

## ANAIS DO VIII SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA APLICADA



*Revista Ciência, Tecnologia & Ambiente, v. 6, n. 1, p. 1-545, 2017*

## RESUMOS EXPANDIDOS

Produção de lipase por <i>Yarrowia lipolytica</i> utilizando resíduo de manga .....	1
Triagem e identificação de microrganismos isolados do tubo intestinal de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	7
Utilização de Planejamento Fatorial para variação metabólica de <i>Annulohypoxylon stygium</i> .....	13
Alta densidade celular de <i>Clostridium carboxidivorans</i> com gás de síntese.....	20
Fitotoxicidade pela associação de vinhaça em solos com diferentes manejos.....	26
Estabilidade de surfactante produzido por estirpe de <i>Enterobacter aerogenes</i> LBPMA-BMA10.....	32
Atividade Antimicrobiana e Antibiofilme de Filtrados de Fungos Endofíticos.....	38
Avaliação da atividade inibitória de <i>Lactobacillus</i> spp. sobre <i>Salmonella Heidelberg</i> .....	44
Diversidade de fungos basidiomicetos em tocos de eucalipto.....	50
Avaliação de microrganismos contaminantes da micropropagação de pinhão manso.....	56
Biofertilizante no controle de fitonematoides em tomateiro.....	62
Monitoramento do crescimento de bactérias formadoras de biofilmes .....	67
Influência da aeração na produção de ectoína por <i>Halomonas salina</i> .....	74
Ácido indolacético produzido por <i>Torulaspora globosa</i> imobilizada em espuma poliuretano.....	79
Hidrólise enzimática de hemiceluloses extraídas de resíduos agroindustriais.....	85
Biomassa fúngica como nutriente para produção de EPS.....	91
Produção de ficocianina por <i>Aphanothece microscopica</i> Nügeli em cultivo mixotrófico suplementado com vinhaça.....	97
Preservação de <i>Lactobacillus acidophilus</i> utilizando xantana como agente encapsulante.....	103
Fermentação de xilose em etanol por leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	109
Viabilidade da inoculação de <i>Cratylia argentea</i> com microrganismos fixadores de nitrogênio para uso como forragem em vinocultura.....	115
Resíduos agroindustriais como substratos para produção de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	121
O potencial da vinhaça no crescimento de fungos do solo.....	127
Atividade celulolítica de fungos filamentosos isolados do intestino de insetos aquáticos.....	133
Produção de pectina esterase e poligalacturonase por <i>Aspergillus</i> sp.....	139
Obtenção de biossólido de lodo de esgoto anaeróbio por biolixiviação bacteriana.....	145
Atividade antibacteriana de extratos fúngicos contra a <i>Xanthomonas vesicatoria</i> .....	151
Potencial inibitório contra <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> utilizando composto natural e semissintético.....	157
Produção de invertase por <i>Aspergillus</i> sp. em condições submersas.....	163
Produção de frutosiltransferase por <i>Aspergillus</i> sp em cultivo submerso.....	169
Prospecção química de <i>Nodulisporium</i> sp: otimização das condições de cultivo.....	175
Caracterização da atividade tanásica produzida por fungos isolados da biomassa.....	181
Produção de β-Glicosidase por bactérias das amêndoas do <i>Theobroma cacao</i> .....	187
Avaliação da atividade dos metabólitos secundários contra <i>Xanthomonas vesicatoria</i> .....	193
Diversidade bacteriana do solo após desastre ambiental em Mariana, Minas Gerais.....	199
Comunidade microbiana em solos com aplicação de vinhaça e tebutiurom.....	205
Vinho de jabuticaba: análise físico-química e cariotipagem das leveduras.....	211
Fungos micorrízicos nativos e nutrição do morangueiro em sistemas orgânicos.....	217
Fungos da Antártica: Metabólitos bioativos contra <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> .....	223
Seleção de meios de cultivo para produção de poli(3-hidroxibutirato).....	229
Produção de poli(3-hidroxibutirato) por <i>Ralstonia solanacearum</i> sob diferentes condições salinas.....	235
Acumulação de lipídio e produção de lipase por <i>Candida viswanathii</i> .....	242
Avaliação da composição de micro-organismos de lodo de esgoto durante o processo de biorremediação.....	248
OSMAC: Ferramenta útil para a exploração racional da microbiota subterrânea associada a <i>Senna spectabilis</i> .....	255
Influência de biocarvão e rizosfera na microbiota do ciclo do metano em solo amazônico.....	261
Seleção de bactérias ácido láticas da silagem de capim Mombaça ( <i>Panicum maximum</i> ) baseada nas suas propriedades funcionais <i>in vitro</i> .....	267
Potencial micotoxigênico de fungos isolados de solos de vinhaça.....	273
Tolerância de <i>Stenotrophomonas acidamiliphila</i> a ácido ferúlico.....	280
Qualidade microbiológica de salgado recheado com hambúrguer vegano artesanal.....	285
Caracterização da endoglucanase usando casca de café como substrato.....	290
Fungos Antárticos: Bioatividade contra <i>Xanthomonas vesicatoria</i> e <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> .....	295
Bioacumulação de cobre no biofilme perifítico e seu impacto ecológico.....	301
Agitação e aeração do inóculo visando maior produção de P(3HB).....	307
Análise micrográfica de Poli(3-hidroxibutirato) após ensaio de degradação em solo.....	313

Determinação de metanol em biorreatores anaeróbios por NIRS-SVM.....	319
Identificação de macrofungos encontrados no Extremo Sul da Bahia.....	325
Otimização da produção de xilanases por <i>Aspergillus hortai</i> em estado sólido.....	331
Ação do cloranfenicol em bactérias presente no mosto.....	337
Bioestimulação de lodo de esgoto por meio de bagaço de cana-de-açúcar e borra de café.....	343
Densidades de <i>Enterococcus</i> sp em praia do Litoral Norte Paulista.....	349
Biodegradação em solo cultivado com cana-de-açúcar com tebutirom e vinhaça.....	355
Metabólitos de <i>Schinus terebinthifolius</i> com potencial antimicrobiano.....	361
Identificação, por desreplicação, de ácidos orgânicos produzidos por <i>Fusarium oxysporum</i> .....	367
Ação da temperatura durante o processo fermentativo.....	373
Atividade antibacteriana de filmes de gelatina e zeólita clinoptilolita-Ag.....	379
Avaliação da atividade $\beta$ -glicosídica de fungo isolado da madeira.....	385
Produção de xilanase por <i>Fusarium oxysporum</i> utilizando resíduos agroindustriais.....	391
Detoxificação de lodo de esgoto por meio de bioestimulação.....	397
Isolamento de microrganismos do sistema digestivo do peixe Curimbatá.....	403
Presença de <i>Candida</i> sp e <i>R. mucilaginosa</i> na Baía Araçá.....	409
Microbiolização de sementes com bactérias diazotróficas isoladas de milho.....	415
Seleção de fungos filamentosos produtores de celulases e otimização da produção enzimática.....	421
Influência do meio na produção de biossurfactante pela <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> .....	427
Produção de enzimas lignocelulolíticas em lodo branco por diferentes <i>Aspergillus</i> .....	433
Atividade antimicrobiana de frações de Cambará sobre microbiota de morango.....	439
Metabólitos secundários de <i>Alternaria</i> sp., fungo endofítico isolado das folhas de <i>Serjania lethalis</i> A. St.Hil.....	445
Seleção de espécies de <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> produtores de enzimas aplicadas na indústria de alimentos.....	451

## RESUMOS SIMPLES

Novel culture medium SPsA (sweet potato-sucralose-agar) for optimal growth of bacteria and filamentous fungi.....	457
Sugarcane harvesting systems alter rhizosphere bacterial communities.....	458
Evaluation of the mechanisms of degradation of lignocellulosic biomass by the basidiomycete fungus <i>Laetiporus sulphureus</i> .....	459
Experimental evolution with budding yeast: getting high on ethanol.....	460
Sex, alcohol and Darwin: experimental evolution of ethanol tolerance with fission yeast.....	461
Screening of fungal isolates from Amazon soil.....	462
Endophytic Bacteria Associated to <i>Tabebuia roseo-alba</i> : A Promissing Source of Bioactive Metabolites.....	463
Toxicity of water soluble elements evaluated by yeast metabolism.....	464
Stringent response and fatty acid starvation: Importance and implications towards drug development.....	465
Search for the role of eIF5A in endoplasmic reticulum stress using large-scale proteomic GFP screen in budding yeast.....	466
Diversity of the genus <i>Penicillium</i> isolated from Quadrilatero Ferrifero soil.....	467
Production and purification of ligninolytic enzymes by <i>Mucor racemosus</i> CBMAI 847.....	468
Temperature influence on lipase activity of <i>Trichoderma harzianum</i> immobilized on Celite.....	469
Optimization of $\beta$ -glucanase production using wastewater from the pulp industry.....	470
Oleyl oleate synthesis by lipase from <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02.....	471
Comparison of the fumigation-extraction and radiation-extraction methods in the evaluation of microbial biomass C in cave soil.....	472
Marker assisted selection for <i>Pseudocercospora griseola</i> resistance in common beans.....	473
Amino acid supplementation under industrial yeast on sugarcane bagasse hydrolysate.....	474
Time-course proteomics during <i>Aspergillus nidulans</i> growth on pre-treated sugarcane bagasse and straw.....	475
Endoglucanase activity in digestive organs content of Teredinidae.....	476
Evaluation of riboswitch theo/metE for gene silencing in <i>Xanthomonas citri</i> .....	477
Evaluation of the use of commercial biomass for the treatment of wastewater of a sugar and alcohol industry.....	478
New hydrazones: Promising compounds against <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	479
Preliminary test for kinetic study of fermentative processes of lactic acid producing <i>Metschnikovia koreensis</i> G18.....	480
The influence of edible fungi in the total and digestible protein using agro-industrial wastes as substrate.....	481
Production of extracellular biosurfactant/bioemulsifier among heavy-metal tolerant bacteria.....	482
Antimicrobial/antioxidant activity of spices used in shrimp preparation.....	483
Evaluation of bioactivity of essential oils and hydrolates in control of <i>Alternaria</i> sp, phytopathogenic fungus isolated from tomato plants.....	484

Experimental validation of an <i>in silico</i> approach for prediction of new thermostable GH11 endo-xylanases.....	485
Isolation of Bisphenol A degrading bacteria from an estuarine environment.....	486
Evaluation of Basidiomycetes secretomes in order to search for new active carbohydrate esterases.....	487
Genome features of <i>Serratia marcescens</i> UENF 22-GI: a plant growth promoting bacterium isolated from vermicomposted material.....	488
Evaluation of the anti-bacterial activity of vegetable oil esters against <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> .....	489
Ethanol fermentation of fungal extract by solid-state cultivation of <i>Trichoderma reesei</i> from sugarcane bagasse.....	490
Methodological adequacy to evaluate the reaction of common bean cultivars to <i>Pseudocercospora griseola</i> .....	491
Construction of an ultrasensitive arsenic biosensor through synthetic biology approaches.....	492
Growth and stability of immobilized <i>Desmodesmus subspicatus</i> in alginate beads for cultivation in vinasse.....	493
Trophic and microbiological conditions of an artificial receiving system for aquaculture wastes.....	494
Poison and infections food caused by microbial agents.....	495
Oxygen transfer in heterotrophic cultivation of unicellular and filamentous cyanobacterium from vinasse.....	496
Microorganism isolation for enzymatic activity verification as a form of waste industry process.....	497
Use of MALDI-TOF mass spectrometry for bacteria identification present in composting.....	498
Use of waste coffee processing for carotenoids production.....	499
Production of extracellular hydrolases and of bioflocculant of <i>Bacillus thuringiensis</i> -BDLJ2.....	500
Rosemary on polymicrobial biofilms of <i>Candida albicans</i> and <i>Streptococcus mutans</i> .....	501
Electrolytic Treatment of a Simulated Textile Effluent and Toxicology Bioassay with <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	502
Fermentative parameters in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	503
Biological treatment with microorganisms to reduce phytotoxicity of agroindustrial wastewater.....	504
Production and studies of blended enzymatic cocktails for sugarcane bagasse saccharification.....	505
Cultivation of fungus <i>Pleurotus ostreatus</i> (shimeji) in term hydrolyzed sugarcane bagasse.....	506
Determination of the Minimum Inhibitory Concentration of compounds belonging to the class N-acylidranzones and their respective Silver(I) complexes against <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	507
Evaluation of the structure and antibiotic activity of fluorophore-labeled mastoparan Polybia-MPII.....	508
Use of MALDI-TOF for wastewater fungi identification.....	509
Effect of rosemary ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.) extract on polymicrobial biofilm of <i>Candida albicans</i> and <i>Enterococcus faecalis</i> .....	510
Xylanase production by <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA isolated from bracharya, soybean and rice crop.....	511
Biotic and abiotic assessment of a wetland in a frog pond effluent.....	512
Filamentous fungi diversity in Syrah grapes variety from Jequitinhonha Valley.....	513
Production of fungal $\beta$ -1,3-glucanase using vinasse.....	514
Maintaining <i>Escovopsis</i> cultures in three preservation methods.....	515
Antifungal potential of compounds produced by actinobacteria.....	516
Obtention of Fuji apple cutin and qualitative screening for filamentous fungi cutinase producers.....	517
Bioprospecting of thermophilic fungi and producing enzymes for saccharification of lignocellulosic biomass.....	518
Microorganisms isolated from solid residue of olive oil production.....	519
Influence of different N-glycans in carbohydrate active enzymes secretion, folding and functional activity.....	520
Systemic infection by <i>Candida</i> spp. and its tropism to the central nervous system in a murine model.....	521
<i>Aspergillus nidulans</i> as a platform for recombinant production of cellulases and oxidative enzymes for biomass degradation.....	522
Influence of growth temperature on the antimicrobial activity of eugenol and thymol against <i>Staphylococcus aureus</i> tris-(1,10-phenanthroline) iron(II): drug repositioning in the treatment of Tuberculosis.....	523
Ochratoxigenic fungi isolated from different agricultural products belonging to the EPAMIG-URESM and CCDCA-UFLA cultural collections.....	524
Growth of xylose fermenters <i>S. cerevisiae</i> in sugarcane bagasse hydrolyzed.....	525
Different concepts for identification of species within <i>Fusarium fujikuroi</i> complex associated with <i>Pokkah boeng</i> of sugarcane.....	526
Sediment profile influences on methane cycle communities in Amazonian wetlands.....	527
Diversity of filamentous fungi in the south of Minas Gerais vineyards.....	528
Archaeal, bacterial and fungal responses to vinasse and nitrogen application to the sugarcane soil.....	529
Comparative analysis of the action of the adsorbents hydrotalcite, <i>Moringa oleifera</i> and activated carbon in the treatment of landfill leachate.....	530
Extraction of a yeast lipase from Antarctic environment using Aqueous Two-Phase System.....	531
Sensory analysis of fermented beverages from different yeasts.....	532
Prospecting of yeast of biotechnological interest from residual activated sludge.....	533
Biodegradation of perfluorinated compounds and their impact in soil microbiota compared to plant toxicity datasets.....	534
Novel Biotechnological Spray Formulation for Fungi and Bacteria control.....	535
Fungal strains identification for gold nanoparticles biosynthesis.....	536
	537

Production and Evaluation of the Activity of Chitinase by <i>Trichoderma reesei</i> and <i>Penicillium simplicissimum</i> .....	538
Diversity and ligninolytic activity of fungi from regions with different states of conservation of the Iguazu National Park.....	539
Selection of fungi for xylanase production.....	540
Isolation and identification of yeasts in homemade frescal minas cheese.....	541
Taxonomic assessment and antimicrobial screening of isolated bacteria from marine and terrestrial Antarctic samples.....	542
Comparison between culture media submitted with different microorganisms by the ecometric test.....	543
Microbiological evaluation of leafy vegetables produced by organic and conventional farming systems.....	544
Liquid agroindustrial waste in production of cellulase.....	545

## Produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* utilizando resíduo de manga

Adejanildo da Silva Pereira<sup>1</sup>, Gizele Cardozo Fontes<sup>2</sup>, Priscilla Filomena Fonseca Amaral<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Engenharia Bioquímica, Escola de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro  
\*e-mail: adejanildo@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Departamento de Tecnologia de Processos Bioquímicos – Universidade Estadual do Rio de Janeiro

---

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a produção de lipase por *Yarrowia lipolytica*, utilizando o tegumento fibroso do resíduo do processamento da manga variedade Ubá, suplementado com diferentes fontes de nitrogênio. A fermentação foi realizada em meio cultivo submerso, sendo este suplementado com ureia, cloreto de amônio, sulfato de amônio, extrato de levedura, triptona de soja, triptona T1, milhocina, peptona e extrato de levedura/peptona, todos na concentração de 2 g/L. Os resultados evidenciaram que o emprego de meios suplementados com extrato de levedura, peptona e triptona T1 apresentam potencial para a produção de lipase extracelular, apresentando uma atividade máxima 3412, 1490 e 1142 U/L respectivamente. O emprego dos demais meios de cultivo não se mostraram eficazes na produção da enzima de interesse. Portanto, o tegumento fibroso da manga variedade Ubá suplementado com fontes de nitrogênio pode ser uma alternativa para a produção de lipase extracelular.

**Palavras-chave:** Bioprocess; nitrogênio; levedura; enzima.

---

### Production of lipase by *Yarrowia lipolytica* using mango residue

### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate lipase production by *Yarrowia lipolytica*, using the fibrous tegument of the residue of the Ubá mango variety, supplemented with different nitrogen sources. The fermentation was carried out in a submerged culture medium, supplemented with urea, ammonium chloride, ammonium sulfate, yeast extract, tryptone from soybean, tryptone T1, corncine, peptone or yeast extract / peptone, all at the concentration of 2 g / L. The results evidenced that the use of media supplemented with yeast extract, peptone and tryptone T1 present a potential for the production of extracellular lipase, presenting a maximum activity of 3412, 1490 and 1142 U / L respectively. The use of the other culture media did not prove effective in the production of the enzyme of interest. Therefore, the fibrous tegument of the Ubá mango variety supplemented with nitrogen sources may be an alternative for the production of extracellular lipase.

**Keywords:** Bioprocess; nitrogen sources; yeast; enzyme.

## INTRODUÇÃO

Lipases são enzimas hidrolíticas, que têm como principal função realizar a hidrólise de óleos e gorduras liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (JAEGER & REETZ, 1998). Estas são enzimas de grande aplicação, tanto em nível industrial (indústria alimentícia, de cosméticos e perfumes, biomédica, pesticidas, detergentes, entre outras) como no acadêmico (BREUER et al., 2004).

As lipases podem ser de origem vegetal, animal ou microbiana. Os microrganismos como as bactérias e fungos, são reconhecidos como bons produtores de lipase extracelular (TREICHEL et al., 2010). Dentre os fungos a espécie da levedura *Yarrowia lipolytica* possui grande potencial para ser usada na produção destas enzimas.

A utilização de resíduos agroindustriais como substrato para a produção de bioproductos, como enzimas, tem sido bastante estudada, pois esta é uma alternativa que contribui para a redução dos custos dos bioprocessos e também agrega valor a esses materiais. Entre os resíduos gerados pelas indústrias alimentícias está o resíduo da manga, o qual pode ser uma importante matéria-prima para ser empregada como meio de cultura para o crescimento celular e produção de lipases.

Portanto, neste trabalho, objetivou-se a produção de lipases por fermentação submersa a partir da cepa *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, utilizando como matéria-prima o tegumento fibroso do resíduo industrial da manga Variedade Ubá.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Matéria-prima

O resíduo agroindustrial da manga foi fornecido pela Tial – Tropical Indústria de Alimentos S/A e utilizado como matéria-prima nas fermentações. O material foi previamente seco e seus componentes separados manualmente (casca, tegumento fibroso e amêndoas). O tegumento fibroso, matéria-prima empregada neste estudo, foi posteriormente moído e peneirado em peneira com tamanho de partícula menor que 0,80 mm. Após estes procedimentos os mesmos foram embalados em sacos de polietileno até o momento de serem empregados.

### Preparação do Inóculo

Foi utilizada a levedura *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, isolada da Baía de Guanabara, estocada em meio YPD contendo ágar (1% extrato de lêvedo, 2% peptona, 2% glicose) a temperatura de 4°C. O pré-inóculo foi realizado em erlenmeyer de 1000

mL contendo 400 mL de meio YPD, agitado em shaker a 160 rpm, 28°C por 72h. A densidade óptica (570 nm) de uma amostra deste cultivo foi determinada visando encontrar a concentração inicial células por meio da curva de peso seco; em seguida as células foram centrifugadas em tubos falcon de 50 ml a 3000 rpm por 5 minutos e adicionadas ao meio de produção.

### **Produção de lipase**

O processo fermentativo foi realizado em meio cultivo submerso. Este foi conduzido em erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL meio fermentativo, os quais foram mantidos em shaker a 160 rpm a 28°C durante 20 horas. O meio fermentativo foi suplementado com diferentes fontes de nitrogênio na concentração de 2 g/L. Ureia, cloreto de amônio, sulfato de amônio, extrato de levedura, triptona de soja, triptona T1, milhocina, peptona e extrato de levedura/peptona foram as fontes investigadas. Após 20 h de cultivo alíquotas de 20 ml foram retiradas e centrifugadas a 4°C, 3000 rpm durante 5 minutos, sendo o sobrenadante recolhido e congelado para a avaliação da lipase extracelular.

### **Avaliação da Atividade da Lipase**

A atividade da lipase foi estimada mediante a variação da absorbância a 410 nm em espectrofotômetro, devido à oxidação do *p*-nitrofenil laurato (*p*-NFL) com uma concentração de 0,162 mg.mL<sup>-1</sup> em tampão fosfato de potássio (0,05 M), pH 7,0 (PEREIRA & MEIRELLES, 1997).

### **Análises estatísticas**

A avaliação dos dados obtidos neste experimento foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% de significância, utilizando o software **Statistica®** versão 7.0.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

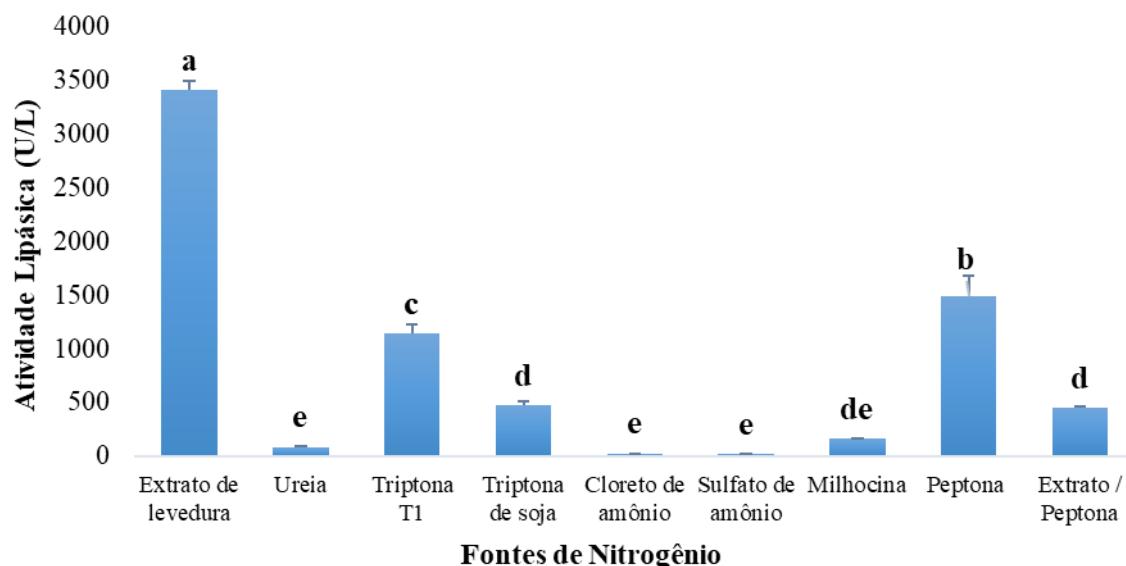
Em estudos anteriores realizados por Pereira et al. (2016) não foi detectada produção de lipase extracelular quando se empregou o resíduo total da manga e suas combinações, sendo observado atividade lipásica apenas quando se utilizou o tegumento fibroso como matéria-prima. Assim, nesse estudo foram realizados experimentos com tegumento fibroso da manga suplementado com diferentes fontes de nitrogênio. Os dados obtidos foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) (Tabela 1).

**Tabela 1** – Resultado da ANOVA para a atividade lipásica obtida para o cultivo com o tegumento fibroso da manga suplementado com diferentes fontes de nitrogênio

FV	GL	SQ	QM	F	p
Fonte de Nitrogênio	8	19628641	2453580	410,863	0,000000
Resíduo	9	53746	5972		
<b>Total</b>	17	19682387	2459552		

**GL** = Graus de liberdade; **SQ** = Soma de Quadrados; **QM** = Quadrado Médio; **F** = Teste de Fisher, **p** = probabilidade.

Observando a Tabela 1 verifica-se que as fontes de nitrogênio foram significativas ( $P<0,05$ ). Assim, realizou-se um teste de Tukey para identificar as diferenças entre as médias das atividades lipásicas obtidas com as fontes de nitrogênio (Figura 2).



**Figura 2** – Atividade da lipase em meio de cultivo contendo o tegumento fibroso da manga variedade Ubá suplementada com diferentes fontes de nitrogênio com 20 horas de fermentação.

**Nota:** Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem entre si a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Observa-se que a melhor fonte de nitrogênio foi o extrato de levedura, apresentando uma atividade máxima de 3412 U/L após 20 horas de fermentação. O extrato de levedura é eficiente na produção de lipases, pois além de ser uma fonte de nitrogênio é também uma boa fonte de vitaminas (Li et al., 2004). Galvagno et al. (2011) também obtiveram aumento na produtividade de lipase ao usar o extrato de levedura. Fickers et al. (2006) observaram uma atividade máxima de 1118 U/mL utilizando 3% de extrato de levedura, 3% de soro de leite, 1,5% de glicose e 0,5% de azeite de oliva.

Depois do extrato de lêvedo, as maiores atividades foram quando se empregou peptona bacteriológica ou triptona T1, observando-se valores máximos de 1490 e 1142 U/L, respectivamente. No entanto, a combinação de extrato de lêvedo e peptona não favoreceu a produção de lipase. Rajendran e Viruthagiri (2007) utilizaram peptona como fonte de nitrogênio e observaram o aumento da atividade com o incremento da concentração de peptona. A utilização da ureia, do sulfato de amônio, do cloreto de amônio e da milhocina não foram eficientes para a produção da lipase. Pereira-Meirelles et al. (1997) também encontraram valores baixos para a atividade da lipase quando a ureia foi utilizada.

## CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo indicaram que o extrato de levedura foi a fonte de nitrogênio que mostrou maior potencial em aumentar a produção da lipase extracelular, apresentando uma produção máxima de 3412 U/L. O uso da peptona ou da triptona também aumentou consideravelmente a produção, observando-se valores máximos de 1490 e 1142 U/L respectivamente. A ureia, o sulfato de amônio, o cloreto de amônio, a milhocina e a mistura extrato de levedura/peptona não apresentaram potencialidade de aplicação neste estudo. Portanto, pode se concluir o resíduo do tegumento fibroso da manga variedade Ubá apresenta-se como uma alternativa para a produção de lipase extracelular pela levedura *Yarrowia lipolytica*.

## AGRADECIMENTO

Os autores agradecem a FAPERJ pelo apoio financeiro no desenvolvimento do trabalho.

## REFERÊNCIAS

- BREUER, M., DITRICH, K., HABICHER, T., HAUER, B., KESSELER, M., STURMER, R., ZELINSKI, T., BROCKMAN, H. L., BORGSTROM, B., 2004. Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angewandte Chemie International.*, n.43, v.7, p.788-824. 10.1002 / anie.200300599.
- FICKERS P., ONGENA M., DESTAIN J., WEEKERS F., THONART P., 2006. Production and down-stream processing of an extracellular lipase from the yeast

Yarrowia lipolytica. *Enzyme Microbiol. Technol.* 38:756-759.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.08.005>.

GALVAGNO, M.A., IANNONE, L.J., BIANCHI, J., KRONBERG F., ROST, E., CARSTENS, M.R., CERRUTTI, P.P., 2011. Optimization of biomass production of a mutant of *Yarrowia lipolytica* with an increased lipase activity using raw glycerol. *Microbiology Argentina journal.* 43, 218-225. 10.1590 / S0325-75412011000300010.

JAEGER, K.; REETZ, M. T., 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Tibtech*, v. 16, p. 396-403. [Http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01195-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01195-0).

Li, C.Y., Cheng, C.Y., Chen, T.L., 2004. Fed-batch production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* using Tween 80 as the carbon source. *Biochemical Engineering Journal.* 19, 25–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2003.09.006>.

PEREIRA, A.S., FONTES, G.C., AMARAL P.F. F., 2016. Produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* a partir do resíduo do processamento agroindustrial da manga (*Mangifera indica* L. var ubá), suplementado com diferentes fontes de nitrogênio. In *Anais do XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos - CBCTA*. Gramado: SBCTA Regional.

PEREIRA-MEIRELLES, F.V., ROCHA-LEÃO, M.H. E SANT'ANNA, G.L., 1987. “A stable lipase from *Candida lipolytica* – cultivation conditions and crude enzyme characteristics”, *Applied Biochemical. Biotechnology*, v.63-65, p.73-85. <http://dx.doi.org/10.1007 / BF02920414>.

RAJENDRAN A., VIRUTHAGIRI T., 2007. Optimization of medium composition for lipase production by *Candida rugosa* NCIM 3462 using response surface methodology. *Can. J. Microbiol.* 53:643-655. <http://dx.doi.org/10.1139 / W07-017>.

TREICHEL H.; OLIVEIRA D.; MAZUTTI, M. A.; LUCCIO M.; OLIVEIRA J. V., 2010. Review on Microbial Lipases. *Production Food Bioprocess Technology*, 3,182–196. <http://dx.doi.org/10.1007 / s11947-009-0202-2>.

## **Triagem e identificação de microrganismos isolados do tubo intestinal de *Culex quinquefasciatus***

Adriano Guimaraes Parreira<sup>1,2</sup>; José Márcio Gomes Fernandes<sup>1</sup> Stenio Nunes Alves<sup>2</sup> Eduardo José Azevedo Correa<sup>3</sup>

\*aguiparreira@ufs.edu.br (autor para correspondência):

<sup>1</sup>UEMG-Unidade Divinópolis MG.

<sup>2</sup>UFSJ-CCO

<sup>3</sup>EPAMIG- Pitangui MG

### **RESUMO**

Mosquitos são insetos dípteros pertencentes à família Culicidae e em grande parte hematófagos. Dos gêneros dessa família, *Culex* e *Aedes* tem grande importância sanitária no Brasil. Estão presentes em todo território nacional e, na tentativa de combatê-los, buscam-se novas alternativas tendo em vista relatos de resistência aos inseticidas tradicionalmente empregados. Uma das possibilidades de controle da infestação e transmissão de doenças seria por meio de controle biológico, com o emprego de bactérias endosimbiontes presentes na microbiota intestinal dos insetos e capazes de bloquear a transmissão de vírus diversos. Com base nestas considerações, o presente projeto buscou identificar espécies bacterianas cultiváveis presentes no tubo intestinal de espécimes de *Culex quinquefasciatus* assim como avaliar os efeitos de inseticidas comumente utilizados sobre as bactérias residentes. Para tal, foram montadas cubas ao ar livre para a obtenção de larvas de *Culex* e mosquitos adultos. Em seguida, as larvas e mosquitos tiveram seu trato intestinal assepticamente retirado e o material triturado e plaqueado em meio BHI a fim de se obter culturas bacterianas para identificação a nível de espécie. Foram identificadas várias espécies de bactérias empregando-se espectrometria de massas sendo que a maioria delas não apresenta relatos na literatura quanto a sua presença e colonização do trato intestinal de espécimes do gênero *Culex* além de provados os efeitos danosos do uso do inseticida temefós sobre a micobiota naturalmente encontrada em insetos daquele gênero.

**Palavras-chave:** Microbiota, intestino, Culicidae, controle biológico.

## **Screening and identification of microorganisms isolated from the intestinal tube of *Culex quinquefasciatus***

### **ABSTRACT**

Mosquitoes are dipterous insects belonging to the Culicidae family and largely hematophagous. Of the genera of this family, *Culex* and *Aedes* have great sanitary importance in Brazil. They are present throughout the national territory and, in an attempt to combat them, new alternatives are sought in view of reports of resistance to insecticides traditionally employed. One of the possibilities of control of infestation and transmission of diseases would be through biological control, with the use of endosymbionts bacteria present in the intestinal microbiota of insects and capable of blocking the transmission of various viruses. Based on these considerations, the present

project aimed to identify cultivable bacterial species present in the intestinal tube of specimens of *Culex quinquefasciatus* as well as to evaluate the effects of commonly used insecticides on resident bacteria. For this, vats were set up outdoors to obtain Culex larvae and adult mosquitoes. Then, the larvae and mosquitoes had their intestinal tract aseptically removed and the material crushed and plated on BHI medium in order to obtain bacterial cultures for identification at the species level. Several species of bacteria were identified using mass spectrometry and most of them do not present reports in the literature regarding their presence and colonization of the intestinal tract of specimens of the genus Culex, besides proving the harmful effects of the use of the insecticide temefós on the mycobiota Naturally found in insects of that genus.

**Keywords:** Microbiota, intestine, Culicidae, biological control.

---

## INTRODUÇÃO

Mosquitos são insetos dípteros pertencentes à família Culicidae, conhecidos também como pernilongos, muriçocas ou carapanãs, adultos são alados, possuem pernas e antenas longas e na sua grande maioria são hematófagos. Entre os Culicidae encontramos a maior subfamília, Culicinae, com cerca de 3000 espécies divididas em 10 tribos que reúnem 34 gêneros. Destes, os gêneros *Culex* e *Aedes* tem grande importância sanitária no Brasil, sendo o último vetor relacionado a transmissão da dengue, febre amarela chikungunya e zika vírus (TSETSARKINT et al., 2014), enquanto *Culex* relaciona-se a transmissão da filariose, ainda comum em diversas partes do globo. Estão presentes em todo o território nacional, são antropofílicos, tendo, portanto, especial preferência pelo sangue humano. As fêmeas picam seus hospedeiros no intradomicílio e no peridomicílio ao entardecer e ao amanhecer, podendo agir a noite ou qualquer hora do dia, sendo considerado mosquito oportunista (IOC/FIOCRUZ, 2016). Em 2015 o ministério da saúde confirmou a circulação do zika vírus em algumas regiões do Brasil, no dia 10 de fevereiro de 2016, a OMS declarou situação internacional de emergência em saúde pública em razão do aumento de casos de infecção pelo zika vírus em diversos países e de uma possível relação da doença com quadros registrados de malformação congênita e síndromes neurológicas (BRASIL, 2016). Na tentativa de combatê-los, a indústria química vem investindo na busca de novos produtos, pois existem relatos de vários casos de resistência aos empregados atualmente para controle de espécimes de *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti* (SUAREZ et al., 1996). Atualmente, uma alternativa que vem merecendo atenção refere-se ao controle biológico de *A. aegypti* com o emprego de bactérias endosimbiontes, presentes na microbiota intestinal de diversos insetos, podendo causar infecções ou bloquear a transmissão de alguns vírus (WALKER et al., 2011). Desse modo, é de extrema importância o conhecimento da microbiota do tubo

digestivo dos artrópodes, em especial aqueles da família Culicidae, a fim de se promover estudos mais detalhados acerca das principais espécies de micro-organismos presentes e suas possíveis potencialidades quanto ao controle biológico relacionado a proliferação dos vetores. Com base no que foi exposto, o presente trabalho buscou realizar a triagem, cultivo e identificação de microrganismos cultiváveis isolados do trato intestinal de espécimes de *C. quinquefasciatus* assim como avaliar os efeitos do uso do inseticida tradicional temefós sobre a microbiota residente de espécimes daquela espécie.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Obtenção e manutenção dos espécimes de *C. quinquefasciatus***

Para a obtenção dos espécimes de *C. quinquefasciatus* presentes em campo foram empregados: cubas plásticas (50 X 40 X 25cm) contendo 25 L de água deionizada e 200g de ração, rotineiramente utilizada para a alimentação de camundongos (Labina - Purina®). As larvas de *C. quinquefasciatus* foram obtidas de criadouro semi- natural da Universidade Federal de São João Del Rei - Campus Centro-Oeste Dona Lindu em Divinópolis, MG. As cubas que continham ovos eram periodicamente levadas ao insetário da UFSJ-CCO e lá deixadas sob condições de temperatura e umidade controladas, até a eclosão dos mesmos.

### **Obtenção dos tubos intestinais e isolamentos microbianos**

Larvas de *C. quinquefasciatus* de 3 e 4 instar, obtidas a partir da eclosão dos ovos, foram coletadas e levadas para a extração dos tubos intestinais. Outras larvas foram deixadas na cuba, e aguardou- se que as mesmas se tornassem insetos adultos e, com isso, sendo levadas posteriormente para a extração do trato intestinal. Os tubos eram retirados e depositados em Eppendorfs contendo solução PBS e armazenados sob refrigeração para posterior utilização. Volumes de 10 µL da solução contendo os tubos macerados foram pipetados em placas de petri contendo meio BHI, empregando-se a técnica de spread-plate. Feito isso, eram levadas até estufa bacteriológica mantida a 37oC e incubadas por até 24 horas, com vistas a obtenção das colônias em placas. Após o crescimento eram feitos repiques com vistas a obtenção de culturas puras, A partir de então a foram executados procedimentos de caracterização bioquímica empregando-se testes IMVic. Colônias mais comuns eram selecionadas identificação em nível de espécie por espectrometria de massas, conforme Muniaraj et al. (2012). Experimentos adicionais foram executados buscando avaliar o efeito do inseticida temefós sobre a microbiota intestinal dos insetos. Foi promovida a exposição das larvas selecionadas ao

inseticida em intervalos de 24 a 72h, seguindo-se os mesmos procedimentos de isolamento dos tubos digestivos, inoculações e incubações descritos anteriormente. A concentração do inseticida comumente empregada e utilizada nos experimentos foi de 1,2  $\mu$ L.L-1, com vistas a manutenção de condições assépticas durante as manipulações foram seguidos os procedimentos descritos por Jarusevicius (2013). A dissecção foi realizada com auxílio de protocolo padrão (COLEMAN et al, 2007) empregando-se um microscópio estereoscópico Stemi DV4 (Carls Zeiss).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No que se refere aos experimentos de isolamento e identificação dos micro-organismos encontrados no trato intestinal de larvas e insetos adultos de *C. quinquefasciatus*, foi possível observar considerável diversidade de espécies bacterianas cultiváveis. As colônias que apresentavam diferenças demostradas por características bioquímicas reveladas pelos testes IMVic foram identificadas a nível de espécie por espectrometria de massas. Observou-se um total de seis espécies bacterianas diferentes a partir dos isolados selecionados. Importante ressaltar que tais microrganismos foram isolados tanto do trato intestinal de adultos quanto de larvas de *C. quinquefasciatus*. Das várias espécies encontradas, *Bacillus safensis* é relatada como uma potente promotora do crescimento em plantas (Kothari et al., 2013), embora, na literatura não são encontrados relatos de patogenicidade em humanos. Já *Corynebacterium amycolatum* é descrita como causadora de septicemia, peritonite, endocardite e mastite em humanos e outros animais (ANVISA, 2013). *Sphingobacterium multivorum*, por sua vez, raramente está associada a infecções em humanos, embora pacientes com lesões graves possam apresentar infecção respiratória causada por esta espécie (LAMBIASE et al, 2009). *Aeromonas hydrophila* apresenta atividade citotóxica (KHAJANCHI et al, 2010) o que pode ocasionar patogenia em humanos. *Curtobacterium albidum* e *Microbacterium oxydans* não apresentam relatos na literatura que as relacionam com doenças em animais. Não foram encontrados estudos ou relatos na literatura a respeito da presença das espécies bacterianas aqui identificadas no trato digestivo de membros da família Culicidae sendo, portanto, a primeira descrição de tais espécies bacterianas isoladas daquele ambiente. Do experimento realizado com larvas expostas ao inseticida Temefós, em diferentes intervalos de tempo, vale ressaltar que apenas as larvas do tratamento controle permaneceram viáveis. As larvas do Teste 1 (24 horas após), Teste 2 (48 horas após) e Teste 3 (72 horas após a exposição ao inseticida) morreram após os intervalos de

exposição, porém, foi possível identificar 4 tipos diferentes de espécies bacterianas. Para os tratamentos T2 e T3, no entanto, foram encontradas as mesmas espécies de bactérias, ou seja, após a exposição ao inseticida a partir de 48h prevalecem as espécies encontradas a partir daquele intervalo de exposição. O tratamento Controle 1 revelou o predomínio de bactérias identificadas como *Serratia fonticola*, relatada na literatura como um patógeno incomum em seres humanos (ALJORAYID et al, 2016). Já para o Controle 2 foram encontradas bactérias da espécie *Raoultella ornithinolytica* que, segundo a literatura, pode representar um agente infeccioso em casos raros, principalmente em pacientes com lesões graves (KAYA et al, 2015). Em T1, foram encontradas bactérias da espécie *Pseudomonas mosseli*, isenta de relatos que envolvem importância clínica. Em T2 e T3 observou-se, por sua vez, predomínio da espécie *Aeromonas hydrophila*, já relatada anteriormente, e encontrada com frequência no tubo digestivo de insetos adultos não expostos ao inseticida Temefós. De igual maneira, não são encontrados relatos na literatura que fazem menção ao efeito do inseticida Temefós sobre a microbiota cultivável do tubo digestivo de espécimes de *C. quinquefasciatus*, sendo este trabalho um primeiro relato relacionado.

## **CONCLUSÕES**

Por meio deste trabalho foi possível identificar espécies bacterianas cultiváveis, isoladas de tubos digestivos de larvas e insetos adultos de *C. quinquefasciatus*, até então não descritas na literatura, assim como o efeito do inseticida comumente utilizado, o organofosforado Temefós, sobre a microbiota que habita o trato intestinal de *C. quinquefasciatus*. Faz-se necessário, contudo, estudos complementares a fim de se avaliar o efeito do inseticida em intervalos de tempo menores, assim como ampliar os estudos para isolamentos em espécimes de *A. aegypti*.

## **AGRADECIMENTOS**

À UEMG-Unidade Divinópolis MG e a UFSJ-Campus CCO.

## **REFERÊNCIAS**

- ALJORAYID, A.; VIAU, R.; CASTELLINO, L.; JUMP, R. L.P. *Serratia fonticola*, pathogen or bystander? A case series and review of the literature doi: 10.1016/j.idcr.2016.05.003, 2016.
- ANVISA. Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. V. 1, pág 88, 2013.
- BRASIL. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO - Volume 47 - no 08 - 2016 - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 5, 2016.

- FORATINI, O. P. Culicidologia Médica. Vol. 2. Edusp. São Paulo, 2002.
- JARUSEVICIUS, J. Análise microbiológica da flora intestinal do mosquito *Aedes aegypti* através do sequenciamento do gene 16S rRNA na plataforma Illumina MiSeq. 2013. 36 f. Monografia apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, para obtenção de título de Bacharel em Ciências Biomédicas. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Instituto de Biociências de Botucatu. Departamento de Parasitologia. Botucatu. 2013.
- KAYA, S.; BAYRAMOGLU, G.; SÖNMEZ, M.; KÖKSAL, I. *Raoultella ornithinolytica* causing fatal sepsis. *Braz J Infect Dis*, vol. 19, n 2. Salvador, 2015.
- KHAJANCHI, B. K.; FADL, A. A.; BORCHARDT, M. A.; BERG, R. L.; HORNEMAN, A. J.; STEMPER, M. E.; JOSEPH, S. W.; MOYER, N. P.; SHA, J; CHOPRA, A. K. Distribution of virulence factors and molecular fingerprinting of *Aeromonas* species isolates from water and clinical samples: suggestive evidence of water-to-human transmission. *Applied and Environmental Microbiology*. V. 76, n. 7, p. 2313 – 2325, 2010.
- KOTHARI W, KOTHARI RK, KOTHA CR, BHATT VD, NATHANI NM, KORINGA PG, JOSHI CG, VYAS. Genome sequence of salt-tolerance *Bacillus safensis* strain VK, isolated from saline desert area of Gujarat, India. *Genome Announc.* 1(5):e00671-13. doi: 10.1128/genomeA.00671-13, 2013.
- LAMBIASE, A.; ROSSANO, F.; PEZZO, M. D., RAIA, V.; SEPE, ANGELA; GREGORIO, F.; CATANIA, M. R. *Sphingobacterium* respiratory tract infection in patients with cystic fibrosis, doi: 10.1186/1756-0500-2-262, 2009.
- MAZZARRI, M.B.; GEORGHIOU, G.P. Caracterization of resistance to organophosphate, carbamate and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *Journal of American Mosquito Control Association*; v.11, p.315-22, 1995.
- TSETSARKIN, K.A; CHEN, R; YUN, R; ROSSI, S.L; PLANTE, K.S; GUERBOIS, M; FORRESTER, N; PERNG, G.C; SREEKUMAR, E; Leal, G. Multi-peaked adaptive landscape for chikungunya virus evolution predicts continued fitness optimization in *Aedes albopictus* mosquitoes. *Nat. Commun.* 5. 2014.
- WALKER, T., JOHNSON, P.H., MOREIRA, L.A., ITURBE-ORMAETXE, I., FRENTIU, F.D., MCMENIMAN, C.J., LEONG, Y.S., DONG, Y., AXFORD, J., KRIESNER, P., LLOYD, A.L., RITCHIE, A., O'NEILL, S.L., HOFFMANN, A.A. The wMel Wolbachia strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature* 476, 450–453.2011.
- COLEMAN, J. et al. Dissection of Midgut and Salivary Glands from *A. aegypti* Mosquitoes. J. Vis. Exp. v. 5, 2007.

