

Caroline Macedo Carvalho, Walter Orlando Beys da Silva, Lucélia Santi, Jorge Almeida Guimarães

Centro de Biotecnologia, UFRGS

INTRODUÇÃO

Ambientes restritos normalmente são fonte de novos microrganismos com grande potencial biotecnológico. Dentro desse, contexto enquadram-se diferentes ecossistemas e microambientes, inclusive os relacionados a diferentes seres vivos. O manguezal é um ecossistema situado entre os ambientes marinho e terrestre, com solo lodoso, salobro e rico em matéria orgânica provinda da fauna e flora ali existentes. Para a decomposição dessa matéria orgânica, é necessária a atuação de microrganismos que degradem, entre outros substratos, celulose, hemicelulose e lignina das células vegetais. Outro microambiente é o sistema digestório de animais herbívoros, tais como a lagarta *Lonomia obliqua*. Essa lagarta é uma larva de mariposa, de grande relevância médica, que se alimenta exclusivamente de folhas e tem uma microbiota potencialmente associada a microrganismos lignocelulolíticos.

O interesse na conversão de biomassa em etanol tem aumentado consideravelmente nos últimos tempos, por ser um combustível renovável e de ampla produção no mundo inteiro. No processamento da cana-de-açúcar para obtenção de melão, gera-se uma grande quantidade de bagaço contendo aproximadamente 50% de celulose, sendo um dos resíduos agroindustriais mais expressivos do país. Portanto a busca por métodos eficientes de conversão de biomassa em açúcares fermentáveis é importante para o aproveitamento desse resíduo. Assim, enzimas que degradam essa biomassa, como celulases, hemicelulases e ligninases, são fundamentais para este processo.

OBJETIVO

Selecionar e avaliar a eficiência de microrganismos isolados de manguezal e do intestino da lagarta *Lonomia obliqua*, como produtores de celulases e agentes de degradação do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta: realizada em diferentes manguezais, na região de Porto Seguro (BA) e Rio de Janeiro (RJ). Além das coletas dos microrganismos de solo, foram coletados microrganismos do intestino de lagartas.

Isolamento dos microrganismos de mangue: 5 g de amostra de manguezal foi adicionado em 100 mL de meio mínimo contendo 2% de bagaço de cana-de-açúcar e cultivado em agitação à 28°C. Os microrganismos foram isolados através de plaqueamentos de diluições seriadas das culturas em diferentes intervalos de tempo, em diferentes meios de cultivo sólidos.

Isolamento dos microrganismos de lagartas *L. obliqua*: intestinos de lagartas foram removidos, picados, adicionados em microtubo contendo solução salina estéril e agitados em vórtex. O material resultante foi inoculado em diferentes meios de cultivo sólidos.

Seleção por halo de degradação em placa: os microrganismos foram cultivados por cinco dias em placas contendo meio sólido com 1% de CMC. Após o tempo de cultivo, as placas foram reveladas, utilizando-se corante vermelho congo 0,1%, e o halo de degradação foi medido.

Cultivo dos microrganismos: microrganismos previamente selecionados foram cultivados em meio de cultivo líquido contendo como substratos CMC e bagaço de cana-de-açúcar (1%), por cinco dias a 37°C (bactérias) ou 28°C (fungos filamentosos) e 180 rpm. Após isso os cultivos foram centrifugados e o sobrenadante foi utilizado para a realização de ensaios enzimáticos.

Ensaio enzimático de celulases totais e endoglicanases: realizados em microplaca pelo método do ácido 3,5-dinitrissalicílico (DNS), em triplicata, utilizando-se como substrato papel Whatman n° 1 e CMC 2%, respectivamente.

RESULTADOS

Foram isolados aproximadamente 248 microrganismos dos manguezais e 80 microrganismos dos intestinos de lagartas *Lonomia obliqua*.

