

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE MICRORGANISMOS TERMÓFILOSSOLUBILIZADORES DE FOSFATO E PRODUTORES DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS

Simony Pimenta Mascarenhas Cotta¹

Christiane Abreu de Oliveira²

Ivanildo Evódio Marriel³

RESUMO

Este trabalho está voltado para a área agrícola, no sentido de possibilitar uma melhor utilização de fósforo pelas plantas, acelerar processos de produção de composto orgânico e contribuir para a otimização e o aumento da utilização de fertilizantes organominerais granulados, diminuindo assim o uso de fertilizantes com alto custo e grande potencial poluidor, além de obter bioinoculantes termófilos com potencial de utilização em processos biotecnológicos industriais que demandam altas temperaturas. Tem como objetivo isolar estirpes de microrganismos termófilos durante o processo de compostagem e testar o seu potencial biotecnológico para a solubilização de fosfato e produção das enzimas hidrolíticas amilases, celulases e fitases. Bactérias, fungos e actinomicetos foram isolados de três leiras de compostagem no município de Capim Branco, MG (Bege, Fito Alimentos e Vista Alegre), e testados

para crescimento por 2h e 4h a 60°C e a 100°C, e também para a produção de amilase, celulase e fitase. O composto “Bege” foi o que apresentou o maior número de bactérias e actinomicetos, e o “Vista Alegre” maior contagem de fungos. O composto “Fito Alimentos” apresentou a menor contagem de bactérias e não houve crescimento de fungos e actinomicetos. “Vista Alegre” apresentou maior temperatura (60,8°C), e “Fito Alimentos” a menor (25,7°C). Os testes de crescimento a 60°C e a 100°C e os de produção de enzimas estão sendo realizados. Espera-se poder realizar testes futuros com os produtos de fertilizantes organominerais enriquecidos com microrganismos termófilos, além de outras aplicações biotecnológicas industriais.

Palavras-chave: Termófilos. Organomineral. Enzimas microbianas.

¹ Bióloga, Mestranda em Biotecnologia e Gestão da Inovação pelo Centro Universitário de Sete Lagoas. E-mail: spbm@uaivip.com.br | ² Christiane Abreu Paiva, DSc., Pesquisadora em Microbiologia do Solo da Embrapa Milho e Sorgo, Professora do Mestrado Profissional em Biotecnologia e Gestão da Inovação do Centro Universitário de Sete Lagoas E-mail: christiane.paiva@embrapa.br | ³ Ivanildo Evódio Marriel, DSc, Pesquisador em Microbiologia do Solo da Embrapa Milho e Sorgo, Professor do Mestrado Profissional em Biotecnologia e Gestão da Inovação do Centro Universitário de Sete Lagoas E-mail: ivanildo.marriel@embrapa.br

1 INTRODUÇÃO

O fósforo é um nutriente essencial para os vegetais, mas apesar de ser abundante no solo, as plantas só conseguem utilizá-lo na forma de fosfato solúvel, forma que se apresenta em pequenas quantidades (SILVA *et al.*, 2012). Para suprir as necessidades de fósforo, é necessário o uso de fertilizantes fosfatados, que são produzidos a partir de fosfato de rocha, cujas reservas podem ser esgotadas até o final deste século (VASSILEV *et al.*, 2014). Esses fertilizantes, quando aplicados no solo, além de apresentarem um potencial poluidor para o meio ambiente, rapidamente se tornam indisponíveis para as plantas porque se ligam a outros compostos (SILVA *et al.*, 2012). Existem microrganismos no solo que são capazes de solubilizar o fósforo para as plantas e mineralizar as formas orgânicas de fósforo, através da produção de ácidos orgânicos e de enzimas. (LARA *et al.*, 2011; CEREZINI *et al.*, 2009). Os fertilizantes organominerais constituem uma alternativa promissora para a produção agrícola. Segundo Benites *et al.* (2010), é possível sua produção na forma granulada, com alto teor de fósforo solúvel, após a transformação biológica dos resíduos animais, associados com minerais, representando o principal desafio tecnológico para ampliar o uso desses fertilizantes no Brasil. De acordo com JSA Consultoria e Assessoria Técnica, a temperatura durante o processo de granulação se eleva a até 104°C, o que poderia matar alguns microrganismos ou desnaturar enzimas microbianas presentes no fertilizante. Microrganismos termófilos são aqueles capazes de crescer em temperaturas acima de 55°C; tais microrganismos produzem enzimas que são ativas em condições extremas de temperatura, conhecidas como termoenzimas ou enzimas termoestáveis, possibilitando seu uso em muitos processos industriais, onde esta condição é necessária (DELATORRE *et al.*, 2010; ROCHA, 2010).

