

ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE CELULASE EM SISTEMA DE BIODIGESTÃO ANAERÓBIA DE DEJETOS BOVINOS

RESUMO

As enzimas microbianas celulolíticas são consideradas biocatalisadores com aplicação em diversos setores industriais. A biodigestão anaeróbia é um bioprocesso considerado fonte de microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial, porém é um ambiente pouco explorado. Assim sendo, este trabalho teve como objetivo isolar e identificar microrganismos produtores de celulase em biodigestor modelo canadense operado com dejetos bovinos. Foram isolados 25 microrganismos produtores de celulase, obtidos em pH de $7,21 \pm 0,25$ e temperatura de $18,83 \pm 0,20$ °C, sendo a maioria celulolíticos aeróbios e em menor número anaeróbios. Os isolados celulolíticos isolados neste estudo retratam a diversidade microbiana presente no bioprocesso e com potencial para a produção de celulase. A água de lavagem do piso free-stall e do efluente do biodigestor podem ser consideradas fontes alternativas de microrganismos capazes de produzir a enzima celulase para fins industriais.

INTRODUÇÃO

As enzimas microbianas celulolíticas são biocatalisadores, com aplicabilidade em diversos setores industriais (1). A biodigestão anaeróbia é um bioprocesso considerado uma fonte de microrganismos produtores de celulase, porém é um ambiente pouco explorado (2).

As enzimas microbianas apresentam alta estabilidade e oferecerem diversas transformações químicas consideradas eficientes e ambientalmente sustentáveis. Além de baixo custo, fácil produção em larga escala e não produção de efeitos tóxicos e resíduos perigosos (3). As celulasas estão entre as principais enzimas produzidas comercialmente para aplicações diversificadas. Essa enzima hidrolisa celulose em monossacarídeos como arabinose, galactose, glicose, manose e xilose. Ela atua quebrando as ligações glicosídicas β -1,4 (4), sendo considerada uma das enzimas industriais mais utilizadas (5).

O complexo celulolítico consiste em três enzimas, β -glicosidase, endoglucanase e exoglucanase. Essas enzimas geralmente são produzidas pelas bactérias celulolíticas *Thermobifida fusca*, *Thermonospora* spp., *Streptomyces* spp., *Ruminococcus albus*, *Thermobispora bispora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Clostridium* spp., *Cellulomonas* spp., *Bacillus* spp. e *Acetivibrio cellulolyticus* (5). Dentre esses microrganismos *Clostridium* spp. são considerados os mais isolados em biodigestores anaeróbios (7). Além das bactérias, os fungos filamentosos se destacam pela produção de celulasas industriais (5). Na indústria de alimentos, as enzimas microbianas, como a celulase, têm aplicação na extração de materiais aromatizantes e óleos essenciais, amaciamento de frutas, clarificação de sucos de frutas, otimização da filtração dos extratos e no aroma e sabor dos alimentos (5; 6). Essas aplicações demonstram a relevância de conduzir pesquisas direcionadas à bioprospecção de microrganismos produtores de celulase em ambientes pouco explorados, como na biodigestão anaeróbia.

OBJETIVO

Isolar e identificar microrganismos produtores de celulase em sistema de biodigestão anaeróbia, tipo lagoa coberta (modelo canadense) utilizado no tratamento de dejetos bovinos.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Foram isolados 25 microrganismos produtores de celulase, da água de limpeza do piso free-stall, antes do separador de sólidos e do efluente do biodigestor tipo lagoa coberta (modelo canadense), plug flow, operado à temperatura ambiente no processo de tratamento de dejetos bovinos por biodigestão anaeróbia, instalado na fazenda experimental da Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco, MG, Brasil.