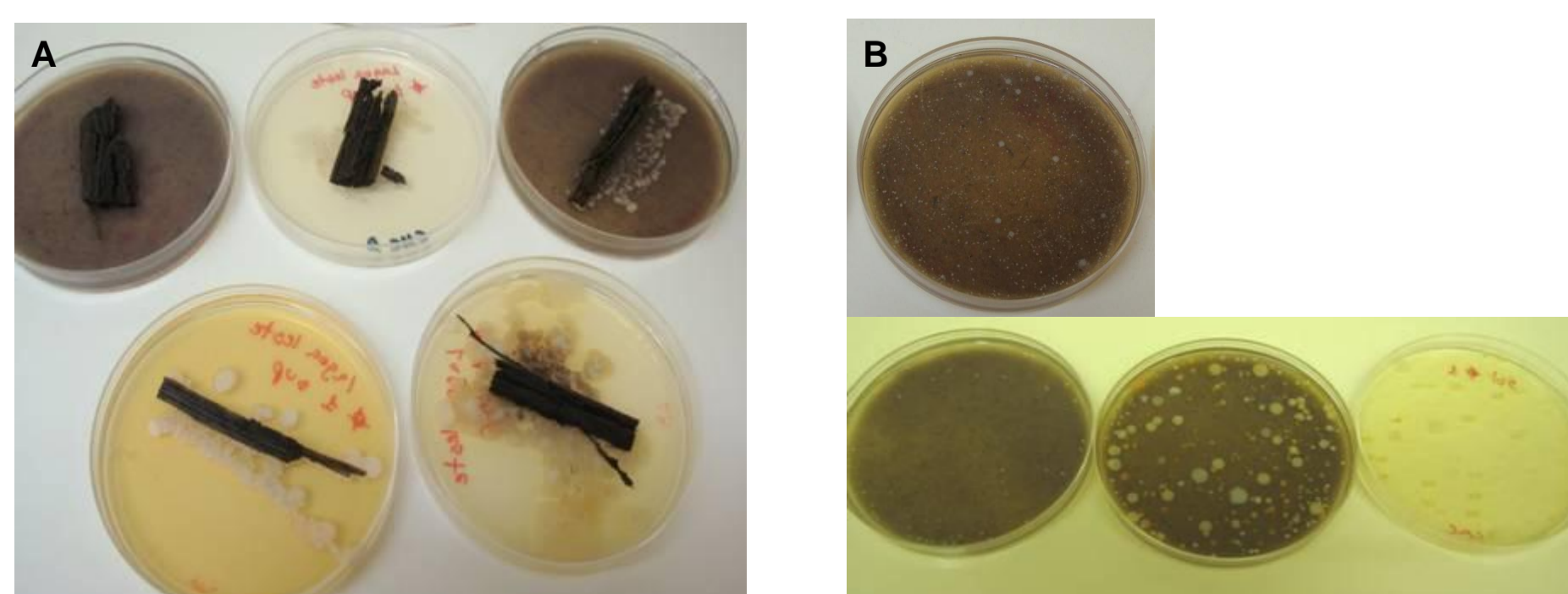


Figura 1. Plaqueamento e cultivo de microrganismos de manguezais (A) e de intestino de *L. obliqua* (B) em diferentes meios de cultivo.

Destes, 50 microrganismos foram considerados positivos para o teste de halo de degradação em placa.