A compostagem é um processo aeróbio de biooxidação, geralmente aplicada a resíduos sólidos, provenientes de diversas fontes, como resíduos urbanos, agroindustriais e agropecuários. É um processo resultante da ação de microrganismos (bactérias, actinomicetos e fungos), geralmente associados aos substratos, durante o qual ocorre uma fase termófila. Por ser um processo puramente microbiológico, sua eficiência depende da ação e da interação de microrganismos, os quais são dependentes de condições favoráveis de temperatura, umidade, aeração, pH, tipo de compostos orgânicos existentes, relação carbono/nitrogênio (C/N), granulometria do material e as dimensões das leiras. Os principais nutrientes encontrados nos resíduos animais e vegetais estão na forma orgânica e são decompostos em diferentes estágios por diferentes populações de microrganismos que secretam enzimas e digerem o seu alimento fora da célula. A biomassa sofre profundas transformações (mineralização e humificação parciais), sendo o principal produto final designado composto, estável, higienizado e homogêneo (VALENTE *et al.*, 2009; SANTOS, 2007; CUNHA-QUEDA *et al.*, 2003).

Segundo Branco *et al.* (2001), são encontradas baixas concentrações de nutrientes essenciais, como fósforo e nitrogênio, em fertilizantes organominerais produzidos a partir da compostagem de resíduos sólidos urbanos ou rurais. Para suprir a necessidade desses nutrientes, adiciona-se, *superfosfato*, além de uma fonte de nitrogênio, encarecendo o produto e tornando-o pouco competitivo. Diante disso, as biotecnologias emergentes representam um recurso que pode tornar possível a biodisponibilização do fósforo insolúvel contido no composto ou no solo.

De acordo com Delatorre *et al.* (2010), as enzimas termofílicas oferecem vantagens para o uso industrial, mas a aplicação biotecnológica dos microrganismos termófilos ainda é limitada. O crescente interesse

biotecnológico pelas enzimas produzidas por termófilos é motivado pela sua capacidade de trabalhar em condições em que as enzimas produzidas por microrganismos mesófilos são geralmente desnaturadas.

Tendo como base essas questões, este trabalho teve como objetivo selecionar microrganismos resistentes a altas temperaturas e produtores de amilase, celulase e fitase.

2 METODOLOGIA

2.1 Coleta de amostras de composto orgânico

As amostras de composto orgânico foram coletadas na cidade de Capim Branco, MG, em três leiras de compostagem: (1) composto “Bege”, no 33º dia de compostagem, feito com capim colônia picado, cama de frango, esterco bovino, fosfato de Araxá, fosfato Natural, pó de rocha (verdete), adicionado de bioinoculante; (2) composto “Fito Alimentos”, estabilizado, com mais de 12 meses, feito com resto de hortaliças, esterco bovino e capim Cameron picado; e (3) composto “Vista Alegre”, no 60º dia de compostagem, feito com capim colônia, cama de frango, esterco bovino, esterco caprino, Yoorin (termofosfato) e pó de carvão (fonte de K). As amostras foram coletadas em sacos plásticos devidamente identificados, em porções de no mínimo 200g, em triplicata, em 3 regiões diferentes da leira, no ápice, meio e base. No momento da coleta foi registrada a temperatura de cada amostra. Logo após a coleta as amostras foram colocadas em caixa de isopor e levadas para o laboratório.

2.2 Isolamento de microrganismos do composto orgânico

Pesou-se 45g de cada amostra para um tubo contendo 45 ml de solução salina estéril, que posteriormente foi submetido a 80°C, sob agitação, por 30 minutos. Esta é a diluição 10⁻¹. A partir dessa diluição foram preparadas diluições até 10⁻⁵. Antes de cada diluição as amostras foram agitadas em vortex.

De cada diluição foi transferido 0,1 ml para placas com o meio sólido específico, em triplicata: Ágar Batata Dextrose para bactérias, meio Martin para fungos e Meio Actinomiceto para actinomicetos. As placas foram incubadas a 46-48°C até o crescimento dos microrganismos (POP PS LXX 03 – Análise Qualitativa e Quantitativa da População Microbiana do Solo – Embrapa Milho e Sorgo, 2012).

2.3 Leitura das placas e seleção das colônias

Após incubação, as colônias de cada amostra foram contadas e agrupadas de acordo com a morfologia, e das colônias morfologicamente semelhantes, apenas uma foi transferida para Ágar Batata Dextrose e incubada a 46-48°C pelo tempo necessário para crescimento.