## **Utilização de Planejamento Fatorial para variação metabólica de *Annulohypoxylon stygium*.**

Alana Evangelista Honório<sup>1\*</sup>; Alan Cesar Pilon<sup>1</sup>; Dulce Helena Siqueira Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. \*e-mail: (lana\_quim@yahoo.com.br)

---

### **RESUMO**

A busca por substâncias bioativas tem impulsionado estudos em novas fontes naturais até então inexploradas, como os organismos marinhos, fungos, entre outros. Neste sentido, os micro-organismos, em especial, aqueles obtidos a partir de organismos marinhos têm desempenhado um papel importante na produção de metabólitos com esqueletos moleculares inéditos de alta diversidade estrutural e com um grande potencial terapêutico. Dentro deste contexto, este estudo visa estabelecer, através de ferramentas quimiométricas (Planejamento Fatorial 2<sup>3</sup>), quais condições de cultivo fornecem as maiores quantidades, em massa, de extrato do fungo endofítico *Annulohypoxylon stygium* isolado da alga vermelha *Acanthofera spicifera* e como estas variações podem afetar a diversidade química de seus metabólitos secundários. O uso desta abordagem visa facilitar o desenvolvimento das etapas subsequentes de isolamento de novos compostos bioativos, além de contribuir com o avanço nos estudos da química de micro-organismos associados as espécies marinhas.

**Palavras-chave:** fungo endofítico, alga vermelha, *Acanthophora spicifera*, anticolinesterásica.

---

**Use of design of experiments for evaluation of the metabolic production from endophyte *Annulohypoxylon stygium*.**

### **ABSTRACT**

The search for bioactive products has impelled studies in new natural sources until then unexplored, such as marine organisms, fungus, among others. In this sense, microorganisms, especially those obtained from marine organisms, have played an important role in the production of metabolites with novel molecular skeletons of high structural diversity and with great therapeutic potential. In this context, this study aims to establish, through chemometric tools (Factorial Planning 2<sup>3</sup>), which cultivation conditions provide as the largest mass of extract of Endophytic fungus *Annulohypoxylon stygium* isolated from red algae *Acanthofera spicifera* and how these variations can affect the chemical diversity of its secondary metabolites. The use of this approach aims to facilitate the development of subsequent stages of isolation of new bioactive compounds, as well as contribute to the chemical studies of associated microorganisms as marine species.

**Keywords:** Endophytic fungus, red algae, *Acanthophora spicifera*, anticholinesterase.

## INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas os estudos com organismos marinhos tem recebido um crescente destaque motivado, principalmente, pela alta diversidade estrutural de seus quimiotipos, incluindo compostos halogenados, sulfonados e nitrogenados assim como sua ampla variedade de efeitos terapêuticos associados a propriedades antioxidantas, anti-inflamatórias, antimicrobianas e antitumorais (Pilon et al., 2016). A cytarabina e a trabectedina são exemplos de promissores agentes anticâncer oriundos dos produtos marinhos (Pilon et al., 2016).

O estudo de algas marinhas é de suma importância, pois garante oportunidades de isolamento de organismos endêmicos incluindo novos gêneros e espécies. Dentro deste contexto este trabalho visou o estudo do perfil químico da alga vermelha *Acanthophora spicifera*, uma das espécies mais abundantes no litoral brasileiro, com propriedades biológicas associadas a atividade antitumoral e antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Muthuraman et al., 2014). Até o momento, foram isolados nove fungos endofíticos que se encontram em fase de estudo químico e biológico.

Esses micro-organismos apresentam grande importância na pesquisa de produtos naturais, não apenas pela ampla gama de metabólitos secundários produzidos, mas também, pela sustentabilidade associada à produção de matéria prima em larga escala através de processos fermentativos (Costa-Lotufo et al., 2009) e a manipulação de suas condições de cultivo (tempo, pH, nutrientes, temperatura e aeração) que podem ser modificadas, a fim de aumentar ou direcionar a produção de metabólitos de interesse (Aly et al., 2011).

Afim de explorar toda a maquinaria genética diversos métodos tem sido aplicados aos estudos dos perfis metabólicos de micro-organismos, como por exemplo, o uso de ferramentas quimiométricas como o planejamento experimental (do inglês DOE, Design of Experiments), que torna possível extrair em alta reprodutibilidade uma grande quantidade de informações com um número mínimo de experimentos, permitindo estimar todas as possíveis interações e predizer condições otimizadas através de modelos de regressão (Pilon et al., 2016).

Dentre os diversos tipos de planejamento experimental, destacam-se os sistemas de planejamento fatorial, pois permitem avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis a partir de um número reduzido de ensaios experimentais quando

comparados aos processos univariados, podendo ter várias respostas de interesse, que talvez precisem ser consideradas simultaneamente (Peralta-Zamora et al., 2005).

No presente trabalho foi aplicado um planejamento fatorial para o fungo endofítico *Annulohypoxylon stygium* pertencente à família Xilareaceae (Ascomycota) associado a alga vermelha *A. spicifera*, afim de avaliar como a variação do pH, tempo de crescimento e tipo de água afetam sinergicamente a produção em massa e a diversidade de química de seus componentes.

## MATERIAL E MÉTODOS

O endófito foi preservado em slants e posteriormente repicado para placas de Petri contendo PDA e incubada por dez dias a 25°C, a fim de se obter maior massa micelar.

Foram utilizados Erlenmeyers de 500 mL (5 cm diâmetro) contendo 200 mL de meio de cultivo, para uma maior aeração do sistema e assim auxiliar o processo de crescimento. Para o planejamento experimental foi aplicado um fatorial  $2^3$  com 5 pontos centrais. As variáveis escolhidas para realização dos experimentos foram: meio de cultivo Czapeck e Extrato de Malte e, para os planejamentos foram avaliados: pH, tipo de água e tempo de cultivo (Tabela 1). Todas as combinações e normalizações entre as variáveis podem ser observadas na Tabela 1, totalizando 13 experimentos para cada meio de cultivo (Czapek e Malte).

Valores Reais			
# experim.	pH	Tempo (dias)	Tipo de Água
1	6,5	20	Deionizada
2	8,5	20	Deionizada
3	6,5	32	Deionizada
4	8,5	32	Deionizada
5	6,5	20	Mar
6	8,5	20	Mar
7	6,5	32	Mar
8	8,5	32	Mar
9	7,5	26	Torneira
10	7,5	26	Torneira
11	7,5	26	Torneira
12	7,5	26	Torneira
13	7,5	26	Torneira

**Tabela 1.** Variáveis escolhidas para realização do planejamento fatorial  $2^3$ .

Todos os meios de cultivo foram tamponados em Tris-HCl 0,01 M, pela sua eficiência em todos os tipos de água na faixa de pH escolhida.

Todos os equipamentos e meios de cultivo foram previamente esterilizados em autoclave a 121°C por 40 minutos. Após atingir a temperatura ambiente esses meios foram inoculados com, aproximadamente, um terço do micélio de cada placa de Petri, e mantidos a 25°C em modo estático por 20, 26 e 32 dias, conforme o experimento obtido no planejamento. Após os períodos específicos, os meios de cultivo líquidos foram filtrados para separar o micélio do caldo fermentado, que foi então submetido à partição com AcOEt (3 vezes), fornecendo os extratos AcOEt após evaporação do solvente. Todos os extratos foram analisados por experimentos hifenados em CLAE-DAD-CAD-CORONA.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao analisarmos os resultados obtidos para os cultivos da linhagem *A. stygium*, realizados em planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, verificou-se uma significativa diferença entre massas obtidas para cada extrato e no número e intensidade dos picos obtidos em CLAE-DAD-CAD-CORONA (**Tabela 2**), demonstrando que a variação na produção metabólica, em cada caso, está diretamente associada à variação dos parâmetros propostos.

Amostra	Código	Massa (mg)	Nº de Picos	Amostra	Código	Massa (mg)	Nº de Picos
Malte MQ 6,5 20d	Fr 01	53	N/A	Czapeck MQ 6,5 20d	Fr 10	153	42
Malte MQ 6,5 32d	Fr 02	38	29	Czapeck MQ 6,5 32d	Fr 11	100	28
Malte MQ 8,5 20d	Fr 03	92	28	Czapeck MQ 8,5 20d	Fr 12	232	20
Malte MQ 8,5 32d	Fr 04	56	34	Czapeck MQ 8,5 32d	Fr 13	205	26
Malte Mar 6,5 20d	Fr 05	111	31	Czapeck Mar 6,5 20d	Fr 14	142	23
Malte Mar 6,5 32d	Fr 06	61	N/A	Czapeck Mar 6,5 32d	Fr 15	36	N/A
Malte Mar 8,5 20d	Fr 07	105	24	Czapeck Mar 8,5 20d	Fr 16	126	17
Malte Mar 8,5 32d	Fr 08	52	N/A	Czapeck Mar 8,5 32d	Fr 17	65	19
Malte Torn 7,5 26d	Fr 09	59	48	Czapeck Torn 7,5 26d	Fr 18	53	54

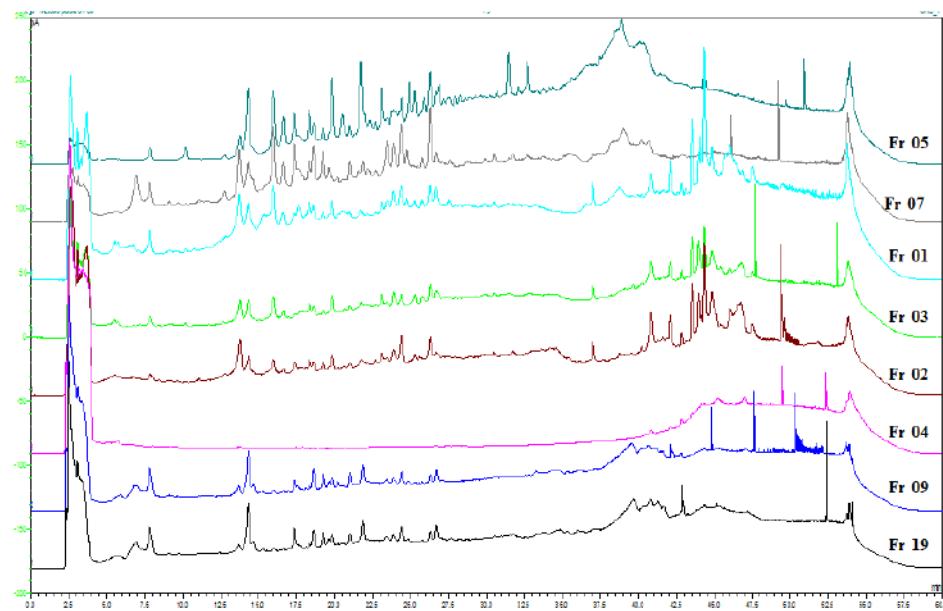
Amostra	Código	Massa (mg)	Nº de Picos
Sem Planejamento	Fr 19	26	54

**Tabela 2.** Massas dos extratos brutos obtidos para o planejamento fatorial 2<sup>3</sup> realizado com a linhagem do fungo endofítico *A. stygium*.

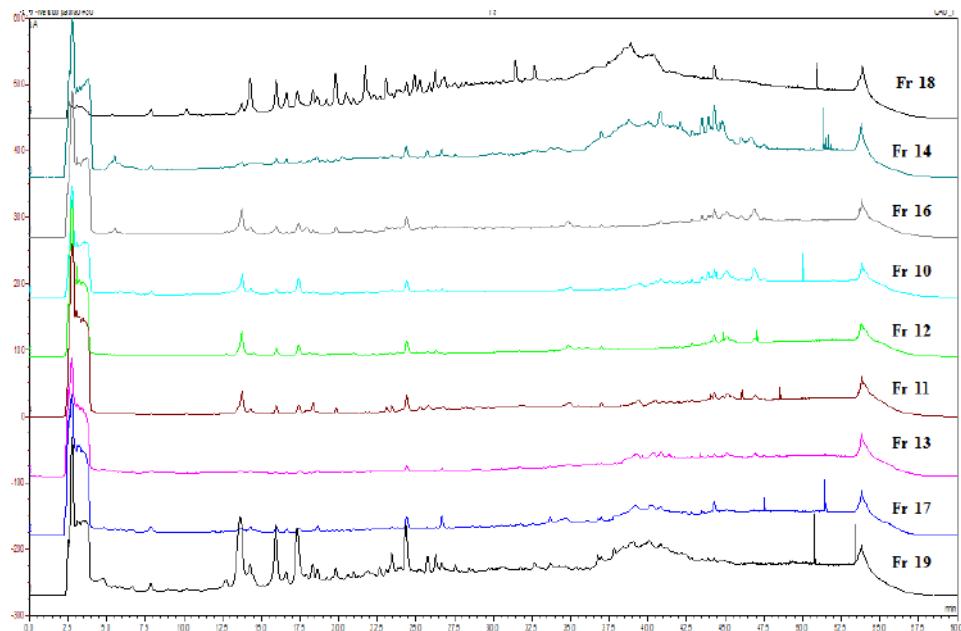
Os extratos do cultivo em Malte e Czapek foram analisados em CLAE-DAD-CAD-CORONA com coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadecil silano (C-18) e eluição em gradiente H<sub>2</sub>O/MeOH (95:05→0:100) por 40 min., permanecendo nesta condição por mais 10 min., com fluxo de 1,0 mL·min<sup>-1</sup>, **Figura 1 e 2**.

Foram também submetidos à avaliação antitumoral e anticolinesterásica para verificar se havia variação no potencial biológico para cada experimento. Parte das

amostras (23/26) apresentaram resultados promissores frente à acetilcolinesterase humana com inibição > 80%, ou seja, se mostraram mais ativas que o padrão tacrina utilizado, evidenciando o potencial desses extratos em estudos para a descoberta de agentes inibidores de acetilcolinesterase.



**Figura 1.** Cromatogramas extratos de Malte (Fr 01 a 09) e extrato padrão (19).



**Figura 2.** Cromatogramas extratos de Czapeck (Fr 10 a18) e extrato padrão (19).

Foi possível observar uma variação na produção metabólica de acordo com o tipo de ensaio realizado, como aumento/diminuição de algumas bandas e aparecimento/desaparecimento de outras. Esses resultados estão de acordo com o

esperado e reforçam a teoria de que diferentes fatores afetam de maneiras diversas a produção metabólica de um micro-organismo.

## **CONCLUSÕES**

Os resultados encontrados no estudo do fungo *A. stygium* isolado da alga *A. spicifera* ajudam a confirmar que o uso planejamentos experimentais podem estimular diferentes rotas biossintéticas e, portanto, fornecer uma grande variedade na produção metabólica dos micro-organismos com interessantes características do ponto de vista químico e biológico.

Além disso, esses estudos podem fornecer subsídios para uma melhor compreensão das interações existentes entre os endófitos com as espécies de algas marinhas hospedeiras.

Estes resultados demonstram ainda a importância da investigação dos organismos marinhos, uma vez que estes não são muito explorados no âmbito das pesquisas realizadas no Brasil, podendo trazer diversos avanços no campo da pesquisa em produtos naturais.

## **AGRADECIMENTO**

Os autores agradecem ao IQ-UNESP Araraquara, NuBBE, CEPID e BIOTA pelo suporte financeiro. À CAPES pela bolsa de doutorado. Ao grupo GCBPN-USP Ribeirão pela colaboração nas atividades biológicas.

## **REFERÊNCIAS**

- ALY, H. A, et al., 2011. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 90, pp. 1829-1845.
- COSTA-LOTUFO, et. al., 2009. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico e perspectivas. *Química Nova*, vol.32, no. 3, pp. 703-716.
- MUTHURAMAN et. al., 2014. In vitro cytotoxicity and molecular docking studies on *Acanthophora spicifera*. *Der Pharma Chemica*, vol. 6(1), pp. 411-417.
- PERALTA-ZAMORA et. al., 2005. Por que otimização multivariada? *Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental*, vol. 10, no. 2, pp. 106-110.

PILON, A. C., et. al., 2016. Partial least squares model and design of experiments toward the analysis of the metabolome of *Jatropha gossypifolia* leaves: Extraction and chromatographic fingerprint optimization. *Journal of Separation Science*, vol. 39, pp. 1023-1030.

## Alta densidade celular de *Clostridium carboxidivorans* com gás de síntese

Alanna Medeiros Botelho<sup>1\*</sup>; Roberta dos Reis Ribeiro<sup>1</sup>; Tatiana Felix Ferreira<sup>2</sup>; Priscilla Filomena Fonseca Amaral<sup>1</sup>; Nei Pereira Jr<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Bioquímica.

\*lanna.mbotelho@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Processos Orgânicos.

---

### RESUMO

O gás de síntese é um resíduo gerado por processos térmicos e composto majoritariamente por CO e H<sub>2</sub>. A fermentação deste gás é uma alternativa biotecnológica para produção de combustíveis e *commodities* químicas. A quantidade de bioproductos obtida depende da concentração celular no processo. Porém, devido ao processo ser anaeróbico e o substrato gasoso, o aumento da concentração celular durante a fermentação de gás de síntese é um desafio. A fim de determinar uma metodologia para obtenção de elevada concentração celular, avaliou-se a importância da adição do gás de síntese durante a fermentação. Além disso, avaliou-se também a estratégia de batelada alimentada, além da adição de gás de síntese. Detectou-se  $0,832 \pm 0,03$  g p.s.cél.L<sup>-1</sup> em 18 horas de cultivo com adição de gás de síntese a cada 2 horas. No entanto, com a estratégia de batelada alimentada com meio concentrado e adição de gás de síntese a concentração máxima obtida foi de  $1,94 \pm 0,01$  g p.s.cél.L<sup>-1</sup> em 34 horas de cultivo.

**Palavras-chave:** Wood-Ljungdahl; acidogênese; solventogênese.

---

### High *Clostridium carboxidivorans* cell density with syngas

### ABSTRACT

Syngas is a thermal processes residue composed mainly of CO and H<sub>2</sub>. Syngas fermentation is a biotechnological alternative for fuels and chemical commodities production. In the process, the amount of bioproducts obtained depends on the cell concentration. However, to obtain high cell density in syngas fermentation is a challenge since the process is anaerobic and the substrate is a gas. Syngas addition during fermentation was evaluated to obtain high cell density. Besides that, a feed-batch strategy followed by syngas addition was also evaluated. A cell concentration of  $0,832 \pm 0,03$  g d.w. cell.L<sup>-1</sup> was detected in 18 hours of fermentation with syngas addition every 2 hours. However, with a feed-batch strategy with syngas addition a cell concentration of  $1,94 \pm 0,01$  g d.w. cell.L<sup>-1</sup> was detected after 34 hours of fermentation.

**Keywords:** Wood-Ljungdahl; acidogenesis; solventogenesis.

---

## INTRODUÇÃO

Com a necessidade de criação de rotas sustentáveis para a produção de *commodities* químicas renováveis e biocombustíveis, surge o processo híbrido termoquímico-bioquímico (Shen et al., 2014). Nesse processo, o gás de síntese (CO, H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>) é fermentado por bactérias acetogênicas, tal qual *Clostridium carboxidivorans*, reconhecida por sua capacidade de assimilar CO e CO<sub>2</sub> por meio da via redutora de Acetil-CoA (via Wood–Ljungdahl), convertendo-os em ácidos orgânicos e compostos químicos (Liu et al., 2014).

Entretanto, há gargalos como a baixa taxa de crescimento dos micro-organismos anaeróbicos e a reduzida conversão do gás de síntese, tornando necessário aprimorar a etapa de aumento de biomassa. Portanto, o presente trabalho avalia o crescimento da bactéria *Clostridium carboxidivorans* em meio ATCC 2713 em diferentes condições operacionais visando a obtenção de elevada biomassa celular.

## MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo e pré-inoculo e condições de cultivo: A cepa *Clostridium carboxidivorans* DSM 15243 (Liou et al., 2005) foram repicadas e conservadas em frascos de soro (100 mL) devidamente vedados contendo 50 mL de meio de cultura ATCC 2713 (*American Type Culture Collection*), com composição descrita por Botelho (2016), e saturados com gás de síntese. Como pré-inóculo esses frascos eram incubados em agitador rotatório a 150 rpm e 37°C em posição horizontal por 24 h.

Para todos os cultivos frascos de soro de 100 mL contendo 45 mL de meio ATCC 2713 foram inoculados com 5 mL de pré-inóculo e incubados a 150 rpm, 37°C, na horizontal. A concentração celular ([X]) foi determinada em espectrofotômetro a 600 nm e convertida a gramas de peso seco de células por litro (g.p.s.cél.L<sup>-1</sup>) por curva padrão de peso seco.

Cultivo de *Clostridium carboxidivorans*: Foram inoculados 20 frascos e incubados por 40 horas. A cada 2 horas de cultivo um frasco era utilizado para determinação de [X] e do pH e nos demais frascos, realizada a adição de gás de síntese no *headspace* por 30 s.

Adição de gás de síntese durante o crescimento celular: Foram inoculados 10 frascos de soro e retiradas alíquotas de 5 ml de todos os frascos após 24 h do inoculo. Nas amostragens seguintes, 5 ml de amostra eram retiradas de apenas dois frascos, nos seguintes tempos: Frascos A: 31 h, 48 h; Frascos B: 31 h e 55 h; Frascos C: 72 h e 79 h; Frascos D: 144 h e 192 h; Frascos E: 240 h e 312 h. O gás de síntese foi adicionado no

*headspace* por 30 s após amostragens de 24 h, 31 h, 72 h, 144 h e 240 h, apenas nos frascos onde retirou-se amostra.

**Batelada alimentada e adição de gás de síntese:** Foram inoculados 3 frascos de soro e retiradas alíquotas de 5 ml de cada frasco nos seguintes tempos de cultivo: 0 h, 25 h, 28 h, 31h, 34 h e 73 h. A cada amostragem (5 mL), adicionou-se 5 mL de meio ATCC 2713 com concentração 10 vezes superior ao meio original (batelada alimentada), além de gás de síntese (no *headspace* por 30 s).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra os resultados do cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio ATCC 2713 com adição de gás de síntese a cada amostragem (de 2 em 2 horas). É possível observar que em 14 horas de cultivo ocorreu uma desaceleração do crescimento celular, atingindo em seguida a fase estacionária. A concentração celular máxima obtida foi 0,832 g p.s.cel.L<sup>-1</sup> (densidade ótica média de 0,541 após diluição de 3 vezes) em 18 horas de cultivo. Segundo Ukpong et al. (2012), a fase estacionária de crescimento celular de *C. carboxidivorans* se dá com a diminuição do pH do meio e a produção de solventes, característica do início da fase solventogênica.

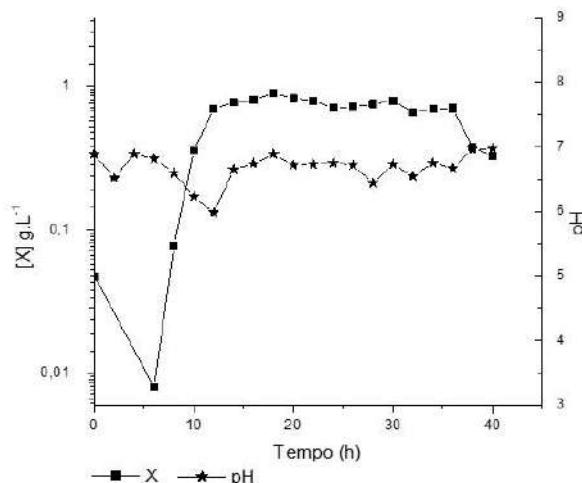


Figura 1 – Perfil cinético do crescimento celular de *Clostridium carboxidivorans*, cultivado em frasco de soro de volume útil 100 ml e com 50 ml de meio ATCC 2713 e adição de gás de síntese.

Segundo Bruant et al. (2010), *Clostridium carboxidivorans* cultivado em frasco de soro com 120 mL de volume útil contendo 20 mL de meio específico para *Clostridium*, presença de 0,5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de lêvedo, *headspace* 1 atm com 100% CO, a 37 °C, 100 rpm e pH 6,0, apresenta uma fase de adaptação de 24 h, atingindo a fase estacionária após quatro dias de incubação, alcançando uma densidade ótica (DO) de 0,77. A diferença entre as concentrações obtidas deve, possivelmente, à presença de glicose no meio de cultivo. A glicose é utilizada na via de crescimento heterotrófico,

atuando na ativação do metabolismo e reduzindo o tempo de adaptação da cepa, visto que, a fixação de CO e CO<sub>2</sub> através da via WL (via autotrófica) não é eficiente na geração de ATP.

A fase exponencial, que ocorreu de 6 a 12 horas de cultivo (Figura 1), foi utilizada para determinação da taxa específica de crescimento celular ( $\mu$ ) da cepa *Clostridium carboxidivorans* DSM 15243 que foi de 0,55 h<sup>-1</sup>, com tempo de duplicação de 1,26 horas.

Em seguida, estudou-se a influência da adição de gás de síntese em tempos específicos. Assim, após a adição em 24 horas verificou-se um aumento médio de 0,30 g.p.s.cel.L<sup>-1</sup> até a adição seguinte (31 h) (Tabela 1), o que não ocorreu no cultivo com adição de gás de síntese a cada 2 h (Figura 1). No entanto, após a adição seguinte (31 h) não se detectou aumento na concentração celular (Tabela 1).

Tabela 1 - Concentração celular (g.p.s.cel.L<sup>-1</sup>) e pH para o cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio ATCC 2713 com adição de gás de síntese em 0, 24 e 31 horas de cultivo.

Tempo (h)	Concentração celular (g.p.s.cel.L <sup>-1</sup> )	pH
0	0,03 ± 0,00	7,08 ± 0,00
24	0,78 ± 0,02	6,15 ± 0,00
31	1,10 ± 0,21	7,00 ± 0,00
48	1,02 ± 0,00	6,95 ± 0,04
55	1,02 ± 0,00	6,92 ± 0,11

±: Valor do desvio padrão para 2 réplicas.

Para cultivos mais longos (Tabelas 2, 3 e 4) há uma significativa redução da concentração celular entre 24 horas e a adição seguinte de gás de síntese (terceira adição). Isso possivelmente ocorre devido à escassez de fonte de carbono.

Tabela 2 - Concentração celular (g.p.s.cel.L<sup>-1</sup>) e pH para o cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio ATCC 2713 com adição de gás de síntese em 0, 24 e 72 horas de cultivo.

Tempo (h)	Concentração celular (g.p.s.cel.L <sup>-1</sup> )	pH
0	0,03 ± 0,00	7,08 ± 0,00
24	0,77 ± 0,02	6,14 ± 0,09
72	0,33 ± 0,03	6,93 ± 0,04
79	0,58 ± 0,23	6,90 ± 0,01

±: Valor do desvio padrão para a duplicata.

Tabela 3 - Concentração celular (g.p.s.cel.L<sup>-1</sup>) e pH para o cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio ATCC 2713 com adição de gás de síntese em 0, 24 e 144 horas de cultivo.

Tempo (h)	Concentração celular (g.p.s.cel.L <sup>-1</sup> )	pH
0	0,03 ± 0,00	7,08 ± 0,00
24	0,79 ± 0,01	6,12 ± 0,00
144	0,40 ± 0,02	6,62 ± 0,00
192	0,65 ± 0,03	6,81 ± 0,06

±: Valor do desvio padrão para a duplicata.

Após a terceira adição, observa-se um pequeno aumento da concentração celular para todos os cultivos (Tabelas 2, 3 e 4), evidenciando a existência de células viáveis e capazes de assimilar a fonte de carbono fornecida através da terceira adição de gás de síntese. Igualmente ao cultivo mais curto (Tabela 1), os cultivos mais longos apresentaram uma queda inicial no pH, característica da fase acidogênica, seguindo de um aumento do pH, característica da fase solventogênica, na qual os ácidos produzidos na fase acidogênica são convertidos a etanol e butanol.

Tabela 4 - Concentração celular (g.p.s.cél.L<sup>-1</sup>) e pH para o cultivo de *Clostridium carboxidivorans* em meio ATCC 2713 com adição de gás de síntese em 0, 24 e 240 horas de cultivo.

Tempo (h)	Concentração celular (g.p.s.cél.L <sup>-1</sup> )	pH
0	0,03 ± 0,00	7,08 ± 0,00
24	0,79 ± 0,03	6,15 ± 0,08
240	0,54 ± 0,04	6,53 ± 0,04
312	0,75 ± 0,10	6,77 ± 0,10

±: Valor do desvio padrão para a duplicata.

Observa-se na Figura 2 que com a estratégia de batelada alimentada com adição de gás de síntese a partir de 25 horas de cultivo, a cada três horas de cultivo, direcionou-se a rota metabólica à produção de biomassa. Assim, a concentração celular aumentou 2,51 vezes em 34 horas, enquanto o pH manteve-se estável.

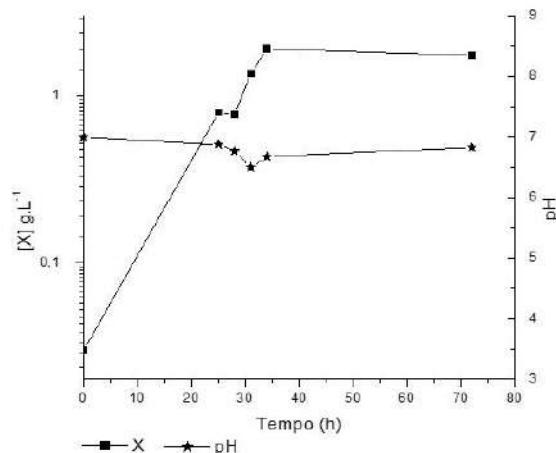


Figura 2– Perfil cinético do crescimento de *Clostridium carboxidivorans*, cultivado em frasco de soro de volume útil 100 ml e com 50 ml de meio ATCC2713 com adição de meio concentrado e adição de gás de síntese em 25, 28, 31, 34 e 73 horas.

## CONCLUSÕES

Foi possível obter elevadas concentrações celulares de *Clostridium carboxidivorans* em meio ATCC 2713. Observou-se que o gás de síntese promove o crescimento celular. A estratégia de batelada alimentada juntamente com a adição do gás de síntese mostrou-se uma estratégia interessante para o aumento da concentração celular, aumentando de

0,78 g.p.s.cél.L<sup>-1</sup> ± 0,02 no momento da primeira adição (25 h) para 1,94 g.p.s.cél.L<sup>-1</sup> ± 0,01 cerca de nove horas depois dessa primeira adição.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPERJ pelo financiamento por projeto Pensa Rio 2014.

## REFERÊNCIAS

- BOTELHO, A. M., 2016. *Aumento da produção de biomassa de Clostridium carboxidivorans utilizando gás de síntese para fins biotecnológicos*. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro. 79 p. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.
- BRUANT, G. et al., 2010. Genomic analysis of carbon monoxide utilization and butanol production by clostridium carboxidivorans strain P7T. *PLoS ONE*, vol. 5, no. 9, pp. 1–12. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0013033>
- LIOU, J. S. C. et al., 2005. *Clostridium carboxidivorans* sp. nov., a solvent-producing clostridium isolated from an agricultural settling lagoon, and reclassification of the acetogen *Clostridium scatologenes* strain SL1 as *Clostridium drakei* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 55, no. 5, pp. 2085–2091. <http://dx.doi.org/10.1099/ijss.0.63482-0>
- LIU, K. et al., 2014. Continuous syngas fermentation for the production of ethanol, n-propanol and n-butanol. *Bioresource Technology*, vol. 151, pp. 69–77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.059>
- SHEN, Y. and BROWN, R. and WEN, Z., 2014. Syngas fermentation of Clostridium carboxidivoran P7 in a hollow fiber membrane biofilm reactor: Evaluating the mass transfer coefficient and ethanol production performance. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 85, pp. 21–29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.01.010>
- UKPONG, M. N. et al., 2012. Physiological response of Clostridium carboxidivorans during conversion of synthesis gas to solvents in a gas-fed bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 109, no. 11, pp. 2720–2728. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.24549>

## **Fitotoxicidade pela associação de vinhaça em solos com diferentes manejos**

Alessandra Baroni Rodrigues Neves<sup>1</sup>; João Vitor França Pirola<sup>1</sup>; Mirian Alves de Faria<sup>1</sup>, Paulo Renato Matos Lopes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Dracena. Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros, km 651, CEP 17900-000, Dracena, Brasil.

\*plopes@dracena.unesp.br

---

### **RESUMO**

O trabalho teve como objetivo avaliar a ecotoxicidade de dois sistemas de manejo do solo (convencional e orgânico) com diferentes volumes de vinhaça. Foram realizados bioensaios de toxicidade com sementes de *Lactuca sativa*. Os resultados demonstraram que as amostras de solo de manejo convencional favoreceram o desenvolvimento das plântulas independente da adição de vinhaça. Por outro, foi observado indícios de ecotoxicidade nos tratamentos de sistema orgânico. No entanto, uma análise das características físico-químicas das amostras e novos bioensaios são necessários para detalhar o efeito do tipo de manejo e da associação da vinhaça na ecotoxicidade do solo.

**Palavras-chave:** cana-de-açúcar, ecotoxicidade, sistemas convencional e orgânico.

---

### **Phytotoxicity to vinasse association in soils with different managements**

#### **ABSTRACT**

The objective of this work was to evaluate the ecotoxicity of two soil management systems (conventional and organic) with different vinasse volumes. Toxicity bioassays were performed with *Lactuca sativa* seeds. Results demonstrated that conventional management soil samples favored the plant development independent of vinasse addition. On the other hand, ecotoxicity evidence was observed in organic system treatments. However, physicochemical analysis of samples and new bioassays are necessary to detail the effect of management systems and vinasse association in soil ecotoxicity.

**Keywords:** Conventional and organic systems, ecotoxicity, sugarcane.

---

## INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar no Brasil é uma das mais importantes, devido à área que ocupa e ao seu destaque socioeconômico e ambiental (Urquiaga, 1991). Neste contexto, a geração de etanol combustível nas usinas sucroenergéticas vem acompanhada de resíduos que são utilizados como fertilizantes nas lavouras. A vinhaça representa um desses subprodutos e sua geração é elevada, representando dez a dezoito litros para cada litro de álcool produzido (Silva et al., 2007).

Por seu alto teor de matéria orgânica e sua riqueza nutricional, a vinhaça tem sido utilizada na fertirrigação (Canellas et al., 2003). Todavia, ela também pode ser um composto potencialmente poluente, pois pode apresentar um impacto cem vezes maior que o esgoto doméstico pelo alto índice de DBO e corrosividade (Silva et al., 2007).

Em relação aos sistemas de cultivo de cana-de-açúcar, tem-se o manejo convencional como o modelo comumente adotado. Entretanto, a substituição pelo manejo orgânico em lavouras canavieiras vem crescendo não só no país como internacionalmente (Evangelista et al., 2013).

Estes sistemas agrícolas convencionais, baseados na utilização de fertilizantes químicos e pesticidas e no constante revolvimento do solo, têm promovido impacto negativo nos seus parâmetros de qualidade (Miernickzuk et al., 2003). Em contrapartida, a adoção do manejo orgânico na lavoura com práticas mais conservacionistas tem despertado grande interesse atualmente (Xavier et al., 2006).

Além disso, a utilização agrícola intensiva e de forma inadequada tem contribuído para a degradação das características físicas, químicas e biológicas do solo (Cunha et al., 2001). Assim, o histórico do uso do solo reflete em diferenças na sua estrutura e composição (Xavier et al., 2006).

Em suma, o presente trabalho teve por objetivo analisar o efeito ecotoxicológico da aplicação de diferentes volumes de vinhaça em solo cultivado com cana-de-açúcar de sistemas distintos de produção: convencional e orgânico.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Universidade Estadual Paulista (FCAT/UNESP, câmpus de Dracena).

Foram utilizadas amostras de solos a partir de dois tipos de manejo distintos: convencional e orgânico. O solo de manejo convencional e a vinhaça foram coletados na usina Caeté no município de Paulicéia/SP. Por outro lado, o solo de manejo orgânico

foi coletado em uma propriedade pertencente a empresa Planeta Verde, localizada no município de Lucélia/SP.

As amostras foram coletadas até no máximo 30 cm de profundidade do perfil do solo. Posteriormente, foram peneiradas, homogeneizadas e acondicionadas em recipientes plásticos para sua utilização no decorrer do experimento.

O delineamento experimental foi fatorial 2x4 (Tabela 1), sendo analisados 2 tipos de manejo de solo (convencional e orgânico) e 4 volumes de vinhaça (zero, 0,5\*VV, 1,0\*VV e 2,0\*VV). O volume vinhaça (VV) referiu-se à dose geralmente utilizada para aplicação na lavoura canavieira, segundo Lourencetti et al. (2012).

**Tabela 1.** Composição dos tratamentos com solo cultivados com cana-de-açúcar pelos sistemas convencional e orgânico associado a diferentes volumes de vinhaça (VV)

Tratamentos	Manejo do solo	Volume de vinhaça (VV)
<b>Conv - 0,0</b>	Convencional	-
<b>Conv - 0,5</b>	Convencional	0,5
<b>Conv - 1,0</b>	Convencional	1,0
<b>Conv - 2,0</b>	Convencional	2,0
<b>Org - 0,0</b>	Orgânico	-
<b>Org - 0,5</b>	Orgânico	0,5
<b>Org - 1,0</b>	Orgânico	1,0
<b>Org - 2,0</b>	Orgânico	2,0

Foram realizados testes de ecotoxicidade por meio de avaliação fitotoxicológica com sementes de *Lactuca sativa* (alface), segundo Morales et al. (2004). A determinação do efeito tóxico de cada tratamento foi realizada a partir do extrato aquoso solubilizado das amostras de solo, obtido de acordo a NBR 10.006 (ABNT, 2004).

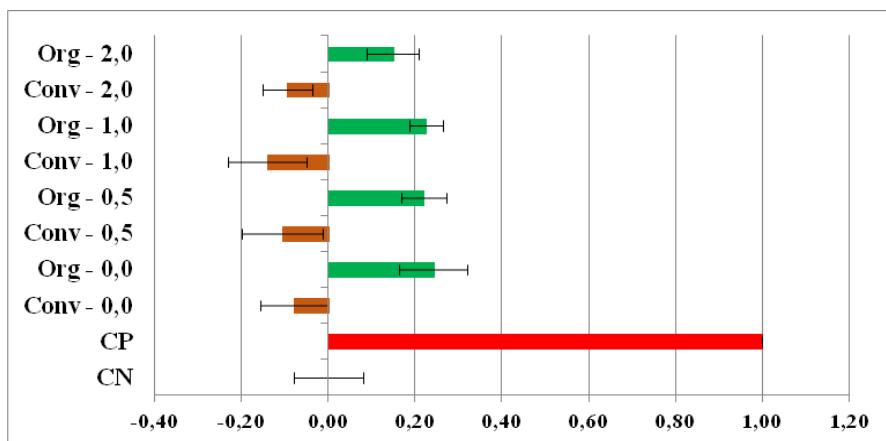
O efeito fitotóxico do tipo de manejo de solo associado a diferentes volumes de vinhaça foi analisado de acordo com Labouriau e Agudo (1987). Deste modo, foram mensurados: a germinação das sementes, o alongamento da raiz ( $\geq 0,1$  mm) e o índice de germinação (GI - *Germination Index*).

GI representa um fator de germinação de sementes (%G) e alongamento da raiz (%R) relativos ao controle negativo (CN) e é expresso pela equação:  $GI = (%G) \times (%R) / 100$ . A fim de facilitar a interpretação dos dados, os resultados foram expressos pelo cálculo “1 – GI”, cujos valores maiores representam maior efeito fitotóxico do tratamento.

Os dados experimentais foram analisados efetuando-se a análise de variância pelo teste de Tukey a 5,0% de probabilidade para a comparação de médias. Neste caso, foi utilizado o software Microcal Origin 8.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de testes de toxicidade (1-GI) para os diferentes tipos de manejo de solo cultivados com cana-de-açúcar associados ou não à vinhaça estão apresentados na Figura 1 e na Tabela 2.



**Figura 1.** Ecotoxicidade entre os manejos convencional e orgânico com diferentes volumes de vinhaça em solos cultivados com cana-de-açúcar (1-GI). (CN – controle negativo, CP – controle positivo).

**Tabela 2.** Análise de variância nos dados de ecotoxicidade entre os tipos de manejo com diferentes volumes de vinhaça em solos cultivados com cana-de-açúcar (1-GI)

	Conv	Org
<b>CN</b>	$0,000 \pm 0,080$ Aa	$0,000 \pm 0,080$ Aa
<b>CP</b>	$1,000 \pm 0,000$ Ab	$1,000 \pm 0,000$ Ac
<b>0,0</b>	$-0,079 \pm 0,077$ Aa	$0,243 \pm 0,079$ Bb
<b>0,5</b>	$-0,105 \pm 0,094$ Aa	$0,220 \pm 0,052$ Bb
<b>1,0</b>	$-0,140 \pm 0,090$ Aa	$0,225 \pm 0,039$ Bb
<b>2,0</b>	$-0,094 \pm 0,058$ Aa	$0,149 \pm 0,060$ Bab

\*letras minúsculas representam diferença significativa das médias entre os tratamentos na coluna, \*\*letras maiúsculas representam diferença significativa das médias entre os tratamentos na linha. (teste de Tukey a 0,05% de probabilidade)

Notou-se diferença na ecotoxicidade quando comparados os tipos de manejo do solo, conforme apresentado na Figura 1 e na Tabela 2. Desta forma, demonstra-se na Tabela 2 que, quando adicionado o mesmo volume de vinhaça, houve diferença significativa na ecotoxicidade pelos dados “1-GI” para os sistemas de manejo convencional (Conv) e orgânico (Org). Além disso, mesmo sem a adição desta substância (tratamentos 0,0), os resultados de ecotoxicidade foram significativamente diferentes quando comparados os solos Conv e Org.

Observa-se que o índice de germinação foi favorecido nas amostras com manejo convencional do solo, independente dos volumes de vinhaça testados. Estes tratamentos não apresentaram toxicidade e tiveram valores de “1-GI” menores que o controle

negativo (0,000). Entretanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos Conv em relação ao CN.

Devido à elevada concentração de matéria orgânica e presença de vários nutrientes, a vinhaça representa uma alternativa viável como adubo (Canellas et al., 2003). Portanto, sua adição nos tratamentos com solo de manejo convencional pode ter auxiliado numa maior germinação das sementes e no desenvolvimento radicular.

No solo de manejo orgânico, foi demonstrado que sem adição de vinhaça (Org-0,0) já houve indícios de toxicidade. Além disso, em todos os tratamentos com vinhaça, observou-se que os valores de “1-GI” eram próximos a Org-0,0. Neste caso, as amostras Org não tiveram diferença significativa nos valores de ecotoxicidade entre si. Em relação ao CN, apenas Org-2,0 não foi significativamente diferente (Tabela 2).

Apesar do seu valor como fertilizante, a vinhaça também é caracterizada por ser potencialmente poluente pela alta carga orgânica e baixo pH. Assim, pode representar um efeito tóxico no meio ambiente, conforme Silva et al. (2007). Contudo, o valor 24,3% em Org-0,0 para “1-GI” pode estar relacionado com o tipo de solo e suas características físico-químicas. Outro importante fator a se considerar é a utilização de outras espécies em novos bioensaios de toxicidade para estas amostras de solo.