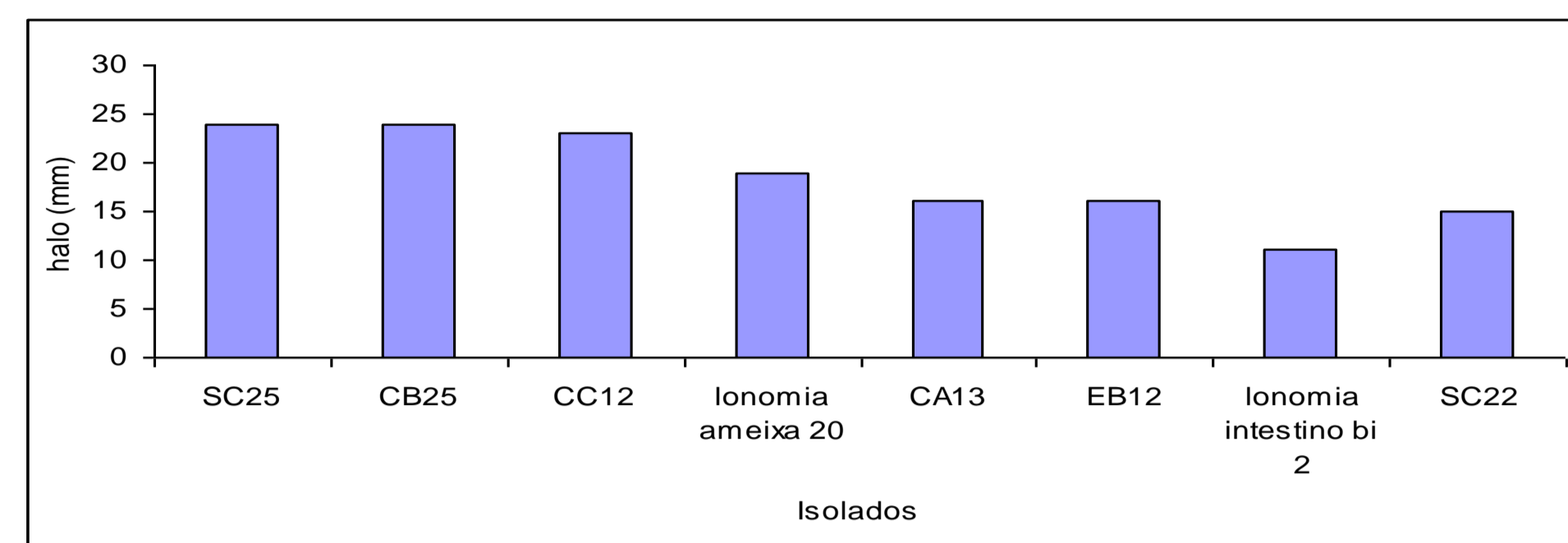


Figura 2. Medida do halo de microrganismos isolados de mangue e de intestino de *L. obliqua*.



Figura 3. Visualização do halo de degradação de microrganismos em meio contendo CMC. Detecção realizada com vermelho congo.

Microrganismos com resultado positivo no teste do halo de degradação foram selecionados para cultivo em meio líquido contendo CMC ou bagaço de cana-de-açúcar. Destes, 28 apresentaram atividade de celulases totais e/ou endoglicanases, até o momento.

Tabela 1. Atividade de celulases totais e endoglicanases de isolados de mangue e *L. obliqua*.

Isolado	Meio de cultivo	Endoglicanase (umol/mL/h)	Papel filtro (umol/mL/h)	Isolado	Meio de cultivo	Endoglicanase (umol/mL/h)	Papel filtro (umol/mL/h)
CC13	bagaco de cana	223,950	116,150	CA11	bagaco de cana	0,000	115,543
	CMC	221,367	135,057		CMC	0,000	114,708
DA19	bagaco de cana	231,850	118,430	CA12	bagaco de cana	222,885	114,784
	CMC	253,260	152,976		CMC	222,126	115,315
CB25	bagaco de cana	224,100	115,695	CA13	bagaco de cana	222,430	116,150
	CMC	221,367	152,976		CMC	222,733	115,087
Lonomia ameixa 14	bagaco de cana	223,797	116,606	CA22	bagaco de cana	221,974	111,443
	CMC	221,367	129,142		CMC	222,582	117,669
CA21	bagaco de cana	225,011	117,289	Lonomia cana 1	bagaco de cana	0,000	115,998
	CMC	221,367	128,527		CMC	222,278	115,011
EB17	bagaco de cana	225,011	116,150	Lonomia cana 11	bagaco de cana	222,733	117,062
	CMC	306,560	137,335		CMC	223,341	115,467
SC25	bagaco de cana	223,948	112,961	Lonomia cana 8	bagaco de cana	0,000	113,721
	CMC	287,426	140,296		CMC	0,000	116,302
CB22	bagaco de cana	222,733	113,872	Lonomia intestino 3	bagaco de cana	222,733	117,517
	CMC	221,367	124,882		CMC	223,493	115,391
CC12	bagaco de cana	224,556	113,417	SB11	bagaco de cana	223,341	119,188
	CMC	221,367	130,349		CMC	224,708	115,771
EB113	bagaco de cana	224,708	117,062	SB23	bagaco de cana	223,189	116,454
	CMC	334,806	133,842		CMC	230,782	0,000
Lonomia ameixa 20	bagaco de cana	224,860	117,517	TB1	bagaco de cana	223,645	111,595
	CMC	221,367	126,074		CMC	227,745	0,000
EB16	bagaco de cana	223,797	119,112	TB23	bagaco de cana	227,593	110,911
	CMC	225,011	129,666		CMC	224,708	112,050
TC22	bagaco de cana	224,100	112,278	TC12	bagaco de cana	224,404	117,441
	CMC	242,323	132,779		CMC	228,960	111,139
Lonomia intestino 23	bagaco de cana	0,000	0,000	TD11	bagaco de cana	223,797	112,582
	CMC	244,905	112,733		CMC	229,112	111,063

CONCLUSÕES

- Dos 50 microrganismos selecionados pelo teste de halo, 28 também apresentaram atividade de celulases em meio líquido.
- Estes microrganismos são capazes de crescer em bagaço-de-cana como única fonte de carbono e suas celulases são potencialmente capazes de liberar açúcares a partir desta biomassa.

PERSPECTIVAS

- Identificar os microrganismos promissores.
- Avaliar a presença de outras enzimas importantes para a degradação de compostos lignocelulósicos.
- Produzir e caracterizar as enzimas a partir dos microrganismos selecionados.
- Testar as enzimas produzidas na liberação de glicose a partir de bagaço-de-cana para produção de etanol de segunda geração.