As colônias não selecionadas de bactérias, fungos e actinomicetos foram transferidas para Ágar Nutriente, e após crescidas a 50°C, conservadas em óleo mineral (DELLARETTI, 2014).

2.4 Teste de crescimento em temperaturas superiores a 50°C

As colônias isoladas de bactérias, fungos e actinomicetos foram suspensas em solução salina a 0,85%, utilizando-se, para as bactérias,

como comparação a turvação do tubo 0,5 da escala de MacFarland ($1,0 \times 10^8$ UFC/ml). Foi feita a contagem de bactérias em cada suspensão (contagem no tempo zero de incubação), nas diluições 10-3 e 10-5, em duplicata, em BDA pH 7,0. Posteriormente 0,1 ml de cada suspensão de bactérias, fungos e actinomicetos foi inoculado em BDA (Ágar Batata Dextrose), em duas repetições, para incubação a 60°C e a 100°C por 2h e 4h. A contagem de bactérias após incubação a 60°C por 2h e 4h foi feita nas diluições 10-2 e 10-3, em duplicata, e na diluição 10-1 em triplicata, após incubação a 100°C por 2h e 4h. Para fungos e actinomicetos foi observado somente a presença ou ausência de crescimento.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As contagens de bactérias, fungos e actinomicetos no composto "Bege" foram de $6,4 \times 10^6$ UFC/g, $5,3 \times 10^2$ UFC/g e $6,0 \times 10^6$ UFC/g, respectivamente, e a temperatura média no momento da coleta foi de 51,7°C. No composto "Fito Alimentos", que apresentou uma temperatura média de 25,7 °C, não houve crescimento de fungos e actinomicetos e a contagem de bactérias foi de $4,7 \times 10^4$ UFC/g. No composto "Vista Alegre" a temperatura média foi de 60,8°C, apresentando $7,7 \times 10^5$ UFC/g de bactérias, $9,0 \times 10^4$ UFC/g de fungos e $5,9 \times 10^5$ UFC/g de actinomicetos. O composto "Bege" foi o que apresentou o maior número de bactérias e actinomicetos, e o "Vista Alegre" maior contagem de fungos. O composto "Fito Alimentos" apresentou a menor contagem de bactérias e não houve crescimento de fungos e actinomicetos. Isso pode ser explicado pelo fato do com-

posto Bege possuir menor tempo de decomposição e maior atividade biológica dos microrganismos e por ser um composto enriquecido com inoculantes microbianos.

Realizou-se o isolamento de cerca de 105 morfotipos bacterianos e 9 fúngicos com base nas características macromorfológicas detectadas. Ocorreu diferença quanto ao número de isolados e morfotipos provenientes de cada local (Figuras 1, 2), sendo alguns exclusivos do tipo de composto. De acordo com a coloração bioquímica de gram realizada, todas as bactérias testadas são bastonetes gram positivos. Os testes de crescimento a 60°C e a 100°C ainda estão sendo realizados, bem como os de produção das enzimas amilase, celulase e fitase.

Com os resultados obtidos, poderão ser realizados testes futuros com os produtos de fertilizantes organominerais enriquecidos com microrganismos termófilos, avaliando-se a sobrevivência destes microrganismos nos grânulos. Espera-se também poder contribuir para futuros testes com tais enzimas na aceleração dos processos de compostagem e na resistência das enzimas ao processo de granulação, bem como com outras aplicações biotecnológicas industriais.

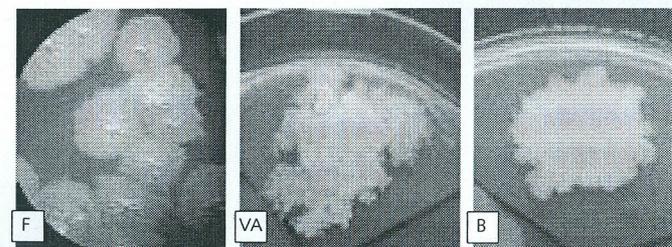


Figura 1. Bactérias isoladas dos compostos Fito Alimentos (F), Vista Alegre (VA) e Bege (B).

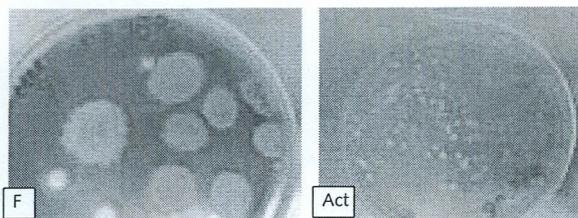


Figura 2. Fungos (F) e Actinomicetos (Act) isolados do composto "Bege".