Ainda, faz-se necessária a análise dos parâmetros físico-químicos das amostras de solo e a realização de outros bioensaios de toxicidade utilizando espécies diferentes como organismos teste.

## **CONCLUSÕES**

O histórico do solo de lavoura canavieira baseado no tipo de manejo adotado representou diferenças na análise de ecotoxicidade independente da adição de vinhaça. O volume adicionado não refletiu em alteração no efeito tóxico da vinhaça.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPe/UNESP), às empresas Usina Caeté e Planeta Verde pela disponibilidade na coleta das amostras de solo e vinhaça e também ao GAIA da FCAT/UNESP, câmpus de Dracena.

## **REFERÊNCIAS**

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2004. *NBR 10006: Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos*. Rio de Janeiro: ABNT, 7 p.

- CANELAS, L. P.; VELLOSO, A. C. X.; MARCIANO, C. R.; RAMALHO, J. F. G. P.; RUMJANEK, V. M.; REZENDE, C. E. and SANTOS, G. A., 2003. Propriedades químicas de um cambissolo cultivado com cana-de-açúcar, com preservação do palhço e adição de vinhaça por longo tempo. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, vol. 27, no. 5, pp. 935-944.
- CUNHA, T.J.F., MACEDO, J.R., RIBEIRO, L.P., PALMIERI, F., de FREITAS, P.L. and AGUIAR, A.C., 2001. Impacto do manejo convencional sobre propriedades físicas e substâncias húmicas de solos sob cerrado. *Ciência Rural*, vol. 1, no. 1, pp. 27-36.
- EVANGELISTA, C.R.; PARTELLI, F.L.; FERREIRA, E.P.B. and PIRES, F. R., 2013. Atributos microbiológicos do solo na cultura da cana-de-açúcar sob manejo orgânico e convencional. *Semina: Ciências Agrárias*, vol. 34, no. 4, pp. 1549-1562.
- LABOURIAU, L.G. and AGUDO, M., 1987. On the physiology of seed germination in *Salvia hispanica* L. I. Temperature effects. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, vol. 59, pp. 37-56.
- LOURENCETTI, C.; DE MARCHI, M. R. R. and RIBEIRO, M. L., 2012. Influence of sugar cane vinasse on the sorption and degradation of herbicides in soil under controlled conditions. *Journal of Environmental Science and Healt - Part B*, vol. 47, pp. 949-958.
- MIELNICZUK, J.; BAYER, C.; BESAN, F.M.; LOVATO, T.; FERNÁNDEZ, F.F. and DEBARBA, L., 2003. Manejo de solo e culturas e sua relação com os estoques de carbono e nitrogênio do solo. In: CURI, N.; MARQUES, J.J.; GUILHERME, L.R.G.; LIMA, J.M.; LOPES, A.S. and ALVAREZ V., V.H., eds. *Tópicos em ciência do solo*. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, vol. 3, pp. 209-248.
- MORALES, C. G., 2004. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de agua: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. México: IMTA. 189 p.
- SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P. and BORGES L. C., 2007. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, vol. 11, no. 1, pp. 108–114.
- URQUIAGA, S., BODDEY, R.M., de OLIVEIRA, O.C., LIMA, E. and GUIMARÃES, D.H.V., 1991. *Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária*. Comunicado técnico: A importância de não queimar a palha na cultura de cana-de-açúcar, no. 5, pp. 1-6.
- XAVIER, F.A.S., MAIA, S.M.F., de OLIVEIRA, T.S. and MENDONÇA, E.S., 2006. Biomassa microbiana e matéria orgânica leve em solos sob sistemas agrícolas orgânico e convencional na chapada da ibiapaba – CE. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, vol. 30, pp. 247-258.

## **Estabilidade de surfactante produzido por estirpe de *Enterobacter aerogenes* LBPMA-BMA10**

Amanda Lys Silva<sup>1</sup>; Elane Cristina dos Santos<sup>1</sup>; Ana Maria López<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Lab. de Bioquímica do Parasitismo e Microbiologia Ambiental, Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas. CEP 57072-900. Maceió-AL, Brasil. \*e-mail: amql@qui.ufal.br

---

### **RESUMO**

Biosurfactantes/bioemulsificantes (BS/BE) são metabólitos produzidos por microrganismos com capacidade de diminuir a tensão superficial. Eles têm recebido enorme atenção devido a suas propriedades únicas quando comparado aos sintéticos. Entretanto, a aplicabilidade dos biosurfactantes em várias áreas depende da estabilidade dos mesmos. Desta maneira, a estabilidade do biosurfactante extracelular de *Enterobacter aerogenes* LBPMA-BMA10 foi estudada em diferentes concentrações de NaCl e condições de pH e temperatura. O índice de emulsificação foi medido após 24 h (E<sub>24</sub>) usando o sobrenadante livre de células. Todas as amostras foram termalmente estáveis em tolueno, mas não em querosene. Resultados similares foram obtidos quando o pH do sobrenadante foi ajustado para 2, 7 e 10, bem como quando concentrações diferentes de NaCl (2, 6 e 10 %) foram adicionadas às amostras. Tais resultados revelam o potencial da estirpe LBPMA-BMA10 de *Enterobacter aerogenes* em produzir biosurfactante, e sua potencial aplicabilidade em diferentes áreas da biotecnologia, como a biorremediação.

**Palavras-chave:** Biotensoativos. Bactéria. Moléculas extracelulares.

---

**Stability of biosurfactant produced by the strain  
*Enterobacter aerogenes* LBPMA-BMA10**

### **ABSTRACT**

Biosurfactant/bioemulsifiers (BS/BE) are metabolites synthesized by microorganisms with capacity of reducing surface tension. They have been receiving increasing attention as a result of their unique properties when compared to their synthetic chemical counterparts. However, the applicability of biosurfactants in several fields depends on their stability. In this way, the stability of an extracellular biosurfactant of *Enterobacter aerogenes* LBPMA-BMA10 was studied in different concentrations of NaCl and conditions of pH and temperatures. The emulsification index was measured after 24 h (E<sub>24</sub>) using the cell-free supernatants of this microorganism cultures. All samples were thermally stable in toluene, but not in kerosene. Similar results were obtained when the pH of such supernatants were adjusted to 2, 7 and 10, or when different concentrations of NaCl (2, 6, and 10 %) were added to them, emphasizing the ability of the strain LBPMA-BMA10 of *E. aerogenes* to produce biosurfactants and its potential applicability in different biotechnological fields, such as in bioremediation.

**Keywords:** Biotensoatives. Bacteria. Extracellular molecules.

---

## INTRODUÇÃO

Surfactantes são definidos como substâncias que mesmo em baixíssimas concentrações podem diminuir com elevada eficácia a tensão superficial de solventes, aumentando a solubilidade, a mobilidade, a biodisponibilidade e a biodegradação de diferentes compostos (Ron and Rosenberg, 2001). Essa principal característica deve-se à natureza anfipática das mesmas, capazes de agregarem-se em micelas nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (Abbasi and Amiri, 2008). Essas são as estruturas responsáveis para compatibilizar, por exemplo, a mistura de água com óleos, por meio da geração de emulsões (Cooper and Goldemberg (1987). A micelização é, portanto, uma propriedade intrínseca dos surfactantes.

De acordo com a origem, os surfactantes podem ser sintéticos ou biológicos, sendo os últimos denominados de biosurfactantes. Geralmente, os biosurfactantes apresentam baixo peso molecular e excelente atividade superficial, formando emulsões estáveis (Uzoigwe et al., 2015). Já os bioemulsificantes têm maior peso molecular que os biosurfactantes e também formam emulsões estáveis, porém sem reduzir muito a tensão superficial (Liang et al., 2014; Uzoigwe et al., 2015). De acordo com o modo de ação, os biosurfactantes podem ser de dois tipos: há os que permanecem aderidos à membrana do microrganismo, enquanto outros são secretados para o ambiente extracelular (Ron and Rosenberg, 2001).

A aplicabilidade dos biosurfactantes, seja na indústria farmacêutica ou em campos de petróleo, por exemplo, depende da sua estabilidade em diferentes condições. Portanto, a investigação do comportamento do surfactante frente a variações de pH, temperatura e salinidade, é de suma importância na caracterização de moléculas excretadas por microrganismos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a estabilidade do biosurfactante extracelular produzido pela linhagem de *Enterobacter aerogenes* LBPMA-BMA10 por meio da emulsão formada quando da mistura do sobrenadante livre de células (após tratamentos específicos) da referida bactéria com dois hidrocarbonetos (querosene e tolueno).

## MATERIAL E MÉTODOS

Alíquotas ( $10^8$  células.mL<sup>-1</sup>) de suspensões aquosas de *Enterobacter aerogenes* LBPMA-BMA10 foram inoculadas no meio de produção de biosurfactante descrito por Diab and El Din (2013). As culturas foram incubadas por 72 h ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ) sob agitação

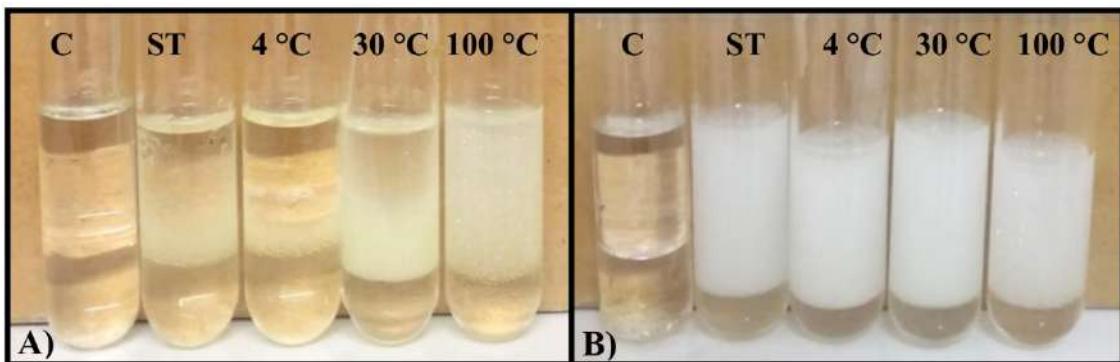
orbital constante (180 rpm) em frascos contendo 50 mL do meio de cultura. Para a verificação da estabilidade do índice de emulsificação, o volume total de cada cultura foi centrifugado (20 min, 5.000 g) e o sobrenadante livre de células foi dividido em alíquotas de 5 mL para a realização dos diferentes tratamentos, a saber: a) salinidade: acrescentou-se NaCl ao meio de cultura nas concentrações de 2, 6 e 10 %; b) temperatura: as amostras foram mantidas às temperaturas de 4, 30 e 100 °C durante uma hora; c) alteração de pH: utilizou-se uma solução de NaOH ou HCl 5 M para ajuste do pH para 2, 7 e 10. Para comparação, alíquotas foram mantidas sem tratamento. O índice de emulsificação das amostras (Cooper and Goldemberg, 1987) foi obtido utilizando-se como hidrocarbonetos querosene e tolueno. Após homogeneização sob agitação (*vortex*), esse material foi incubado por 24 h, quando finalmente mensurou-se a altura da zona de emulsão formada em relação ao volume total da mistura. Os resultados de cada parâmetro foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e suas médias comparadas entre si através do teste de Tukey (5 % de significância).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sintetizados por muitos microrganismos como subprodutos de seu metabolismo primário (Ron and Rosenberg, 2001), os biosurfactantes possuem grande apelo na chamada tecnologia verde, sendo que a atividade emulsificante dos mesmos pode ser compreendida pela investigação do seu índice de emulsificação (Liang et al., 2014). Os resultados obtidos com o sobrenadante do cultivo de *Enterobacter aerogenes* BMA-10 mostraram que nenhum dos tratamentos ao qual a amostra foi submetida foi capaz de alterar a capacidade emulsificante ( $E_{24}$ ) na presença do tolueno. Resultados semelhantes foram obtidos por Abbasi and Amiri (2008), que verificaram a estabilidade do bioemulsificante produzido por *Enterobacter cloacae* frente a variações de NaCl (5 – 40 g.L<sup>-1</sup>) na emulsificação tanto de tolueno como também do óleo de milho. No trabalho Liang et al. (2014), a caracterização do surfactante excretado por uma linhagem de *Paenobacillus* considerou a estabilidade do índice de emulsificação ( $E_{24}$ ) de suas amostras em óleo de máquina, apresentando-se estável mesmo quando submetido a altas temperaturas, variações de pH e salinidade < 5 %. A necessidade de se verificar a estabilidade da emulsificação frente a diferentes concentrações de sal se justifica pelo fato de que um dos possíveis usos de biosurfactantes microbianos é a recuperação de ambientes marinhos impactados por derramamentos de petróleo, já que concentrações

salinas acima de 3 % são suficientes para inativar os surfactantes convencionais (Uzoigwe et al., 2015).

No presente trabalho, quando se utilizou querosene – cuja composição inclui hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e naftênicos, com cadeias carbônicas variando entre 9 e 16 – todos os tratamentos tiveram efeito nas amostras do sobrenadante proveniente do cultivo de *E. aerogenes* LBPMA-BMA10 (Figura 1).

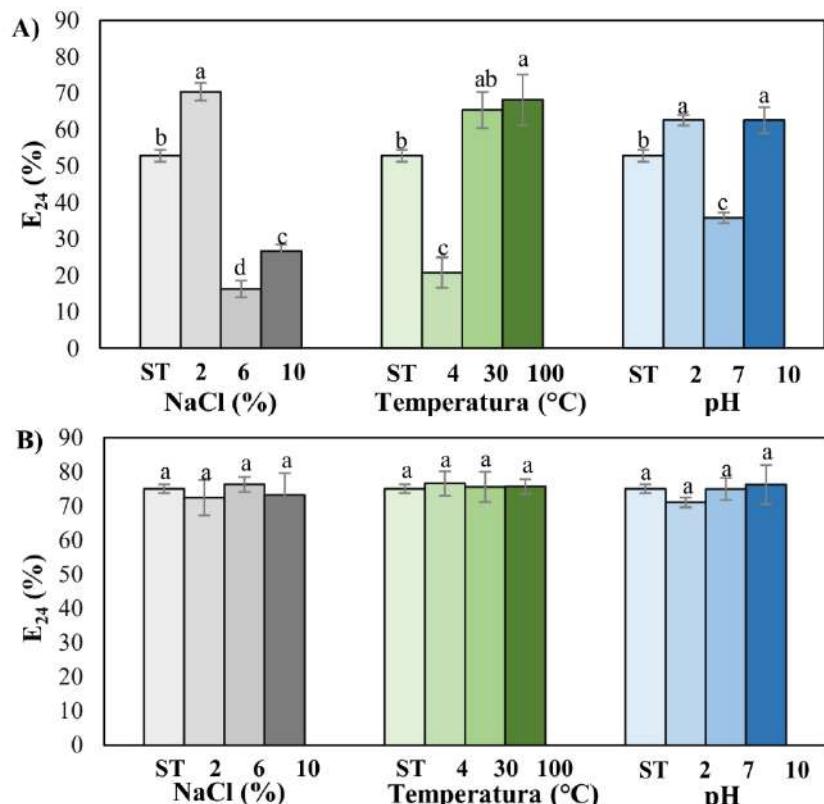


**Figura 1.** Emulsificação do sobrenadante (pós-tratamento térmico) proveniente do cultivo de *Enterobacter aerogenes* LBPMA-BMA-10 em tubos contendo querosene (A) ou tolueno (B). C= controle (meio de cultura sem prévia inoculação e sem tratamento térmico); ST= sobrenadante livre de células de cultura do mesmo microrganismo, o qual não foi submetido a quaisquer dos tratamentos.

Outra maneira de estudar a estabilidade dos surfactantes é por meio do cultivo das células microbianas já em condições diferenciadas, como fizeram Dadrasnia and Ismail (2015) ao trabalhar com *Bacillus salmaya* 139SI. Abbasi and Amiri (2008), por sua vez, cultivaram *E. cloacae* em caldo nutritivo e em meios de cultura alternativos utilizando água do mar e aquele microrganismo foi incapaz de produzir biosurfactante quando cultivado no meio complexo, ao contrário de Diab and El Din (2013), que registraram a produção de biosurfactantes nesse meio de cultura. Na Figura 2 é possível verificar que a temperatura de 100 °C por uma hora aumentou o poder de emulsificação do biosurfactante na presença do querosene. A temperatura de 4 °C, por sua vez, resultou numa porcentagem menor de emulsificação ( $20,75 \pm 4,17$ ) quando comparado ao sobrenadante sem tratamento ( $52,87 \pm 1,63$ ). A acidificação e alcalinização do sobrenadante favoreceram os índices de emulsificação das amostras ( $61,61 \pm 1,4$  e  $62,59 \pm 3,57$ , respectivamente) enquanto o pH neutro foi desfavorável ( $E_{24} = 37,81 \pm 1,44$ ). Além disso, a emulsificação do querosene foi maior quando 2 % NaCl estava presente no sobrenadante em comparação com o sobrenadante não tratado. Nas concentrações de 6 e 10 %, valores reduzidos de  $E_{24}$  foram observados.

Sabe-se que a combinação de polissacarídeos, ácidos graxos e componentes protéicos dos bioemulsificantes conferem a essas moléculas um elevado potencial não

somente para formar as emulsões, como também para estabilizá-las (Uzoigwe et al., 2015). Por isso, a detecção dos aminoácidos e o estudo da contribuição dos componentes protéicos tem sido reportada na literatura (Ron and Rosenberg, 2001). Da mesma forma, os polissacarídeos também podem atuar eficientemente na formação de emulsões estáveis. Assim, é imperativo determinar a composição química do bioemulsificante de *E. aerogenes* LBPMA-BMA10, passo seguinte ao presente estudo.



**Figura 2.** Índices de emulsificação do sobrenadante livre de células de *Enterobacter aerogenes* BMA-10 em tubos com querosene (A) ou tolueno (B), 24 h após a agitação das amostras. Letras diferentes nas barras do mesmo tipo de tratamento indicam diferença estatisticamente significativa pelo teste Tukey ( $\rho < 0,05$ ), enquanto letras iguais indicam que as emulsificações obtidas nos não diferem entre si estatisticamente. Tratamentos: NaCl (2, 6 e 10 %), temperatura (4, 30 e 100 °C) e pH (2, 7 e 10). Legenda: ST= sem tratamento.

## CONCLUSÕES

As emulsões formadas pelo sobrenadante livre de células de *Enterobacter aerogenes* LBPMA-BMA10 são estáveis no tolueno mesmo quando as amostras foram previamente tratadas com diferentes concentrações de sal, alterações no pH (2, 7 e 10) ou submetidas durante uma hora às temperaturas de 4, 30 e 100 °C, o que indica que a molécula excretada tem elevada afinidade por hidrocarbonetos aromáticos.

## AGRADECIMENTO

Ao CNPq e a “S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool” pelo auxílio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- ABBASI, A. and AMIRI, S., 2008. Emulsifying behavior of an exopolysaccharide produced by *Enterobacter cloacae*. *African Journal of Biotechnology*, vol. 7, no. 10, pp. 1574-1576.
- COOPER, D. G. and GOLDENBERG, B. G., 1987. Surface-active agents from two *Bacillus* Species. *Applied of Environmental Microbiology*, vol. 53, no. 2, pp. 224-229. [http://dx.doi.org/0099-2240/87/020224-06\\$02.00/0](http://dx.doi.org/0099-2240/87/020224-06$02.00/0).
- DADRASNIA, A. and ISMAIL, S., 2015. Biosurfactant production by *Bacillus salmalaya* for lubricating oil solubilization and biodegradation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 12, no.8, pp. 9848–9863. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph120809848>.
- DIAB, A. and EL DIN, S. G., 2013. Application of the biosurfactants produced by *Bacillus* spp. (SH 20 and SH 26) and *Pseudomonas aeruginosa* SH 29 isolated from the rhizosphere soil of an Egyptian salt marsh plant for the cleaning of oil - contaminated vessels and enhancing the biodegradation of oily sludge. *African Journal of Environmental Science and Technology*, vol. 7, no. 7, pp. 671-679. <http://dx.doi.org/10.5897/AJEST2013.1451>.
- LIANG, T., WU, C., CHENG, W., CHEN, Y., WANG, C., WANG, I. and WANG, S., 2014. Exopolysaccharides and Antimicrobial Biosurfactants produced by *Paenibacillus macerans* TKU029. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol.172, no.2, pp. 933–950. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-013-0568-5>.
- RON, E. and ROSENBERG, E., 2001. Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, vol. 3, no. 4, pp. 229-236. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00190.x>.
- UZOIGWE, C., BURGESS, J.G., ENNIS, C.J. and RAHMAN, P.K., 2015. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Frontiers in Microbiology*, vol. 6, no.1, pp. 1-6. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00245>.

## **Atividade Antimicrobiana e Antibiofilme de Filtrados de Fungos Endofíticos**

Ana Graziela Gomes Travassos<sup>1\*</sup>; Ana Nirla da Silva Sampaio<sup>1</sup>; Maria de Fátima Oliveira Almeida<sup>1</sup>; Juliana Mesquita Vidal Martínez de Lucena<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas. \*agraziela616@gmail.com

---

### **RESUMO**

As interações benéficas fungo-planta podem gerar compostos de interesse biotecnológico com perspectivas de desenvolvimento de novos antimicrobianos. Neste trabalho, teve-se por objetivo testar os caldos metabólicos filtrados de fungos endofíticos quanto à sua atividade antimicrobiana e antibiofilme contra *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027) e *Escherichia coli* (ATCC8739). Fungos endofíticos (n=19) de diferentes plantas medicinais conservados na micoteca do IFAM/CMC, foram reativados e cultivados em meios líquidos sob agitação a 25° C, por cerca de 14 dias (dependendo da cepa). Os extratos foram obtidos por filtração do caldo de cultivo em membrana Millipore (0,22 µm) e aplicados contra os patógenos por método de microdiluição, na concentração de 3µg/ml, em triplicata. Os resultados foram obtidos por leitora de absorbância (630nm), determinando a taxa de crescimento (TC%) e taxa de formação de biofilme (TB%) após incubação a 37° C por 24h. *E. coli* não sofreu inibição de crescimento, nem de adesão, apresentando TC% e TB% acima de 50% em todos os casos. Contra *P. aeruginosa*, a melhor inibição ocorreu por *Aspergillus* sp. com TC = 39,4±1% e nenhum biofilme formado. Outros filtrados apresentaram TB<50% contra *P. aeruginosa* sem reduzir significativamente seu crescimento: *Trichoderma* sp. (35,9%), 2 cepas de *T. harzianum* (21,4% e 41,9%), *Fusarium falciforme* (31,7%) e *Penicillium* sp. (35,0%). Observou-se, portanto, que 6 cepas parecem promissoras para estudos posteriores de sua composição química, visando o isolamento dos compostos ativos.

**Palavras-chave:** *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, inibição de biofilme, inibição de crescimento, endófitos fúngicos.

---

### **Antimicrobial and Antibiofilm Effect of Endophytic Fungi Filtrates**

### **ABSTRACT**

Fungal-plant beneficial interactions might be responsible for the production of biotechnological interesting compounds with potential applicability in the development of new antimicrobials. The present work aimed to evaluate the antimicrobial and antibiofilm effect of fungal filtrates against *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027) and *Escherichia coli* (ATCC8739). Endophytic fungi (n=19) from different medicinal plants preserved in the IFAM/CMC collection were cultivated under agitation for 14 days at 25° C. The broth were filtrated through a Millipore membrane (0,22 µm). Each filtrate was tested in triplicate by microdilution against the pathogens in a concentration of 3µg/ml. The results were obtained by a microplate reader (630nm), determining the

growth inhibition (GI%) and biofilm inhibition (BI%) after 24h incubation at 37° C. *E. coli* was not inhibited, showing both indexes over 50%. The best score against *P. Aeruginosa* was achieved by *Aspergillus* sp. (GI = 39,4 ±1%) and the biofilm formation was null. Other filtrates inhibited the formation of biofilm by *P. aeruginosa* with less interference on growth: *Trichoderma* sp. (BI=35,9%), 2 strains of *T. harzianum* (BI=21,4% and 41,9%), *Fusarium falciforme* (BI=31,7%) and *Penicillium* sp. (BI=35,0%). These are promising strains for future chemical prospection of antimicrobial compounds.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, biofilm inhibition, growth inhibition, fungal endophytes

---

## INTRODUÇÃO

Os metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos levaram a crer que os fungos poderiam se tornar a fonte principal de compostos bioativos, acabando com a dependência dos hospedeiros produtores dos mesmos compostos (FREIRE et al. 2014). Apesar de, após algum tempo, ter sido observado que com sucessivas repicagens esses endófitos diminuem ou perdem a capacidade de produzir os metabólitos de interesse (SACHIN et al., 2013), esses simbiontes continuam sendo importantes alvos da busca por novos antimicrobianos.

Um desafio a ser vencido, é o controle de microrganismos produtores de biofilmes, muitas vezes associados à resistência aos antimicrobianos. Algumas espécies são mais habilidosas que outras na colonização de superfícies e muitos patógenos se utilizam de compostos de sua parede celular ou da síntese de exopolímeros para ligar-se às células e tecidos do hospedeiro (HALL-STOODLEY et al., 2004). *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* possuem reconhecida aptidão para causar doenças graves por meio de biofilmes e pela resistência adquirida aos antibióticos (BOUCHER, 2007; COS et al. 2010; SILVA et al., 2011).

O presente estudo teve por objetivo avaliar se alguns filtrados obtidos do caldo de cultivo de fungos endofíticos de diferentes plantas medicinais teriam a capacidade de inibir o crescimento microbiano e/ou prevenir a formação de biofilme por bactérias patogênicas *in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram cultivadas 30 cepas de fungos endofíticos conservadas na micoteca do IFAM/CMC. As linhagens selecionadas (n=19) foram cultivadas em frascos Erlenmeyers (250ml) por um período de 14 dias em caldo batata dextrose (BDA) ou

Sabouraud dextrose (SDA), dependendo do meio que possibilitou melhores condições de crescimento a 25°C sob agitação constante. Após a incubação, os micélios foram separados por filtração simples e os caldos de cultivo, filtrados por membrana Millipore (0,22μm). Os filtrados fúngicos (FF) assim obtidos foram submetidos aos testes antimicrobianos.

As cepas *Escherichia coli* (ATCC8739) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027) foram reativadas em caldo infusão cérebro coração (BHI) e incubadas por 24h a 35±2 °C. A concentração do inóculo foi determinada antes de cada ensaio utilizando câmara de Neubauer, aferindo-se a concentração de 10<sup>8</sup> BC/ml. Os ensaios de microdiluição para inibição de crescimento e de formação de biofilme seguiram metodologia de Kwasnyand Opperman (2010) com algumas modificações. A determinação da taxa de crescimento (TC%) e de formação de biofilme (TB%) foi realizada conforme Melo et al. (2016). Cada ensaio foi realizado em triplicata na concentração de 3μg/ml. Para controle positivo foi utilizada a amoxicilina na mesma concentração.

Após a inoculação, as microplacas de 96 poços foram submetidas ao espectrofotômetro de absorbância (630nm), gerando os dados iniciais (T<sub>0</sub>) para cada ensaio. Para a determinação da TC%, foi realizada leitura após 24h de incubação (T<sub>24</sub>). Para gerar os dados sobre a formação de biofilme num mesmo ensaio, foi removido o sobrenadante de cada microplaca, seguido de lavagem sequencial (3x) com água destilada estéril e coloração do biofilme com uma solução de cristal violeta (0,06%). Após secar e ressuspender o biofilme corado, foi realizada a 3<sup>a</sup> leitura (T<sub>B</sub>). Os valores gerados serviram para calcular as taxas percentuais em relação ao controle negativo (microrganismo inoculado somente com meio de cultura, sem inibidores).

Foram calculadas as diferenças T<sub>24</sub> – T<sub>0</sub>, poço a poço, indicando quanto o microrganismo cresceu em 24h. Cada triplicata gerou uma média e desvio padrão para cada FF. O mesmo procedimento foi adotado para o biofilme (T<sub>B</sub> – T<sub>0</sub>). Em seguida, foram calculados os valores percentuais, conforme abaixo:

TC% e TB%: a média das diferenças (triplicata) obtida para o controle negativo (CN) foi considerada como 100% de crescimento e de biofilme para cada cepa, calculando-se, em seguida, o percentual correspondente à média das diferenças das triplicatas de cada FF, conforme abaixo:

$$TC\% = \frac{FF(T24 - T0) \times 100}{CN(T24 - T0)} TB\% = \frac{FF(TB - T0) \times 100}{CN(TB - T0)}$$

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maioria dos trabalhos publicados com extratos fúngicos avalia a ação antimicrobiana por meio de difusão em ágar e microdiluição. Neste estudo, 19 filtrados do caldo metabólico de fungos endofíticos foram testados por microdiluição, observando sua atividade contra o crescimento dos patógenos de modo planctônico e aderido ao fundo das microplacas.

Nenhum FF foi eficaz em inibir *E. coli* nas condições deste estudo, apresentando valores de TC% e TB% acima de 50% em todos os casos. A menor TC% (64,5) foi resultante do FF de *Aspergillus* sp. que, entretanto, produziu biofilme em grande quantidade (TB = 92,0%). Por meio de antibiograma, Clementino et al. (2015) detectou inibição de *E. coli* por cepas endofíticas do mesmo gênero.

Contra *P. aeruginosa*, a melhor inibição ocorreu pelo FF de *Aspergillus* sp., que apresentou com TC = 39,4% e impediu totalmente a formação de biofilme. Os FF obtidos do cultivo de *Trichoderma* sp., *T. harzianum*, *Fusarium falciforme* e *Penicillium* sp. induziram uma TB<50% contra *P. aeruginosa* sem reduzir significativamente os valores de crescimento planctônico, os quais resultaram em TC>70% em todos os casos. Isto poderia indicar a capacidade de interferir com mecanismos envolvidos na colonização de superfícies. Os resultados são mais detalhados na Tabela 1.

Avaliando extratos de 13 cepas isoladas de *Costusspiralis* contra 7 espécies bacterianas e 2 leveduras por microdiluição, Ascêncio et al. (2014) obtiveram inibição de *P. aeruginosa* por 5 amostras em concentrações muito superiores (MIC= 125 $\mu$ g/ml) às relatadas aqui, e nenhuma delas foi eficaz contra *E. coli*. A partir dos resultados obtidos, observou-se que 6 cepas fúngicas podem gerar informações interessantes com estudos posteriores de sua composição química, visando o isolamento dos compostos ativos. Essas cepas mostraram-se promissoras no combate à *P. aeruginosa*.

**Tabela 1.** Taxa de crescimento (TC%) e de formação de biofilme (TB%) por microrganismos patogênicos em presença de diferentes filtrados fúngicos.

Linhagens	TC%		TB%	
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
<i>Trichoderma</i> sp.	106,2±5,2	182,2±27,8	35,9±47,0	89,8±15,4
NI	101,0±14,3	161,4±9,9	153,9±91,1	72,8±8,3
<i>T. harzianum</i>	85,5±5,9	150,6±16,9	21,4±103,6	106,7±48,8
<i>Trichoderma</i> sp.	97,6±7,6	130,8±3,7	171,8±57,3	117,3±61,4
<i>T. harzianum</i>	76,2±5,3	123,7±21,9	41,9±12,6	117,0±6,9
<i>T. harzianum</i>	97,6±2,3	147,5±19,1	151,3±59,1	183,5±59,4
<i>Aspergillus</i> sp.	88,2±6,3	144,0±11,3	137,6±57,9	155,3±22,0
<i>A. japonicus</i>	76,2±3,1	154,2±9,6	150,4±31,9	110,2±19,6
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	91,9±2,3	205,1±3,9	262,4±156,2	96,7±40,6
<i>A. flavus</i>	91,8±2,1	144,6±3,6	213,7±132,6	141,0±23,0
<i>Fusarium falciforme</i>	96,0±14,4	142,0±5,6	159,0±143,7	172,5±13,9
<i>Fusarium falciforme</i>	88,0±6,0	142,8±5,7	36,8±179,8	127,7±33,8
<i>Penicillium</i> sp.	89,1±2,1	164,2±4,7	35,0±81,1	158,0±44,0
<i>Colletotrichum</i> sp.	84,4±4,2	146,4±9,0	186,3±105,1	164,5±23,5
<i>Hypocrealixii</i>	76,9±5,1	150,6±6,3	84,6±184,8	116,2±21,1
<i>Aspergillus</i> sp	39,4±1,2	64,5±11,8	-5,1±158,5	92,0±14,9
<i>Aspergillus</i> sp.	86,2±1,3	177,9±3,5	347,9±95,6	120,2±14,8
<i>Trichoderma</i> sp.	97,5±4,6	134,7±13,9	382,9±58,6	133,7±40,3
<i>Aspergillus</i> sp.	88,5±9,5	129,9±6,6	254,7±159,1	120,0±38,3
Controle (+)	25,9±7,7	-19,5±26,7	87,3±54,0	-179,6±62,8
Controle (-)*	0,65±0,03	0,27±0,01	-0,04±0,1	-0,64±0,07

Controle (+): amoxicilina; Controle (-): caldo TSB-D com microrganismo-alvo; \*valor absoluto de densidade ótica, usado como referência para os cálculos de TC% e TB%. NI: cepa não identificada.

## CONCLUSÕES

O presente trabalho indicou cepas endofíticas promissoras para o isolamento de compostos eficazes contra *Pseudomonas aeruginosa*. No que diz respeito à inibição de biofilmes com extratos de fungos endofíticos, trata-se de um estudo pioneiro, cujos melhores resultados foram obtidos por *Trichoderma* sp., *T. harzianum*, *Fusarium falciforme*, *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp.

## AGRADECIMENTOS

Ao INCQS/FIOCRUZ-RJ pelas cepas padrão utilizadas neste estudo. À FAPEAM pela bolsa de fixação de doutores e apoio técnico (FIXAM). Ao Programa de Educação Tutorial pela bolsa PET-Biologia (tutora e estudante).

## REFERÊNCIAS

- ASCÊNCIO, P. G. M., ASCÊNCIO, S. D., AGUIAR, A. A., FIORINI, A., PIMENTA, R. S. 2014. Chemical assessment and antimicrobial and antioxidant activities of endophytic fungi extracts isolated from *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (Costaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2014, pp. 1-10.

BOUCHER, R. C. 2007. Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy. *Annual Reviews of Medicine*, vol. 58, n.1, pp. 157-170.

CLEMENTINO, L. C., BARBOSA, C.C., SILVA, D. P. D., SILVA, F. D., QUEIROZ, J.C.F. 2015. *Evidência – Ciência e Biotecnologia*, vol. 15, n. 1, pp. 37-56.

COS P.; TOTÉ, K.; HOREMANS, T.; MAES, L. 2010. Biofilms: an extra hurdle for effective antimicrobial therapy. *Current Pharmaceutical Design*, vol. 16, pp. 2279-2295.

FREIRE, F. C. O.; VASCONCELOS, F. R.; COUTINHO, I. B. L. 2014. Fungos endofíticos: uma fonte de produtos bioativos de importância para a humanidade. *Essentia*, vol. 16, n.1, pp. 61-102.

HALL-STOODLEY L, COSTERTON J. W.; STOODLEY, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* vol. 2, pp. 95-108.

KWASNÝ S.M, OPPERMAN T.J. 2010. Static biofilm cultures of Gram-positive pathogens grown in a microtiter format used for anti-biofilm drug discovery. *Current Protocols in Pharmacology*, 50:13.A.8.1-13.A.8.23. Acesso em 14.03.2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3272335/pdf/nihms236443.pdf>

MELO A.C.R., SANTOS A.L.M., VELOZO R.O., ARAÚJO F.A.M., DE LUCENA J.M.V.M. 2016. Antibiofilm effect of Tucumã (*Astrocaryum* sp.) endosperm against *Candida albicans*. *African Journal of Microbiology Research*, vol. 10, pp. 1056-1060.

SACHIN, N. et al. 2013. Do endophytic fungi possess pathway genes for plant secondary metabolites? *Current Science*, v.104, n. 2, pp. 178 182.

SILVA, A. F., SUZUKI, E. Y., FERREIRA, A. S., OLIVEIRA, M. G., SILVA, S. S., RAPOSO, N. R. B. 2011. *Brazilian Archives of Biology and Biotechnology*, vol. 54, n. 2, pp. 235-241.

## **Avaliação da atividade inibitória de *Lactobacillus* spp. sobre *Salmonella Heidelberg***

Ana Carolina Izidoro de Moraes<sup>1\*</sup>; Igor Herique Vellano Bastos<sup>1</sup>; Rafaela Altarugio<sup>1</sup>; Bianca Akemi Nagayoshi<sup>1</sup>; Letícia da Silveira Gross<sup>1</sup>; Adriano Sakai Okamoto<sup>1</sup>; Raphael Lucio Andreatti Filho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UNESP - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Departamento de Clínica Veterinária- Área de Ornitopatologia \*acimoraes@fmvz.unesp.br

---

### **RESUMO**

O Brasil é o segundo produtor mundial e o primeiro em exportação da carne de frango e isso gera desafios na produção que interfere diretamente na qualidade final da carne. Um dos principais agentes envolvidos na toxico infecção alimentar e nas infecções de aves é a *Salmonella* spp. Com isso, medidas alternativas estão sendo utilizadas dentre elas está o uso de probióticos como o *Lactobacillus* spp., que demonstra eficiência no combate a *Salmonella* spp. Para elucidar alguns dos mecanismos utilizados pelos *Lactobacillus* spp. para inibir à *Salmonella* spp. utilizamos a técnica Spot-on-the-lawn, que avalia o mecanismo de *Quorum Sensing*, e assim obtivemos resultados que levam a concluir que, após o contato prévio coma *Salmonella* spp. o *Lactobacillus* spp. aumentou seu halo de inibição contra a *Salmonella* spp.

**Palavras-chave:** *Lactobacillus* spp., *Salmonella* spp., *Quorum Sensing*, probióticos.

---

## **Evaluation of the inhibitory activity of *Lactobacillus* spp. on *Salmonella Heidelberg***

### **ABSTRACT**

Brazil is the second world product and the first one to export chicken meat and this is what happens in the final production of meat. One of the major agents involved in toxic foodborne infection and bird infections is *Salmonella* spp. With this, alternative measures are being used and among them is the use of probiotics such as *Lactobacillus* spp., which demonstrates efficiency in combating *Salmonella* spp. To elucidate some of the mechanisms used by *Lactobacillus* spp. to inhibit *Salmonella* spp., we used the technique Spot-on-the-lawn, which evaluates the mechanism of *Quorum Sensing*, and thus we obtained results that lead to the conclusion that, after previous contact

with *Salmonella* spp., the *Lactobacillus* spp. increased its inhibition halo against *Salmonella* spp.

**Keywords:** *Lactobacillus* spp., *Salmonella* spp., *Quorum Sensing*, probiotics.

---

## INTRODUÇÃO

Em 2015 o Brasil foi o segundo maior produtor mundial de carne de frango (Abpa, 2016). A ocorrência de doenças transmitidas por alimentos tem sido foco de discussões nos últimos anos, onde a *Salmonella* spp. é o principal e mais importante agente envolvido, e mesmo com o aumento da tecnologia ainda é um problema pertinente e de ocorrência mundial. (Boyle et al., 2007). Destacam-se as salmonelas paratípicas (Berchieri Jr., 2000) por não serem específica de aves, assim oferecendo maior risco para a população. Quando isoladas de aves e seus subprodutos têm maior frequência quando comparado com outros animais (Andreatti Filho., 2007). Além disso, a presença de animais portadores assintomáticos facilita a disseminação da doença (Shinohara, et al, 2008). O uso indiscriminado de antibióticos em aves possibilitou a manutenção de lotes positivos para *Salmonella* spp., o que promoveu o aumento da resistência antimicrobiana (Ribeiro et al, 2008), gerando assim pesquisas de medidas alternativas, entre elas o uso de probióticos (Santos and Gil-Tunes, 2005).

Probióticos são bactérias que fazem parte da microbiota natural das aves, e por serem produtos naturais não apresentam todas as ações que os antibióticos possuem, porém não geram resíduos nos produtos de origem. Além disso, eles induzem o equilíbrio da microbiota intestinal, onde produzem metabólitos com ação antimicrobiana, competem por sítios de ligações e auxiliam na melhoria da absorção de nutrientes (da Silva and Andreatti Filho, 2000; Kuritza et al, 2014).

O objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade dos *Lactobacillus* spp. inibirem o crescimento da *Salmonella* Heidelberg pelo mecanismo de *Quorum sensing*.

## MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de *Lactobacillus* spp. (LCT) e de *Salmonella* Heidelberg (SH) foram provenientes da bacterioteca do Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia UNESP- BOTUCATU.

Para o preparo do indutor, o *Lactobacillus plantarum* (LP) resistente aos antibióticos Ácido nalidíxico (Nal) e Rifampicina (Rif) foi cultivado em caldo DeMan-

Rugosa-Sharpe (MRS) já a SH foi cultivada em caldo infusão de cérebro e coração (BHI). Após o cultivo, foram agrupados 2 ml de caldo MRS, 2 ml de BHI, 100 microlitros do cultivo de LP e 100 microlitros do cultivo da SH. Dessa solução, foram passados 100 microlitros em um caldo MRS com Nal e Rif e cultivado. Em seguida 100 microlitros deste caldo com antibiótico foi acrescentado em caldo MRS e novamente incubado, o qual passou por um processo de filtração com uma membrana de 0.22 $\mu$ m, gerando assim o indutor.

O *Quorum sensing* foi avaliado pelo teste de antagonismo, o “Spot-on-the-lawn” com modificações. Onde os LCT foram cultivadas no caldo MRS e no filtrado, posteriormente foram gotejados 10 microlitros em pontos da placa de MRS e incubado. Em seguida foi preparado um caldo BHI com 0,65% de Agar Agar, 20 ml para cada placa de MRS, o qual foi mantido em banho Maria e quando atingiu 40°C acrescentou-se 200 microlitros do cultivo de SH em BHI. Este preparo foi desprezado cuidadosamente em cada placa, as quais foram incubadas e posteriormente realizada a leitura dos halos de inibição.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alguns *Lactobacillus* spp. possuem mecanismo de comunicação denominado de *Quorum Sensing* que produzem, liberam e reconhecem substâncias sinalizadoras, resultando em resposta coletiva a qual regulam atividades fisiológicas para sobreviver e prosperar. No presente trabalho observou que os *Lactobacillus* spp. sobreviveram à interação com a *Salmonela* spp. e a inibição foi aumentada após a interação. Após a condução do teste de “Spot-on-the-lawn” (Figura 1) houve um maior halo de inibição dos *Lactobacilos* spp. que foram cultivados com o indutor, do que os que não tiveram contato com o indutor (Miiler and Bassler, 2001; Sola et al, 2012; Hawver et al, 2016).

Os *Lactobacillus* spp. apresentaram antagonismo à *Salmonella* spp. (Figura 2), conforme descrito por Lima e colaboradores (2009). Com isso pode-se reduzir a ocorrência de tóxico infecção alimentar, a utilização de drogas no controle da doença nas aves e também os gastos e perdas econômicas para os produtores.

Figura 1. Comparação entre halos (1) *Lactobacillus* spp. cultivados sem indutor e (2) com o indutor frente a *Salmonella* Heidelberg pelo método “Spot-on-the-lawn” representados em milímetros.

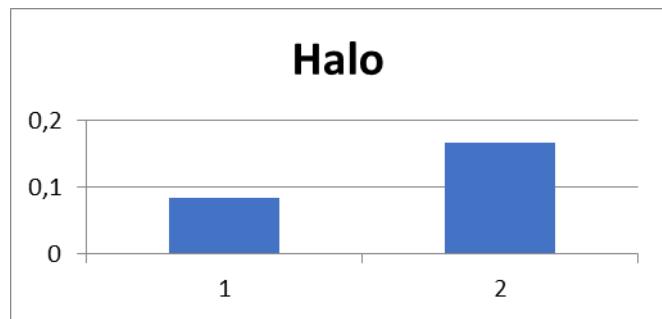


Figura 2. (1) Foto do teste “Spot-on-the-lawn” de *Lactobacillus* spp. cultivados sem o indutor frente a *Salmonella* Heidelberg . (2) Foto do teste “Spot-on-the-lawn” de *Lactobacillus* spp. cultivados com o indutor frente a *Salmonella* Heidelberg.



## CONCLUSÃO

Conforme os resultados obtidos, pode-se concluir que as amostras de *Lactobacillus* spp. têm um sistema de comunicação *Quorum sensing* amplamente adaptado, que os confere capacidade de comunicar e de alterar o comportamento em resposta a presença da *Salmonella* Heidelberg. Além disso, novas estratégias antimicrobianas poderiam ser estudadas com as substâncias que este mecanismo produz para a inibição do crescimento da *Salmonella* Heidelberg.