Esses microrganismos produtores de celulase foram identificados por meio de microbiologia clássica, utilizando o método de diluição seriada em solução salina 0,9 % e por espalhamento superficial. Foram cultivados em duplicata, em ágar carboximetilcelulose (CMC), a 30 °C por 72 horas em aerobiose e anaerobiose. Os produtores de celulase foram identificados por meio da formação de halo ao redor das colônias em pH $7,21 \pm 0,25$ e temperatura de $18,83 \pm 0,20$ °C. Apesar da literatura descrever que o isolamento desses microrganismos ocorre em pH de 8,00 e temperaturas de 50 a 65 °C (8; 9), pode-se considerar como vantagem tecnológica que os isolados deste estudo em pH neutro e em temperatura ambiente, porque com isso pode-se estimar uma facilidade futura na manutenção e cultivo dos isolados mais promissores e produtores de celulases (Tabela 1). Os dados obtidos foram analisados por meio de estatística com cálculo de média e desvio padrão.

Os microrganismos anaeróbios produtores de celulase representam 16% do total de isolados (Tabela 1). O que corrobora com o que relata a literatura, onde refere que em isolamento de microrganismos celulolíticos cerca de 90 a 95% são em aerobiose (10). Apesar de diferentes características e fases do bioprocessamento a quantidade de microrganismos produtores de celulase isolados em cada ponto de coleta foram semelhantes

Tabela 1.: Caracterização da fonte e das condições de cultivo dos microrganismos produtores de celulase isolados de sistema de biodigestão anaeróbia de dejetos bovinos.

Fonte	pH	Temperatura (°C)	Diluição	Condição de cultivo	Número de isolados
AL	7,46 _(0,03)	19,30 _(0,42)	10 ⁻²	Aeróbio	5
AL	7,32 _(0,01)	19,07 _(0,09)	10 ⁻²	Anaeróbio	4
AL	7,45 _(0,03)	19,60 _(0,01)	10 ⁻⁴	Aeróbio	2
AL	7,40	17,00	10 ⁻⁸	Aeróbio	1
EB	7,05 _(0,03)	18,84 _(1,07)	10 ⁻²	Aeróbio	10
EB	7,06 _(0,01)	19,60 _(0,01)	10 ⁻³	Aeróbio	2
EB	7,00	17,00	10 ⁻⁴	Aeróbio	1

AL água de limpeza: água residuária da limpeza de pisos, utilizada para abastecimento dos biodigestores, coletada do sistema de produção de leite do campo experimental da Embrapa Gado de Leite, que maneja animais da raça Girolando.

EB efluente do biodigestor: saída do biodigestor antes do reservatório do biofertilizante.

Os valores entre parênteses indicam o desvio padrão.

A identificação dos isolados foi realizada por meio de testes bioquímicos. Para as bactérias Gram-negativas foram realizados os seguintes testes: motilidade, produção de indol e sulfeto, produção intracelular da enzima oxidase no citocromo C, degradação do peróxido de hidrogênio pela enzima catalase e capacidade de utilizarem o citrato como única fonte de carbono para o seu metabolismo. Os testes realizados para as bactérias Gram-positivas foram: motilidade, degradação do peróxido de hidrogênio pela enzima catalase, produção de urease e capacidade de hidrolisar esculina (11).

Os isolados identificados neste estudo (Tabela 2) não estão descritos dentre os principais produtores de celulase, retratando a diversidade microbiana do bioprocesso e o potencial para novos produtores de celulase (12; 13).

Tabela 2.: Caracterização dos microrganismos produtores de celulase isolados de sistema de biodigestão anaeróbia de dejetos bovinos.

Fonte	Coloração GRAM	Identificação fenotípica presuntiva	Número de isolados
AL	BGP	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1
AL	BGP	<i>Corynebacterium diptheriae</i>	1
AL	BGN	<i>Beijerinckia</i>	1
AL	BGN	<i>Acetobacter</i>	1
EB	BGP	<i>Corynebacterium diptheriae</i>	5
EB	BGP	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	3
EB	BGN	<i>Acetobacter</i>	1
EB	BGN	<i>Acinetobacter</i>	1

AL água de limpeza: água residuária da limpeza de pisos, utilizada para abastecimento dos biodigestores, coletada do sistema de produção de leite do campo experimental da Embrapa Gado de Leite, que maneja animais da raça Girolando.

EB efluente do biodigestor: saída do biodigestor antes do reservatório do biofertilizante.

