formato pequeno e arredondado (Figura 5).

Figura 5 – Isolamento de linhagens isolados do cupinzeiro e cupim *Cornitermes cumulans*.



Fonte: Autoria própria (2021)

4 CONCLUSÃO

Conclui-se a partir da realização do isolamento do cupim *Cornitermes cumulans*, com resquícios de seu habitat, a presença de 6 linhagens de microrganismos degradadores de celulose, evidenciando, assim, a necessidade de posterior identificação desses microrganismos, com relação a capacidade de degradação de celulose e produção de enzimas celulasas, devido ao grande potencial desses fungos em relação a agregação de valor aos resíduos da celulose.

REFERÊNCIAS

- FERREIRA, Hadma Souza; S., RANGEL, Maria do Carmo. **Nanotecnologia: Aspectos gerais e potencial de aplicação e catálise**. v. 32, Bahia: Quim. Nova, 2009.
- BASTOS, Ricardo Martins de Paiva. **Nanotecnologia: Uma revolução no desenvolvimento de novos produtos**. Juiz de Fora: UFJF, 2006.
- DELATORRE, Andréia Boechat. **Utilização do Bagaço de Cana como substrato para produção de celulasas pelo microrganismo termofílico Bacillus sp SMIA-2**. Rio de Janeiro: IBEAS, 2010.
- CASTRO, Heizir Ferreira. **Processos químicos industriais: Papel e celulose**. São Paulo: EEL, 2009.
- NEVES, Pedro Janeiro; ALVES, Sérgio Batista. **Controle associado de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) com fungos entomopatogênicos e o inseticida imidacloprid**. Piracicaba: Scielo, 1998.
- PRESTES, Rosilene Aparecida; IORIS, Emellyn Gabriela; PINHEIRO, Luís Antonio. **Processo de obtenção de nanocelulose e nanolignina de casca de soja pela hidrólise enzimática e consórcio com microrganismos e produtos obtidos**. Depositante: Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Depósito: 05 maio 2021.