## REFERÊNCIAS

- Andreatti filho, Raphael Lucio. Paratifo aviário. Saúde aviária e doenças. São Paulo: Roc, p. 96- 111, 2007.
- Berchieri Junior, Ângelo. Salmonellose Aviária. In: Berchieri Júnior, A.; Macari, m. Doença das aves, Campinas: Facta, 2000. Cap 4, p. 185-195.
- Boyle EC, Bishop JL, Grassl GA, Finlay BB. *Salmonella: from pathogenesis to therapeutics*. J. Bacteriol. Mar; v. 189, ed. 5, p.1489–1495. 2007.
- Da Silva, Edir Nepomuceno; Andreatti Filho, Raphael Lucio. Próbióticos e prebiótico na avicultura. II Simpósio de Sanidade Avícola.
- Hawver, L. A.;Jung, S. A.; Ng, Wai-Leung. *Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems*. Federaton of European Microbiological Societies. *Microbiology Reviews*, v. 40, n.5, p. 738–752, 2016.
- Kuritza, Leandro Nagae; Westphal, Patrick; Santin, Elizabeth. Próbiótico na avicultura. Cienc. Rural vol.44 no.8 Santa Maria 2014.
- Lima, Edna Tereza; Andreatti Filho, Raphael Lucio; Gonçalves, Guilherme Augusto Marietto; Rocha, Ticiana Silva; Menconi, Anita Menconi; Okamoto, Adriano Sakai. Perfil de sensibilidade de *Salmonella enterica* sorovar *Enteritidis* isolada de aves, frente a drogas e substâncias antimicrobianas produzidas por *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus salivarius*. *Veterinária e Zootecnia*, v.16, n.1, p.180-189, 2009.
- Miller, M. B.; Bassler, B. L. *Quorum sensing in bacteria*. Annu. Rev. Microbiol. v.55: p.165-199, 2001.
- Ribeiro,A.R.; Kellermann,Aline; Santos,Luciana.R.; Nascimento, Vladimir Pinheiro. Resistência antimicrobiana de *Salmonella enteritidis* isoladas de amostras clínicas e ambientais de frangos de corte e matrizes pesadas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* , Belo Horizonte. Vol. 60, n.5 (out. 2008), p. 1259-1262.
- Santos, J. R. G. ; Gil-Turnes, C. Probióticos em avicultura. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.35, n.3, p.741-747, mai-jun, 2005.

Shinohara, N. K. S.; Barros, V. B.; Jimenez, S. M. C.; Machado, E. C. L.; Dutra, R. A. F.; Lima Filho, J. L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. Ciênc. saúde coletiva vol.13 n.5 Rio de Janeiro Sep./Oct. 2008.

Sola, Marília Cristina; Oliveira, Aline Pedrosa; Feistel, Janaína Costa; Rezende, Cíntia Silva Minafra. Mecanismo de *Quorum Sensing* e sua relevância na microbiologia de alimentos. Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, N.14; p.1 4 a 19 – 2012.

## Diversidade de fungos basidiomicetos em tocos de eucalipto

Beatriz Lourenço Manzato<sup>1</sup>; Caroline Lourenço Manzato<sup>1</sup>; Djanira Rodrigues Negrão<sup>2</sup>; Paula Leite dos Santos<sup>3</sup>; Tadeu Antônio Fernandes da Silva Júnior<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade do Sagrado Coração.

\*beatrizmanzato@hotmail.com

<sup>2</sup>Faculty of Forestry, University of Toronto.

<sup>3</sup>Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA), Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’ (UNESP)

---

### RESUMO

O eucalipto (*Eucalyptus* spp.) é o gênero florestal mais utilizado para fins comerciais em nível mundial. Uma das maiores preocupações dos silvicultores são os resíduos deixados na área após o corte do eucalipto. Na tentativa de solucionar o problema, os produtores acabam optando pelo método de rebaixamento ou remoção dos tocos. Entretanto, a destoca mecanizada causa inúmeros impactos negativos à sustentabilidade florestal. O emprego de fungos degradadores de madeira pode ser uma alternativa eficaz sem impactar negativamente o ambiente, mas ainda é um método pouco estudado e empregado em áreas de reflorestamento de eucalipto. Este trabalho se destaca por ser o primeiro a realizar o levantamento da diversidade de fungos basidiomicetos macroscópicos em tocos de eucalipto, em áreas de reflorestamento no estado de São Paulo, de diferentes idades, com potencial para utilização na destoca biológica. Foram realizadas sete coletas entre os meses de setembro de 2016 a fevereiro de 2017, onde cada fungo coletado foi fotografado individualmente para identificação. Os fungos de maior ocorrência nos tocos com dois anos de idade foram dos gêneros *Coprinus* spp. e *Ganoderma* spp. Na área com os tocos de um ano de idade houve predomínio dos gêneros *Coprinus* spp. e *Galerina* spp. Não foram encontrados fungos nos tocos da área recém-cortada. Houve maior ocorrência e diversidade de fungos basidiomicetos macroscópicos na área de reflorestamento de eucalipto com tocos de dois anos de idade.

**Palavras-chave:** Destoca biológica. Floresta plantada. Áreas de reflorestamento. Resíduos florestais. Bioprospecção.

---

### Diversity of basidiomycete fungi on eucalyptus stumps

### ABSTRACT

*Eucalyptus* (*Eucalyptus* spp.) is the forest genus most commonly used for commercial purposes worldwide. One of the biggest concerns of foresters is the residues left in the area after cutting the eucalyptus. In an attempt to solve the problem, the producers end up opting for the method of lowering or removing the stumps. However, mechanized clearing causes numerous negative impacts to forest sustainability. The use of wood-degrading fungi can be an effective alternative without negatively impacting the environment, but it is still a poorly studied method used in reforestation areas of

eucalyptus. This work stands out as being the first to carry out a survey of the diversity of macroscopic basidiomycete fungi in eucalyptus stumps, in reforestation areas in the state of São Paulo, of different ages, with potential for use in biological stump removal. Seven samplings were carried out between September 2016 and February 2017, where each fungus was photographed individually for identification. The most frequent fungi in the two years old stumps were of the genus *Coprinus* spp. and *Ganoderma* spp. In the area with one year old stumps, there was predominance of the genus *Coprinus* spp. and *Galerina* spp. No fungi were found on the stumps of the freshly cut area. There was a higher occurrence and diversity of macroscopic basidiomycetes fungi in the area of reforestation of eucalyptus with two years old stumps.

**Keywords:** Biological stump removal. Planted forest. Reforestation areas. Forest residues. Bioprospecting.

---

## INTRODUÇÃO

O eucalipto (*Eucalyptus* spp.) é originário da Oceania, sendo reconhecidas cerca de 730 espécies. Entretanto, apenas 20 delas são utilizadas para fins comerciais em nível mundial (Santarosa et al., 2014).

Uma das maiores preocupações dos silvicultores são os resíduos deixados na área após o corte do eucalipto, sendo eles tocos, cepos ou cepas. Quando a área florestal é reformada, o próximo plantio é realizado nas entrelinhas, dobrando-se assim o número de tocos na área. Um método utilizado para solucionar o problema é o rebaixamento ou arranque desses tocos. Porém, são inúmeros os impactos negativos à sustentabilidade florestal, como remoção do carbono orgânico, aumento da erosão, exportação de nutrientes do solo e alterações nas ciclagens de nutrientes e na qualidade dos recursos hídricos (Foelkel, 2014).

Os principais problemas causados pelo rebaixamento e remoção de tocos são a compactação do solo, perturbação da microbiota, remoção de matéria orgânica, impactos no armazenamento do carbono e emissão de gases de efeito estufa, aumento na erosão e alteração da ciclagem de nutrientes, além da redução da biodiversidade (Casseli, 2013).

O emprego de fungos degradadores da madeira não patogênicos ao eucalipto, conhecidos como fungos de podridão branca, é um dos métodos com maior potencial para acelerar o processo de degradação de tocos e raízes. Nessa prática basicamente, é

feita a inoculação dos tocos com fungos adaptados à região onde serão aplicados, sendo esta prática denominada destoca biológica (Abreu et al., 2007).

A ação de fungos e bactérias é responsável pelo processo de degradação das raízes contribuindo para a sustentabilidade desse sistema, pois há uma redução da exportação de nutrientes da área e a manutenção da biodiversidade (Abreu et al., 2007; Alonso et al., 2007).

O conhecimento da diversidade de fungos basidiomicetos degradadores de madeira é de extrema importância para o setor florestal brasileiro, visto que possuem potencial para serem empregados na destoca biológica do eucalipto. Este trabalho é o primeiro a avaliar a diversidade de fungos basidiomicetos macroscópicos de ocorrência nos tocos de eucalipto, além de estudar a relação da idade dos tocos com a sua diversidade.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

As coletas foram realizadas em áreas de reflorestamento de eucalipto da empresa LWARCEL Celulose em talhões com tocos recém cortados, e com um e dois anos de idade, totalizando-se três áreas: área 1 (tocos recém-cortados); área 2 (tocos com um ano de idade) e área 3 (tocos com dois anos de idade). Cada área foi dividida em três subáreas: 1A, 1B e 1C (subáreas da área 1); 2A, 2B e 2C (subáreas da área 2) e 3A, 3B e 3C (subáreas da área 3). A dimensão de cada subárea foi de 20 x 5 metros (20 tocos nas linhas x 5 tocos nas entrelinhas), em um total de 100 m<sup>2</sup>. Cada subárea foi espaçada em 200 metros entre si.

Os fungos foram coletados entre os meses de setembro de 2016 a fevereiro de 2017 totalizando-se sete coletas, nas seguintes datas: 08/09/2016 (1<sup>a</sup> coleta); 28/09/2016 (2<sup>a</sup> coleta); 27/10/2016 (3<sup>a</sup> coleta); 27/11/2017 (4<sup>a</sup> coleta); 14/12/2016 (5<sup>a</sup> coleta); 24/01/2017 (6<sup>a</sup> coleta) e 15/02/2017 (7<sup>a</sup> coleta), sendo que em cada coleta todas as áreas foram vistoriadas em sua totalidade.

Cada fungo coletado foi fotografado no local de ocorrência e acondicionado em sacos de papel de 500 g em uma caixa de isopor para transporte até o Laboratório de Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade do Sagrado Coração para identificação dos gêneros e das espécies segundo Largent (1986) e Lincoff (1982).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O maior número de fungos basidiomicetos foi detectado na área com os tocos de dois anos de idade (área 3) (Tabela 1), sendo o maior número encontrado nos meses de setembro (1<sup>a</sup> coleta), outubro (3<sup>a</sup> coleta) e dezembro (5<sup>a</sup> coleta). Na área com tocos de um ano de idade (área 2) os fungos foram encontrados apenas no mês de outubro (3<sup>a</sup> coleta) (Tabela 1). Não foram encontrados fungos basidiomicetos na área com os tocos recém-cortados (área 1) (Tabela 1).

A maior abundância de fungos basidiomicetos foi verificada na área com os tocos de dois anos de idade (área 3), sendo predominantes os gêneros *Coprinus* spp., *Ganoderma* spp. e *Pycnoporus sanguineus* (Tabela 2).

Tabela 1. Número de fungos basidiomicetos macroscópicos coletados em tocos de eucalipto em sete coletas realizadas em três áreas de reflorestamento com tocos de diferentes idades: área com tocos recém-cortados (Área 1 – subáreas 1A, 1B e 1C); área com tocos de um ano de idade (Área 2 – subáreas 2A, 2B e 2C); e área com tocos de dois anos de idade (Área 3 – subáreas 3A, 3B e 3C).

Coletas	Área 1			Área 2			Área 3		
	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C
1	0	0	0	0	0	1	7	14	5
2	0	0	0	0	0	0	1	0	2
3	0	0	0	4	0	4	0	1	4
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	4	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	1	0	0

Tabela 2. Abundância de fungos basidiomicetos macroscópicos coletados em três áreas de reflorestamento com tocos de diferentes idades: área com tocos recém-cortados (Área 1 – subáreas 1A, 1B e 1C); área com tocos de um ano de idade (Área 2 – subáreas 2A, 2B e 2C); e área com tocos de dois anos de idade (Área 3 – subáreas 3A, 3B e 3C).

Gênero/Espécie	Área 1			Área 2			Área 3		
	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C
<i>Auricularia</i> spp.	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Coprinus</i> spp.	0	0	0	2	0	3	1	11	1
<i>Fuscoporia</i> spp.	0	0	0	0	0	0	0	0	4
<i>Galerina</i> spp.	0	0	0	2	0	2	0	0	1
<i>Ganoderma</i> spp.	0	0	0	0	0	0	7	4	3
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	0	0	0	0	0	0	1	3	5

## CONCLUSÕES

A idade dos tocos influenciou a quantidade e a diversidade dos fungos basidiomicetos macroscópicos nas áreas de reflorestamento de eucalipto avaliadas.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, L.D. and MARINO, R.H. and MESQUITA, J.B. and RIBEIRO, G.T., 2007. Degradação da madeira de *Eucalyptus* sp. por basidiomicetos de podridão branca. *Arquivos do Instituto Biológico*, vol. 74, pp. 321-328.
- ALONSO, S.K. and SILVA, A.G. and KASUYA, M.C.M. and BARROS, N.F. and CAVALLAZZI, J.R.P. and BETTUCCI, L. and LUPO, S. and ALFENAS, A.C., 2007. Isolamento e seleção de fungos causadores de podridão branca da madeira em florestas de *Eucalyptus* sp. com potencial de degradação de cepas e raízes. *Revista Árvore*, Viçosa, vol. 31, pp. 145-155.
- CASSELI, V., 2013. *Remoção de tocos de eucalipto com sistema de serra tubular*. Piracicaba: Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 111 p. Dissertação de Mestrado em Ciências.

FOELKEL, C., 2014. *O Problema dos Tocos Residuais das Florestas Plantadas de Eucaliptos. Eucalyptus Online Book & Newsletter.*

LARGENT, D. L., 1986. *How to identify mushrooms.* Eureka, CA: Mad River Press.

LINCOFF, G. H., 1982. *Guide to Mushrooms.* New York: Simon & Schuster. 511 p.

SANTAROSA, E. and PENTEADO JÚNIOR, J.F. and GOULART, I.C.G.R., 2014. *Transferência de tecnologia florestal: cultivo de eucalipto em propriedades rurais: diversificação da produção e renda.* Brasília: Embrapa. 138 p.

## **Avaliação de microrganismos contaminantes da micropropagação de pinhão manso**

Bruno Fernando de Souza<sup>1</sup>; Daniela Defavari do Nascimento<sup>1\*</sup>; Rosana Maria de Oliveira Freguglia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Tecnologia de Piracicaba “Dep. Roque Trevisan” - Fatec Piracicaba.  
\*daniela.nascimento01@fatec.sp.gov.br

---

### **RESUMO**

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) é uma planta rústica, perene e que possui elevado teor de óleo em suas sementes, tendo assim, grande potencial para a produção energética. A propagação de genótipos superiores ainda é um desafio que pode ser minimizado com o auxílio de técnicas biotecnológicas, como a micropropagação. A cultura de tecidos é uma técnica bastante empregada para a multiplicação clonal de plantas *in vitro*. No entanto, deve-se ter cuidado com o manuseio dos materiais de forma a evitar contaminações por microrganismos, geralmente fungos e bactérias. Mesmo com todos os cuidados, ainda é possível que haja contaminantes que não possam ser removidos pelos métodos de assepsia, como é o caso dos microrganismos endofíticos, que podem ou não causar patogenia nos tecidos em que se hospedam. Neste trabalho, foram isolados os microrganismos presentes nas contaminações de explantes de pinhão manso já estabelecidos *in vitro*. Para esta finalidade, microrganismos persistentes ao longo do processo de regeneração de plantas foram inoculados em placas com meios de cultura seletivos, YPD e YPD acrescido de antibióticos para fungos e leveduras e ágar nutritivo para bactérias. Posteriormente, realizou-se a coloração de Gram para determinação da estrutura celular bacteriana e sua forma. Amostras provenientes de contaminação de calos regenerados a partir de gemas (cocos gram +), em sua maioria, são diferentes dos encontrados nos calos provenientes de embriões (bacilos gram +).

**Palavras-chave:** micropropagação, contaminação, microrganismos, pinhão manso.

---

**Evaluation of contaminating microorganisms at *Jatropha* micropropagation**

### **ABSTRACT**

*Jatropha curcas* L. is a rustic, perennial plant that has a high oil content in its seeds, and thus has great potential for energy production. The propagation of higher genotypes is still a challenge that can be minimized with the aid of biotechnological techniques, such as micropropagation. Tissue culture is a widely-used technique for clonal multiplication of plants *in vitro*. However, care must be taken in handling the materials to avoid contamination by microorganisms, usually fungi and bacteria. Even with all care, it is still possible that there are contaminants that cannot be removed by asepsis methods, such as endophytic microorganisms, which may or may not cause pathogenesis in the tissues in which they are housed. In this work, the microorganisms present in the contaminations of *Jatropha* explants, already established *in vitro*, were isolated.

Persistent microorganisms obtained during plant regeneration process were inoculated in plates with selective culture media, YPD and YPD supplemented with antibiotics for fungi and yeasts and nutrient agar for bacteria. Subsequently, Gram staining was performed to determine the bacterial cell structure and its shape. Samples from contamination of callus regenerated from buds (gram + coccus), are usually different from those found in calli from embryos (gram + bacilli).

**Keywords:** micropagation, contamination, microorganisms, *Jatropha*.

---

## INTRODUÇÃO

A cultura do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) se destaca como fonte alternativa de cultura energética, que está ganhando importância, devido seu teor elevado de óleo (30-40%) nas sementes e a composição lipídica semelhante ao combustível fóssil. Além disso, por ser tóxica à ingestão humana, não compete com fontes de óleo comestível (Deodore and Johnson, 2008).

Um desafio a ser vencido é a produção e obtenção de mudas selecionadas a partir de plantas matrizes superiores e livres de contaminação microbiológica. Com isso, a micropagation aparece como alternativa viável para obtenção de plantas livres de patógenos e para a propagação de elevada quantidade de plantas, em curto período de tempo (Saturnino et al., 2005).

A associação entre meio de cultura e as condições físicas nas quais são incubados os explantes, formam um ambiente extremamente favorável à proliferação de microrganismos (Damião Filho, 1995). Essas contaminações podem ocorrer pela presença de micróbios externos (epifíticos) ou endofíticos (Esposito-Polesi, 2011). No caso de contaminações epifíticas, o manuseio e a falta de prática do manipulador podem ser um fator determinante para que isso ocorra. Porém, mesmo tomando todas as providências de uma assepsia rotineira, às vezes não é possível contornar completamente a contaminação, por esta ter uma base endógena (Cid, 2010).

Contaminações que ocorrem frequentemente na cultura de tecidos vegetais podem não ser consequência de ineficiência na técnica ou de descuido do manipulador, mas sim da presença de microrganismos endofíticos, que nem sempre são caracterizados como patógenos (Azevedo, 1998).

O presente trabalho objetivou identificar quais os microrganismos responsáveis pela contaminação de explantes de pinhão manso micropagados em meios de cultura diversos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas gemas apicais/laterais e embriões de sementes de pinhão manso, retiradas de plantas cultivadas no campus da Fatec Piracicaba “Dep. Roque Trevisan”. As gemas foram coletadas, com aproximadamente 0,5cm de comprimento. No laboratório, as gemas e sementes foram submetidas a processo de assepsia em câmara de fluxo laminar, com solução de hipoclorito de sódio comercial (3:1) por 2 minutos, seguida de solução de etanol 70% por 1 minuto. Os explantes foram então enxaguados em água autoclavada e inoculados nos meios de cultura.

Os meios de cultura usados foram: M1 – MS (MURASHIGE and SKOOG, 1962); M2 – MS + 0,2mg.L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP) + 1,0mg.L<sup>-1</sup> de ácido naftaleno acético (NAA); M3 – 50% dos sais do meio MS + 0,2mg.L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP) + 1,0mg.L<sup>-1</sup> de ácido naftaleno acético (NAA). Todos os meios foram suplementados com sacarose (30 g L<sup>-1</sup>) e Phytagel® (2,3g.L<sup>-1</sup>). O pH foi aferido para 5,7±0,1 antes da autoclavagem (120°C e 1 Kgf.m<sup>-2</sup>) por quinze minutos.

A incubação foi realizada em sala de crescimento climatizada (25 ± 3 °C), sob fotoperíodo de 16 horas luz/escuro. Os explantes foram avaliados a cada 30 dias, contados da data de inoculação, período esse que compreende a fase de estabelecimento da cultura.

Microrganismos que apareceram durante o processo de micropromoção, após estabelecimento do cultivo *in vitro*, foram isolados em meios de cultura apropriados para posterior caracterização. Para identificação de fungos, foram usadas placas de Petri com meios de cultura YPD e YPD acrescido de antibióticos (YPD/A) (100mg.L<sup>-1</sup> de cloranfenicol + 100mg.L<sup>-1</sup> de tetraciclina). Para isolamento de bactérias, foram usados meios ágar nutritivo (NA). Análises de Gram também foram efetuadas. Uma alçada de cada colônia do microrganismo contaminante foi dissolvida em solução salina 0,9% (NaCl). Amostras destas diluições foram estriadas (semeadas com auxílio da alça de platina) nos meios de cultura YPD, YPD/A e NA. Para observação do crescimento do microrganismo, foram feitos plaqueamento, através da técnica de profundidade (*pour plate*), em meio NA.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, para estabelecimento da cultura *in vitro* a contaminação é maior, especialmente por fungos, tendo sido obtidos níveis de 90% de contaminações quando se utilizou embriões zigóticos como explante, e 80% de perdas por contaminação

quando foram utilizadas gemas axilares. O índice de sobrevivência dos explantes não contaminados nos primeiros 30 dias, foi de 100%. Nesta fase, os fitorreguladores presentes nas formulações dos meios M2 e M3 (1,0mg;L<sup>-1</sup> NAA e 0,2mg.L<sup>-1</sup> BAP) se mostraram essenciais para o desenvolvimento dos explantes, sendo responsáveis pela indução de regeneração celular e desenvolvimento de calos com aspecto embriogênico. Explantes mantidos na formulação de meio M1 (sem fitorreguladores) não foram induzidos à formação de calos.

As contaminações que surgiram no estabelecimento *in vitro* da cultura não foram analisadas neste trabalho, dando-se importância às contaminações que apareceram após cultivo já estabelecido. Mais especificamente, 4 meses após inoculação 30% dos calos em regeneração começaram a apresentar contaminações. Deste material contaminado, foram escolhidas 8 amostras representativas das contaminações obtidas nos calos regenerados a partir dos explantes, 4 de gemas (amostras 1 a 4) e 4 de embriões zigóticos (amostras 5 a 8), as quais foram diluídas em solução salina 0,9% (NaCl) e inoculadas em meios YPD, YPD/A e NA conforme descrito na metodologia.

As 8 amostras cresceram nos meios sem antibióticos, exceto as amostras 5 e 8 que não cresceram no meio NA quando inoculado *pour plate*. Estas mesmas duas amostras, foram as únicas que cresceram também no meio YPD/A (Tabela 1).

Análise de coloração de Gram (Figura 1) indica que as amostras provenientes de contaminação de calos regenerados a partir de gemas (cocos gram +), em sua maioria, tratam-se de microrganismos diferente dos encontrados nos calos provenientes de embriões (bacilos gram +). As únicas exceções foram a amostra 4, que além de apresentar bactérias tipo cocos semelhantes às amostras 1, 2 e 3, apresentou também bactérias do tipo bacilos, todas Gram positivas. A amostra 7 apresentou contaminação na forma de cocos gram positivos, semelhante às amostras de contaminações de calos provenientes de gemas. Outra exceção foi a amostra 8, que quando o microrganismo foi isolado em YPD/A (Figura 1 8a), observou-se pequenos bacilos gram negativos, enquanto que, microrganismos da mesma amostra, quando isolados em NA (Figura 1 8b) apresentou bacilos gram positivos, semelhantes aos obtidos em análise das amostras 5 e 6.

É importante mencionar que as transferências para renovação de meios de cultura foram realizadas sempre num mesmo dia para todos os calos, independente do tipo de explante de indução, desta forma, a chance de ter ocorrido contaminação por

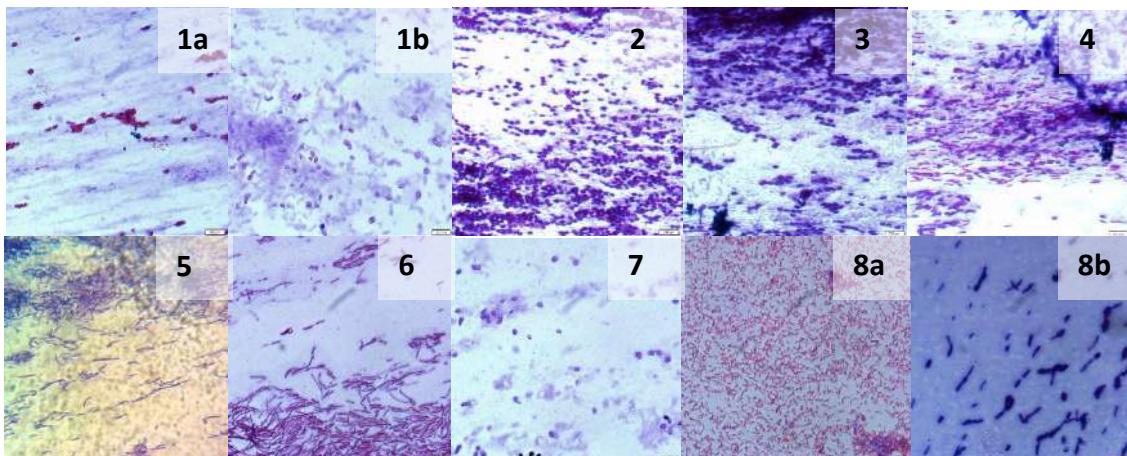
manipulação fica menor, já que microrganismos contaminantes diferentes foram encontrados conforme a fonte de explante usados.

Conforme Azevedo (1998), as técnicas biotecnológicas de propagação de plantas, quase nunca levam em consideração os microrganismos endofíticos, o que pode ocasionar desequilíbrio entre a planta e o endófito, resultando em respostas patogênicas. Desta forma, há possibilidade de a contaminação ter sido desencadeada pelo estresse sofrido pelo material já estabelecido *in vitro*, levando-se à suspeita de se tratar da manifestação de microrganismos endofíticos.

**Tabela 1:** Crescimento microbiológico nos meios de cultura NA, YPD e YPD/A, avaliação de Gram e forma dos microrganismos observados em microscópio óptico.

Meio de Cultura	1	2	3	4	5	6	7	8
NA	+	+	+	+	+	+	+	+
NA <i>pour plate</i>	+	+	+	+	-	+	+	-
YPD	+	+	+	+	+	+	+	+
YPD/A	-	-	-	-	+	-	-	+
Gram	-	+	+	+	+	-	-	+ em NA - em YPD
Forma	cocos	cocos	cocos	cocos e bacilos	bacilos	bacilos	cocos	bacilos

(+) houve crescimento e (-) não houve crescimento



**Figura 1:** Micrografias de análise de gram de microrganismos isolados, contaminantes da micropropagação de pinhão manso. Amostras 1 a 4 microrganismos contaminantes em calos provenientes de gemas como explantes; Amostras 5 a 8 microrganismos contaminantes em calos provenientes de embriões como explantes. Algumas amostras apresentaram microrganismos diferentes dependendo do meio em que foi isolado: 1a: isolado em YPD, 1b: isolado em NA, 8a: isolado em YPD/A, 8b: isolado em NA. Demais amostras apresentaram microrganismos com características similares independente do meio usado para seu isolamento.

## CONCLUSÕES

Os fitorreguladores (1,0mg;L<sup>-1</sup> NAA e 0,2mg.L<sup>-1</sup> BAP) se mostraram essenciais para a regeneração dos explantes de pinhão manso.

Amostras provenientes de contaminação de calos regenerados a partir de gemas (cocos gram +), em sua maioria, são diferentes dos encontrados nos calos provenientes de embriões (bacilos gram +).

## AGRADECIMENTO

Agradecemos ao CNPq pela bolsa de iniciação científica concedida a Bruno Fernando de Souza, para desenvolvimento deste projeto.

## REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, J.L., 1998. Microrganismos endofíticos. In: I.S. MELO, ee. Ecologia Microbiana. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, pp. 117-137.
- CID, L.P.B. (editor técnico), 2010. *Cultivo in vitro de plantas*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica.
- DAMIÃO FILHO, C.F., 1995. *Micropropagação*. Jaboticabal: FUNEP.
- DEORE, A. C. and JOHNSON, S., 2008. High-frequency plant regeneration from leaf-disc culture of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. *Plant Biotechnology Reports*, vol. 2, no. 1, pp. 7-11.
- ESPOSITO-POLESI, N.P., 2011. Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. *Revista Brasileira de Biociências*, vol. 9, no. 4, pp. 533-541.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F., 1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, vol. 15, no. 1, pp. 473-479.
- SATURNINO, H.M.; PACHECO, D.D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA N.; GONÇALVES, N.P., 2005. Cultura do Pinhão Manso (*Jatropha curcas* L.). *Informe Agropecuário*, vol. 26, no. 229, pp. 44-78.

## Biofertilizante no controle de fitonematóides em tomateiro

Camila Kiritani<sup>1\*</sup>; Valdionei Giassi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Pesquisa Mokiti Okada, filial da Fundação Mokiti Okada, Ipeúna/SP, CEP 13537-000, Brasil.

\*(e-mail: microbiologia@cpmo.org.br)

<sup>2</sup> Centro de Pesquisa Mokiti Okada- CPMO, filial da Fundação Mokiti Okada

---

### RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação no solo do biofertilizante FertBokashi®Premium, produto a base de água, extrato de levedura, composto orgânico e melaço de cana, para a redução populacional de nematóides nas raízes. O experimento foi realizado em casa de vegetação contendo 3 tratamentos: sem aplicação do biofertilizante, aplicação do biofertilizante preventivamente e aplicação do biofertilizante curativamente com 7 repetições. Após 60 dias, as plantas foram coletadas e avaliadas a massa seca da parte aérea, massa fresca da raiz e contagem de ovos e juvenis. A aplicação do biofertilizante reduziu o número de ovos e juvenis tratados preventivamente em 56% em relação ao controle. A massa fresca da raiz e a massa seca da parte aérea não diferiram significativamente do controle.

**Palavras-chave:** produto biológico, *Meloidogyne* spp., nematóides das galhas, controle biológico, *Solanum lycopersicum*

---

### Biofertilizer in the control of phytonematoids in tomato crop

### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of the application in the soil of a biofertilizer FertBokashi®Premium, water-based product, yeast extract, organic compound and sugar cane molasses, for the population reduction of nematodes in the roots. The experiment was carried out in a greenhouse containing 3 treatments: no biofertilizer application, biofertilizer application preventively and biofertilizer application curatively with 7 replications. After 60 days, the plants were collected and evaluated dry mass of the aerial part, fresh mass of the root and egg and juveniles counts. The application of the biofertilizer reduced the number of eggs and juveniles treated preventively in 56% in relation to the control. The fresh root mass and dry mass of the aerial part did not differ significantly from the control.

**Keywords:** biological product, *Meloidogyne* spp., root-knot nematode, biological control, *Solanum lycopersicum*

---

## INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é atacado por inúmeros patógenos que causam os mais variados tipos de doenças. Os nematóides do gênero *Meloidogyne*, formam estruturas no sistema radicular da planta denominadas galhas e podem ocasionar murcha das plantas durante os períodos mais quentes do dia, desfolha prematura, sintomas de deficiência mineral, cloroze, redução e deformação do sistema radicular. São os patógenos de maior importância econômica, causando perda de produtividade com cerca de 25 a 85% (Araújo and Marchesi, 2009; Carvalho et al., 1999; Nunes et al., 2010; Sousa et al., 2006). Quando atacadas severamente apresentam redução do tamanho e da eficiência de seu sistema radicular (Robl et al., 2012).

O controle de nematóides por meio de nematicidas além de apresentar riscos à saúde humana, animal e ao meio ambiente são pouco eficientes no controle de meloidoginose em hortaliças (Sousa et al., 2006). Contudo, o controle biológico tem se apresentado uma alternativa mais viável para o manejo destes fitopatógenos, por minimizar o dano ambiental e por ser economicamente mais vantajoso, em comparação aos métodos químicos convencionais (Araújo and Marchesi, 2009).

Neste trabalho, o objetivo foi avaliar o potencial de controle de nematóides fitoparasitos por meio da aplicação do biofertilizante no solo, fornecendo assim uma alternativa de controle destes patógenos.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Centro de Pesquisa Mokiti Okada- Ipeúna-SP.

Utilizou-se vasos com capacidade para 2 litros, como substrato foi utilizado uma mistura de solo arenoso (50%) e areia grossa (50%), ambos submetidos ao processo de autoclavagem a 121°C por duas horas.

Foram utilizadas sementes de tomates da variedade “Santa Clara” semeadas em bandejas plásticas de 128 células, contendo substrato autoclavado. Após 20 dias, as mudas foram transplantadas em vasos, onde cada vaso recebeu uma muda, representando uma unidade experimental.

Para este estudo, foi utilizado o FertBokashi®Premium, biofertilizante a base de água, extrato de levedura, composto orgânico e melaço de cana de açúcar.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, sendo 3 tratamentos com 7 repetições. Desta forma, o experimento contou com os seguintes tratamentos: T1- testemunha, irrigado somente com água; T2- aplicação do biofertilizante, de forma preventiva (antes da inoculação dos nematóides) e T3- aplicação do biofertilizante, de forma curativa (após a inoculação dos nematóides). A aplicação do produto foi realizada semanalmente via irrigação, com 0,05 mL por vaso.

Foram inoculados 3.300 ovos de *Meloidogyne* spp. por planta. Antes da inoculação, foram feitos 3 orifícios de 3 cm de profundidade em cada vaso, ao redor do colo da planta, para que a suspensão infestasse diretamente a raiz. Com o auxílio de um micropipetador, foram inoculados 1 mL da suspensão em cada orifício.

Após 60 dias, foram coletadas e extraídas as raízes das plantas e avaliados os seguintes parâmetros: contagem de ovos e juvenis na massa total e em 10 gramas de raiz, massa seca da parte aérea e massa fresca da raiz. Para extração dos ovos e juvenis utilizou-se o método de Jenkins (Jenkins, 1964).

As médias foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade com o auxílio do programa SISVAR (Ferreira, 2000).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

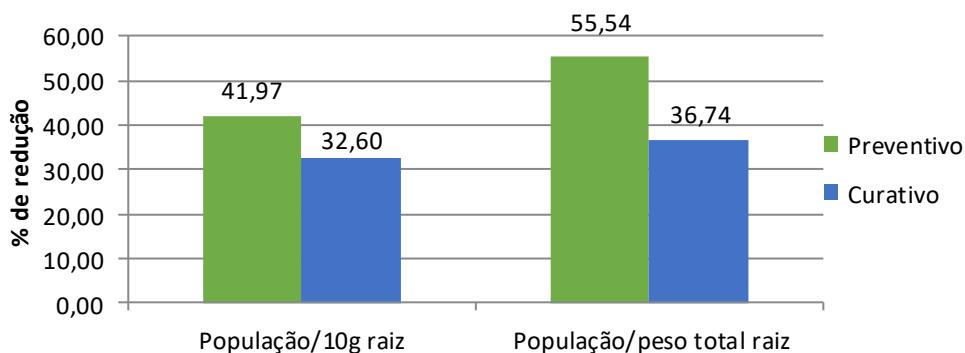
Os tratamentos que foram submetidos a aplicação do biofertilizante foram eficientes na redução da população dos nematóides em relação ao tratamento controle (Tabela 1). O número de ovos e juvenis na massa fresca total das raízes, foi significativamente menor quando a aplicação do biofertilizante ocorreu de forma preventiva, reduzindo em 56% da população em relação ao controle. Apesar do tratamento curativo não diferir estatisticamente, este reduziu em 37% o número de ovos e juvenis em relação ao tratamento, onde não houve a aplicação do produto (Figura 1).

Tais resultados corroboram com o estudo de Sousa et al. (2006), onde a redução do número de massa de ovos de nematóides em raízes de tomate foi ocasionada pelo tratamento das mudas com cepas de micro-organismos. Segundo Maciel and Ferraz (1996), o controle biológico de nematóides pode ocorrer pela produção de exsudatos radiculares com propriedades nematicidas ou nematostáticas, reduzindo assim a capacidade reprodutiva.

**Tabela 1-** Efeito do biofertilizante sobre o número de ovos e juvenis na massa fresca de 10 gramas de raiz (MFR 10), número de ovos e juvenis na massa fresca total da raiz (MFR total), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa fresca da raiz (MFR) de tomateiro cv. Santa Clara.

Tratamento	MFR 10 (nº ovos e juvenis)	MFR Total (nº ovos e juvenis)	MSPA (g)	MFR (g)
Controle	3.460 a <sup>(1)</sup>	15.529 b <sup>(1)</sup>	19,43 a <sup>(1)</sup>	42,95 a <sup>(1)</sup>
Preventivo	2.124 a	6.904 a	19,85 a	35,6 a
Curativo	2.467 a	9.823 ab	20,09 a	39,42 a
CV%	27,84	30,23	8,14	10,34

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade. Dados transformados a  $x^{0,5}$ .



**Figura 1-** Percentual de redução populacional de *Meloidogyne* spp. nos tratamentos com aplicação de biofertilizante preventivo e biofertilizante curativo em relação ao controle.

De acordo com Freitas (2001), a transformação dos exsudatos radiculares pelos micro-organismos pode fazer com que o nematóide não reconheça o estímulo quimiotrópico e continue movimentando-se no solo até morrer. O mesmo autor ainda cita que as rizobactérias ou seus metabólitos desencadeiam reações de hipersensibilidade nas células vegetais, impedindo que as fêmeas dos nematóides consigam energia suficiente para produzir ovos.

Apesar de não haver diferenças estatísticas entre os tratamentos no número de ovos e juvenis em 10 gramas de raiz, a redução da populacional é bastante relevante em relação ao controle, com diferenças de 1340 e 993 ovos e juvenis no tratamento preventivo e curativo respectivamente.

Em infestações severas, os nematóides fitoparasitas tendem a reduzir o desenvolvimento e consequentemente diminuem a massa da matéria seca das raízes

(Vilas-Boas et al., 2002). Todavia, a massa fresca da raiz avaliada neste estudo, obteve maior peso somente no tratamento controle. A massa seca da parte aérea também não demonstrou resultados significativos em relação ao controle, porém obteve uma maior massa no tratamento curativo com aplicação do biofertilizante.

Estudos demonstram que o controle biológico dos fitonematoides utilizando cepas individuais ou associações de micro-organismos, possuem capacidade de biocontrole desses fitopatógenos, como produção de antibióticos, enzimas líticas e indução a resistência (Dallemore-Giaretta et al., 2010; Sousa et al., 2006), corroborando que a aplicação do biofertilizante via irrigação no solo realizado de forma preventiva, pode ser uma alternativa viável no manejo do nematoide das galhas.

## CONCLUSÕES

O biofertilizante mostrou-se eficiente no controle dos fitonematóides quando aplicado no solo preventivamente. Avaliações a campo serão necessárias para comprovar a eficiência do produto.

## AGRADECIMENTO

Apoio financeiro do Centro de Pesquisa Mokiti Okada e Korin Agropecuária.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, F. F. and MARCHESI, G. V. P., 2009. Uso de *Bacillus subtilis* no controle da meloidoginose e na promoção do crescimento do tomateiro. *Ciência Rural*, vol.39, pp.1558-1561.
- CARVALHO, J.W.A., MALUF, W.R., FIGUEIRA, A.R. and GOMES, L.A.A., 1999. Obtenção de linhagens de tomateiro de crescimento determinado com resistência múltipla a nematóides de galhas e a tospovírus. *Ciência e Agrotecnologia*, vol.23, pp.593-607.
- DALLEMORE-GIARETTA, R. et al., 2010. Associação de *Pochonia chlamydosporia*, *Bacillus cereus* e fibra de coco no controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro. *Nematologia Brasileira*, vol.34, nº1, pp. 18-22.

FERREIRA, D. F. *Manual do Sistema SISVAR para análises estatísticas*. Universidade Federal de Lavras, 2000. 66 p.

FREITAS, L.G., 2001 [viewed 02 March 2017]. *Rizobactérias versus nematóides* [on line]. Viçosa. Available from: <http://www.ufv.br/dpf/labnematologia/rizo.pdf>.

JENKINS, W. R., 1964 A rapid centrifugal – flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Report*, vol. 48, pp. 692.

MACIEL, S.L. and FERRAZ, L.C.C.B., 1996. Reprodução de *Meloidogyne incognita* raça 2 e de *Meloidogyne javanica* em oito espécies de plantas medicinais. *Scientia Agricola*, vol.53, pp.956-960.

NUNES, H. T., MONTEIRO, A.C. and POMELA, A.W.V., 2010. Uso de agentes microbianos e químico para o controle de *Meloidogyne incognita* em soja. *Acta Scientiarum Agronomy*, Maringá, vol. 32, no. 3, pp. 403-409.

ROBL, D.; et al., 2012. Controle de nematóides das galhas em plantas de tomate com isolados mutantes de *Paecilomyces Lilacinus*. Universidade Federal do Paraná – UFPR, Iniciação Científica CESUMAR jul./dez, vol. 14, no. 2, pp. 213-219.

SOUSA, C. S., SOARES, A.C.F., GARRIDO, M. S. and ALMEIDA, G.M.C.O., 2006. Estreptomicetos no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol.41, pp.1759-1766.

VERZIGNASSI, J. R, et al., 2007. Podridão de raízes de bananeira PV0376 causada por *Meloidogyne incognita* no Pará. In *Anais da Jornada de Iniciação Científica do Pet*, 2. Belém, PA, 2007. Belém, PA: PROEN/UFRA.

VILAS-BOAS, L. C. et al., 2002. Reação de clones de bananeira (*Musa* spp.) ao nematóide *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, Raça 2. *Revista Brasileira de Fruticultura*, vol. 24, no. 3, pp. 690-693.

## **Monitoramento do crescimento de bactérias formadoras de biofilmes**

Camila A. Ribeiro<sup>1</sup> \*; Jackson E. N. Batalha<sup>1</sup>; William de M. Silva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia, FCA-Unesp, Botucatu, \*camila.amorimribeiro@gmail.com

<sup>2</sup> Instituto de Biotecnologia-IBTEC Unesp-Botucatu e Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia, FCA-Unesp, Botucatu.

---

### **RESUMO**

Os chamados biofilmes são, basicamente, uma camada (ou película) de micro-organismos fortemente aderidos sobre uma superfície. Este fenômeno ocorre em diversas situações do cotidiano, por exemplo, em instalações hidráulicas, como tubulações, pias e cubas até mesmo sobre instrumentos cirúrgicos, médicos e odontológicos. Esta fina camada na escala de micrômetros é protegida por uma substância extracelular polimérica que é peculiar dos biofilmes, conferindo ao organismo presente no biofilme uma resistência aos agentes externos naturais nocivos à sua manutenção e reprodução. Este trabalho tem como objetivo o levantamento da curva de crescimento de bactérias formadoras de biofilmes. Dessa maneira, está sendo apresentada a metodologia empregada para três bactérias formadoras de biofilme: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Com isso, espera-se que essas informações ajudem diretamente na saúde pública em vista do papel quase invisível dos biofilmes na transmissão de doenças

**Palavras-chave:** Superfícies, Adesão, Saúde, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*.

---

### **Monitoring the growth of biofilm-forming bacteria**

#### **ABSTRACT**

So-called biofilms are basically a layer (or film) of microorganisms strongly adhered to a surface. This phenomenon occurs in various everyday situations, for example, in hydraulic installations, such as pipes, sinks and vats even on surgical, medical and dental instruments. This thin layer on the micrometer scale is protected by a polymeric extracellular substance that is peculiar to biofilms, giving the organism present in the biofilm a resistance to natural external agents harmful to its maintenance and reproduction. This work aims to survey the growth curve of biofilm forming-bacteria. In this way, it is being presented the methodology used for three biofilm forming bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Thus, it is hoped that this information will directly aid public health in view of the almost invisible role of biofilms in disease transmission.