BGP Bacilo Gram-positivo, BGN Bacilo Gram-negativo

CONCLUSÃO

Foram identificados na água de lavagem do piso free-stall e no efluente do biodigestor microrganismos celulolíticos, demonstrando assim o potencial dessas fontes alternativas de microrganismos capazes de produzir a enzima celulase para aplicações industriais.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- BHARDWAJ, N.; Kumar, B.; AGRAWAL, K.; VERMA, P. Current perspective on production and applications of microbial cellulases: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, n. 95, p. 1–34, 2021.
- DE MENDONÇA, H. V.; OTENIO, M. H.; DE PAULA, V. R. Digestão anaeróbia para produção de energia renovável. **Revista em Agronegocio e Meio Ambiente**, v. 14, n. 3, 2021.
- BABAGIL, A.; NADAROGLU, H. Purification of pectin lyase enzyme from bacillus pumilus bacteria by three-phase partitioning method (TPP), nanoflower preparation and investigation of fruit juice clarification. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 12, n. 3, p. 3938–3955, 2022.
- KUMAWAT, P. K.; SARKAR, S.; KUMAR, S.; SAHOO, A. Functional Characterization of Cellulose Degrading Bacteria Isolated From Faecal Samples of Sheep. **Indian Journal of Small Ruminants**, v. 28, n. 1, p. 52–60, 2022.
- EJAZ, U.; SOHAIL, M.; GHANEMI, A. Cellulases: From bioactivity to a variety of industrial applications. **Biomimetics**, v. 6, n. 3, p. 1–11, 2021.
- YANG, Y.; KUMRUNGSEE, T.; KATO, N.; FUKUDA, S.; KURODA, M.; YAMAGUCHI, S.; Aspergillus-Derived Cellulase Preparation Exhibits Prebiotic-like Effects on Gut Microbiota in Rats. **Fermentation**, v. 8, n. 2, p. 1–12, 2022.
- ZAKOURA, M.; KOPSAHELIS, A.; TSIGKOU, K.; NTOUGIAS, S.; ALI, S. S.; KORNAROS, M. Performance evaluation of three mesophilic upflow anaerobic sludge blanket bioreactors treating olive mill wastewater: Flocculent and granular inocula tests, organic loading rate effect and anaerobic consortia structure. **Fuel**, v. 313, p. 122951, 2022.
- KHOSRAVI, F.; KHALEGHI, M.; NAGHAVI, H. Screening and identification of cellulose-degrading bacteria from soil and leaves at Kerman province, Iran. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 1, p. 1–9,

2022.

9. SEDDOUK, L.; JAMAI, L.; TAZI, K.; ETTAYEBI, M.; ALAOUI-MHAMDI, M.; ALEYA, L.; JANATI-IDRISSI, A. Isolation and characterization of a mesophilic cellulolytic endophyte *Preussia africana* from *Juniperus oxycedrus*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 30, p. 45589–45600, 2022.

10. TANDEL, T.; PATEL, S. Production of Fungal Cellulase Enzymes and Their Applications. **International Journal of Research Publication and Reviews**, v. 3, n. 7, p. 3831–3838, 2022.

11. ANVISA. **Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica**, 2004. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicosade/microbiologia/mod_5_2004.pdf. Acesso em: 30 set. 2022.

12. CHEN, Y.; WANG, W.; ZHOU, D.; CAI, B.; ZHANG, M.; QI, D.; JING, T.; ZANG, X.; ZHANG, L.; XIE, J. *Acetobacter orientalis* XJC-C with a high lignocellulosic biomass-degrading ability improves significantly composting efficiency of banana residues by increasing metabolic activity and functional diversity of bacterial community. **Bioresource Technology**, v. 324, n. December 2020, 2021.

13. MOHAMMADIPOUR, Z.; ENAYATIZAMIR, N.; GHEZELBASH, G.; MOZZI, A. Bacterial Diversity and Chemical Properties of Wheat Straw-Based Compost Leachate and Screening of Cellulase Producing Bacteria. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, n. 3, p. 1293–1302, 2021.