4 REFERÊNCIAS

BENITES, Vinícius de M. *et al.* Produção de fertilizante organomineral granulado a partir de dejetos de suínos e aves no Brasil. In: XXIX Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas; XIII Reunião Brasileira sobre Micorrizas; XI Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo; VIII Reunião Brasileira de Biologia do Solo. Guarapari – ES, Brasil, 13 a 17 de setembro de 2010. Centro de Convenções do SESC. **Resumo dos Trabalhos**. Guarapari, 2010.

BRANCO, Samuel M.; MURGEL, Paulo H.; CAVINATTO, Vilma M. Compostagem: solubilização biológica de rocha fosfática na produção de fertilizante organomineral. **Engenharia Sanitária e Ambiental**. v. 6, n. 3, jul.-set. 2001 e n. 4, out.-dez. 2001.

CASTRO, Aline M.; JUNIOR, Nei P. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Quim. Nova**, v. 33, n. 1, 181-188, 2010.

CEREZINI, Paula; MILANI, Karina M. L.; BALOTA, Elcio, L. Seleção de microrganismos solubilizadores de fosfato. **Synergismus scientifica - Universidade Tecnológica Federal do Paraná**, Pato Branco, 04 (1). 2009.

CUNHA-QUEDA, Ana C. F. *et al.* Estudo da evolução de actividades enzimáticas durante a compostagem de resíduos provenientes de mercados horto-frutícolas. **Anais do Instituto Superior de Agronomia**, Lisboa, 2003. p. 193-208.

DELATORRE, Andréia B. *et al.* Microrganismos termofílicos e enzimas termoestáveis de importância comercial. **Perspectivas on line**. v.4, n. 16, 2010.

DELLARETTI, Érica M. **Preservação de fungos em baixas temperaturas**. Monografia (Bacharelado Interdisciplinar em Biosistemas). 2014. 36 f. Universidade Federal São João del-Rei, Sete Lagoas, MG.

GREINER, R.; KONIETZNY, U. Phytases: Biochemistry, Enzymology and Characteristics Relevant to Animal Feed Use. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G.G. *Enzymes in Farm Animal Nutrition*, 2nd Edition. CAB International, 2011. Cap 5, p. 96-128.

JORQUERA, Miko A. *et al.* Identification of b-propeller phytase-encoding genes in culturable *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. From the rhizosphere of pasture plants on volcanic soils. **FEMS Microbiol Ecol**, 75 (2011) 163-172.

LARA, Cecília; AVILA, Lina M. E.; PEÑATA, Jorge L. M. Bacterias nativas solubilizadores de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba-Colombia. **Rev.Bio.Agro**, v.9 n.2 Popayán July-Dec. 2011.

PANDEY, Ashok et al. Review - Advances in microbial amylases. **Bio-technol. Appl. Biochem.** (2000) 31, 135-152.

QUAN, Chunshan *et al.* Production of Phytase in a Low Phosphate Medium by a Novel Yeast *Candida krusei*. **Journal of Bioscience and Bioengineering.** v.92, n. 2, 154-160, 2001.

ROCHA, Tiago B. **Isolamento, identificação e caracterização enzimática de uma bactéria de fonte termal do Cerrado.** Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular). 2010. 124 f. Universidade de Brasília. Brasília, DF, 2010.

SANTOS, Joana L. D. **Caracterização físico-química e biológica em diferentes laboratórios de produtos obtidos a partir da compostagem de resíduos orgânicos biodegradáveis.** 2007. 144 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada). Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Porto, 2007.

SILVA, Joanna C.; GOUVEIA, Ester R. Algumas propriedades de endoglucanases produzidas por *Streptomyces* spp. em meio à base de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 02, n. 02: p. 60-70, 2008.

SILVA, Patrícia G. et al. Eficiência de Microrganismos Mineralizadores de Fitato Isolados da Rizosfera de Linhagens de Milho Eficientes e Ineficientes para o Uso de Fósforo. In: XXIX CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO - Águas de Lindóia - 26 a 30 de Agosto de 2012. **Resumo dos Trabalhos.** Águas de Lindóia, 2012.

VALENTE, B. S. et al. Fatores que afetam o desenvolvimento da compostagem de resíduos orgânicos. **Archivos de Zootecnia.** 58 (R): 59-85. 2009.

VASSILEV, Nikolay; COSTA, Gilberto M. M.; VASSILEVA, Maria. Biotechnological Tools for Enhancing Microbial Solubilization of Insoluble Inorganic Phosphates. **Geomicrobiology Journal** (2014) 31, 751-763.