**Keywords:** Surface, Attach, Health, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*.

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos alguns trabalhos interessantes têm mostrado a importância do estudo dos biofilmes (Gaspar-Grillo et al., 2012) principalmente com os aspectos pertinentes à saúde humana, visto que diversos micro-organismos causadores de doenças podem ser encontrados inseridos em biofilmes (Mendes et al., 2011; Flores et al., 2009). M. Wilkins afirma que por volta da década de 1970, cientistas perceberam que diversas bactérias eram capazes de aderir e crescer em diferentes superfícies do ecossistema. Em seu trabalho, Wilkins et al. (2014) explica sobre 5 etapas do ciclo de vida de um biofilme: (1) a adesão das bactérias, (2) divisão das bactérias, (3) camada protetora extracelular polimérica e (4) a formação de colônias em estruturas tridimensionais capazes de transportar oxigênio e nutrientes através de canais de comunicação. Por fim, em (5) o ciclo se encerra com o espalhamento de pequenas porções do biofilme que formarão um novo biofilme (Wilkins et al., 2014). Além desses estudos, A. Braem produziu um mecanismo de liberação controlada de antibiótico na superfície de titânio para evitar rejeições causadas por biofilmes que conduzem a perda de ossos, amputações e recidivismo (Braem et al., 2015).

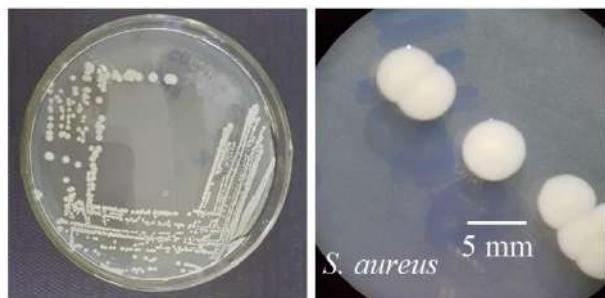
## MATERIAL E MÉTODOS

Cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* foram descongeladas da bacterioteca do Instituto de Biotecnologia Unesp - IBTEC. Foram utilizados os processos convencionais de plaqueamento com ágar TSA e MacConkey, além dos testes coloração Gram e EPM –mili – citrato. Após o isolamento de colônias individuais para cada placa, foi realizada a inoculação em meio líquido em que imediatamente foi colocado à temperatura de 37° C. A partir de então, nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 24, 30 e 48 horas foram feitas medidas de absorbância através de um equipamento marca Eppendorf biophotometer ® d30 para a avaliação da densidade ótica.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 2 podem ser observadas duas fotografias. À esquerda verifica-se a placa contendo as colônias oriundas da bactéria *Staphylococcus aureus*, enquanto que à direita, está sendo apresentada a colônia isolada em que foi retirada a bactéria para a

inoculação no meio líquido. O diâmetro de 5 mm foi medido com o auxílio de uma lupa.



**Figura 2** – À esquerda, observa-se o crescimento da *Staphylococcus aureus* em 48h de incubação a 37° C. À direita, observa-se uma imagem feita com o auxílio de uma lupa no momento de escolha das colônias a serem utilizadas, com aproximadamente 5 mm de diâmetro.

Na figura 3, semelhante à figura anterior, pode-se observar a placa feita para a *Staphylococcus aureus*. Após, o tempo de 48 horas na temperatura de 37° C foi retirada a bactéria de uma colônia isolada para o procedimento de inoculação no meio líquido. De maneira análoga, foi obtida a colônia, porém percebe-se que o diâmetro é de aproximadamente 2 mm.



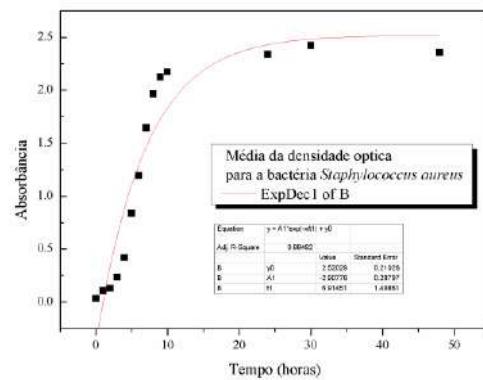
**Figura 3** - À esquerda, observa-se o crescimento da *Escherichia coli* em 48h de incubação a 37° C. À direita, observa-se a colônia a ser utilizada com aproximadamente 2 mm de diâmetro.

Na Figura 4, semelhante à figura anterior, pode-se observar a placa feita para a *Pseudomonas aeruginosa*. Após, o tempo de 48 horas na temperatura de 37° C foi retirada a bactéria de uma colônia isolada para o procedimento de inoculação no meio líquido.



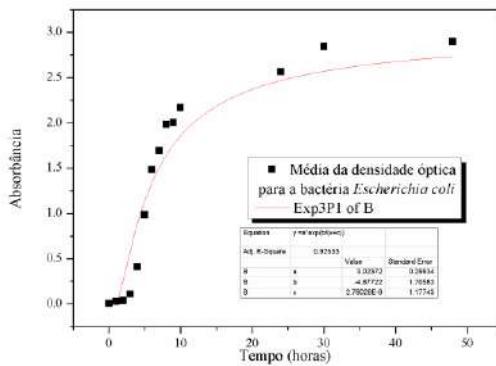
**Figura 4** - À esquerda, observa-se o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* em 72h de incubação a 37° C. À direita, observa-se a colônia com aproximadamente 8 mm de diâmetro.

Foram construídos os gráficos da variação da absorbância em função do tempo após a realização de todas as medidas em triplicata. Na Figura 5, observa-se a curva de crescimento obtida para a *Staphylococcus aureus*. Pode-se notar um crescimento mais acentuado entre os tempos de 1 hora a até 10 horas. Após dez horas na estufa, a leitura de absorbância se manteve estável, o que indica que a densidade óptica chegou ao seu máximo. Provavelmente, isto está relacionado com o limite máximo de crescimento das bactérias nesse meio.



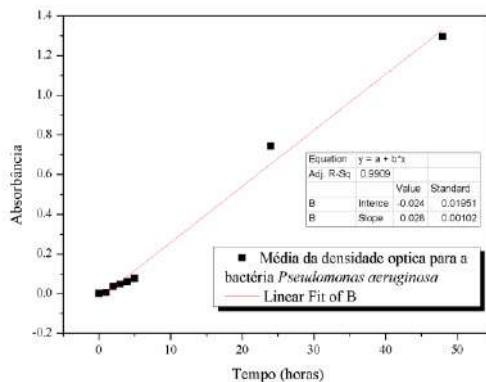
**Figura 5**- Curva de crescimento para a *Staphylococcus aureus* obtida através da leitura da absorbância em cada tempo. Os pontos de absorbância do gráfico são resultados de uma média, pois a leitura foi feita em triplicata.

Na Figura 6, observa-se a curva de crescimento obtida para a *Escherichia coli*. Assim como a curva obtida para a *Staphylococcus aureus*, tem-se um elevado aumento até as dez horas. Porém, percebe-se que a leitura de densidade óptica é levemente menor para essa bactéria, sendo um indício da menor taxa de crescimento.



**Figura 6**– Curva de crescimento para a *Escherichia coli* obtida através da leitura da absorbância em cada tempo. Os pontos de absorbância do gráfico são resultados de uma média, pois a leitura foi feita em triplicata.

Na Figura 7, observa-se uma curva de crescimento para *Pseudomonas aeruginosa* totalmente diferente em relação ás anteriores.



**Figura 7**- Curva de crescimento para da *Pseudomonas aeruginosa* obtida através da leitura da absorbância em cada tempo. Os pontos de absorbância do gráfico são resultados de uma média, pois a leitura foi feita em triplicata.

## CONCLUSÕES

O isolamento das colônias para a verificação do crescimento das bactérias é essencial para evitar problemas de contaminação, e com isso ter maior confiabilidade no ensaio de absorbância. A variação do diâmetro entre as colônias oriundas de diferentes bactérias é uma indicação da taxa de crescimento para cada uma delas. Um aumento de leitura de absorbância nas primeiras horas indica um aumento substancial na taxa de crescimento de cada bactéria. Diferentemente, ocorre uma estabilização da absorbância.

Diante disso, é preciso entender os fatores envolvidos nesse comportamento, e com isso, conciliar esses fatores com o exato momento de formação do biofilme.

## AGRADECIMENTO

Este trabalho foi realizado com recursos obtidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa – FAPESP, processo nº 2015/20438-6. Agradecemos também a SISPROPE-Unesp pela bolsa de iniciação científica.

## REFERÊNCIAS

- [1] GASPAR-GRILLO, J. et al. Isolamento e identificação de micobactérias em águas tratadas provenientes do sistema de abastecimento de Araraquara-SP. *Alim. Nutr.*, vol. 23, n. 1, pp. 147-155, 2012. ISSN 0103-4235 ISSN 2179-4448 on line.
- [2] MENDES, R. et al, 2011. Contaminação por *Bacillus cereus* em superfícies de equipamentos e utensílios em unidade de alimentação e nutrição. *Ciência e Saúde coletiva*, vol. 16 (9), pp. , 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232011001000030>.
- [3] FLORES, A. et al, 2009. Oral bacterial adhesion on amorphous carbon films. *Diamond & Related Materials* vol. 18, pp. 1179–1185, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diamond.2009.03.003>.
- [4] WILKINS, M. et al, 2014. New approaches to the treatment of biofilm-related infections. *Journal of Infection*, vol. 69, no. S1, pp. S47–S52, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.014>.
- [5] BRAEM, A. et al, 2015. Novel anti-infective implant substrates: Controlled release of antibiofilm compounds from mesoporous silica-containing macroporous titanium. *Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces*, vol. 126, pp. 481–488, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.12.054>.

## **Influência da aeração na produção de ectoína por *Halomonas salina***

Carina Heigl<sup>1-2\*</sup>; Nei Pereira Junior<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes - UFRJ \*e-mail: ca.heigl@gmail.com  
<sup>2</sup>Escola de Química - UFRJ.

---

### **RESUMO**

O soluto compatível ectoína fornece proteção celular contra os efeitos da dessecção, congelamento e aquecimento, e apresenta aplicações em diversos segmentos da indústria. O gênero *Halomonas* tem atraído interesse para a produção de ectoína pelos altos valores de produtividade obtidos e técnica fácil de obtenção do produto. Produção química industrial não é viável pelo alto custo dos precursores, a baixa qualidade do produto e a formação de co-produtos. O processo biotecnológico possui algumas vantagens: microrganismo utilizado robusto e de fácil manuseio e reagentes com custo e toxicidade mais baixos comparado com a síntese química. Entretanto, alguns obstáculos ainda precisam ser superados, como as altas concentrações de sal necessárias, que podem causar problemas nos equipamentos e limitam o crescimento celular, diminuindo assim a concentração do produto. Após a otimização do meio com o uso de metodologias estatísticas, a influência da aeração na produção de ectoína foi investigada em biorreatores instrumentados, usando diferentes níveis de taxa de aeração e velocidade de agitação. Assim, a aeração se mostrou um fator limitante, já que o seu controle causou um ganho de 6 vezes na concentração de ectoína, com diferença de 50% entre os dois biorreatores. Produtividade de ectoína aumentou de 0.011g/L.h para 0.238g/L.h com taxa de aeração de 2.5 vvm, junto com o fator de rendimento por célula ( $Y_{P/X}$ ) acima de 0.8 g/g. Esses resultados mostram um grande avanço se comparado com a literatura, que obteve fatores por volta de 0.25 g/g.

**Palavras-chave:** Sólido compatível, fermentação, halofílica.

---

**The Influence of Aeration in Ectoine Production by *Halomonas salina***

### **ABSTRACT**

The compatible solute ectoine provides cell protection against the effects of desiccation, freezing and heating, and presents applications in several industry segments. The genus *Halomonas* has been regarded as promising for ectoine production due to high productivity rates and easy technique described for secreting the product. Chemical industrial production is not viable because of high cost of the precursors, the low product quality and the formation of by-products. The biotechnological process, however, has some advantages: the microorganism used is robust and easy to handle

and the reagent cost and toxicity are lower compared to the chemical synthesis. Nevertheless, some obstacles still should be overcome, such as those concerning the required high salt concentrations, which may cause problems for the equipments and is responsible for limiting cell growth, lowering the product concentration. After the optimization of the medium with the use of statistical methods, the influence of aeration in ectoine production was investigated in instrumented bioreactors, using different levels of both stirring speed and air flow. Thus, aeration was shown as a limiting factor, once its control caused a 6 times gain in the ectoine concentration, with a 50% gain between both bioreactors. Ectoine productivity increased from 0.011g/L.h to 0.238g/L.h at 2.5 vvm air flow rate, along with a product yield per cell factor ( $Y_{P/X}$ ) higher than 0.8 g/g. These results shows a big advance over those previously reported in the literature, which reached yield factors around 0.25 g/g.

**Keywords:** Compatible solute, fermentation, halophilic.

---

## INTRODUÇÃO

Ectoína é um soluto compatível presente nos três reinos e descoberta em 1985 por Galinski em *Halorhodospira* (anterior *Ectothiorhodospira*) *halochloris*, no Egito. Além do seu efeito osmoprotetor, esse soluto compatível também confere proteção contra os efeitos do dessecamento, congelamento e aquecimento, tanto para macromoléculas como para células inteiras. Tais características atraíram muita atenção para essa molécula, que começou a ser obtida pela extração de produtores naturais (Sauer and Galinski, 1998) ou pela síntese química (Lentzen and Neuhaus, 2013; Pastor et al., 2010), porém de forma ineficiente. As aplicações são das mais diversas, sendo elas a nível molecular ou celular. Podemos listar sua capacidade de estabilidade enzimática e proteica, de DNA (podendo ser aplicada na otimização da técnica de microarranjo) (Pastor et al., 2010) e de células inteiras, aumentando a sobrevivência de diversos microrganismos como *E. coli* nos processos de secagem e de cultivo em altas concentrações de sal (Nagata et al., 2002). As aplicações mais interessantes são as biomédicas, onde a estabilização das células é capaz de evitar o desenvolvimento de doenças, entre elas o Mal de Alzheimer, a encefalopatia espongiforme, doença de Machado-Joseph, entre outras (Heigl, 2016). Muitos microrganismos foram descritos produtores de ectoína, e um número maior ainda é capaz de fazer uso desse soluto compatível como um protetor osmótico (Pastor et al., 2010; Steger et al., 2004). Porém, sua produção é limitada por diversos razões, como os baixos fatores de rendimento e as altas concentrações de sal necessárias para o estresse osmótico. Assim, desenvolvimentos no processo de síntese de ectoína, seja pela otimização do meio de

cultivo ou nas condições de fermentação são necessárias, a fim de se obter maiores concentrações de ectoína.

## MATERIAL E MÉTODOS

- 1- Microrganismos e Inóculo: a cepa utilizada foi *Halomonas salina* DSMZ 5928, obtida liofilizada e então ativada (Meio DSM 593) e congelada (Meio DSM 593 + 30% glicerol) no LADEBIO. Para ativação da cultura para posterior fermentação, foi utilizado o protocolo de Lang et al. (2011), a 30°C e 200 rpm. Para fermentação visando a síntese de ectoína, foi utilizado o protocolo de Heigl, (2016).
- 2- Quantificação de biomassa, substrato e produto: para a quantificação de biomassa, foi utilizada a técnica de correlação de massa seca e absorvância a 600nm. As concentrações de glutamato monossódico e ectoína foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE – Waters, Milford, MA, E.U.A), como descrita por Onraedt et al. (2005).
- 3- “Ordenha Bacteriana”: para a obtenção da fração intracelular de ectoína, após a centrifugação da amostra e remoção do sobrenadante, foi adicionado o mesmo volume do sobrenadante em água destilada. Após 10 minutos incubado a 30°C e 200 rpm, a cultura é novamente centrifugada e o sobrenadante seguinte guardado para análise.
- 4- Fermentação em Frascos Cônicos Agitados: após a ativação em frascos cônicos agitados, a 30°C e 200 rpm, por 24 horas, 10% (20 mL) da suspensão bacteriana foram inoculados em frascos cônicos com meio de fermentação, prosseguindo assim para a fermentação a 30°C e 200 rpm. Amostras foram removidas em intervalos constantes para levantamento do perfil cinético.
- 5- Fermentação em Biorreator Instrumentado: após a ativação em frascos cônicos agitados, a 30°C e 200 rpm, por 24 horas, 10% (200 mL) da suspensão bacteriana foram inoculados em 2 L de meio de fermentação em um frasco de 4 L. A fermentação foi realizada a 30°, pH 7,1 com agitação variando conforme tempo (500 rpm, aumentada para 600 rpm com 10 horas de processo, e 700 rpm com 16 horas). Diferentes taxas de aeração foram utilizadas: 1,7 vvm e 2,5 vvm. Amostras foram removidas em intervalos constantes para levantamento do perfil cinético.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma vez que a cultura de *Halomonas salina* para a síntese de ectoína apresenta altas concentrações celulares, diferentes taxas de aeração foram testadas a fim de observar se há ganhos na produtividade, investigando assim a influência da aeração na síntese de ectoína. Como é possível observar na tabela abaixo (Tabela 1), o primeiro ganho com a mudança do sistema é a diminuição do tempo do processo, passando de 30 para 20 horas. Além disso, também houve um ganho grande na proporção de ectoína produzida por células, mostrando que essa maior aeração estimulou mais a produção de ectoína do que o crescimento celular em si. Entre o sistema de frascos cônicos e o biorreator II, que apresentou os melhores resultados, foi possível observar um ganho de 14 vezes (de 0,331 g/L para 4,764 g/L) na concentração de ectoína, e, principalmente, um ganho de 21 vezes na produtividade volumétrica de ectoína, variável que considera produção em g/L por hora de processo (de 0,011 g/L.h para 0,238 g/L.h). Entre os dois reatores, houve um aumento de 50% na taxa de aeração, mantendo a mesma condição de agitação, o que resultou em um aumento de 50% na concentração de ectoína e na produtividade volumétrica. Outra observação de grande valia é no aproveitamento do substrato, uma vez que o sistema de frascos cônicos não forneceu condição boa suficiente para a cultura consumir o glutamato monossódico, tendo sido consumido apenas 16% do mesmo fornecido, enquanto os biorreatores tiveram consumo de aproximadamente 87%.

Tabela 1 – Variáveis de Resposta dos sistemas Frascos Cônicos e Biorreatores  
Instrumentados com vazão de ar de 1,7 vvm (Biorreator I) e 2,5 vvm (Biorreator II)

<b>Variável</b>	<b>Frascos</b>	<b>Biorreator I</b>	<b>Biorreator II</b>
	<b>Cônicos</b>		
<b>Tempo (h)</b>	30	20	20
<b>Y<sub>P/S</sub> (g/g)</b>	0,048	0,085	0,140
<b>Y<sub>P/X</sub>(g/g)</b>	0,140	0,635	0,883
<b>Y<sub>x/s</sub> (g/g)</b>	0,342	0,134	0,159
<b>RPS (%)</b>	16,0	87,27	87,0
<b>X máx (g/L)</b>	2,542	5,146	5,603
<b>Ect máx (g/L)</b>	0,331	3,114	4,764
<b>Q<sub>P</sub> (g/L.h)</b>	0,011	0,155	0,238
<b>Q<sub>x</sub> (g/L.h)</b>	0,085	0,257	0,280

## CONCLUSÕES

Tais resultados mostram que a aeração é um fator limitante não apenas para a cultura e seu crescimento, mas principalmente para a síntese de ectoína, que pareceu ser mais eficiente. Estudos posteriores serão realizados a fim de se observar se maiores ganhos serão obtidos com maiores taxas de aeração, e até que ponto esse gasto será economicamente viável.

## AGRADECIMENTO

Agradeço ao grupo do LADEBIO – UFRJ e o professor Nei Pereira Jr, por todas as oportunidades de desenvolvimento do projeto.

## REFERÊNCIAS

- HEIGL, C., 2016. *Produção de Ectoína por Bactérias Halofílicas do Gênero Halomonas*. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro. 113 p. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.
- LANG, Y. et al., 2011. Production of ectoine through a combined process that uses both growing and resting cells of *Halomonas salina* DSM 5928. *Extremophiles*, vol. 15, pp. 303–310.
- LENTZEN, G. and NEUHAUS, T. *Synthesis of Cyclic Amidines*, 2013.
- NAGATA, S. et al., 2002. Effect of compatible solutes on the respiratory activity and growth of *Escherichia coli* K-12 under NaCl stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 94, no. 5, pp. 384–389.
- ONRAEDT, A. E. et al., 2005. Optimization of ectoine synthesis through fed-batch fermentation of *Brevibacterium epidermidis*. *Biotechnology Progress*, vol. 21, pp. 1206–1212.
- PASTOR, J. M. et al., 2010. Ectoines in cell stress protection: Uses and biotechnological production. *Biotechnology Advances*, vol. 28, no. 6, pp. 782–801.
- SAUER, T. and GALINSKI, E. A., 1998. Bacterial milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 57, no. 3, pp. 306–313.
- STEGER, R. et al., 2004. LcoP, an osmoregulated betaine/ectoine uptake system from *Corynebacterium glutamicum*. *FEBS Letters*, vol. 573, pp. 155–160.

## Ácido indolacético produzido por *Torulaspora globosa* imobilizada em espuma poliuretano

Caroline Jonas de Andrade\*; Márcia Maria Rosa Magri

Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação – Campus Araras/SP. \*e-mail: carolinejonas@gmail.com

---

### RESUMO

Micro-organismos promotores de crescimento vegetal são conhecidos por auxiliarem as plantas em seu desenvolvimento, sendo a produção de hormônios vegetais um dos principais mecanismos. A produção de metabólitos secundários por micro-organismos em culturas imobilizadas, *in vitro*, tem mostrado ser atraente para estímulo e aumento na produção de compostos de interesse. Considerando o exposto, o trabalho teve como objetivo avaliar a produção do hormônio vegetal ácido indolacético (AIA) pela levedura rizosférica *Torulaspora globosa* (6S01), em cultivo de células livres e imobilizadas em espuma de poliuretano. Os testes consistiram do cultivo da levedura nas duas condições, em meio BD com adição de triptofano. Os resultados obtidos mostram que não houve diferença na produção de AIA, isto é, a produção não foi estimulada pela condição imobilizada da levedura, como esperado e descrito na literatura. Conclui-se que o processo de imobilização deve ser revisto, e outras matrizes testadas, como alginato e quitosana, para melhor avaliação da produção de AIA por *T. globosa* em condição imobilizada.

**Palavras-chave:** promotores de crescimento de plantas; leveduras rizosféricas; imobilização de células.

---

**Indoleacetic acid produced by *Torulaspora globosa* immobilized on polyurethane foam**

### ABSTRACT

Microorganisms that promote plant growth are known to assist plants in their development, and the production of plant hormones is one of the main mechanisms. The production of secondary metabolites by microorganisms in immobilized cultures, *in vitro*, has been shown to be attractive for stimulating and increasing the production of compounds of interest. Considering the above, the objective of this work was to evaluate the production of the phytohormone indoleacetic acid (AIA) by the rhizosphere yeast *Torulaspora globosa* (6S01), in culture of free cells and immobilized in polyurethane foam. The tests consisted of the yeast culture in the two conditions, in BD medium with addition of tryptophan. The results showed that there was no difference in the production of AIA, i.e., the production was not stimulated by the immobilized condition of the yeast, as expected and described in the literature. It was concluded that the immobilization process should be reviewed, and other matrices tested, such as

alginate and chitosan, to better evaluate the production of AIA by *T. globosa* in immobilized condition.

**Keywords:** plant growth promoters; rhizosphere yeasts; cell immobilization.

---

## INTRODUÇÃO

Micro-organismos associados às plantas são capazes de produzir hormônios vegetais, como as auxinas, que são responsáveis pela extensão, divisão e diferenciação celular; são capazes de estimular a germinação de sementes e tubérculos, promover o desenvolvimento do xilema, estimular a formação de raízes, controlar processos de crescimento vegetativo, fotossíntese, a biossíntese de metabólitos, e fatores de resistência a estresses ambientais (Zhao, 2010). Dentre as auxinas, a que mais se destaca é o ácido indolacético (AIA). Bactérias, fungos filamentosos e leveduras são descritos na literatura como capazes de produzir AIA e estimular o desenvolvimento vegetal, sendo, desta forma, denominados Micro-organismos Promotores de Crescimento Vegetal (MPCV).

A imobilização de células (IC) consiste no confinamento físico de células microbianas em uma região definida de espaço, na qual suas atividades catalíticas, contínuas ou descontínuas, são mantidas. A alta concentração de células, em pouco espaço, é capaz de promover alta produção de compostos metabólicos secundários de interesse, como em processos fermentativos industriais (Freeman and Lilly, 1998).

A IC em espuma de poliuretano tem a capacidade de proporcionar a concentração de uma quantidade aceitável de biomassa celular aderida, num tempo substancialmente baixo. A estrutura porosa da espuma é altamente uniforme (mais de 97%), facilitando a exposição total das superfícies; desta forma evita-se problemas associados à acessibilidade para as células, facilitando a rápida adesão celular (De Ory et al., 2004).

Considerando o exposto acima, o trabalho teve por objetivo avaliar a produção *in vitro* de ácido indolacético (AIA) pela levedura rizosférica *Torulaspora globosa* (6S01), em cultivo de células livres e imobilizadas em espuma de poliuretano.

## MATERIAL E MÉTODOS

A levedura avaliada foi a linhagem 6S01 de *T. globosa*, isolada de rizosfera de milho, e pertencente ao banco de micro-organismos do LAMAM – Laboratório de Microbiologia agrícola e Molecular, da Universidade Federal de São Carlos.

Para a produção do inóculo, uma alçada da levedura foi utilizada para inocular 10 ml de meio YEPD em tubo Falcon; este foi incubado por 3 dias a 30°C e 160 rpm. Após este período, o meio de cultivo foi centrifugado para a separação da massa celular do meio. As células foram ressuspensas em solução salina (NaCl 0,85%) e efetuada a contagem do número de células em câmara de Neubauer. Para a imobilização das células em espuma, 6 cubos de 1 cm<sup>3</sup> foram colocados em Erlenmeyer de 125 ml, com 50 ml de meio YEDP, sendo estes inoculados com 1 ml de uma suspensão de 4x10<sup>5</sup> células. Os frascos foram incubados por 3 dias, sendo os cubos de espuma, com células, lavados com água destilada estéril, para retirada do meio de cultura.

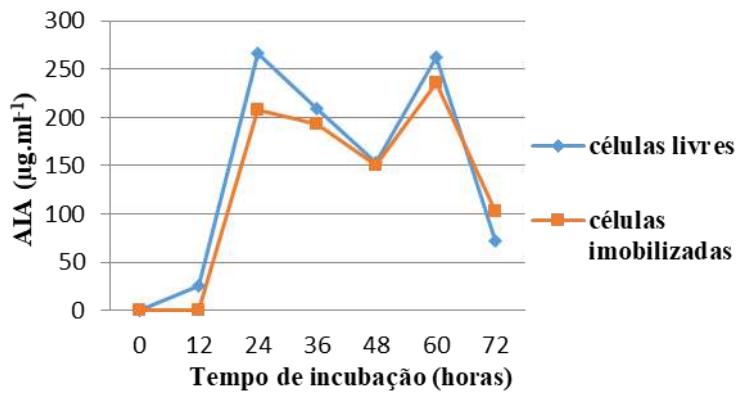
Para os testes de produção de AIA, foram considerados dois tratamentos: T1 – produção de AIA em cultivo de células livres; T2 – produção de AIA em cultivo de células imobilizadas em espuma. Para ambos os tratamentos, foram utilizados frascos Erlenmeyer de 500 ml, com 200 ml de meio BD (caldo de batata e dextrose), com triptofano 5%; o inóculo de células livres consistiu na inoculação do meio com 4x10<sup>5</sup> células/ml, a partir do inóculo; para o tratamento com células imobilizadas, o inóculo consistiu em 6 cubos de espuma com células. Cada tratamento foi preparado em triplicata, sendo os frascos incubados por 72 horas, com amostragens realizadas a cada 12 horas.

As análises consistiram na quantificação do número de células livres (realizada nos dois tratamentos), em câmara de Neubauer, e determinação do pH do meio, em pHmetro digital. Também foi realizada a quantificação de AIA no meio; para tanto a amostra foi centrifugada, para separação das células; em seguida 1 ml do sobrenadante foi adicionado a 1 ml do Reagente de Salkowsky. Se houver a mudança da cor do meio, após a reação, para rosa, indica a presença de AIA no meio. Quanto mais intensa a cor, maior a concentração do metabólico; para determinação da quantidade presente no meio, foi produzida uma curva padrão, com valores conhecidos de AIA.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

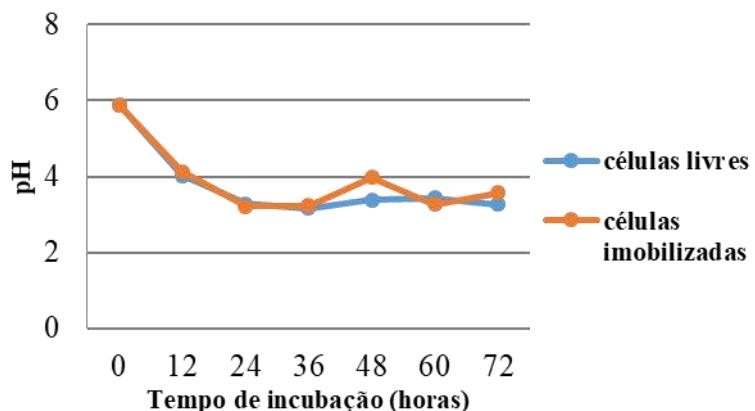
Os resultados obtidos mostram que não houve diferença significativa entre os tratamentos avaliados. A imobilização das células da levedura *T. globosa* em espuma de poliuretano não proporcionou maior produção de AIA (Figura 1). Na literatura, porém,

é possível encontrar trabalhos que mostram que a imobilização das células microbianas pode estimular, de forma significativa, a produção de metabólitos de interesse. Covizzi (2007) realizou um trabalho onde a produção de lacase por células de *Botryosphaeria rhodina* imobilizada em espuma apresentou o melhor resultado, com produção três vezes maior do produto de interesse, quando comparado com o cultivo de células livres.



**Figura 1.** Produção de AIA pela levedura *T. globosa*, em cultivo de células livres e imobilizadas em espuma.

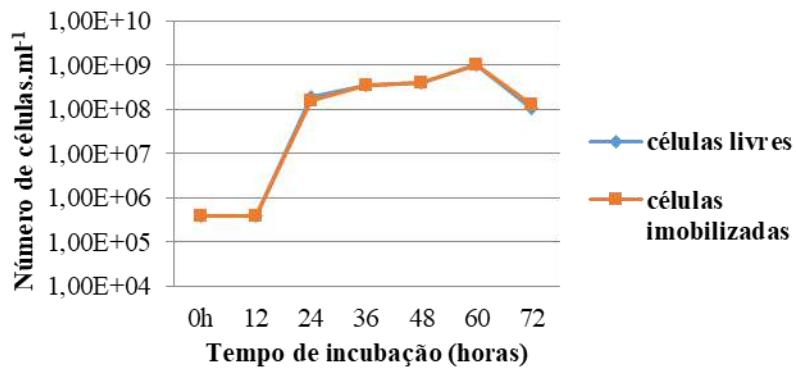
O mesmo resultado foi observado para o pH do meio; em ambos os tratamentos o pH do meio sofreu queda, devido principalmente, à produção de ácidos orgânicos pela levedura; esta produção, porém, não sofreu variações quanto a imobilização ou não das células.



**Figura 2.** Variação do pH do meio de cultura com cultivo de *T. globosa* em células livres e imobilizadas em espuma.

A quantificação de células livres nos cultivos não diferiu, apesar de apresentar células imobilizadas na espuma; esse dado mostra que, no tratamento com células

imobilizadas, estas se soltaram da matriz, e se multiplicaram de forma planctônica no meio (de forma livre). O número de células nesta condição se apresentou idêntica nos diferentes tratamentos (Figura 3).



**Figura 3.** Número de células livres nos cultivos de *T. globosa* em células livres e imobilizadas em espuma.

O desprendimento das células pode ocorrer devido o cultivo ter ocorrido em incubadora refrigerada com agitação, a 160 rpm; nesta velocidade os cubos de espuma se chocam, entre si e com a parede do frasco, podendo tornar frágil a estrutura do biofilme. Uma vez que a levedura é unicelular, a estabilidade do biofilme está diretamente relacionada a produção de compostos extra-celulares, como exopolissacarídeos, importantes para a fixação das células. Novos estudos devem ser realizados para avaliação da imobilização das células em outras matrizes, como alginato ou quitosana, para avaliar a possibilidade de exploração da levedura na produção de hormônios vegetais, para aplicação na agricultura.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por viabilizar a realização do trabalho, assim como o Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular da Universidade Federal de São Carlos, *campus* Araras.

## REFERÊNCIAS

COVIZZI, L. G., 2007. *Seleção de um suporte sintético para imobilizar células do Botryosphaeria rhodina e comparação da produção de lacase por células livres e*

*imobilizadas.* São José do Rio Preto: Universidade Estadual Paulista. 90 p. Tese de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos.

DE ORY, I., ROMERO, L. E., and CANTERO, D. 2004. Optimization of immobilization conditions for vinegar production. Siran, wood chips and polyurethane foam as carriers for *Acetobacter aceti*. *Process Biochemistry*, 39(5), 547-555.

[http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00136-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00136-5).

FREEMAN, A. and LILLY, M. D. 1998. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 23, n. 5, p. 335-345. [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00046-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00046-5).

ZHAO, Y., 2010. Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development. *Annual Review of Plant Biology*, v.61, p.49–64. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112152>.

## **Hidrólise enzimática de hemiceluloses extraídas de resíduos agroindustriais**

Caroline de Freitas<sup>1\*</sup>; Eleonora Cano Carmona<sup>2</sup>; Cárol Cabral Terrone<sup>2</sup>; Michel Brienz<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de São Carlos – Campus Araras \*e-mail: caroline.fr94@gmail.com

<sup>2</sup>Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - Campus Rio Claro

<sup>3</sup>Instituto de Pesquisa em Bioenergia, Universidade Estadual Paulista - Campus Rio Claro

---

### **RESUMO**

As biomassas lignocelulósicas são fontes renováveis encontradas em abundância na natureza. Esses resíduos têm se tornado interessantes, pois podem ser utilizados para a produção de novos materiais. As xilanases são enzimas produzidas em grande quantidade por fungos filamentosos, e são conhecidas pela sua capacidade de hidrolisar a xilana, principal componente da hemicelulose, e a partir dos produtos da hidrólise, outros compostos podem ser obtidos. Dentro deste contexto, o objetivo desse trabalho foi comparar e determinar quais dentre as xilanases extraídas dos fungos estudados como bons produtores dessas enzimas, apresentaram maior capacidade de hidrolisar a xilana de hemiceluloses extraídas de diferentes resíduos agroindustriais. Para produção das enzimas, os fungos foram cultivados em meio líquido de Vogel acrescido de 1% (m/v) de farelo de trigo e, após o crescimento, as culturas foram filtradas a vácuo e esse filtrado foi utilizado como fonte de enzimas extracelulares. Foi realizada a extração da hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de malte e sabugo de milho através de hidrólise alcalina modificada. Após a extração, foi realizada a atividade enzimática utilizando xilanases comerciais e as hemiceluloses extraídas em laboratório. Dos substratos estudados, aquele que foi hidrolisado em maior extensão pela maioria dos filtrados foi o bagaço de malte. Em relação aos filtrados dos micro-organismos, o que apresentou maior atividade enzimática em todos os substratos foi o de *Aspergillus versicolor*. As hemiceluloses provenientes dos resíduos agroindustriais extraídas em laboratório foram mais extensivamente hidrolisadas que as hemiceluloses comerciais pelo filtrado da maioria dos micro-organismos estudados.

**Palavras-chave:** Resíduos agroindustriais; Xilana; Xilanase; *Aspergillus versicolor*

---

**Enzymatic hydrolysis of hemicelluloses extracted from agroindustrial residues**

### **ABSTRACT**

Lignocellulosic biomasses are renewable sources found in abundance in nature. These residues have become interesting because they can be used for the production of new materials. Xylanases are enzymes produced in large quantities by filamentous fungi and are known for their ability to hydrolyze xylan, the major component of hemicellulose, and other compounds can be obtained from the hydrolysis products. In this context, the objective of this work was to compare and determine which of the xylanases extracted

from fungi studied as good producers of these enzymes, presented a higher capacity to hydrolyze xylan from hemicelluloses extracted from different agroindustrial residues. For the production of the enzymes, the fungi were grown in liquid Vogel medium added with 1% (w/v) of wheat bran and, after growing, the cultures were vacuum filtered and the filtrate was used as a source of extracellular enzymes. Hemicellulose was extracted from sugarcane bagasse, malt bagasse and corn cob by modified alkaline hydrolysis. After extraction, the enzymatic activity was performed using commercial xylyanes and hemicelluloses extracted in the laboratory. Of the substrates studied, the malt bagasse was more extensively hydrolyzed by the majority of the fungi filtrates. In relation to the microorganisms filtrates, that from *A. versicolor* presented greater enzymatic activity on all the substrates assayed. Hemicelluloses from agroindustrial residues extracted in the laboratory were more extensively hydrolyzed than commercial hemicelluloses by the filtrates of the majority of the microorganisms studied.

**Keywords:** By products; Xylan; Xylanase; *Aspergillus versicolor*

---

## INTRODUÇÃO

Atualmente, há um interesse global no uso tecnológico de resíduos agroindustriais como fonte renovável de alimentos e biocombustíveis. A biomassa mais abundante e renovável encontrada na Terra é a lignocelulose, que contém três grandes grupos de polímeros: celulose, hemicelulose e lignina, e o seu acúmulo, além de representar um problema de poluição ambiental, implica em perda de materiais com grande potencial de conversão em produtos de valor comercial. (Sánchez, 2009).

A xilana é o polímero mais abundante na hemicelulose, e a segunda estrutura orgânica predominante na parede celular vegetal. Sendo assim, a xilana é a hemicelulose com maior incidência em resíduos agrícolas e agroindustriais (Silva and Carmona, 2008). As xilanases são enzimas produzidas, principalmente por fungos e bactérias, que atuam na degradação da xilana, liberando xilo-oligossacarídeos. Do ponto de vista industrial, fungos filamentosos são produtores interessantes dessas enzimas por conta de seu fácil cultivo e pela maior liberação dessas enzimas. (Knob and Carmona, 2008).

Como as hemiceluloses apresentam ligações relativamente fortes com a celulose e lignina na parede celular da planta, é necessário um processamento para separar as frações lignocelulósicas (Brienzo et al., 2009). Além disso, a extração das hemiceluloses torna esses polissacarídeos mais acessíveis às enzimas. As hemiceluloses podem ser hidrolisadas a açúcares através de hemicelulases e, a parte majoritária dos trabalhos publicados sobre hemicelulases trata das propriedades e modos de ação, assim como das aplicações das xilanases (Ogeda and Petri, 2010).

Nesse contexto, a busca por novos processos de reaproveitamento de resíduos agroindustriais e materiais lignocelulósicos tem aumentado, motivando estudos da aplicação de enzimas microbianas capazes de hidrolisar esses compostos de forma vantajosa. O objetivo desse trabalho foi comparar e determinar as atividades de xilanases produzidas por fungos estudados como bons produtores dessas enzimas, avaliando sua capacidade de hidrolisar a xilana de hemiceluloses extraídas de diferentes resíduos agroindustriais.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os micro-organismos *Aspergillus giganteus*, *Aspergillus versicolor*, *Trichoderma inhamatum*, *Penicillium janczewskii* e *Penicillium sclerotiorum* foram mantidos em meio contendo farelo de trigo a 1% (m/v). As culturas foram incubadas, nesse mesmo meio, para a produção de esporos por 7 dias a 28°C.

O meio líquido de Vogel foi preparado utilizando-se a solução de sais de Vogel diluída 50 vezes, acrescido de 1% (m/v) da fonte de carbono. Suspensões de conídios das linhagens foram preparadas com água destilada esterilizada, em concentrações de 2 a  $5 \times 10^7$  esporos/mL. Um volume de 1,0 mL dessas suspensões foi inoculado em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio líquido.

Após o crescimento pelo período adequado para produção máxima de xilanase por cada micro-organismo, as culturas foram filtradas a vácuo para a eliminação do substrato, micélio e outras impurezas e o filtrado obtido foi congelado e utilizado como fonte de proteínas e enzimas extracelulares.

As hemiceluloses foram extraídas do bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho e bagaço de malte utilizando o método de Brienzo et al (2009).

A atividade enzimática foi avaliada pelo método de Bailey et al. (1992) modificado, em intervalos de 5 e 10 minutos de reação. A mistura de reação constituiu-se da amostra do filtrado do fungo incubada em banho-maria a determinada temperatura com 750  $\mu$ L de solução do substrato a 1% (m/v) com tampão fosfato de sódio 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 6,0 ou 6,5, dependendo do micro-organismo. Após cada intervalo de tempo, interrompeu-se a reação pela adição de 250  $\mu$ L de ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS). Por fim, as soluções foram fervidas por cinco minutos, resfriadas e diluídas com 2,5 mL de água destilada. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm, utilizando-se curva de calibração de xilose. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar extremidade redutora

equivalente a 1  $\mu\text{mol}$  de xilose por minuto nas condições de ensaio. Os ensaios de atividade foram realizados em duplicata.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As atividades enzimáticas foram realizadas com os filtrados brutos dos micro-organismos supracitados utilizando diferentes substratos para determinar a capacidade de sua hidrólise enzimática na conversão da xilana em seus oligômeros correspondentes.

As xilanases comerciais estudadas foram beechwood, birchwood e de aveia. O filtrado do micro-organismo que apresentou maior atividade enzimática sobre todas as xilanases comerciais foi de *A. versicolor*, porém foi em farelo de aveia que o filtrado desse fungo apresentou maior atividade xilanolítica, correspondendo a 141,4  $\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{min}$ .

**Tabela 1.** Atividade xilanase do filtrado bruto de fungos filamentosos sobre diferentes xilanases comerciais.

<b>Micro-organismo</b>	<b>Atividade xilanase (U/mL)</b>		
	<b>Substrato: xilanases comerciais extraídas de</b>		
	<b>“Beechwood”</b>	<b>“Birchwood”</b>	<b>“Oat Spelt”</b>
<i>A. giganteus</i>	0,7 $\pm$ 0,006	0,8 $\pm$ 0,03	1,2 $\pm$ 0,04
<i>A. versicolor</i>	88,5 $\pm$ 2,62	38,5 $\pm$ 0,4	141,4 $\pm$ 4,03
<i>T. inhamatum</i>	4,8 $\pm$ 0,01	22,6 $\pm$ 0,2	35,5 $\pm$ 2,82
<i>P. janczewskii</i>	3,0 $\pm$ 0,2	5,7 $\pm$ 0,17	10,4 $\pm$ 0,12
<i>P. sclerotiorum</i>	6,8 $\pm$ 0,24	10,6 $\pm$ 0,2	13,4 $\pm$ 1,76

Dentre os experimentos realizados com as hemiceluloses dos resíduos agroindustriais, o filtrado do micro-organismo que apresentou o melhor desempenho quanto atividade enzimática em todos os substratos também foi o de *A. versicolor*, sendo que na hemicelulose de bagaço de malte sua atividade enzimática foi de 154,4 U/mL.

**Tabela 2.** Atividade enzimática do filtrado bruto de fungos filamentosos sobre diferentes hemiceluloses provenientes de resíduos agroindustriais.

<b>Micro-organismo</b>	<b>Atividade enzimática (U/mL)</b>		
	<b>Substrato: hemiceluloses extraídas de</b>		
	<b>Bagaço de Cana</b>	<b>Bagaço de Malte</b>	<b>Sabugo de Milho</b>
<i>A. giganteus</i>	0,99 ± 0,05	1,93 ± 0,03	1,25 ± 0,007
<i>A. versicolor</i>	97,22 ± 1,5	154,4 ± 3,72	119,64 ± 3,44
<i>T. inhamatum</i>	24,2 ± 0,92	41,77 ± 2,29	23,31 ± 0,34
<i>P. janczewskii</i>	22,22 ± 0,75	14,25 ± 0,06	13,84 ± 0,17
<i>P. sclerotiorum</i>	8,84 ± 0,11	10,52 ± 0,2	10,68 ± 0,32

O maior desempenho da atividade enzimática da maioria dos filtrados sobre as hemiceluloses dos resíduos agroindustriais em relação às xilanases comerciais pode dever-se ao fato de que os substratos comerciais continham apenas xilana, enquanto que os de resíduos agroindustriais continham outros carboidratos hemicelulósicos, além da xilana, bem como pelo fato do filtrado bruto não conter apenas xilanases, mas também outras enzimas que podem hidrolisar as outras hemiceluloses.

## CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, foi possível comparar a capacidade de diferentes fungos já estudados como bons produtores de enzimas xilanases de realizar a hidrólise enzimática de diferentes hemiceluloses comerciais e extraídas no laboratório.

Dentre os filtrados dos cinco micro-organismos utilizados, aquele que apresentou maior atividade enzimática em todos os substratos testados foi de *A. versicolor*. Tendo isso em vista, é possível afirmar que mais estudos acerca das enzimas xilanolíticas produzidas por esse fungo devem ser realizados, pois elas podem ser utilizadas de forma vantajosa. Quanto aos substratos, a xilana do bagaço de malte foi aquela que apresentou maior conversão em açúcares redutores através da ação enzimática dos filtrados da maioria dos micro-organismos estudados, especialmente aquele de *A. versicolor*.

O uso de resíduos agroindustriais para produzir compostos de alto valor agregado através da hidrólise enzimática é uma tecnologia promissora que, além de dar um destino mais adequado para esses resíduos, pode gerar lucro para as próprias indústrias produtoras desses resíduos.

## REFERÊNCIAS

- BAILEY, M. J., BIELY, P., POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*. v. 23, n. 3, p. 257-270, 1992.
- BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. *Biochemical Engineering Journal*, v. 46, n. 2, p.199-204, out. 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2009.05.012>
- KNOB, A.; CARMONA, E. C. Xylanase production by *Penicillium sclerotiorum* and its characterization. *World Applied Sciences Journal*, Rio Claro, v. 4, n. 2, p.277-283, 2008.
- OGEDA, T. L.; PETRI, Denise F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. *Química Nova*, São Paulo, v. 33, n. 7, p.1549-1558, jul. 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000700023>
- SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 2, p.185-194, mar. 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>
- SILVA, L. A. O.; CARMONA, E. C. Production and Characterization of Cellulase-Free Xylanase from *Trichoderma inhamatum*. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, v. 150, n. 2, p.117-125, jul. 2008. DOI: 10.1007/s12010-008-8296-y

## Biomassa fúngica como nutriente para produção de EPS

Caroline Sakata<sup>1</sup>; Ivanildo Vicente do Nascimento<sup>2</sup>, Valéria M.G. Nascimento<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus Assis.

### RESUMO

A produção de exopolissacarídeo (EPS) pelo fungo filamentoso *Lasiodiplodia theobromae* apresenta interesse industrial, devido ao seu potencial de aplicação relacionada a sua ação indutora de resposta pró-inflamatória e anti-tumoral e anticoagulante quando sulfatado. Entretanto, a viabilidade industrial deste bioprocesso ainda precisa superar desafios, como crescimento celular 10 vezes superior a produção do EPS, gerando resíduo na forma de biomassa e baixa produtividade (concentração de fonte de carbono/concentração de EPS). Estudos anteriores verificaram é viável a produção de EPS utilizando biomassa residual de cultivo anterior como nutriente para nova batelada de cultivo. O presente trabalho teve como objetivo determinar a influência de diferentes temperaturas de cultivo (25-40°C), utilizando a biomassa lyofilizada de *L. theobromae* como nutriente para produção de EPS. Verificou-se que a temperatura interfere no crescimento do fungo *L. theobromae* e na produção de EPS, sendo que diferentes condições de cultivo requerem temperaturas distintas. A maior produção de EPS utilizando sacarose (meio padrão) ocorreu a 20 °C, enquanto em meio BV, os melhores resultados foram obtidos a 35 °C.

**Palavras-chave:** Exopolissacarídeos, temperatura, fungo filamentoso, viabilidade industrial.

---

### ***L. theobromae* biomass: culture medium nutrient for EPS production at different temperatures**

The production of exopolysaccharide (EPS) by the filamentous fungus *Lasiodiplodia theobromae* presents an industrial interest, due to its application potential related to its action inducing pro-inflammatory and anti-tumor response and anticoagulant when sulfated. However, the industrial viability of this bioprocess still needs to overcome challenges, such as cell growth 10 times higher than EPS production, generating biomass residue and low productivity (carbon source concentration / EPS concentration). Previous studies have verified that it is feasible to produce EPS using previous culture biomass as a nutrient for a new culture batch. The objective of this work was to determine the influence of different culture temperatures (25-40 °C) using the lyophilized biomass of *L. theobromae* as a nutrient for the production of EPS. It has been found that temperature interferes with the growth of fungus *L. theobromae* and the production of EPS, with different growing conditions requiring different temperatures. The highest EPS production using sucrose (standard medium) occurred at 20 °C, while in BV medium the best results were obtained at 35 °C.

**Keywords:** Exopolysaccharides, temperature, filamentous fungus, industrial viability.

---

## INTRODUÇÃO

Há um crescente interesse científico e industrial pelos exopolissacarídeos (EPS), devido à facilidade de obtenção e separação, e possuir vantagens em relação às gomas tradicionais (Figueiredo, 2013). O *Lasiodiplodia theobromae* é um dos microrganismos produtores de EPS que apresenta a capacidade de formar filmes plásticos, ação imunomoduladora, indutora de resposta pró-inflamatória e anti-tumoral (Oliveira et al., 2015) e capacidade de coagulação quando sulfatado (Vasconcelos et al., 2013).

Estudos do cultivo de *L. theobromae* em meio padrão (Sais de Vogel e 50 g/L de sacarose), proporcionaram produção de 2,5 g/L de EPS e 24,3 g/L de biomassa (Oliveira et al., 2015). O destino dessa biomassa é importante para o bioprocesso, para diminuição de custos e por questões ambientais (Muzzarelli et al., 2000).

A utilização da biomassa seca de *L. theobromae* como nutriente no meio, visando a produção de EPS foi estudada por Bueno (2016). A melhor condição de cultivo foi composta de biomassa (40g/L) e Sais de Vogel (BV), obtendo-se 3,22 g/L de EPS, enquanto no meio padrão (sem biomassa e com adição de sacarose), houve produção de 1,3 g/L.

O presente trabalho teve como objetivo analisar o crescimento e a produção de EPS por *L. theobromae* em diferentes temperaturas utilizando a biomassa seca proveniente de cultivo anterior como nutriente no meio de cultivo em novo ciclo de produção.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Microrganismo**

Foi utilizado o fungo filamentoso *Lasiodiplodia theobromae* isolado da berinjela (*S. elongata*) gentilmente cedido pela Dra. Aneli de Melo Barbosa, pesquisadora convidada da UEL, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR. O microrganismo foi inoculado em placa de Petri contendo meio VGA, composto por Sais Mínimos de Vogel (VOGEL, 1956) (SMV), glicose (10 g/L) e ágar (15 g/L), e mantido por 5 a 7 dias a 28°C. A cepa foi armazenada em geladeira a 4°C.

### **Produção de EPS em condição padrão**

O microrganismo foi repicado em placas de Petri contendo meio VGA e foi mantido a 28°C por 5 dias. Após o crescimento, 4 discos de 8 mm de diâmetro foram transferidos para Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio, composto por sais mínimos de Vogel (VOGEL, 1956) (SMV) e 0,5 g/L de glicose. O pré-inóculo foi

cultivado por 48 horas a 28°C em agitador orbital a 180 rpm. Posteriormente, o conteúdo dos frascos foi triturado e homogeneizado por 60 segundos em blender (Pratic Blender, Cadence) previamente higienizado com solução de álcool 70% (p/p). Desta forma, foi obtida a suspensão micelial com absorbância entre 0,4 – 0,5 a 400 nm.

Foi transferido 12 mL e 4 mL da suspensão micelial para inocular cada Erlenmeyer de 3.000 mL ou 1.000 mL, contendo 600 mL ou 200 mL de meio de cultivo, respectivamente. O meio foi composto por 50 g/L de sacarose e SMV, e o pH do meio foi corrigido para 5,8 utilizando-se HCl 1 mol/L. Os frascos foram mantidos em agitador orbital, a 28°C, com velocidade de agitação de 180 rpm, por 72h.

Após o cultivo, a biomassa foi separada por centrifugação a 3800 rpm, 4°C, por 30 minutos. O sobrenadante foi separado e acrescentou-se etanol, na proporção de 3:1 (três volumes de etanol para um volume do caldo), para a precipitação do EPS, durante 24 h. Após este período, o EPS foi determinado por gravimetria.

A biomassa foi lavada 2 vezes com solução de NaCl 0,15 mol/L, repetindo-se a centrifugação nas mesmas condições, liofilizada e utilizada como nutriente em nova batelada de produção.

### **Produção de EPS utilizando biomassa seca como nutriente**

A biomassa obtida do cultivo padrão foi autoclavada e seca em liofilizador. Após a secagem, a biomassa foi triturada, para obtenção de partículas entre 0,5 e 1 mm.

Obteve-se a suspensão celular como descrita no item anterior, e foi inoculado 1 mL desta suspensão em Erlenmeyers de 250 mL, em quadruplicata, contendo 50 mL de meio, que foi composto por 40 g/L de biomassa seca e SMV sem nitrato de amônio, e foi adicionado 2,5 mg de cloranfenicol. O pH do meio de cultivo será corrigido para 5,8 com HCl 1 mol/L.

Os frascos foram mantidos em incubadora orbital a 180 rpm, por 72 h. O cultivo foi analisado em diferentes temperaturas variando entre 25 e 40°C.

### **Métodos analíticos**

A biomassa e o EPS foram secos a 70°C, em estufa, até peso constante, e quantificados por gravimetria.

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). A determinação de açúcares totais foi realizada pelo método do fenol-sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956).

## RESULTADOS

Em meio padrão verificou-se aumento de biomassa até 30 °C (22,6 g/L) (Figura 1). A produção de EPS foi maior a 25°C, obtendo-se 1,17 g/L. De acordo com a determinação de açúcares redutores e totais, houve maior consumo de açúcar nas temperaturas entre 25 e 30°C. O pH do meio de cultivo apresentou pequenas variações, entre 4,4 e 5,05.

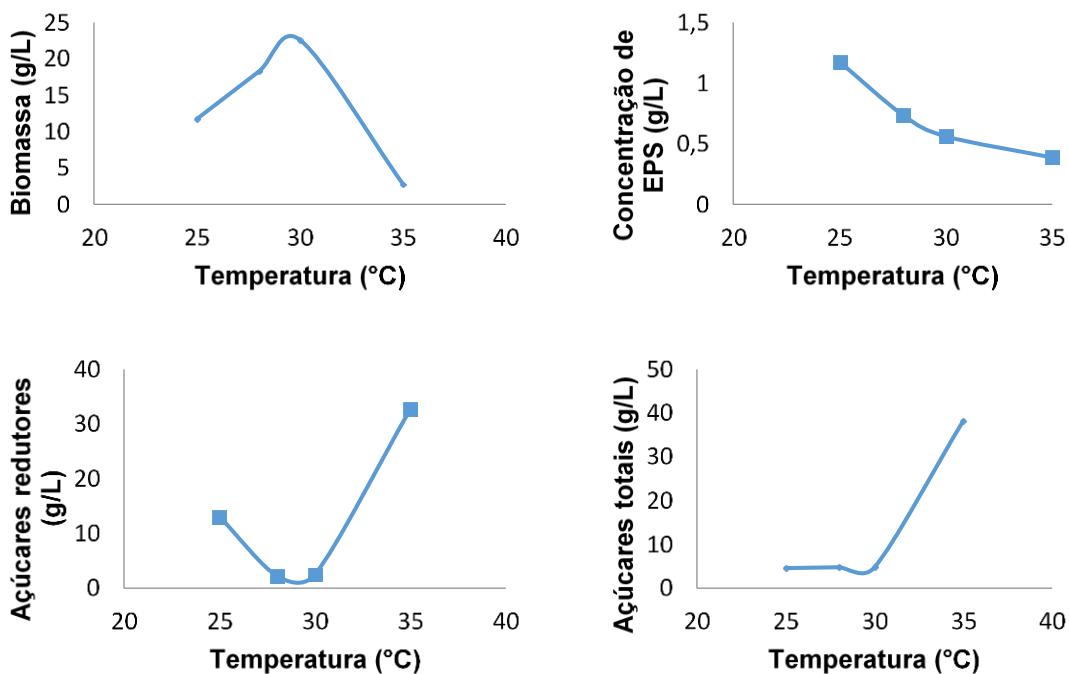


Figura 1. Influência da temperatura no crescimento celular (biomassa) e na produção de EPS de *Lasiodiplodia theobromae* cultivado em meio padrão. Condições de cultivo: meio de cultivo composto de sais mínimos de Vogel e sacarose 50g/L, 72 h de incubação, 180 rpm, temperaturas entre 25 e 35°C.

Em meio BV, a produção de EPS apresentou um perfil côncavo, a 30 °C foi obtida menor produção de EPS do que a 28 e 35 °C (Figura 2). Em meio BV não foi possível separar a biomassa seca do meio de cultivo, da biomassa proveniente de crescimento celular, ainda assim foi realizada a gravimetria e verificou-se que entre 25 e 30 °C praticamente havia o mesmo valor de biomassa total, a 35 °C foi observado valor superior aos demais (39 g/L). O consumo de açúcar redutor e total foi menor a 35 °C, entretanto, nessa temperatura foram obtidos grandes valores de desvio padrão, dificultando a análise. Foi medido o pH do caldo fermentativo após a centrifugação, e verificou-se que o valor oscilou entre 6,98 e 8,4.

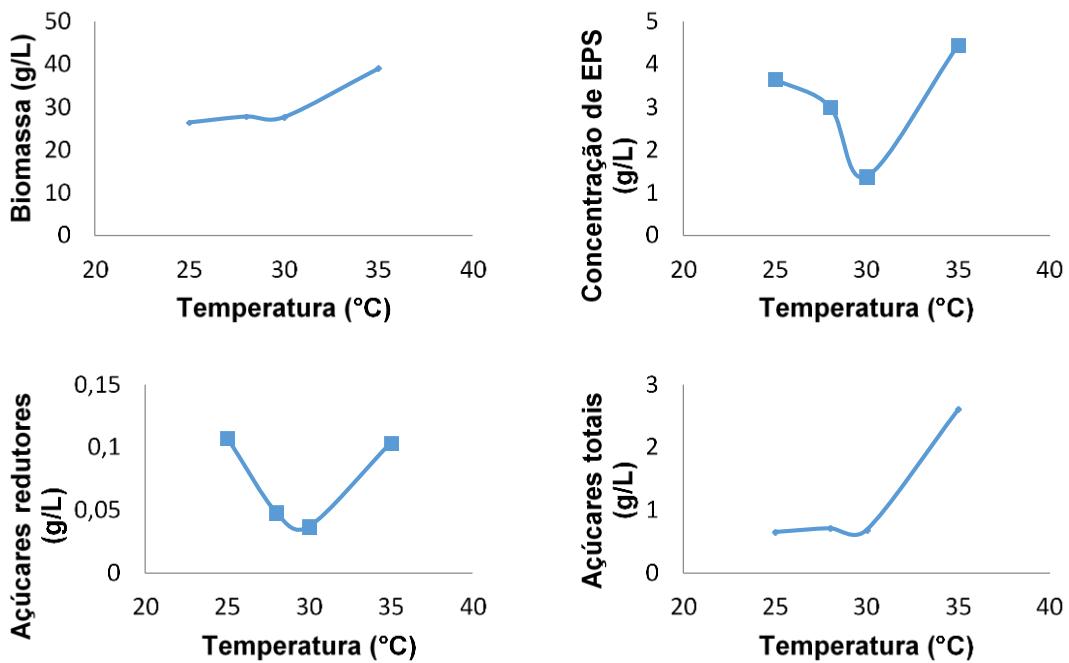


Figura 2: Influência da temperatura no crescimento celular (biomassa) e na produção de EPS por *Lasiodiplodia theobromae* cultivado em meio BV. Condições de cultivo: meio de cultivo composto de sais mínimos de Vogel e biomassa 40 g/L, 72 h de incubação, 180 rpm, temperaturas entre 25 e 35°C.

## CONCLUSÕES

Verificou-se que a temperatura interfere no crescimento do fungo *L. theobromae* e na produção de EPS, sendo que diferentes condições de cultivo requerem temperaturas distintas. A maior produção de EPS utilizando sacarose (meio padrão) ocorreu a 20 °C, enquanto em meio BV, os melhores resultados foram obtidos a 35 °C.

## AGRADECIMENTOS

À FAPESP pela bolsa de iniciação científica.

## REFERÊNCIAS

Bueno, Y. C., 2016. *Biomassa do Fungo Filamentoso Lasiodiplodia theobromae: Composição Química e Utilização como nutriente para Bioprocesso*. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista. 54 p. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Aplicada.

Dubois, M. et al., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, vol. 28, no. 3, pp. 350–356.

Miller, G.L., 1959. Determination of reducing sugar by DNS method. *Anal chem*, vol.31, pp. 426-428.

Muzzarelli, R. A. A. et al., 2000. Polyuronans obtained by regiospecific oxidation of polysaccharides from *Aspergillus niger* , *Trichoderma reesei* and *Saprolegnia sp.* *Carbohydrate Polymers*, vol. 43, pp. 55–61.

Oliveira, K. S., 2014. *Otimização do cultivo de Lasiodiplodia theobromae para obtenção de EPS e caracterização física e química dos polissacarídeos*. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista. 133 p. Tese de Doutorado em Microbiologia Aplicada.

Oliveira, K. S. M. et al., 2015. (1→6)- and (1→3)(1→6)- $\beta$ -glucans from *Lasiodiplodia theobromae* MMBJ: Structural characterization and pro-inflammatory activity. *Carbohydrate Polymers*, vol. 133, pp. 539–546.

Vasconcelos, A. F. D. et al., 2013. Sulfonation and anticoagulant activity of fungal exocellular  $\beta$ -(1→6)-D-glucan (lasiodiplodan). *Carbohydrate polymers*, vol. 92, no. 2, pp. 1908–1914.

Yamamoto, T. L., 2015. *Integração de processos para produção de exopolissacarídeo (EPS) e jasmonato por Lasiodiplodia theobromae*. Assis: Universidade Estadual Paulista. 29 p. Monografia para Conclusão do Curso de Engenharia Biotecnológica.

## **Produção de ficocianina por *Aphanthece microscopica Nügeli* em cultivo mixotrófico suplementado com vinhaça**

Dayane Vanessa Morais<sup>1</sup>; Reinaldo Gaspar Bastos<sup>2</sup>; Isabely Fernanda Pizarro<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Mestranda em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos. daya.morais@gmail.com

<sup>2</sup>Professor Associado do Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Socioeconomia Rural do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos. reinaldo@cca.ufscar.br

<sup>3</sup>Bacharelanda em Biotecnologia no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos. isabely.pizarro@gmail.com

---

### **RESUMO**

Ficocianina é um pigmento natural que comumente substitui corantes sintéticos em alimentos e cosméticos. *Aphanthece microscopica Nügeli* é uma cianobactéria com grande potencial de uso em bioprocessos, incluindo tratamento de águas residuárias agroindustriais e produção de proteínas unicelulares. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de ficocianina por *A. microscopica* em meio BG11 adicionado de nitrato de sódio e vinhaça em diferentes concentrações. Os resultados indicaram produção máxima de 0,091 mg de ficocianina por g de biomassa em 24h de cultivo.

**Palavras-chave:** ficobiliproteínas, pigmentos, cianobactérias

---

### **Phycocyanin production by *Aphanthece microscopica Nügeli* in mixotrophic cultivation supplemented with vinasse**

### **ABSTRACT**

Phycocyanin is a natural dye that commonly replaces synthetics pigments in food and cosmetics products. *Aphanthece microscopica Nügeli* is a cyanobacteria with a great potential of being used in bioprocesses, including for agroindustrial wastewater treatments and single cell protein production. The present work aimed to study the phycocyanin production by *A. microscopica* in BG11 medium added with sodium nitrate and vinasse in different concentrations. Results indicated maximum phycocyanin production of 0,091 mg of phycocyanin per g of biomass in 24 hours of cultivation.

**Keywords:** phycobiliproteins, natural dyes, cyanobacteria

---

## INTRODUÇÃO

O crescente interesse no cultivo de microalgas está baseado na variedade de aplicações comerciais que estes micro-organismos possuem, visto que podem ser utilizados para a alimentação humana, produção de energia, extração de pigmentos e outras substâncias celulares de interesse industrial (Zepka et al., 2008).

*Aphanthece microscopica Nügeli* é uma cianobactéria típica de estuários localizados no sul do Brasil (Santos et al., 2017). Esta espécie é conhecida por habitar ambientes extremos, como locais poluídos; assim demonstrando que estes organismos são robustos e demandam necessidades nutricionais simples, com grande potencial de uso como biocatalisador em bioprocessos (Queiroz et al., 2013; Santos et al., 2017). Ficocianina é uma proteína fluorescente que pertence ao grupo das ficobiliproteínas, que são proteínas solúveis em água e formam componentes extremamente importantes para a máquina fotossintética pois são coletores de luz (Pandey et al., 2013).

Pigmentos a partir de microalgas são amplamente utilizados em várias indústrias, como a alimentícia, nutracêutica, farmacêutica, aquicultura e cosmética. Além disso, os pigmentos têm sido utilizados em laboratórios clínicos e de pesquisa, devido às suas propriedades como marcadores de anticorpos e receptores (Santiago-Santos et al., 2004; Begum et al., 2015).

Cianobactérias têm capacidades metabólicas muito versáteis, o que permite que estas cresçam em condições autotróficas, heterotróficas e mixotróficas (Subashchandrabose et al., 2013). Uma grande vantagem da utilização destes micro-organismos é que podem assimilar fontes e energia de baixo custo, incluindo águas residuárias (Lee e Kim, 2001; Rajoka et al., 2006; Silva, 2008). Nesse sentido, Hornes (2008) estudou a produção de ficocianina por *Aphanthece microscopica Nügeli* cultivada no efluente da indústria de processamento de pescado, alcançando remoções de até 80% e 93% de DBO e NTK, respectivamente. O cultivo de *Aphanthece microscopica Nügeli* no efluente industrial a 20°C resultou em produção de até 27,2 mg de ficocianina por grama de biomassa.

A vinhaça é a principal água residuária do processo de fabricação do etanol, sendo gerada em grandes volumes durante o processamento industrial da cana-de-açúcar, obtendo-se em torno de 10L por litro de etanol produzido. A vinhaça possui odor e coloração escura característicos, sendo altamente poluente devido às altas concentrações de matéria orgânica, baixo pH, altas DBO e DQO (Brasil et al., 2016).

Bonini (2012) avaliou a eficiência de remoção de potássio e DQO da vinhaça por *A. microscopica Nügeli*, alcançando redução de 60,76% para a DQO, com rendimento global médio de 0,58mg/mg (biomassa/DQO). Os resultados obtidos indicam viabilidade da utilização desta água resíduária como meio de cultivo para esta cianobactéria, devido à sua alta taxa de conversão da matéria orgânica presente no efluente em biomassa microbiana. O mesmo estudo também identificou remoção máxima em torno de 13% de potássio do efluente, sendo este íon considerado como o composto nutriente principal da vinhaça.

Neste contexto, o presente trabalho tem como principal objetivo avaliar a produção de ficocianina por *Aphanthece microscopica Nügeli* cultivada em meio padrão BG11 suplementado com diferentes concentrações de vinhaça e nitrato de sódio.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Inóculo*

O inóculo de *Aphanthece microscopica Nügeli* 48, gentilmente cedido pela Unidade de Pesquisa em Cianobactérias (UPC) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), foi mantido e propagado no Laboratório de Microbiologia Aplicada e Controle (LABMAC/CCA/UFSCar) em meio BG11 (Braun-GrunowMedium) (Ripka et al., 1979, Bonini, 2012), e o pH foi ajustado para 7,4 – 7,6. Os meios de cultura foram esterilizados por 20 minutos a 121°C em autoclave. Foram realizadas contagens celulares em Câmara de Neubauer antes do início dos ensaios, para verificação da concentração inicial de células e pureza dos inóculos.

### *Ensaios*

O experimento foi conduzido em Frascos Erlenmeyer de 125mL, que consistiam de 3,5mL de inóculo, 21,5mL de meio BG11, 25% e 50% a mais de nitrato de sódio (0,9375g e 1,875g, respectivamente); e 10%, 20% e 30% de vinhaça (2,5mL, 5mL e 7,5mL). Os frascos foram mantidos em shaker por 24h, a 100 rpm, 25°C e 2klux (fotoperíodo de 12 horas). O experimento foi conduzido em triplicata.

### *Extração e análise de ficocianina*

10 mL de cada amostra foram dissolvidas em 20 mL de água deionizada e centrifugadas a 3000 rpm durante 25 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células

foram ressuspensas em solução tampão de fosfato de sódio pH 6,85. As amostras foram congeladas por 24h a -6°C e descongeladas por 2h a 25°C. O teor de ficocianina, em  $\text{mg.mL}^{-1}$  foi determinado através da leitura das densidades óticas das amostras nos comprimentos de onda de 620 e 652 nm, utilizando-se a Equação 1 (Bennett e Bogorad, 1973; Moraes et al., 2011):

$$\text{CPC} = (\text{OD}_{620} - 0,474 \times \text{OD}_{652}) \quad (1)$$

5,34

O rendimento da extração foi calculado através da Equação 2 (Silveira et al., 2007; Moraes et al., 2011):

$$\text{Rendimento} = (\text{CPC}) \frac{V}{\text{BS}} \quad (2)$$

BS

Onde: CPC é o teor de ficocianina em  $\text{mg.mL}^{-1}$ , V é o volume do tampão e BS a biomassa seca.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta a concentração de ficocianina obtida para os cultivos nas diferentes condições. Percebe-se que apenas na condição suplementada com 10% de vinhaça é que houve um discreto aumento na produção do pigmento. De acordo com Perez-Garcia et al. (2011), os pigmentos das microalgas são produzidos naturalmente em condições fotoautotróficas, podendo ser limitados em crescimento mixotrófico ou heterotrófico. Assim, a maior produção com 10% de vinhaça pode ser explicada por conta da turbidez não tão elevada, que permite a disponibilidade de luz, associada aos nutrientes da vinhaça, como sais e moléculas orgânicas, os quais auxiliam no crescimento microalgal e agem como cofatores de algumas enzimas. Para todas as condições houve uma concentração final de células em torno de  $10^6$  células por mL, o que sugere o acúmulo de ficocianina nestas condições.

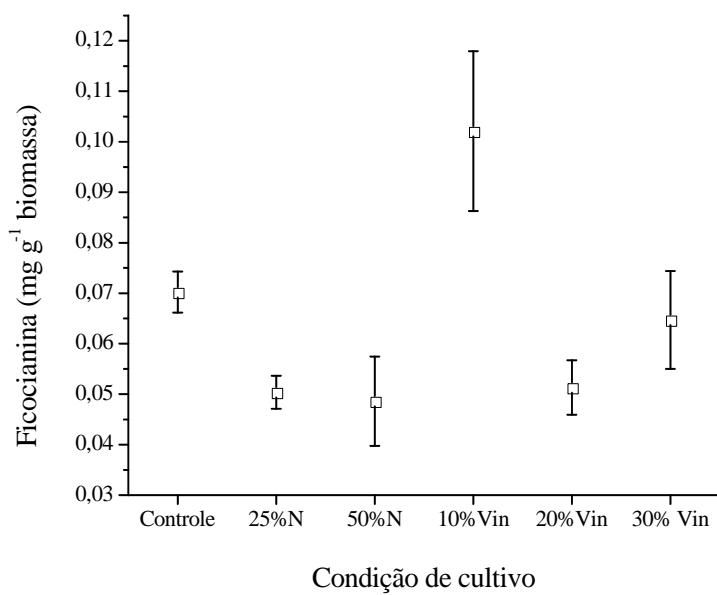


Figura 1. Rendimento em ficocianina nos diferentes cultivos de *Aphanothecace microscopica Nügeli*. O controle consiste de apenas meio BG11 e células de *A. microscopica*, 25 e 50% N representam o cultivo em meio BG11 e 25 e 50% a mais de nitrato de sódio dissolvido no meio, e 10, 20 e 30% Vin correspondem ao meio BG11 adicionados destas três concentrações do efluente.

## CONCLUSÕES

Nas condições experimentais, pode-se concluir que é viável a produção de ficocianina através do cultivo mixotrófico de *Aphanothecace microscopica Nügeli* em meio suplementado com vinhaça de cana-de-açúcar.

## REFERÊNCIAS

- BENNETT, A. and BOGORAD, L., 1973. Complimentary Chromatic Adptation in a Filamentous BlueGreen Alga. *The Journal of Cell Biology*, vol. 58, no. 2, pp. 419.
- BRASIL, B.S.A.F., SILVA, F.C.P. and SIQUEIRA, F.G., 2016. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. *New Biotechnology*, pp.1-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2016.04.007>
- BEGUM, H., YUSOFF, F. M., BANERJEE, S., KHATOON, H. and SHARIFF, M., 2015. Availability and utilization of pigments from microalgae. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 56, no. 13, pp. 2209-2222. doi: 10.1080/10408398.2013.764841.
- BONINI, M.A. and BASTOS, R.G., 2012. Produção de biomassa de *Aphanothecace microscopica* e *Chlorella vulgaris* por cultivo heterotrófico a partir de Glicose. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, vol. 33, no. 2, pp. 151-160. doi: 10.5433/1679-0367.2012v33n2p151
- HORNES, M. O. *Valoração do efluente da indústria processadora de pescado por incorporação de nutrientes em Aphanothecace microscopica Nügeli*. 2008, 221f., Tese

- (doutorado) em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.
- KIM, J. K. and LEE, B. Y. Y., 2000. Mass production of *Rhodopseudomonas palustris* as diet for aquaculture. *Aquacultural Engineering*, vol. 23, pp. 281-293, 2000. doi: 10.1016/S0144-8609(00)00057-1
- MORAES, C.C., SALA, L., CERVEIRA, G.P., and KALIL, S.J., 2011. C-Phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, vol. 28, no. 1, pp. 45-49. doi: 10.1590/S0104-66322011000100006
- PANDEY, V.D., PANDEY, A. and SHARMA, V., 2013. Biotechnological applications of cyanobacterial phycobiliproteins. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, vol. 2, pp.89-97.
- PEREZ-GARCIA, O., ESCALANTE, F.M.E., DE-BASHAN, L.E., BASHAN, Y., 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Research*, vol. 45, pp.11–36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>
- QUEIROZ, M.I., HORNES, M., MANETTI, A.G.S., ZEPKA, L.Q. and JACOB-LOPES, E., 2013. Fish processing wastewater as a platform of the microalgal biorefineries. *Biosystems Engineering*, vol. 115, pp. 195-202. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2012.12.013>
- RAJOKA, M. I., KHAN, S. H., JABBAR, M. A., AWAN, M. S. and HASHMI. A. S., 2006. Kinetics of batch single cell protein production from rice polishings with *Candida utilis* in continuously aerated tank reactors. *Bioresource Technology*. vol. 97, pp. 1934-1941.<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2005.08.019>
- RIPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J.B., HERDMAN, M. and STANIER, R.Y., 1979. Generic Assignments Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, vol. 111, pp.1-61. doi: 10.1099/00221287-111-1-1
- SANTIAGO-SANTOS, M. C., PONCE-NOYOLA, T., OLVERA-RAMÍREZ, R., ORTEGA-LÓPEZ, J. and CAÑIZARES VILLANUEVA, R. O., 2004. Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrixsp*, *Process Biochemistry*, vol. 39, pp. 2047–2052. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2003.10.007>
- SANTOS, A.M., VIEIRA, K.R., SARTORI, R.B., SANTOS, A.M., QUEIROZ, M.I., ZEPKA, L.Q. and JACOB-LOPES, E., 2017. Heterotrophic Cultivation of Cyanobacteria: Study of Effect of Exogenous Sources of Organic Carbon, Absolute amount of Nutrients, and Stirring Speed on Biomass and Lipid Productivity. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 5, pp. 1-7. <http://doi: 10.3389/fbioe.2017.00012>
- SUBASHCHANDRABOSE, S.R., BALASUBRAMANJAN, R., MEGHARAJ, M., VANKATESWARLU and K., NAJDU, R., 2013. Mixotrophic cyanobacteria and microalgae as distinctive biological agents for organic pollutant degradation. *Environment International*, vol. 51, pp. 59-72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2012.10.007>
- SILVA, L. A. *Estudo do processo biotecnológico de produção, extração e recuperação do pigmento fíocianina da Spirulina platensis*. 2008, 91f. Dissertação (mestrado) em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2008.
- SILVEIRA, S.T., BURKERT, J.F.M., COSTA, J.A.V., BURKERT, C.A.V and KALIL, S.J., 2007. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresource Technology*, vol. 98, no. 8, pp. 1629-1634. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.050>
- ZEPKA, L.Q., JACOB-LOPES, E., GOLDBECK, R. and QUEIROZ, M.I., 2008. Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothecce microscopica Nügeli* submitted to different drying conditions. *Chemical Engineering and Processing*, vol. 47, no. 8, pp. 1305-1310. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2007.04.013>

## Preservação de *Lactobacillus acidophilus* utilizando xantana como agente encapsulante

Dener Acosta de Assis<sup>1</sup>, Izadora Almeida Perez<sup>1</sup>, Júlia Borin Fioravante<sup>2</sup>, Victoria de Moraes Gonçalves<sup>2</sup>,  
Patrícia Diaz de Oliveira<sup>3\*</sup>, Angelita da Silveira Moreira<sup>1,2,3</sup>, Claire Tondo Vendruscolo<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas. \*E-mail: bilicadiaz@yahoo.com.br

---

### RESUMO

Objetivou-se com este estudo a preservação de *Lactobacillus acidophilus* pela técnica de secagem por *spray dryer* utilizando xantana como agente encapsulante e avaliar a viabilidade do micro-organismo em diferentes condições de armazenamento. Foram elaborados 3 tratamentos para obtenção das cápsulas: Tratamento 1 - 1,5% de xantana e 1,5% de Aerosil (T1); Tratamento 2 - 1% de xantana e 1% de aerosil (T2); Tratamento 3 - 0,5% de xantana e 0,5% de Aerosil (T3) e ainda Tratamento 4 sem solução encapsulante (T4). A viabilidade do *L. acidophilus* foi avaliada nos dias 0, 7, 15 e 45 de armazenamento à temperatura ambiente e sob refrigeração. Independentemente do tratamento, o uso da solução encapsulante aumentou a sobrevivência inicial dos microrganismos frente ao processo de secagem, em relação ao tratamento controle. O material quando mantido à temperatura ambiente apresentou maior redução da concentração celular ao final do período de armazenamento. A temperatura de refrigeração aumentou a sobrevivência do micro-organismo, principalmente para o T1. Somente o material obtido no T1 armazenados sob refrigeração por até 15 dias apresentou concentração de células viáveis de acordo com o estabelecido pela legislação para probióticos. Pode-se concluir que a goma xantana é um biopolímero que tem alto potencial para ser utilizado como agente encapsulante de microrganismos probióticos.

**Palavras-chave:** microencapsulação; probióticos; *spray dryer*; armazenamento.

---

**Preservation of *Lactobacillus acidophilus* using xanthan gum as encapsulating agent**

### ABSTRACT

The objective of this study was to perform the preservation of *Lactobacillus acidophilus* by the drying at spray dryer using xanthan as an encapsulating agent and to evaluate the micro-organism viability at different storage conditions. Three treatments were elaborated to obtain the microcapsules, varying the concentration of the encapsulating solution, being: Treatment 1 - 1.5% of xanthan and 1,5% of aerosil (T1); Treatment 2 -

1% xanthan and 1% aerosil (T2); Treatment 3 - 0.5% of xanthan and 0.5% of aerosil (T3) and Treatment 4 without encapsulating solution (T4). The *L. acidophilus* viability was evaluated at days 0, 7, 15 and 45 of storage at room temperature and under refrigeration. Irrespective of the treatment, the use of encapsulating solution increased the initial survival of the microorganisms against the drying process, compared to the control treatment. The material when maintained at room temperature showed greater reduction of the cellular concentration at the end of the storage period. The cooling temperature enhanced the surviving micro-organisms, especially for T1. Only material obtaining by T1 treatment and stored under refrigeration until 15 days had a concentration of viable cell as established by legislation of probiotics. It can be concluded that xanthan gum is a biopolymer which has high potential to be used as an encapsulating agent of probiotic microorganisms.

**Keywords:** microencapsulation; probiotics; spray dryer; storage.

---

## INTRODUÇÃO

Probióticos são definidos como microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002). Para que exerça sua função benéfica, a legislação estabelece que a quantidade mínima viável para os probióticos nos alimentos deve estar na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto (BRASIL, 2008).

Alguns alimentos possuem propriedades intrínsecas e extrínsecas, bem como a tecnologia envolvida na sua elaboração, desfavoráveis ao desenvolvimento das culturas probióticas, se fazendo necessárias ações para manter a estabilidade dos mesmos durante o processo de elaboração e armazenamento; a microencapsulação é uma alternativa para superar o obstáculo da redução da viabilidade de probióticos em diferentes produtos alimentícios (ETCHEPARE et al., 2015; SILVA et al., 2014; SAAD et al., 2011). Segundo Menezes et al. (2013), a microencapsulação consiste em uma tecnologia que permite recobrir partículas ou pequenas gotas de material com agente encapsulante, formando microcápsulas protetoras; estas podem liberar seu conteúdo em taxas controladas e/ou sob condições específicas, o que é um fato interessante em se tratando de probióticos, os quais deseja-se que resistam às condições desfavoráveis estomacais e possam chegar ao intestino numa concentração eficaz. Ding and Shah (2009) avaliaram o efeito de vários materiais encapsulantes na estabilidade dos probióticos demonstrando a capacidade da xantana, que também exerce efeito crioprotetor externo, em produzir microcápsulas resistentes às condições

gastrointestinais e aplicáveis em alimentos. Objetivou-se aumentar a sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* durante a secagem por *spray dryer* utilizando a xantana como agente encapsulante, avaliando a viabilidade inicial e após armazenamento a temperatura ambiente e sob refrigeração.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Material e Tratamentos:** o microrganismo probiótico utilizado foi o *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Na solução encapsulante utilizou-se o agente encapsulante xantana (Fufeng®, distribuída pela Farmaquímica) e o antiumectante/antiagregante Aerosil®. Foram elaborados 3 tratamentos variando-se a concentração da solução encapsulante, sendo: tratamento 1 (T1): 1,5% xantana + 1,5% aerosil; tratamento 2 (T2): 1% xantana + 1% aerosil; tratamento 3 (T3): 0,5% xantana + 0,5% aerosil. Ainda um tratamento controle negativo (T4), contendo solução salina 0,89% em substituição à solução encapsulante. As soluções foram esterilizadas.

**Encapsulação:** o inóculo foi padronizado em  $DO_{600nm}$  0,5, sendo obtido segundo SILVA et al. (2014). Após, o inóculo foi centrifugado a 10.000 xg, a 4 °C por 10 min, e as células obtidas foram ressuspensas nas respectivas soluções e homogeneizadas. A secagem foi realizada em *spray dryer* LabMaq (MSD 1.0), com temperatura de entrada de 120°C, na saída de 60°C, fluxo de ar de 3L/h e velocidade de entrada de 0.4 L/h. O pó produzido foi envasado em frascos tipo penicilina armazenados em dessecador à temperatura ambiente (25°) e sob refrigeração (4°C). A sobrevivência ao processo de secagem ou viabilidade inicial percentual foi calculada de acordo com a equação 1 e o resultado expresso em percentual.

$$Vi = (Cf / Ci) \times 100 \quad (1)$$

Onde:  $Vi$  = Viabilidade inicial,  $Ci$  = Concentração celular inicial,  $Cf$  = Concentração celular final após atomização.

**Avaliação da viabilidade:** a viabilidade inicial (dia 0) dos microrganismos liofilizados e após 7, 15 e 45 dias de armazenamento foi determinada conforme Silva et al. (2014) adaptado. Foram adicionadas 0,01 g das microcápsulas a 1 mL de solução tampão 0,05 M e submetidas à agitação de 150 rpm, 37 °C por 3 h. Após, foram realizadas contagens das diluições seriadas em meio MRS ágar e incubadas a 37 °C, por 72 h sob anaerobiose.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obteve-se material pulverulento de excelente aspecto. A viabilidade inicial foi: 6,8% para T1, 4,4% para T2, 9,1% para T3 e 1,4 para T4. Verificou-se sobrevivência variada do microrganismo ao processo de secagem, influenciada pelo tratamento (tabela 1). A viabilidade durante o armazenamento foi influenciada pelo tratamento e temperatura de armazenagem.

**Tabela 1 – Concentração microbiana (UFC g<sup>-1</sup>) dos inóculos e material probiótico armazenado em temperatura ambiente (25 °C) e sob refrigeração (4 °C).**

Ambiente (25° C)					
Trat	Inóculo	0 dia	7 dias	15 dias	45 dias
<b>T1</b>	$3,4 \times 10^{10} \pm 5^{\text{Aa}}$	$2,3 \times 10^9 \pm 2,4^{\text{Ab}}$	$3,1 \times 10^8 \pm 4,6 \times 10^1^{\text{Ac}}$	$2,6 \times 10^8 \pm 8^{\text{Ac}}$	$3,0 \times 10^7 \pm 10^{\text{Ac}}$
<b>T2</b>	$5 \times 10^9 \pm 10^{\text{Ca}}$	$2,2 \times 10^8 \pm 2^{\text{Cb}}$	$2,0 \times 10^6 \pm 0^{\text{Bc}}$	$5,0 \times 10^4 \pm 0^{\text{Bc}}$	$0 \pm 0^{\text{Bc}}$
<b>T3</b>	$8,2 \times 10^9 \pm 2,6^{\text{Ba}}$	$7,5 \times 10^8 \pm 2,1 \times 10^1^{\text{Bb}}$	$3,0 \times 10^5 \pm 0^{\text{Bc}}$	$0 \pm 0^{\text{Bc}}$	$0 \pm 0^{\text{Bc}}$
<b>T4</b>	$2 \times 10^9 \pm 3,7^{\text{Da}}$	$2,7 \times 10^7 \pm 8^{\text{Cb}}$	$2,0 \times 10^6 \pm 0^{\text{Bc}}$	$3,6 \times 10^6 \pm 5^{\text{Bc}}$	$0 \pm 0^{\text{Bc}}$
Refrigeração (4° C)					
Trat	Inóculo	0 dia	7 dias	15 dias	45 dias
<b>T1</b>	$3,4 \times 10^{10} \pm 5^{\text{Aa}}$	$2,3 \times 10^9 \pm 2,4 \times 10^2^{\text{Ab}}$	$3,0 \times 10^9 \pm 0^{\text{Ab}}$	$2,4 \times 10^9 \pm 693^{\text{Ab}}$	$6,2 \times 10^8 \pm 35^{\text{Ac}}$
<b>T2</b>	$5 \times 10^9 \pm 10^{\text{Ca}}$	$2,2 \times 10^8 \pm 2^{\text{Cb}}$	$4,6 \times 10^7 \pm 1,9 \times 10^0^{\text{Bc}}$	$3,0 \times 10^7 \pm 2^{\text{Bc}}$	$3,2 \times 10^6 \pm 0^{\text{Bc}}$
<b>T3</b>	$8,2 \times 10^9 \pm 2,6^{\text{Ba}}$	$7,5 \times 10^8 \pm 2,1 \times 10^1^{\text{Bb}}$	$2,7 \times 10^7 \pm 1^{\text{Bc}}$	$2,4 \times 10^7 \pm 2^{\text{Bc}}$	$8,3 \times 10^5 \pm 0^{\text{Bc}}$
<b>T4</b>	$2 \times 10^9 \pm 3,7^{\text{Da}}$	$2,7 \times 10^7 \pm 8^{\text{Cb}}$	$3,0 \times 10^7 \pm 10^{\text{Bb}}$	$3,0 \times 10^6 \pm 1^{\text{Bc}}$	$5,0 \times 10^5 \pm 0^{\text{Bc}}$

Trat = tratamento. Letras maiúsculas distintas significam diferenças na coluna, letras minúsculas diferenças na linha ( $p \geq 0,05$ ). T1: 1,5% xantana, 1,5% aerosil; T2: 1,0% xantana, 1,0% aerosil; T3: 0,5% xantana, 0,5% aerosil; T4: 0,0 % xantana, 0,0 % aerosil.

Em todos os tratamentos observou-se diminuição da concentração microbiana após a secagem. Isto se dá devido às altas temperaturas que causam injúrias e morte às células (SAAD et al., 2011). A redução foi de 1 ciclo logarítmico na população microbiana usando-se a solução encapsulante, enquanto que no controle negativo (T4) foi de 2 ciclos. Esses resultados são superiores aos obtidos por Zhao et al. (2008) para *L. acidophilus* encapsulados com  $\beta$ -ciclodextrina e goma arábica, que tiveram redução de 2 ciclos logs. Hain et al. (2015) também evidenciaram diminuição de 2 logs para bactéria probiótica encapsulada em diferentes combinações de agentes encapsulantes (alginato de sódio, xantana e  $\beta$ -ciclodextrina).

A utilização de xantana diminuiu a injúria celular frente ao processo de secagem com temperatura de 120 °C, com destaque ao tratamento com maior concentração de

xantana e aerosil (T1), que também ocasionou viabilidade significativamente maior durante o armazenamento, em ambas temperaturas.

O material armazenado à temperatura ambiente apresentou maior redução da viabilidade ao tempo final (45 dias), diminuindo 2 logs no T1; já nos demais tratamentos, ao final do período, não detectou-se nenhuma célula viável. Quando armazenado sob refrigeração, o T1 manteve concentração superior a  $10^8$  UFC.g<sup>-1</sup>, valor mínimo para essa porção de 1g ser considerada probiótico pela legislação atual (BRASIL, 2008). T2 e T3 tiveram valores de  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup>, sendo o mínimo aceitável para que os probióticos exerçam ação benéfica (FAO, 2002; ROY, 2005). Silva et al. (2014) realizaram a microencapsulação de *B. animalis* e *L. acidophilus* utilizando como encapsulante uma solução contendo diversos agentes. Relataram que o armazenamento sob refrigeração auxiliou na estabilidade das células encapsuladas e que este evita rearranjos no material de parede, impedindo a exposição inadequada dos microrganismos às condições adversas, e assim auxiliando no incremento da vida útil das microcápsulas.

## CONCLUSÕES

O processamento utilizado permitiu a sobrevivência do probiótico *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. A xantana é um biopolímero com alto potencial para ser utilizado como agente encapsulante de microrganismos probióticos.

## REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. *Diário Oficial da União*, Brasília, 09 de janeiro de 2002. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2008.

DING, W. K.; SHAH, N. P. Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. *Journal of Food Science*, v. 74, n. 2, p. 100-107, 2009. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01067>.

ETCHEPARE, M. de A.; MENEZES, M. F. S. C.; BARRETO, A. R.; CAVALHEIRO, C. P.; MENEZES, C. R. Microencapsulação de probióticos pelo método de extrusão associado a interações eletrostáticas. *Revista Ciência e Natura*, v.37, p. 75 – 86, dez. 2015. <http://dx.doi.org/10.5902/2179-460X19718>.FAO. *Food and Agriculture Organization of the United Nations. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.* London, Ontario, Canada. April 30 and May 1, 2002.

HAIN, A. B.; GOMES, R. G.; BERGAMASCO, R. de C. Estabilidade de bactéria probiótica encapsulada em diferentes combinações de agentes encapsulantes. In: Encontro Anual de Iniciação Científica da UEL. 2015. Londrina **Anais...** Anais do Encontro Anual de Iniciação Científica da UEL. Londrina: Editora Universitária UEL. 2015.

MENEZES, C. R. de; BARIN, J. S.; CHICOSKI, A. J.; ZEPKA, L. Q.; LOPES, E. J.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. *Revista Ciência Rural*, v. 43 n. 7, p. 1309-1316, jul. 2013. ROY, D. Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. *Le Lait*, v.85 , n.1-2, p.39-56, 2005. <http://dx.doi.org/10.1051/lait:2004026>.SAAD, S. M. I.; CRUZ, A . G. da; FARIA, J. A. F. *Probióticos e prebióticos em alimentos: Fundamentos e aplicações tecnológicas.* 1ed. São Paulo: Varela, 2011. 669p. <http://dx.doi.org/10.1590/0102-6720201600040016>.SILVA, P. T.; FRIES, L . L . M.; MENEZES, C. R. de; SILVA, C. de B.; SORIANI, H.

H.; BASTOS, J. de O.; MOTTA, M. H.; RIBEIRO, R. F. Microencapsulação de probióticos por *spray drying*: avaliação da sobrevivência sob condições gastrointestinais simuladas e da viabilidade sob diferentes temperaturas de armazenamento. 2014. *Revista Ciência Rural*, Santa Maria/RS. ISSN 0103-8478. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20140211>.

ZHAO, R. X.; SUN, J. L.; TORLEY, P.; WANG, D. H.; NIU, S. Y. Measurement of particle diameter of *Lactobacillus acidophilus* microcapsule by spray drying and analysis on its microstructure . *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, p.1349-1354, 2008.

**Fermentação de xilose em etanol por leveduras  
*Saccharomyces cerevisiae***

Dinis Pedro Silvério Batalha<sup>1</sup>; Daniela Defavari do Nascimento<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Tecnologia de Piracicaba “Dep. Roque Trevisan” - Fatec Piracicaba.  
\*daniela.nascimento01@fatec.sp.gov.br

---

**RESUMO**

As preocupações ambientais dão cada vez mais importância aos biocombustíveis com destaque para o bioetanol, mas há necessidade de encontrar matérias-primas alternativas, que não concorram com a produção de alimentos ou propiciem o uso da terra para fins energéticos. Os resíduos agroindustriais, de baixo valor econômico, como o bagaço, atendem esse objetivo, mas para que a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos seja economicamente viável e capaz de competir com combustíveis fósseis, é necessário identificar microorganismos capazes de fermentar xilose, principal constituinte da hemicelulose. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo de excelência utilizado em escala industrial, pela sua resistência a altas concentrações de etanol. No presente trabalho, foram testadas doze linhagens de leveduras disponíveis no banco de germoplasma da Fatec Piracicaba quanto à sua capacidade de metabolizar xilose, visando encontrar leveduras adaptadas à fermentação na presença destas pentoses. Os testes preliminares permitiram observar quais se adaptaram melhor ao substrato com xilose a 15% e 30%, pela medida de gás formado durante a fermentação, três delas apresentaram resultados promissores com a presença de xilose. No passo seguinte as fermentações com estas leveduras, numa escala maior, permitirão medições da quantidade de xilose consumida e correlacionar com a quantidade de etanol produzido.

**Palavras-chave:** Bioetanol, Biocombustíveis, Etanol celulósico, Química verde, Pentoses.

---

**Xylose fermentation to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* yeasts**

**ABSTRACT**

Environmental concerns are giving increasing importance to biofuels, with highlight to bioethanol, however there is a need to find alternative raw materials, which do not compete with the production of food or use of land for energy purposes. The agroindustry waste, of low economic value, such as bagasse, meets this propose, but to make the production of ethanol, from lignocellulosic materials, economically viable and capable of rivaling with fossil fuels, it is necessary to identify microorganisms able to ferment xylose, the main constituent of hemicelluloses. *Saccharomyces cerevisiae* yeasts are excellence microorganisms to use at industrial scale, due to its resistance to high ethanol concentrations. In the present work, twelve yeast strains available at the germplasm bank of Fatec Piracicaba, were tested for their ability to metabolize xylose,

with the aim to find yeasts adapted to the fermentation in the presence of these pentoses. Preliminary tests had permitted to observe which were better adapted to substrate with xylose at 15% and 30%, by the measure of gas formed during the fermentation, three of them presented promising results at the presence of xylose. At the next step, fermentations with these yeasts on a larger scale will allow measurements of the amount of xylose consumed and its correlation with the amount of ethanol produced.

**Keywords:** Bioethanol, Biofuels, Cellulosic ethanol, Green chemistry, Pentoses.

---

## INTRODUÇÃO

O Brasil é, entre os países do BRICS, o que mais utiliza biocombustíveis para transporte, e com tendência para aumentar, segundo Müller et al. (2011), a previsão para 2030 é que se exceda os 40%. A maior contribuição para esse percentual vem do etanol combustível, para o qual 97,1% da matéria prima utilizada é a cana de açúcar. Entre 2012 e 2015 a produção nacional do combustível cresceu mais de 20% (EPE, 2015), já para a safra de 2016/17 a CONAB (2016) estimou um aumento modesto de 2,6% impulsionado pelo aumento da mistura de etanol anidro na gasolina de 25 para 27%, porém o etanol hidratado deverá apresentar queda de produção, pela redução do consumo e devido ao elevado preço do açúcar no mercado externo que leva as usinas a aumentarem a produção de açúcar em detrimento do etanol.

A expectativa é de que as usinas possam utilizar bagaço de cana hidrolisado como fonte de açúcares fermentescíveis. O aproveitamento do bagaço e palha da cana poderá elevar a produção de etanol em 30 a 40% para uma mesma área plantada, porém, o bagaço possui um grande teor de hemiceluloses, o que torna necessário o aproveitamento dos açúcares com cinco carbonos como precursores de etanol (EMBRAPA, 2016).

A fermentação alcoólica é realizada por diversas bactérias e leveduras e as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* estão altamente adaptadas à utilização em processos fermentativos de etanol e exploração industrial (Tortora et al., 2012). Como vantagens principais apresentam alta tolerância a concentrações elevadas de etanol e baixo pH, o que permite o controle de contaminação bacteriana, tão importante no processo industrial (Moysés et al., 2016). Para a obtenção do etanol carburante, quando se visa a utilização de bagaço de cana hidrolisado, surge um novo desafio, devido ao seu alto conteúdo de xilose, uma vez que a *S. cerevisiae* não é capaz de converter a xilose em etanol. Outros microrganismos capazes de realizar essa conversão são pouco eficientes e não toleram altas concentrações de etanol (Mousdale, 2008), a permanência

de linhagens não *Saccharomyces* nas dornas é reduzida pois os teores alcoólicos desse tipo de fermentação não permitem a sobrevivência de outros gêneros de leveduras (Andrietta et al., 2006)

A fermentação alcoólica começa com a glicólise produzindo duas moléculas de ácido pirúvico e duas moléculas de ATP. A Hexoquinase é a enzima que catalisa a primeira reação, a conversão de glicose e ATP em glicose-6-fosfato e ADP. A hidroxila do carbono 6 da glicose, para a qual o fosfato do ATP é transferido, é similar à água em reatividade química e a água entra livremente no sítio ativo da enzima. Apesar disso, a hexoquinase pode discriminar a glicose e a água devido às mudanças conformacionais que ocorrem na enzima quando o substrato correto se liga ao sítio ativo. A xilose, estereoquimicamente similar à glicose mas com um carbono a menos, liga-se à hexoquinase em uma posição onde não pode ser fosforilada, porém suficiente para induzir a mudança para a conformação ativa e, desse modo, a enzima fosforila a água, assim, a adição de xilose à mistura de reação aumenta o consumo de ATP (Nelson and Cox, 2002).

Algumas linhagens de levedura *S. cerevisiae* conseguem utilizar xilose como substratos para reduzir a xilitol, através de enzimas específicas. Podem igualmente aproveitar a xilose como nutriente, promovendo a sua isomerização a xilulose para utilizar na síntese de ácidos nucleicos (Mousdale, 2008). Mas, a grande maioria das linhagens naturalmente ocorrentes de *S. cerevisiae* é incapaz de metabolizar xilose (CGEE, 2010).

A Embrapa (2016) desenvolve alguns projetos relacionados à produção de etanol de segunda geração, os quais buscam identificar leveduras naturalmente capazes de fermentar xilose, assim como o desenvolvimento de linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* com essa característica. Vários desafios surgiram após as primeiras experiências com *S. cerevisiae* recombinantes, em simultâneo com o esclarecimento dos caminhos metabólicos para a xilose na levedura, como a via das pentoses fosfato e a formação de xilitol (Moysés et al., 2016).

Desta forma, a proposta do presente trabalho é identificar linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* que tenham a capacidade de fermentar açúcares de cinco carbonos como a xilose e que ainda não tenham o metabolismo fermentativo inibido pela presença desses açúcares, a fim de que possam ser utilizadas em processos industriais de obtenção de etanol de segunda geração proveniente de materiais lignocelulósicos após tratamento e sacarificação.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os testes têm sido realizados na Fatec Piracicaba com leveduras *S. cerevisiae* disponível no banco de germoplasma da faculdade conservadas em ultrafreezer. Os meios de cultura foram preparados a partir de caldo de cana diluído com água destilada para correção do °Brix para 11,5 e corrigido o pH para 4,5 com ácido sulfúrico diluído, autoclavados por 15 minutos a 121°C. Duas outras formulações de meios foram testadas, acrescentando-se 15 e 30% de xilose ao meio base de caldo de cana a 11,5°Brix.

Na primeira fase foram escolhidas 12 cepas, conforme tabela 1, multiplicadas em caldo de cana a 7°Brix e pH 4,5 a 30°C com agitação constante por 48 horas, as alíquotas de solução de levedura foram calculadas pela medição da turbidez em espectrofotômetro a 600 nm, em proporção inversa à absorbância (1000 µl para 0,1 abs), e adicionadas em triplicata em tubos de ensaio com tubo Durham invertido e 10 ml do respectivo meio de cultura (caldo de cana a 11,5°Brix; caldo de cana a 11,5°Brix + 15% xilose; e caldo de cana a 11,5°Brix + 30% xilose), após 17 e 21 horas mediu-se a altura de gás no tubo Durham.

**Tabela 2** – Leveduras utilizadas na fase de seleção.

Identificação	Nome	Tipo de Levedura	Alíquota (µl)
1	Munich	Cerveja de Trigo	200
2	T58	Cerveja	150
3	Diamond	Cerveja	500
4	Vinho de amora	Natural	150
5	Usina da região	Industrial	1500
6	A2	Industrial	150
7	Uva passa	Natural	250
8	Monte Alegre do Sul	Cachaça artesanal	250
9	Lev. Cerveja	Natural	200
10	English	Cerveja	200
11	S23	Cerveja	300
12	California	Cerveja	750

Os resultados preliminares permitiram selecionar as leveduras que tiveram melhor desempenho na presença de xilose com as quais os testes serão repetidos em escala maior para a realização das medições de etanol produzido através de eboliômetro e a xilose consumida por espectrofotometria a 540 nm com reagente DNS e determinar a sua relação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As leveduras que apresentaram resultados positivos no meio contendo 15% de xilose decorridas 21 horas foram 3, 4, 5, 6, e 8, e destas as que se destacaram nas primeiras 17 horas foram 3, 5, 6 e 8.

Já para o meio com 30% de xilose as que produziram mais gás foram 2, 3, 4, 5, 6, 9 e 10, mas apenas as leveduras 3, 5 e 6 obtiveram resultados significativos nas primeiras 17 horas.

A levedura 9 apresentou resultados melhores no meio sem xilose.

As leveduras 1, 7, 11 e 12 tiveram pouca formação de gás nos três meios, por isso, presume-se que têm baixo rendimento fermentativo.

Na figura 1 são exibidos tubos representativos da cepa 5.



**Figura 1** – Tubos representativos da cepa 5, em meio constituído de caldo de cana a 11,5°Brix, acrescidos de 30%, 15% e 0% de xilose, respectivamente.

Como se observa na figura 1 a formação de gás nos tubos Durham é um indicador simples das leveduras que tiveram bom rendimento na fermentação e permite a seleção das que têm maior potencial para fermentar na presença de xilose, o estudo da relação de xilose consumida com a produção de etanol deverá permitir escolher cepas com potencial para utilização em substratos com esse açúcar.

## CONCLUSÕES

O teste preliminar revelou-se eficiente para selecionar as cepas que têm maior potencial para fermentar em meios contendo xilose e escolher as que serão utilizadas na próxima fase do estudo.

## REFERÊNCIAS

- ANDRIETTA, M.G.S. et al. 2006. Bioetanol: Brasil, 30 anos na vanguarda. *Multiciência: construindo a história dos produtos naturais*. Campinas: UNICAMP.
- CGEE - CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. 2010. *Química verde no Brasil: 2010 – 2030*. Brasília, DF: CGEE.
- CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO . 2016 . *Acompanhamento da safra brasileira de cana de açúcar*. v. 3, Safra 2016/17, n. 2 - Segundo levantamento. Brasília: CONAB.
- EMBRAPA. 2016 [viewed 07 September 2016]. *Genômica funcional, transcriptômica e metabolômica, de leveduras fermentadoras de xilose para aumento da eficiência na produção de etanol de segunda geração*. Available from: <https://www.embrapa.br/projetos>
- EPE - EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. 2016 [viewed 29 August 2016]. *Balanço energético nacional 2016: relatório síntese, ano base 2015*. Available from: <https://ben.epe.gov.br/>
- MOUSDALE, D.M. 2008. *Biofuels: biotechnology, chemistry, and sustainable development*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- MOYSÉS, D.N. et al. 2016. Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and Prospects. *International Journal of Molecular Sciences.*, 17, 207. <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/3/207/htm>
- MÜLLER, S. et al. 2011. *Renewable energy markets and prospects by region*. Paris, France: OECD/IEA.
- NELSON, D.L. and COX, M.M. 2002. *Lehninger princípios de bioquímica*, 3. ed. São Paulo: CLR Balieiro Editores.
- TORTORA, G. J. et al. 2012. *Microbiologia*. 10. Ed. Porto Alegre: Artm

**Viabilidade da inoculação de *Cratylia argentea* com microrganismos fixadores de nitrogênio para uso como forragem em ovinocultura**

Eduardo José Azevedo Corrêa<sup>1\*</sup>; Manoel Eduardo Silva<sup>1</sup>; Henrique Clayton<sup>1</sup>; Adriano Guimarães Parreira<sup>2</sup>, Paulo de Oliveira<sup>1</sup>, Ivanildo Evônio Marriel<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG).

\*e-mail eduardo@epamig.br (autor para correspondência)

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Minas Gerais (UEMG).

<sup>3</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

---

**RESUMO**

Este trabalho mostra os resultados de testes de inoculantes de microorganismos fixadores de nitrogênio desenvolvidos pela EMBRAPA Milho e Sorgo em uma forrageira chamada *Cratylia argentea* muito usada em agro ecossistema como alimentação animal em países da região Amazônica. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência de estípulas de *Rhizobium* spp, que foram pré-selecionadas pela equipe da Embrapa Milho e Sorgo, em campo experimental. Para isso, inoculamos plantas de *C. argentea* em campo, inoculação tardia de plantas já adultas, com foco nas estípulas 4 (CR42) e 22 (CR52) que mostraram ter maior eficiência simbióticas nos estudos já realizados em casa de vegetação. Os trabalhos foram realizados no Campo Experimental de Pitangui (CEPI/EPAMIG), Pitangui, MG, onde plantas adultas de *C. argentea* em campo foram inoculadas tardiamente. Os resultados do presente trabalho demonstraram que até o presente momento a fixação biológica não teve um significativo papel no incremento do crescimento desta espécie, pelo menos quando as plantas são inoculadas após um metro de altura. Outros experimentos estão sendo conduzidos com inoculação em sementes no momento do plantio. Mas estudos principalmente em campo são importantes para se avaliar e se obter uma estípula de rizóbio eficiente principalmente em condições de campo.

**Palavras-chave:** Fixação Biológica de Nitrogênio, *Rhizobium*, *Cratylia argentea*, Consócio pastagem leguminosa, Ovinocultura.

## Rhizobia inoculation's viability with nitrogen-fixing microorganisms in *Cratylia argentea* to use as forage in sheep

### ABSTRACT

This paper shows results from tests of microbial inoculants fixing of atmosferic nitrogen developed by EMBRAPA CNPMS to forage plant called *Cratylia argentea*. A plant very used in agroecosystems to animal supply in countries on Amazonia land. The aim of this work was to evaluate the *Rhizobium* efficiency from EMBRAPA in an experimental field located at Pitangui City. *C. argentea* plants was inoculated in field after one year of growth, the inoculation was late in adult plant one years old, we selected three stirpes of rhizobia CR52 BR 10257; CR42 BR10244 and CR 33 Br10243, and one control treatment not inoculated. This rhizobia was selected by you greatest symbiotic efficiency in older studies in green house conditions. This work has been realized in the Pitangui Experimental field (CEPI/EPAMIG), Pitangui City, MG. Where adult's plants of *C. argentea*, growing in the field past ne year old and with over one meter tall was inoculated with the EMBRAPA rhizobia stirpes. The results of the present work shows that until now the Air Nitrogen Biologic Fixation are not significant role to increase the *C. argentea*'s grow up, when the plants are one meter tall when they are inoculated. Other experiments are been conducted in CEPI/EPAMIG to evaluate the seeds inoculation's efficient. However mainly fields studies are necessary and important to evaluate and obtain one Rhizobia's stirpes efficient in fields conditions.

**Keywords:** Biological Fixation of Nitrogen, *Rizobium*, *Cratylia argentea*, Consortium leguminous pasture, Sheep.

---

### INTRODUÇÃO

O gênero *Cratylia* pertence à subfamília Faboideae da família Fabaceae. É uma planta perene, arbustiva atingindo de 1,5 a 3 metros de altura, com raízes profundas e quando consorciadas com plantas de porte alto podem mostrar um *habitus* volúvel rastejante. As folhas são trifolioladas com lâminas foliares amplamente ovadas com pubescência prateada na face abaxial. As flores são arranjadas em pseudo racemo alongado, com 6-9 flores por nó. As pétalas são predominantemente lilás ou, excepcionalmente, brancas. Os legumes são retos, planos, até 20 cm de comprimento e 1-2 cm de largura, deiscentes, contendo 4-8 sementes ovais a quase circulares de cerca de 1 cm de diâmetro, de tonalidade variando de amarelo escuro a castanho quando maduros e sob condições de alta umidade, tem aspecto marrom escuro. O peso de mil

sementes é de aproximadamente de 220 gramas, ou seja, cerca de 4500 sementes por quilograma (PETERS & SCHULTZE-KRAFT, 2002).

A *Cratylia* é leguminosa arbustiva nativa do cerrado, tolerante à seca e a solos ácidos e tem potencial para adubação verde e forrageamento. Por essas características, pode ser utilizada pelo agricultor familiar. Resultados com germinação mostram que as sementes possuem em torno 80% de germinação, mantido tanto em sementes recém colhidas quanto armazenadas (ARAUÍJO, 2011).

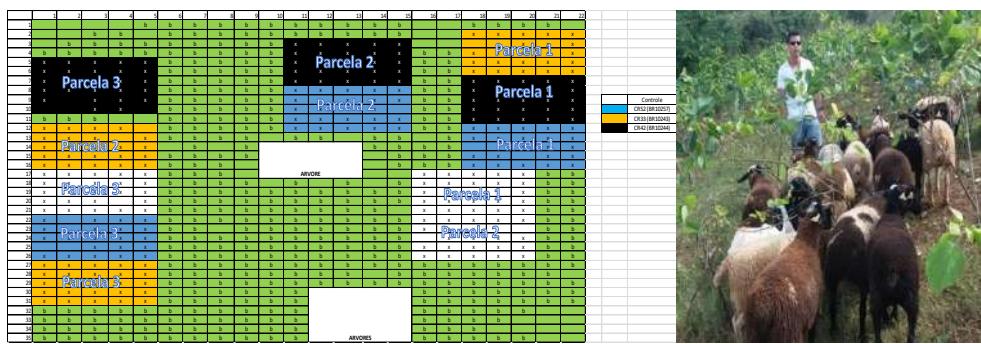
Esta espécie tem potencial para ampliar a disponibilidade de fitomassa em sistemas agrícolas, alimentar ruminantes em épocas de reduzida forragem natural e recuperar áreas degradadas. MIRANDA (2011), na região central de Minas Gerais, avaliou a produção de fitomassa de *C. argentea* em área de 105 m<sup>2</sup>. No primeiro intervalo de cortes (outubro/2010 a fevereiro/2011) produziu 291,7 kg (27,7 t ha<sup>-1</sup>), de fevereiro a maio/2011, produziu 220,7 kg (21,0 t ha<sup>-1</sup>) e de maio a setembro/2011 produziu 93,9 kg (8,9 t ha<sup>-1</sup>) concluindo que *C. argentea* pode ser importante espécie para o fornecimento de fitomassa em agro ecossistema na região estudada.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Inoculação de *C. argentea* tardivamente

Foi realizada a inoculação tardia com estirpes de Rizóbio cedidos pelo Dr. Ivanildo Evódio Marriel EMBRAPA/CNPMS pré selecionados por CALAZANS (2016). 10 mL de inoculante foram aplicados diretamente no colo de plantas adultas de *C. argentea* com cerca de um ano, plantadas em espaçamento de 1 x 1 metros e podadas a altura de 1 metro (conforme croqui da Figura 1). As plantas dentro de cada parcela e obedecendo cada tratamento foram reinoculadas três meses após a inoculação inicial.

As “parcelas” foram montadas dentro do “pool” de plantas visando homogeneidade no tamanho das plantas. Cada parcela ficou delimitada por uma bordadura de plantas que foram inoculadas com a estirpe daquela parcela.



**Figura 1.** Croqui da área de inoculação tardia montada no setor de Ovinocultura do CEPI/EPAMIG. NOTA: Tratamentos: Azul – estirpe de rizóbio CR52 BR 10257; Preto – estirpe CR42 BR10244; Laranja – estirpe CR 33 Br10243; E Branco – tratamento controle sem inoculação de rizóbio.

O desenvolvimento (crescimento em altura e diâmetro e acúmulo de nitrogênio foliar) foi avaliado semanalmente dentro das parcelas, excluindo as bordaduras. Foram coletados dados entre Novembro e Dezembro de 2016 e uma segunda coleta de dados entre janeiro e fevereiro de 2017.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados experimentais obtidos não foram conclusivos sobre a eficiência das estirpes de rizóbio utilizados em inoculação tardia de plantas de *C. argentea*. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos e/ou controle em nenhum dos tempos ou períodos avaliados (Tabelas 1 e 2).

**Tabela 1.** Resultado da Análise não paramétrica (Kruskal-Wallis) para dados de altura (cm) no período de Novembro a Dezembro de 2016.

TRATAMENTO	N	Mediana	Ranke de Média	Z
<i>BR10243'</i>	118	101,50	231,7	-0,36
<i>BR10244'</i>	134	108,00	248,3	1,29
<i>BR10257'</i>	108	96,00	219,2	-1,42
<i>Controle</i>	110	103,50	240,1	0,40
<i>Overall</i>	470		235,5	

**H = 2,96 DF = 3 P = 0,398 NS**

**H = 2,96 DF = 3 P = 0,398 (adjusted for ties)**

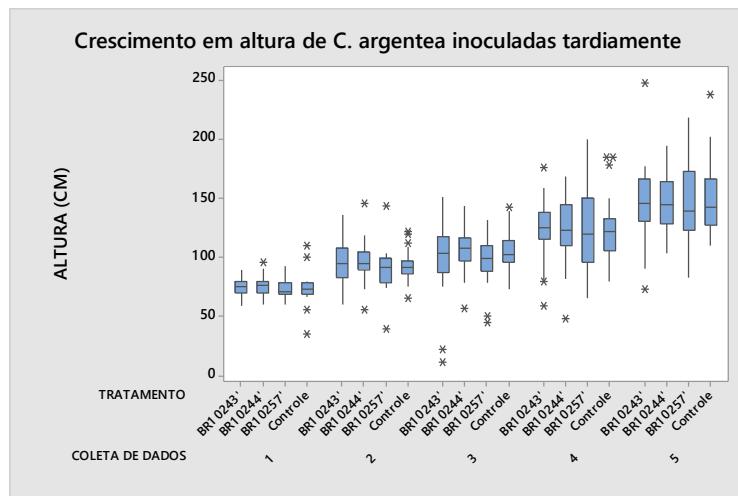
**Tabela 2.** Resultado da Análise não paramétrica (Kruskal-Wallis) para dados de altura (cm) para dados coletados no período de Janeiro a Fevereiro de 2017.

TRATAMENTO	N	Mediana	Ranke de Médias	Z
<i>BR10243'</i>	118	101,50	231,7	-0,36
<i>BR10244'</i>	134	108,00	248,3	1,29
<i>BR10257'</i>	108	96,00	219,2	-1,42
<i>Controle</i>	110	103,50	240,1	0,40
<i>Overall</i>	470		235,5	

**H = 2,96 DF = 3 P = 0,398 NS**

**H = 2,96 DF = 3 P = 0,398 (adjusted for ties)**

O gráfico de box-plot de crescimento em altura da avaliação feita entre Janeiro e Fevereiro de 2017 mostra que as plantas cresceram entre 70 e 80 centímetros entre o inicio e o final da avaliação, entretanto se consideramos a distribuição dos dados entre tratamentos dentro do mesmo período, vamos observar que não há diferenças significativas, o que nos leva a não rejeitar a hipótese nula e dizer que os inoculantes aplicados tardivamente em plantas com um metro de altura não surtiram efeito no período até o momento avaliado.



**Figura 2.** Crescimento em altura de *C. argentea* inoculadas tarde. (Coleta de Dados 1, 2, 3 .. correspondem a 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> ... semana de avaliação).

## CONCLUSÕES

Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos, isso pode indicar que as estirpes pré-selecionadas em vasos por CALAZANS (2016) não sejam efetivas em campo, ou que a inoculação tardia desta espécie não é adequada, é provável que as raízes finas mais profundas susceptíveis a infecção pela bactéria rizóbio não foram atingidas pelo inoculante aplicado no colo da planta, sendo mais adequada a inoculação de mudas ou sementes. Mais estudos e testes em campo serão importantes para se alcançar dados mais consistentes e definir qual o melhor momento e a melhor estirpe de rizóbio para uma maior produção de fitomassa de *C. argentea* em campo.

## AGRADECIMENTO

Agradecemos a EMBRAPA pelo apoio na realização deste trabalho, a FAPEMIG pelas bolsas disponibilizadas e recursos necessários para desenvolvimento desta proposta e toda a equipe de trabalho do CEPI/EPAMIG onde foram desenvolvidos os trabalhos desta pesquisa.

## REFERÊNCIAS

ARAUJO, Sirlene Nunes, MANTRANGOLO, Walter José Rodrigues, MIRANDA, Gabriel Avela, NETTO, Alecia Martins, SILVA, Igor Henrique Sena. Análises das Sementes de *Cratylia argentea*: Cultura Potencial para Adubação Verde e Forragem. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG : Embrapa Milho e Sorgo, 2011. 18 p.

CALAZANS Giovanna Moura; OLIVEIRA, Christiane Abreu; CRUZ, José Carlos; MATRANGOLO, Walter José Rodrigues; MARRIEL, Ivanildo Evódio. Selection of efficient rhizobial symbionts for *Cratylia argentea* in the cerrado 24 biome. Ciência Rural, Santa Maria, v.46, n.9, p.1594-1600, set, 2016.

MIRANDA , G.A.; MATRANGOLO,W.J.R; ARAÚJO, S.N. ; MOREIRA, J. A. A.; PEREIRA, M.P.R; DA SILVA, I.H.S. *Cratylia argentea*: Produção de Fitomassa e Crescimento em Sistemas de Aléias na Região Central de Minas Gerais. Resumos do VII Congresso Brasileiro de Agroecologia – Fortaleza/CE – 12 a 16/12/2011 Cadernos de Agroecologia – ISSN 2236-7934 – Vol6, No. 2, Dez 2011

PETERS, M. & SCHULTZE-KRAFT, R. (2002). *Cratylia argentea* (desv.) Kuntze. FAO Grassland Index, RomeItaly. Available online at: <http://www.fao.org/ag/agp/AGPC/doc/gbase/data/pf000517.htm>. Acesso em: 30 abr. 2015.

## **Resíduos agroindustriais como substratos para produção de *Metarhizium anisopliae***

Eloane Daize Gomes Dallastra<sup>1</sup>; Lina María Grajales Agudelo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Tocantins. \*e-mail: grajales@uft.edu.br

---

### **RESUMO**

A técnica de controle biológico com a utilização de fungos entomopatogênicos tem aumentado nas últimas décadas. A crescente procura e os custos de produção levantam a necessidade de se averiguar novos meios para produzi-los. Os resíduos agroindustriais, por possuírem qualidade nutricional e baixo custo podem se constituir em uma alternativa. O presente trabalho tem por objetivo avaliar a produção de conídios do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* ICBC 425 por Fermentação em Estado Sólido (FES), utilizando: quirela de arroz, farelo de trigo e farelo de soja. Experimentos preliminares foram realizados com o objetivo de determinar a necessidade de pré-tratamentos nos substratos e definir as concentrações das FES posteriores. Estas concentrações foram definidas em 50 e 33,3%. Fermentações utilizando arroz Tipo I foram realizadas como referência. As fermentações foram realizadas em sacos de polipropileno contendo 5g de substrato. Os experimentos preliminares mostraram que o crescimento dos conídios nos resíduos agroindustriais sem a realização de pré-tratamentos é estatisticamente igual às fermentações com pré-tratamentos. Assim, as FES posteriores foram realizadas sem pré-tratamentos e as que proporcionaram maior produção de conídios do fungo, em ordem decrescente, foram: Farelo de trigo e quirela de arroz ambos sem pré-tratamento (50%); Farelo de trigo sem pré-tratamento e arroz cozido (50%); Farelo de soja, farelo de trigo ambos sem pré-tratamento e arroz cozido (33,3%) e Farelo de soja, farelo de trigo e quirela de arroz, todos sem pré-tratamento a 33,3%; mostrando que a combinação desses substratos permite ter uma maior produção de conídios em relação ao arroz Tipo I.

**Palavras-chave:** Fungo entomopatogênico, Resíduos da agroindústria, Controle biológico. Fermentação em Estado Sólido.

---

### **Agroindustrial waste as substrates for *Metarhizium anisopliae* production**

### **ABSTRACT**

The technique of biological control with the use of entomopathogenic fungi has increased in the last decades. Rising demand and production costs raise a need to find new ways to produce them. Agro-industrial waste, because of its nutritional quality and low cost, can be in a viable form. The present work aims to evaluate the production of entomopathogenic fungi. *Metarhizium anisopliae* ICBC 425 by Solid State Fermentation (FES), using: broken rice, wheat bran and soybean meal. Preliminary experiments were carried out to determine the need for pre-treatments on the substrates and to define as concentrations of subsequent FES. These concentrations were defined as 50 and 33.3%. Fermentations using rice were carried out as

reference. Fermentations were carried out in polypropylene bags containing 5g of substrate. Preliminary experiments showed that the conidia growth in agroindustrial wastes with and without a pretreatment were statistically equal. For this reason, subsequent FES were performed without pre-treatments. The higher production of fungus conidia, in descending order, were: Wheat bran and rice seed (50%); Wheat bran without pre-treatment and cooked rice (50%); Soybean meal, wheat bran, both without pre-treatment and cooked rice (33.3%) Soybean meal, wheat bran and rice, 33.3%; It shows that a combination of the substrates allows a greater production of conidia in relation to the conventional method that uses the Type I rice.

**Keywords:** Entomopathogenic fungi, Agroindustrial waste, Biological control, Solid state fermentation.

---

## INTRODUÇÃO

A aplicação da técnica de controle biológico tem se intensificado nas últimas décadas (Lacey et al., 2001) e isso se justifica em decorrência das diversas vantagens que os agentes entomopatogênicos apresentam em relação aos agrotóxicos, como baixo custo, preservação da biodiversidade nos ecossistemas e da segurança do homem (Alves, 1998; Grajales, 2010).

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* é mundialmente conhecido e utilizado como agente biocontrolador de inúmeras pragas agrícolas, sendo produzido por fermentação em estado sólido (FES) utilizando grãos de arroz como substrato (Faria and Magalhães, 2001). A crescente procura pelo controle microbiano, aliada às despesas da produção, levantam a necessidade de averiguar a eficiência de outros meios de cultura para produzi-lo e os resíduos agroindustriais tornam-se uma forma viável por possuírem propriedades nutricionais importantes, grande disponibilidade e baixo custo, em conjunto com a regionalização da produção (Sene, et al., 2010).

O presente trabalho propõe analisar a produção de conídios do fungo *M. anisopliae* utilizando como substratos quirela de arroz, farelo de soja e farelo de trigo, puros e em mistura, com e sem pré-tratamento, tendo como referência fermentações conduzidas com arroz tipo I.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados esporos do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (ICBC 425). Arroz Tipo I, quirela de arroz, farelo de soja e farelo de trigo foram utilizados como substrato.

Pré-inóculo: foi feito em frascos erlenmeyers contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) esterilizados em autoclave (120 °C durante 20 min) e incubados em câmara climatizada BOD (07 dias à 28 ± 1 °C). Após, foi preparada uma suspensão de

conídios utilizando uma Câmara de Neubauer ( $6,9 \times 10^7$  conídios/mL) e uma solução nutritiva (Schamne, 2010).

Pré-tratamento: O arroz e a quirela de arroz foram cozidos por imersão ( $80^0\text{C}$  durante 4 min) e deixados à temperatura ambiente até atingir umidade de 40% (Grajales, 2010). O farelo de soja e o farelo de trigo foram lavados com água corrente, peneirados em tecido do tipo “tecido-não-tecido” (TNT) e secados em estufa ( $80^0\text{C}$  durante 24 h). Ao testar os substratos sem pré-tratamento, foi adicionado água até umidade de 40%.

Experimentos preliminares: os substratos puros (5g) foram colocados em sacos de polipropileno (PP) (15x20cm) e esterilizados. Foi inoculado 1 mL da suspensão de conídios e a fermentação ocorreu em câmara climatizada BOD, após a fermentação fez-se a contagem dos conídios através de uma Câmara de Neubauer.

A partir dos resultados dos experimentos preliminares foram definidas misturas dos substratos a 50 e 33,3% para as FES posteriores. Os substratos foram preparados, esterilizados, inoculados, incubados e foi realizada a contagem da produção de conídios de acordo com a metodologia descrita anteriormente.

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado. Os conídios produzidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Scott-Knott, ambas no nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimentos preliminares: O farelo de trigo com e sem a realização de pré-tratamento proporcionou a maior produção de conídios de *M. anisopliae* (Tabela 1) e a proporção equilibrada de nutrientes deste farelo pode justificar este fato (Penariol, 2006). Ambos os casos não diferiram estatisticamente, assim, a utilização do farelo de trigo sem pré-tratamento poderia se constituir em um meio viável economicamente, pois em produções em larga escala acarretaria uma diminuição de gastos energéticos, de mão de obra e tempo.

Os resultados obtidos para o arroz e para quirela apresentados na Tabela 1 mostram que a quirela de arroz com pré-tratamento proporcionou a menor produção de conídios. Após cozimento e esterilização deste substrato foi possível constatar uma formação de aglomerados maior em relação aos demais, o que segundo Alves and Lopes (2008), dificulta o crescimento do fungo devido a diminuição da superfície de contato. Além disso, assim como Sene et al., (2010), foi observado uma maior dificuldade do desprendimento dos conídios da matriz sólida no momento da contagem, justificando também a menor produção do microrganismo.

O farelo de soja com e sem a realização de pré-tratamento foram os substratos que apresentaram menor produção de conídios de *M. anisopliae*. Segundo Leite et al.,(2003), a produção de fungos em meios ricos em nitrogênio e deficientes em carbono tendem a produzir menor quantidade de conídios, o que é o caso do farelo de soja (Penariol, 2006).

Tabela 1 - Quantidades médias de conídios de *M. anisopliae* obtidas a partir dos substratos puros após incubação por 07 dias em BOD ( $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ).

Substrato	Concentração ( $\times 10^7$ conídios/g)
FTPT	165,6 a
FT	160,3 a
Q	101,6 b
AC	84,3 c
A	57,1 c
QPT	35,0 d
FSPT	12,9 d
FS	10,7 d

FTPT: farelo de trigo com pré-tratamento; FT: farelo de trigo sem pré-tratamento; Q: quirela sem pré-tratamento; AC: arroz cozido; A: arroz sem pré-tratamento; QC: quirela cozida; FSPT: farelo de soja com pré-tratamento; FS: farelo de soja.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si no nível de 5% de probabilidade pelo Teste Scott-Knott.

A partir dos resultados dos experimentos preliminares, optou-se por realizar as FES posteriores utilizando os substratos sem a realização de pré-tratamento devido às questões econômicas já mencionadas.

Com relação às misturas a 50%, os substratos que proporcionaram maior produção de conídios de *M. anisopliae* foram o farelo de trigo com quirela de arroz ( $152,5 \times 10^7$  conídios/g) e o farelo de trigo com arroz cozido ( $114,5 \times 10^7$  conídios/g), resultados estatisticamente superiores à produção de conídios utilizando somente arroz cozido ( $61,3 \times 10^7$  conídios/g). A produção mais elevada de conídios se deve ao fato de que o farelo de trigo pode ter dado suporte nutricional à quirela e ao arroz e permitiu a diminuição da formação de aglomerados do meio, aumentando a superfície de crescimento durante o cultivo (Lonsane et al., 1985).

A produção do fungo *M. anisopliae* em meio de farelo de trigo e quirela de arroz sem realização de pré-tratamento constituiria uma alternativa economicamente viável, pois ambos se tratam de resíduos agroindustriais de baixo custo e, no preparo destes, não foi realizada a etapa de lavagem no farelo e cozimento na quirela, diminuindo significativamente os custos da produção do fungo *M. anisopliae*.

Os substratos que continham farelo de soja e quirela ( $65 \times 10^7$  conídios/g) ou arroz cozido ( $60,7 \times 10^7$  conídios/g) proporcionaram uma menor produção de conídios quando comparados com as duas primeiras misturas. Penariol (2006) sugere que o farelo de soja tem carência de algum fator nutricional importante que pode ocasionar deficiência morfológica ou fisiológica e a consequente baixa produção de conídios.

Os resultados da produção de conídios utilizando as misturas a 33,3%, ou seja, farelo de soja com farelo de trigo sem pré-tratamentos e arroz cozido ( $91,6 \times 10^7$  conídios/g) e farelo de soja com farelo de trigo e quirela sem pré-tratamentos ( $90,2 \times 10^7$  conídios/g) foram estatisticamente superiores à produção de conídios utilizando arroz cozido ( $75,9 \times 10^7$  conídios/g), confirmando assim, os resultados de Ayala (1996) e Santa et al., (2005) que afirmam que a produção de esporos é favorecida quando se utiliza uma mistura de substratos.

Além do aumento da produção de conídios de *M. anisopliae* utilizando essa combinação de substratos, o custo de 1 kg da mistura contendo farelo de soja, farelo de trigo e quirela de arroz a 33,3%, pode ser reduzido em aproximadamente 48% se comparado com a utilização de 1 kg do meio padrão de arroz (Clicmercado, 2016). Portanto a utilização destes resíduos agroindustriais em mistura é uma alternativa viável para a produção de *M. anisopliae*, tanto do ponto de vista econômico, quanto do crescimento satisfatório dos conídios do microrganismo, dessa forma, os resultados obtidos neste estudo podem servir como base para a produção deste fungo em uma escala maior.

## CONCLUSÕES

A partir dos experimentos preliminares concluiu-se que a utilização da quirela de arroz, farelo de soja e farelo de trigo sem a realização de pré-tratamentos proporcionou um crescimento de conídios igual estatisticamente aos experimentos realizados com pré-tratamentos.

As fermentações em estado sólido realizadas com a mistura de resíduos agroindustriais proporcionaram uma maior produção de conídios do fungo *M. anisopliae* quando comparadas ao arroz tipo I.

## AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao CNPq pelo suporte econômico do projeto através do processo 448890/2014-3 e ao programa “Novos Pesquisadores UFT 2016” pela bolsa ao servidor docente.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, S.B. and LOPES, R.B., 2008 *Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios*. Piracicaba: FEALQ. 414 p.
- ALVES, S.B., 1998. *Controle microbiano de insetos*. 2. ed. Piracicaba: FEALQ. 1163 p.
- AYALA, L., 1996. *Aproveitamento biotecnológico de batata refugos (Solanum tuberosum) para produção de conídios do fungo entomopatogênico Beauveria bassiana (Bals.) vuill por fermentação no estado sólido*. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. Tese de Doutorado.
- CLICMERCADO, 2016 [viewed 25 january 2016]. *Cotações Encontradas* [online]. Porto Alegre. Available from: <http://www.clicmercado.com.br/novo/cotacoes/buscacot.asp>
- FARIA, M. R de and MAGALHÃES, B. P., 2001. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. *Biotec. Ciência & Desenv.*, v. 1, no. 22, p.18-21.
- GRAJALES, L. M., 2010. *Avaliação de um biorreator rotativo para fermentação em estado sólido*. São José do Rio Preto: Universidade Estadual Paulista. 98f. Dissertação de mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos.
- LACEY, L.A., FRUTOS, R., KAYA, K. H., and VAIL, P., 2001. Insects pathogens as Biological control agents: Do they have a future? *Biol. Control* v. 21, p. 230-248.
- LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M. and ALVES, S.B., 2003. *Produção de fungos entomopatogênicos*. Ribeirão Preto: Livroceres. 92p.
- LONSANE, B.K.; GHILDYAL, N.P.; BUDIATMAN, and RAMAKRISHNA, S.V., 1985. Engineering aspects of solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, v.7, n.6, p.258-265.
- PENARIOL, M.C., 2006. *Requisitos nutricionais e produção massal de Bipolaris euphorbiae*. 2006. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista. 49f. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agropecuária.
- SANTA, H. S. D.; SANTA, O. R. D.; BRAND, D.; VANDENBERGH, L. P. de S. and SOCCOL, C. R., 2005. Spore production of *Beauveria bassiana* from agro-industrial residues. *Braz. arch. biol. technol.* V. 48, n. spe, p. 51-60.
- SCHAMNE, P. A., 2010. *Efeito de aditivos e fishfertilquitosana® em meios sólidos na produção de conídios de metarhizium anisopliae (metsch.) sorokin e beauveria bassiana (bals.) vuillemin*. Guarapuava: Universidade Estadual do Centro Oeste. 48 f. Dissertação de Mestrado em Produção Vegetal.
- SENE, L.; ALVES, L.F. A. and LOBRIGATE, M. F. P., 2010. Produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* em meio sólido à base de resíduos agroindustriais. *Arq. Inst. Bio.*, v. 77, n. 3, p.449-456.

## O potencial da vinhaça no crescimento de fungos do solo

Emerson Delfino Reginaldo<sup>1</sup>; Margareth Batistote<sup>1</sup>; Thais Domingues da Silva<sup>1\*</sup>; Maria do Socorro Mascarenhas Santos<sup>1</sup>, Edilene Virgulina Cardoso<sup>1</sup>, Geisa Alves da Silva<sup>1</sup>, Elvio Mora Junior<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul. \*thata.dmgs@gmail.com

---

### RESUMO

A vinhaça principal efluente líquido das indústrias sucroenergéticas possui carga poluidora, apresentando alta concentração de matéria orgânica está sendo utilizada para a fertirrigação dos canaviais diminuindo custos com fertilizantes. Este estudo teve como objetivo o isolamento e a caracterização morfológica e a quantificação de fungos filamentosos do solo na presença e na ausência da vinhaça. O solo foi coletado na área experimental no município de Glória de Dourados/MS, transportado e armazenado a temperatura de 4°C. Dez gramas de solo foram peneirados, triturados e diluído em 90 mL<sup>-1</sup> de solução salina NaCl (0.85%) e homogeneizado. Foram realizadas diluições seriadas e alíquotas de 1,0 mL<sup>-1</sup> foram plaqueadas nos respectivos meios de cultura e incubados por 72 horas na temperatura de 30°C horas. Após o crescimento foi realizada a caracterização morfológica dos microrganismos de forma macroscópica bem como a quantificação através da Unidade Formadora de Colônias (UFC). O resultado mais expressivo na caracterização morfológica foi apresentado no aspecto cor, sendo observado para o solo com vinhaça uma diversidade maiores de cores do que no sem vinhaça. Na quantificação dos fungos na presença da vinhaça que ocorreu o maior crescimento de fungos, sendo no ponto 3 mais expressivo. A presença de vinhaça mostrou um maior crescimento dos fungos, o que demonstra que este resíduo agroindustrial poderá ser uma importante fonte potencializadora para o desenvolvimento de fungos presentes no solo.

**Palavras-chave:** Matéria orgânica, resíduo, fungos.

---

### The potential of vinasse in soil fungus growth

### ABSTRACT

The main vinasse liquid effluent from the sugarcane industries has a pollutant load, presenting high concentration of organic matter is being used for the fertirrigation of sugarcane plantations, reducing costs with fertilizers. This study aimed at the isolation and morphological characterization and quantification of filamentous fungi from the soil in the presence and absence of vinasse. The soil was collected in the experimental area in the municipality of Glória de Dourados/MS, transported and stored at 4°C. Ten grams of soil were sieved, ground and diluted in 90 mL<sup>-1</sup> of NaCl (0.85%) and homogenized. Serial dilutions were performed and 1.0 mL<sup>-1</sup> aliquots were plated in the respective culture media and incubated for 72 hours at 30°C hours. After growth, the morphological characterization of the microorganisms was performed in a macroscopic way as well as the quantification through the Colony Forming Unit (CFU). The most expressive result in the morphological characterization was presented in the color aspect, being observed for the soil with vinasse a greater diversity of colors than in the without vinasse. In the quantification of the fungi in the presence of the vinasse that

occurred the greatest growth of fungi, being in point 3 more expressive. The presence of vinasse showed a higher growth of the fungi, which shows that this agroindustrial residue could be an important potential source for the development of fungi present in the soil.

**Keywords:** Organic matter, residue, fungis.

---

## INTRODUÇÃO

O solo é um dos ambientes no qual se encontra uma enorme diversidade de microrganismos. Alguns fatores influenciam na quantidade e na variedade desses organismos e, nas suas atividades no solo, tais como pH, temperatura e clima e possuem versatilidade para adaptações a mudanças ambientais havendo uma ligação muito grande entre microrganismos, estrutura e matéria orgânica desse ambiente (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Os microrganismos apresentam um papel fundamental atuando na decomposição da matéria orgânica, como no ciclo de nutrientes, tais como nitrogênio, fósforo entre outros. As práticas de manejo aliadas as condições físico-químicas são de suma importância para uma boa nutrição do solo e uma eficaz atuação dos microrganismos (DUARTE et al, 2009). Desta forma, a utilização da vinhaça na fertirrigação, desde que seja feita de forma adequada, respeitando os critérios de armazenamentos, transporte e o correto manejo da aplicação nos solos agrícolas, corresponde a uma medida técnica e economicamente viável que traz benefícios ao solo e a obtenção de maior produtividade em algumas culturas (DAMY et al., 2008).

Com o aumento exponencial da população, a procura por alimentos está cada vez maior, motivo este que impulsiona a busca por uma otimização tanto da indústria como da agricultura. Neste sentido, a possibilidade da utilização da vinhaça, subproduto rico em matéria orgânica, vem sendo amplamente estudada como fonte potencializadora podendo ser empregada na agricultura de pequeno porte, propiciando o desenvolvimento microbiano do solo e consequentemente a disponibilidade de matéria orgânica em constante decomposição no solo promovendo sua nutrição. O estudo visa o isolamento, caracterização morfológica e a quantificação dos fungos filamentosos presentes no solo na ausência e na presença da vinhaça.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

A pesquisa foi desenvolvida durante o período de 2015, na área Experimental da UEMS, no município de Glória de Dourados/MS. O solo foi coletado, transportado e armazenado em temperatura de 4°C. Para o isolamento 10,0 gramas de solo foram peneiradas, trituradas e diluído em 90 mL<sup>-1</sup> de solução salina NaCl (0.85%), e homogeneizada. Foi realizada a diluição seriada e 1,0 mL<sup>-1</sup> das amostras e plaqueadas em placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar batata, e incubados por 72 horas para o cultivo de fungos. Após o período de incubação foi realizada a caracterização morfológica das colônias macroscopicamente e a quantificação foi realizada por meio de contagem, também, macroscópicas Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Na avaliação dos aspectos morfológicos das colônias de fungos filamentosos isolados do solo com vinhaça, em relação ao aspecto cor ocorreram variações tendo como predominância as cores branco e bege. Em relação ao aspecto diâmetro ocorreu variação de 2mm a 5,2mm. Quanto à morfologia: elevação convexa, forma irregular e aspecto membranoso foi de 100% das colônias de fungos. Já na análise dos aspectos morfológicos das colônias de fungos filamentosos isolados do solo sem a aplicação da vinhaça, em relação ao aspecto cor, a que predominou foi a branca, entretanto foram observadas colônias com outras cores. Em relação ao aspecto diâmetro ocorreu variação de 3mm a 7mm, na morfologia, borda filamentosa, elevação convexa, forma irregular e aspecto membranoso apresentaram um percentual de 100% das colônias analisadas (Tabela 1).

Estudos realizados por Guimarães (2009), em relação a caracterização das morfo-espécies dos fungos obtidos dos sistemas de tratamento de rejeitos da indústria petroquímica, observaram cores distintas como amarelo, branco, bege, verde, cinza e rosa.

**TABELA 1.** Caracterização morfológica dos fungos isolados do solo e cultivados em meio Ágar Batata na presença e ausência da vinhaça.

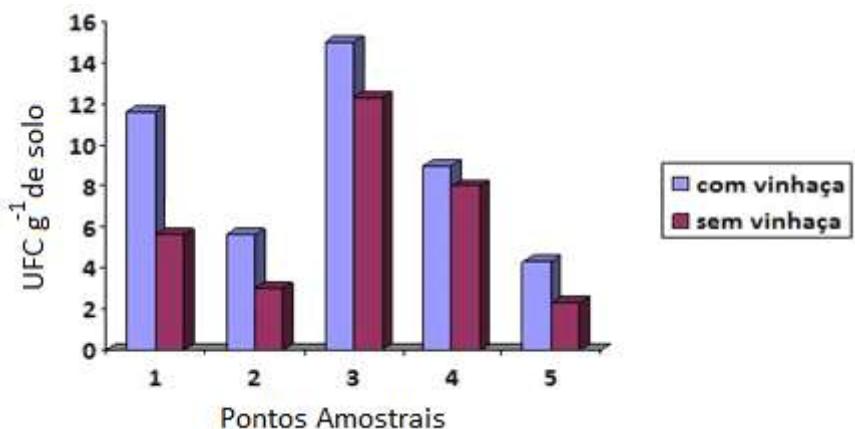
Amostras	Cor	Borda	Elevação	Forma	Aspecto	Diâmetro
C/V	Branco/Marrom/Bege/Amarelo/ Verde/ Laranja/ Preto /Cinza	Filamentosa /Lisa	Convexa	Irregular	Membranoso/ Viscoso	0,2 a 4,1mm*
S/V	Branco/Marrom/ Amarela/Bege /Rosa /Verde	Filamentosa/ Rugosa	Convexa	Irregular	Membranoso	0,3 a 5,2 mm*

\*Valores apresentados foram obtidos a partir de média simples.

A quantificação dos fungos filamentosos isolados do solo na presença e ausência da vinhaça, pode-se observar que em todos os pontos analisados com aplicação da vinhaça ocorreu maior crescimento das colônias de fungos em relação aos pontos amostrais sem vinhaça, podemos observar que o ponto 3ocorreuumma maior quantidade de Unidades Formadoras de Colônias (UFC g<sup>-1</sup> de solo) fungos na presença e na ausência de vinhaça (Figura 1). A vinhaça por possuir uma elevada carga de matéria orgânica talvez tenha proporcionada uma carga de nutrientes necessários para maior desenvolvimento da microbiota de fungos do solo.

Estudos realizado por Santos et al. (2009) avaliaram os efeitos da irrigação com vinhaça sobre a população de micro-organismos do solo, e concluíram que com a adição de vinhaça, após 60 dias de incubação, ocorreu o crescimento da população de fungos filamentosos do solo

A vinhaça, quando aplicada, promove acidificação imediata do solo, favorecendo o desenvolvimento de fungos que são os microrganismos responsáveis pelo início do processo de decomposição (OLIVEIRA et al., 2011), uma vez que a matéria orgânica contida na vinhaça é incorporada ao solo e colonizada por fungos, os quais a transformam em húmus, neutralizando a acidez do meio, favorecendo a proliferação de outros microrganismos (GIACHINI; FERRAZ, 2009). Desta forma sua utilização como fonte de adubação pode se tornar viável, pois estes microrganismos são importantes na atuação das reações químicas do solo.



**Figura 1** – Quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC g<sup>-1</sup> de solo) de fungos.

## CONCLUSÕES

Os fungos apresentaram uma diversidade quanto ao aspecto cor, no entanto na presença da vinhaça a diversidade foi maior.

A quantificação mostrou que houve um crescimento maior de fungos filamentosos no solo com presença de vinhaça, o que demonstra que este resíduo agroindustrial poderá ser uma importante fonte potencializadora para o desenvolvimento da microbiota do solo.

## REFERÊNCIAS

DAMY, C. R. S.; LUZ, P. H. C.; VIZZOTTO, B. A. Manejo do uso da vinhaça no solo agrícola de acordo com a forma técnica. p 4.231. *Nucleus*, Edição Especial, 2008.

DUARTE, M. W.; DAMASCENO, R. G.; SALAMONI, S. P.; OLIVEIRA, M. F. de; SAND, S. T. V.D. *Atividade antimicrobiana e produção de enzimas extracelulares por actinomicetos isolados de solo*. Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas de Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre- RG, 2009.

GIACHINI , C, F.; FERRAZ , M. V. Benefícios da utilização de vinhaça em terras de plantio de cana-de-açúcar - revisão de literatura . *Revista Científica Eletrônica de Agronomia*, Ano VII, www.revista.inf.br Nº 15, 2009.

GUIMARÃES, M. S de O. *Coleta, isolamento e identificação de fungos presentes em sistemas de tratamento de efluentes de indústria petroquímica para utilização em processos degradação de hidrocarboneto aromático.* Dissertação (Mestrado), MG, 2009.

MOREIRA, F.; SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e Bioquímica do solo.* Editora UFLA, p. 623, 2002.

OLIVEIRA, E. M. L.; FENANDES, P. D.; OLIVEIRA, D. C de. S.; FREIRE, E de. A. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas* v. 5, N. 3, p.16, 2011.

SANTOS, T. M. C dos.; SANTOS, M. A. L dos.; SANTOS, C. G dos.; SANTOS, V. R dos.; PACHECO, D. S. Efeito da fertirrigação com vinhaça nos microrganismos do solo. *Revista Caatinga*, Mossoró, RN. v.22. p.155-160, 2009.

## **Atividade celulolítica de fungos filamentosos isolados do intestino de insetos aquáticos**

Enide Luciana L. Belmont<sup>1\*</sup>; Lorena Nacif-Marçal<sup>1</sup>; Neusa Hamada<sup>2</sup>; Carlos Gustavo Nunes-Silva<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas - UFAM. \*e-mail: lucianabelmont22@gmail.com

<sup>2</sup> Coordenação de Biodiversidade, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

<sup>3</sup> Instituto de Ciências Biológicas – ICB, Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

---

### **RESUMO**

Fungos filamentosos tem despertado o interesse para bioprospecção por serem bons produtores de enzimas extracelulares e com grande potencial de utilização na bioindústria por apresentarem crescimento rápido e facilidade nas condições de cultivo. Setenta fungos filamentosos isolados do intestino de larvas de *Phylloicus* (Insecta: Trichoptera: Calamoceratidae) foram analisados para avaliar seu potencial quanto a produção de celulases em resposta à presença de celulose como única fonte de carbono. Foram realizados inóculos no centro das placas e armazenadas por 4 dias a 28 °C e submetidos a choque térmico em estufa a 50 °C por 16 horas. As placas foram coradas com solução de vermelho congo e lavadas com solução de NaCl para melhor visualização do halo de hidrólise. Como resultado positivo para celulase 80% dos fungos formaram halo de degradação e 8,5% foram considerados com potencial para aplicação em biotecnologia.

**Palavras-chave:** Celulase; Hidrólise; Reserva Florestal Ducke; Trichoptera.

---

### **Cellulolytic activity of filamentous fungi isolated from the intestine of aquatic insects**

### **ABSTRACT**

Filamentous fungi have been of interest for bioprospecting due to being good extracellular enzyme producers and great potential for use in bioindustry, demonstrate rapid growth, ease in culture conditions. Seventy filamentous fungi isolated from gut of *Phylloicus* (Insecta: Trichoptera: Calamoceratidae) were analysed concerning their potential to production cellulolytic enzymes in response to cellulose presence as only carbon source. Inocula were performed in the center of plates, stored for 4 days at 28 °C and subjected afterwards to thermal shock at 50 °C for 16 hours. Plates were stained with Congo red solution and washed with a NaCl solution for better detection of the hydrolysis halo. As a positive result for cellulase 80% of fungi formed a halo of degradation and 8.5% were considered with potential for application in biotechnology.

**Keywords:** Cellulase; Hydrolysis; Ducke Forest Reserve; Trichoptera.

---

## INTRODUÇÃO

A transformação de celulose em glicose como fonte de energia é altamente eficiente quando realizada por insetos (cupins, besouros e insetos aquáticos), pois sua principal fonte de alimentação é matéria vegetal (Sun e Zhou, 2009). Insetos aquáticos fragmentadores, geralmente, se alimentam de tecido de plantas aquáticas vivas, madeira e folhas em decomposição que se acumulam ao longo do curso d'água (Cummins et al., 1989; Merritt e Cummins, 1996). Os fragmentadores exercem relevante papel em ecossistemas aquáticos uma vez que convertem matéria orgânica grossa em partículas menores, tornando-a disponível para outros grupos tróficos, tais como os invertebrados coletores (Cummins et al., 1989). De acordo com Sinsabaugh (1985), as enzimas utilizadas nos processos digestivos de insetos aquáticos, como Trichoptera e Plecoptera são originárias de fungos associados. O trato intestinal dos insetos abriga uma ampla variedade de microrganismos, uma vez no intestino, estes podem crescer e serem lisados por enzimas ou excretados (Walker et al., 1999).

Os fungos filamentosos tem despertado o interesse para bioprospecção por apresentarem crescimento rápido, facilidade nas condições de cultivo, por serem bons produtores de enzimas extracelulares com grande potencial de utilização na indústria (Simões & Tauk-Tornisielo, 2005). Estudos sobre a associação entre fungos e insetos aquáticos tem contribuído sobre a biodiversidade fúngica e os mecanismos das interações mutualísticas que ocorrem entre esse grupo e os insetos. Na Amazônia estes estudos são ainda escassos frente a grande diversidade dos insetos neste bioma (*e.g.* Rios-Velasquez et al., 2002, Alencar et al., 2003) devido ao pouco esforço amostral. No entanto, estes estudos contribuem com o conhecimento sobre a biodiversidade fúngica, fornecendo subsídios para compreensão de mecanismos de interações mutualísticas.

Assim, o objetivo deste estudo foi isolar e selecionar fungos filamentosos de associados ao trato digestivo de insetos aquáticos visando à obtenção de linhagens promissoras para produção de enzimas celulolíticas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Coleta dos insetos**

A coleta foi realizada em igarapés da Reserva Florestal Ducke (RFD), localizada na Rodovia Estadual AM-010, km-26, Manaus, AM (02°56'21" N, 59°57'43" O).

Foram coletados 30 larvas do gênero *Phylloicus*, estas foram mergulhadas com auxílio de pinça em microtubo com 1 mL de álcool 70% por 30 segundos para desinfecção das superfícies externas. Em seguida, foram retirados e transferidos para microtubo contendo 1 mL de água destilada estéril, onde foram armazenados e transportados em isopor com gelo até a realização dos procedimentos laboratoriais.

### **Obtenções dos isolados fúngicos**

As larvas de *Phylloicus* foram dissecadas em laboratório com auxílio de pinças estéreis sendo os aparelhos digestórios retirados e transferidos para microtubos contendo 1 mL de água destilada estéril foram homogeneizadas. Uma alíquota 100 microlitros de cada amostra foram espalhados por meio da técnica de spread-plate em placas de Petri, em triplicata, contendo meio BDA (Batata Dextrose Ágar) e 0,1mg/L de antibiótico cloranfenicol. Um total de 90 placas de Petri foram incubadas em estufa a 27 °C por 7 dias. Transcorrido o tempo de incubação das placas, realizou-se a contagem dos fungos crescidos e o isolamento dos mesmos por meio do subcultivo de cada um dos isolados em placas novas de BDA.

### **Produção de celulases**

A produção de enzimas celulases da classe endoglucanases foi avaliada a partir do crescimento dos isolados fúngicos em meio sintético com carboximetilcelulose (CMC) (NaNO<sub>3</sub>: 3,0 g.L<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1,0 g.L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>: 0,5 g.L<sup>-1</sup>; KCl: 0,5 g.L<sup>-1</sup>; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 10,0 mg.L<sup>-1</sup>; CMC: 10,0 g.L<sup>-1</sup>; ágar: 20,0 g.L<sup>-1</sup>) como única fonte de carbono (Ruegger e Tauk-Tornisielo, 2004). As placas foram incubadas por 4 dias a 28 °C e em seguida submetidas a choque térmico de 50 °C em estufa por 16 horas. A atividade enzimática foi verificada pela formação de halos de degradação do polímero, os quais foram revelados a partir da incubação das placas em 10 mL de solução corante de vermelho congo (2,5 g.L<sup>-1</sup>) em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8,0. Após 30 min a solução foi descartada e as culturas foram lavadas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M neste mesmo tampão (Nogueira e Cavalcanti 1996). Os ensaios foram realizados em triplicatas.

Os diâmetros das colônias e dos halos produzidos foram medidos com auxílio de um paquímetro (mm). A atividade enzimática foi expressa em índice enzimático (IE) mediante a relação do diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia (IE= dh/dc) (Nogueira e Cavalcante, 1996). As linhagens que apresentaram halo de hidrólise foram consideradas como positivas para a presença de enzimas celulases e as que alcançaram IE acima de 2,0 como potenciais linhagens para a aplicação

biotecnológica.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as 90 placas obtidas das amostras dos intestinos foram analisadas quanto ao crescimento fúngico e contabilizadas quanto ao número total de UFCs (Unidade Formadora de Colônia). Um total de  $2,95 \times 10^3$  UFC/individuo foram estimados e 120 colônias foram isoladas. Para observação das estruturas reprodutivas realizou-se microcultivo dos fungos isolados (Figura 1).

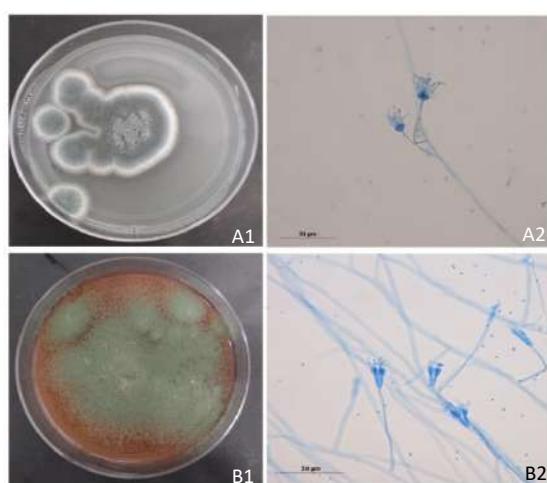


Figura 1. Colônias isoladas de intestino de *Phylloicus*. A1 e B1- Colônias puras; A2 e B2 – Estruturas reprodutivas.

A tabela 1 apresenta os resultados obtidos após o cultivo dos fungos em meio sintético contendo carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono. Dos 120 isolados, 70 foram avaliados nesse estudo, sendo o restante ainda em processo de análise. O halo indicador da degradação da CMC, foi observada em 56 colônias, ou seja, 80% dos fungos estudados. Dentre estas 8,5% foram consideradas com potencial biotecnológico por apresentarem um IE igual ou maior que 2,0.

Tabela 1. Atividade celulolítica dos fungos isolados de larvas de *Phylloicus*. (Negativo = não houve formação de halo; Positivo = presença de halo de hidrólise).

Teste	Celulase	Índice enzimático (máx - mín)
Negativo	8	-
Positivo	56	1,8 - 1,0
Positivo com potencial biotecnológico	6	2,9 - 2,0
<b>Total</b>	<b>70</b>	-

Milano (2003) estudando larvas de Coleoptera (Insecta), observou que apenas um dos isolados do intestino destas larvas apresentou atividade celulolítica com IE de 1,6. Estudos em busca por fungos produtores de celulases isolados de material em decomposição em riachos demonstraram ter grande potencial, onde de 100 linhagens testadas 69% apresentaram atividade celulolítica e 19% tiveram IE maior que 2,0 (Silva et al., 2013). Diferentemente do presente estudo, onde 88,5% dos fungos analisados formaram halo indicador de degradação de celulose com um IE máximo de 2,9. Esses dados mostram que insetos podem ser mais uma fonte de busca para possíveis novas celulases.

## CONCLUSÕES

Os resultados preliminares obtidos nesse estudo demonstraram que há grande potencial na produção de enzimas degradadoras de celulose por fungos associados ao intestino de insetos aquáticos fragmentadores. No entanto, poucos estudos são realizados buscando prospectar enzimas dessas fontes, sendo na literatura encontrado uma maior procura em material vegetal.

A bioindústria tem grande interesse na procura por enzimas para biocatálise, uma vez que reações mediadas por enzimas são alternativas eficazes a métodos químicos, os quais geralmente são poluentes.

Dessa forma, pode-se destacar a importância da realização de mais estudos para um maior conhecimento sobre a biodiversidade, funções exercidas por estes microrganismos, bem como a busca por novas fontes de celulases.

## AGRADECIMENTO

A Rede Bionorte-CNPq nº407843/2013-2 pelo financiamento do projeto de pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- ALENCAR, Y.B., RIOS-VELÁSQUEZ, C.M., LICHTWARDT, R.W.; HAMADA, N., 2003. Trichomycetes (Zygomycota) in the digestive tract of arthropods in Amazonas, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 98, pp. 799–810.
- CUMMINS, K.W.; WILZBACH, M. A.; CATES, D.M.; PERRY, J. B.; TALIAFERRO, W.B. 1989. Shredders and riparian vegetation. Leaf litter that falls into

- streams influences communities of stream invertebrates. *BioScience*, vol. 39, pp. 24–30.
- MERRITT, R.W.; CUMMINS, K.W., 1996. *An introduction to the Aquatic Insects of North America*. 3rd Edition. Kendall/Hunt Publishing Company. xiii +. 862 p.
- NOGUEIRA, E.B.S. e CAVALCANTI, M.A.Q., 1996. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. *Revista de Microbiologia*, vol. 27, pp. 7–9.
- RIOS-VELÁSQUEZ, C.M.; HAMADA, N., 2002. Trichomycete fungi (Zygomycota) associated with the digestive tract of *Simulium goeldii* Cerqueira & Nunes de Mello and *Simulium ulyssesi* (Py-Daniel & Coscarón) (Diptera: Simuliidae) larvae, in Central Amazônia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 97, no. 3, pp. 423–426.
- SILVA, J.B.A.; FRANTZ, S.C.; MARQUES, A.K.; COELHO, C.M.; MORAIS, P.B., 2015. Produção de enzimas extracelulares por fungos associados à decomposição de materiais vegetais em riachos. *Journal of bioenergy and food science*, vol. 2, pp. 208–212.
- SIMÕES, M.L.G. e TAUK-TORNISIELO, S.M., 2005. Comparação da técnica tradicional e do método turbidimétrico automatizado no cultivo em diferentes fontes de carbono de fungos filamentosos isolados de solo de área de Caatinga. *Holos Environment*, vol. 5, no. 2, pp. 94–103.
- SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A.E.; BENFIELD, E.F., 1985. Cellulose digestion and assimilation by three leaf-shredding aquatic insects. *Ecology*, vol. 66, pp. 1464–1471.
- SUN, J. Z.; ZHOU, X. G., 2009. Utilization of lignocelluloses feeding insects for viable biofuels: an emerging and promising area of entomological science. *Recent Advances in Entomological Research*, pp. 251–291.
- WALKER, A.J., GLEN, D.M., SHEWRY, P.R., 1999. Bacteria associated with the digestive system of the slug *Deroceras reticulatum* are not required for protein digestion. *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 31, pp. 1387–1394.

## **Produção de pectina esterase e poligalacturonase por *Aspergillus* sp.**

Estefânia Carneiro Teles<sup>1</sup>; Danilo Vieira Carrijo<sup>1</sup>; Alex Fernando de Almeida<sup>1\*</sup>;

<sup>1</sup>Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins. Campus Universitário de Gurupi. \*e-mail (alexfernando@mail.uft.edu.br)

---

### **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi selecionar um meio de cultivo, utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono para a produção de pectinases por *Aspergillus* sp. em condições submersas. Inicialmente, cinco meios de cultura propostos pela literatura foram suplementados com 1% (m/v) pectina cítrica. Os maiores resultados foram observados com meio Vogel para a produção de pectina esterase e poligalacturonase. A utilização de resíduos agroindustriais como fonte de carbono foi avaliada em 72 e 120 horas de cultivo, a 28 °C, 180 rpm. Os maiores valores de atividade enzimática foram observados após 120 horas, com bagaço de abacaxi como fonte de carbono, obtendo-se 1,90 U/mL e 2,50 U/mL de pectina esterase e poligalacturonase, respectivamente. A linhagem de *Aspergillus* sp., isolada de jatobá-do-cerrado, apresentou potencial para a produção de pectina esterase e poligalacturonase. As condições de cultivo, assim como a composição dos meios de cultivo devem ser otimizadas visando aumentar a produção de enzimas pectinolíticas.

**Palavras-chave:** Pectinase. Pectina cítrica. Meio Vogel.

---

## **Production of pectin esterase and polygalacturonase by *aspergillus* sp.**

### **ABSTRACT**

The aim of this work was to select a culture medium, using agroindustrial residues as carbon source for pectinases production by *Aspergillus* sp. in submerged conditions. Initially, five culture media proposed in the literature were supplemented with 1% (m/v) citrus pectin. The highest values were observed with Vogel medium for pectin esterase and polygalacturonase production. The use of agroindustrial residues as carbon source was evaluated at 72 and 120 hours of cultivation, at 28 °C, 180 rpm. The highest values of enzymatic activity were observed after 120 hours, with pineapple bagasse as carbon source, obtaining 1.90 U/mL and 2.50 U/mL of pectin esterase and polygalacturonase, respectively. The *Aspergillus* sp. strain isolated from jatobá-do-cerrado showed potential for the production of pectin esterase and polygalacturonase. The culture conditions as well as the composition of the culture media should be optimized in order to increase the production of pectinolytic enzymes.

**Keywords:** Pectinase. Citrus pectin. Medium Vogel.

## INTRODUÇÃO

A pectina é capaz de formar géis em soluções e é amplamente utilizada na indústria de alimentos. Pode ser extraída através de diversas matérias primas, como casca de frutas cítricas (Menezes et al., 2015). As enzimas pectinolíticas são produzidas em diferentes combinações pelas plantas e por microrganismos como fungos, leveduras e bactérias. As pectinases são amplamente utilizadas em indústrias alimentícias, como na clarificação de sucos de frutas, melhorando a eficiência de filtração, no tratamento preliminar da uva em indústrias vinícolas, na maceração, liquefação e extração de tecidos vegetais, na fermentação de chá, café e cacau para melhorar a extração de óleos vegetais, na extração de polpa de tomate e no tratamento e degomagem de fibras naturais para as indústrias têxteis e de papel (Duchiron and Suneetha, 2011). O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de enzimas pectinolíticas por uma linhagem de *Aspergillus* sp. isolada de frutos de jatobá-do-cerrado, bem como utilizar fontes de carbono de origem vegetal em condições submersas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Microrganismo e inóculo**

A linhagem de *Aspergillus* sp. JT 102 foi isolada a partir de frutos do jatobá-do-cerrado. A cepa é mantida em placas de Petri e tubos inclinados, contendo meio BDA 2% (batata dextrose ágar), sob refrigeração a 4 °C, no LABAP - Laboratório de Biotecnologia de Alimentos e Purificação de Produtos, Habite – Incubadora de Empresas de Biotecnologia da UFT, campus universitário de Gurupi, da Universidade Federal do Tocantins.

O inóculo foi preparado após o crescimento da linhagem em tubos de cultura contendo BDA inclinado. Os conídios foram suspensos em solução salina 0,8% (m/v) esterilizada. A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer para obter uma concentração de  $10^7$  conídios/mL. Utilizou-se 1 mL dessa suspensão para inocular os meios de cultura líquidos.

### **Seleção do meio de cultivo**

Os cultivos foram preparados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL dos meios de cultura. Foram avaliados 5 meios de cultivo: meio A (g/L): 5,5 de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 15

de KHPO<sub>4</sub>; 0,5 de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,2% Extrato de levedura; Meio B (g/L): MgSO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O 0,14; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5; com substituição de CaCO<sub>3</sub> 5,0 por CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O 7,2; 0,2% Extrato de levedura; Meio C (g/L): NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 12,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,0; CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O 0,03; ZnSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 0,03; FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 0,005; 0,2% Extrato de levedura, Meio D (g/L): NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 12,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,0; MgSO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O 0,168; CaCl<sub>2</sub> •2H<sub>2</sub>O 0,331; 0,2% Extrato de levedura; Meio E (g/L): Solução salina de Vogel, 0,2% Extrato de levedura. Os meios de cultivos foram suplementados com 1,0 % (m.v<sup>-1</sup>) de pectina cítrica e o pH ajustado a 6,0. Os meios foram esterilizados em autoclave durante 15 minutos a 121 °C, inoculados e mantidos na incubadora shaker a 28 °C, 180 rpm durante 120 horas. Os cultivos foram realizados em triplicata.

### **Seleção da fonte de carbono**

Após a etapa de seleção do meio de cultivo foram testados 12 resíduos agroindustriais como fonte de carbono: bagaço de abacaxi, farinha de batata doce, farelo de trigo, casca de mandioca, casca de soja, farinha de bacaba, sabugo de milho, palha de milho, bagaço da cana de açúcar, bagaço de laranja, casca de maracujá e casca de banana. O meio de cultivo foi preparado e distribuído em frascos Erlenmeyers de 125 mL, cada um contendo 20 mL de meio e foram suplementados com 1,0 % (m.v<sup>-1</sup>) da fonte de carbono. Foram realizados dois cultivos, nos tempos 72 e 120 horas. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C durante 15 minutos, inoculados e mantidos na incubadora shaker a 28 °C em 180 rpm. Os cultivos foram realizados em duplicata.

### **Obtenção dos extratos proteicos e biomassas**

Os caldos fermentados foram filtrados utilizando bomba a vácuo para separação dos extratos enzimáticos e biomassas. Os extratos obtidos foram armazenados a -4 °C, para posterior análise da atividade enzimática. As biomassas retidas no papel filtro foram secas até peso constante em estufa com circulação de ar a 60 °C. O valor da biomassa seca foi utilizado para verificar a concentração de biomassa produzida em cada cultivo (g.L<sup>-1</sup>).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Seleção do meio de cultura

O fungo *Aspergillus* sp. JT102 foi cultivado em diferentes meios de cultura para verificar a produção de pectina esterase (PE) e poligalacturonase (PG). A maior produção de pectina esterase (2,330 U/mL) e poligalacturonase (1,793 U/mL) foi obtida utilizando o meio E (VOGEL, 1956). O meio de Vogel é composto por ácido cítrico, ZnSO<sub>4</sub>, Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, NaMoO<sub>4</sub>, Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, biotina. O meio de Vogel tem sido utilizado por diversos autores para a produção de diversas enzimas como celulases, xilanase, lipases (KNOB et al., 2013; ALMEIDA et al., 2013).

**Tabela 1.** Produção de pectina esterase e poligalacturonase utilizando diferentes meios de cultivo submersos.

<b>Meios de cultivo</b>	<b>Biomassa</b> <b>(g/L)</b>	<b>Atividade</b> <b>PE</b> <b>(U/mL)</b>	<b>Atividade</b> <b>PG</b> <b>(U/ml)</b>
A	12,175	0,337	0,125
B	13,732	0,064	0,122
C	10,077	0,118	0,049
D	14,697	0,085	0,146
E	8,434	2,330	1,793

A escolha da composição de sais para o crescimento microbiano e produção de enzimas é um passo importante para a otimização de um processo fermentativo uma vez que cada microrganismos apresenta exigências nutricionais distintas.

### Seleção da fonte de carbono

As fontes de carbono que induziram a maior produção de enzimas PE e PG, respectivamente, foram: bagaço de abacaxi (1,90 U/mL e 2,49 U/mL) e palha de milho (1,36 U/mL e 1,53 U/mL) após 120 horas de cultivo. A produção de biomassa nos cultivos pode estar relacionada com a produção de outras enzimas no meio de cultura como celulases, xilanase que favorecem a liberação de monômeros de açúcar para o crescimento microbiano.

**Tabela 2.** Produção de pectina esterase e poligalacturonase diferentes biomassas como fontes de carbono.

<b>Fonte de carbono</b>	<b>72 horas</b>			<b>120 horas</b>		
	<b>Biomassa</b> (g/L)	<b>PE</b> (U/mL)	<b>PG</b> (U/mL)	<b>Biomassa</b> (g/L)	<b>PE</b> (U/mL)	<b>PG</b> (U/mL)
Bagaço de abacaxi	14,95	0,65	0,02	12,37	1,90	2,49
Farinha de batata doce	14,09	ND	ND	13,77	0,41	0,18
Farelo de trigo	17,57	ND	ND	13,76	0,49	0,18
Casca de mandioca	19,02	ND	ND	13,55	0,42	0,01
Casca de soja	18,77	0,32	0,01	17,47	0,35	0,38
Farinha de bacaba	20,63	ND	ND	17,20	0,47	0,21
Sabugo de milho	14,33	0,63	0,01	13,89	0,60	0,45
Palha de milho	16,88	ND	ND	13,31	1,36	1,53
Bagaço cana de açúcar	19,58	0,70	0,02	18,96	0,46	0,407
Bagaço de laranja	14,40	0,61	ND	13,51	0,21	0,22
Casca de maracujá	11,16	0,28	0,02	14,08	0,48	0,54
Casca de banana	10,93	ND	ND	11,58	0,72	0,43

**Nota:** PE – pectina esterase; PG – poligalacturonase; ND – não dectado.

Ezugwu et al. (2014) relatam a produção de pectinases por *Aspergillus niger* utilizando cascas de abacaxi e laranja e a produção de pectinases por *Aspergillus fumigatus* utilizando cascas de manga em fermentação submersa.

## CONCLUSÕES

Conclui-se que o meio Vogel é eficiente na produção de pectinases por *Aspergillus* sp. Nos cultivos utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono, verificou-se que o cultivo de 120 horas obteve maior produção de pectina esterase e poligalacturonase, utilizando o bagaço de abacaxi como fonte de carbono. A produção de pectinases utilizando fontes renováveis da agroindústria pode ser uma alternativa viável para a produção de enzimas em condições submersas.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A.F., TAUK-TORNISIELO, S.M.; CARMONA, E.C., 2013. Acid lipase from *Candida viswanathii*: production, biochemical properties, and potential application. *BioMed Research International*, 2013.
- EZUGWU, A. L.; EZIKE, T. C.; IBEAWUCHI , A. N.; NSUDE, C. A.; UDENWOBELE, S. O. O.; EZE, D. I.; ANYAWU, C. U.; CHILAKAET; F. C. Comparative studies on pectinases obtained from *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger* in submerged fermentation system using pectin extracted from mango, orange and pineapple peels as carbon sources. *Nigerian Journal of Biotechnology*, v. 28, n. 1, p. 26-34, 2014.
- KNOB, A., et al. Production , purification , and characterization of a major *Penicillium glabrum* xylanase using brewer 's spent grain as substrate . *BioMed Research International*, 8 p., 2013.
- VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). *Microbiology Genetic Bulletin*, v. 13, p. 42–43, 1956.

## Obtenção de biossólido de lodo de esgoto anaeróbio por biolixiviação bacteriana

Franciele Pereira Camargo<sup>1</sup>; Paulo Sérgio Tonello<sup>2</sup>; André Cordeiro Alves dos Santos<sup>1</sup>; Iolanda Cristina Silveira Duarte<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de São Carlos *campus* Sorocaba. \*e-mail: francielep.camargo@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” *campus* Sorocaba.

### RESUMO

Uma das alternativas à disposição dos lodos de esgoto em aterros sanitários é sua aplicação como fertilizantes, entretanto a presença de metais tóxicos pode restringir esta destinação. A biolixiviação é uma tecnologia promissora, uma vez que é um processo economicamente e ambientalmente vantajoso. A presente pesquisa teve como objetivo avaliar a possibilidade de obtenção de biossólido por meio do tratamento de lodo de esgoto anaeróbio pela técnica de biolixiviação. Para tanto, avaliou-se a influência da coinoculação de duas espécies de bactérias acidófilas do gênero *Acidithiobacillus*: *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans* na solubilização de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn neste material. Os metais foram determinados antes e após os ensaios de biolixiviação por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) e o conteúdo de fósforo e nitrogênio foi determinado por espectrometria óptica e pelo método de Kjeldahl, respectivamente. Os resultados de solubilização dos metais após 10 dias de incubação a 28°C foram 70,3% de zinco, 53,1% de níquel, 37,4% de cobre, 17,9% de cádmio, 12,6% de cromo e 8,1% de chumbo. Notou-se que o processo de biolixiviação reduziu a concentração de nitrogênio em 22,8% e de fósforo em 1,2%. Conclui-se que as características finais do lodo de esgoto anaeróbio obtido após o tratamento indicam que este material possui potencial para ser utilizado como fertilizante em solos agrícolas, uma vez que atende as normas exigidas no Estado de São Paulo (Norma Técnica vigente P4.230) e também em países da Comunidade Europeia, Canadá e Estados Unidos.

**Palavras-chave:** Metal pesado. Metal tóxico. Solubilização de metal. Tratamento de águas residuárias. Biorremediação.

### Biosolid obtainment from anaerobic sewage sludge through bacterial bioleaching

### ABSTRACT

One of the alternatives to the disposal of sewage sludge in landfills is its application as fertilizer, though the presence of toxic metals can restrict this allocation. Bioleaching is a promising technology, since it is an economically and environmentally advantageous process. This research aimed to evaluate the possibility of obtaining biosolids through the treatment of anaerobic sewage sludge by the bioleaching technique. The influence of the coinoculation of two acidophilus bacteria of the *Acidithiobacillus* genus: *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* in the solubilization of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in this material was evaluated. The metals determined in the sludge before and after the bioleaching tests through Inductively Coupled Plasma - Optic Emission Spectrometry (ICP-OES) and the phosphorus and nitrogen content was determined by optical

spectrometry and the Kjeldahl method, respectively. After 10 days of incubation at 28°C, were solubilized 70.3% of zinc, 53.1% of nickel, 37.4% of copper, 17.9% of cadmium, 12.6% chromium and 8.1 % lead. It was observed that the bioleaching process reduced the nitrogen concentration by 22.8% and phosphorus by 1.2%. Based on the results obtained, it is concluded that the final characteristics of the anaerobic sewage sludge obtained after the treatment indicate that this material has potential to be used as fertilizer in agricultural soils, since it meets the standards required in the State of São Paulo (Technical Standard in force P4.230) and also in countries of the European Community, Canada and the United States.

**Keywords:** Heavy metal. Toxic metal. Metal solubilization. Wastewater treatment. Bioremediation.

---

## INTRODUÇÃO

Os sistemas de tratamento de esgoto têm como objetivo a minimização dos impactos ambientais causados pelo seu despejo no ambiente, mas este mesmo processo, por consequência, também pode gerar resíduos secundários, que devem ser dispostos adequadamente (DU et al., 2015).

Devido às elevadas concentrações de nutrientes, o uso de lodo de esgoto em campos de cultivo é uma alternativa viável, podendo substituir a adubação química, no entanto, a presença de metais é o principal limitante dessa destinação (PATHAK; DASTIDAR; SREEKRISHNAN, 2009). Para que o produto final obtido possa ser aplicado como fertilizantes em solos agrícolas, como bioassólido, além de matéria orgânica e nutrientes ele deve conter uma baixa concentração de contaminantes, como metais tóxicos, considerando as concentrações máximas de metais tóxicos permitidas, as concentrações máximas de metais em solos agrícolas e também as cargas cumulativas máximas de metais em solos pela aplicação de bioassólidos (TSUTIYA, 2015).

No Estado de São Paulo, os limites máximos de metais permitidos nos bioassólidos foram baseados nos limites máximos permitidos nos Estados Unidos e definidos na Norma P4.230 (CETESB, 1999), sendo esta baseada em análises de risco, enquanto que a definição das normas da Comunidade Europeia e do Canadá, por exemplo, utilizaram o conceito de não degradação do solo e do ambiente.

A biolixiviação é o processo que utiliza o efeito catalítico produzido pela atividade metabólica dos micro-organismos oxidantes de ferro ou enxofre (PATHAK; DASTIDAR; SREEKRISHNAN, 2009). A técnica de biolixiviação tem sido estudada para remoção de metais em lodo de esgoto, sedimentos dragados de rios e solos, não comprometendo suas propriedades como condicionante de solo e fertilizante (FANG et al., 2011). Essa técnica tem se mostrado promissora devido a sua simplicidade em

relação às demais técnicas de tratamento de resíduos atualmente utilizadas, como alguns métodos físicos (submissão a temperaturas elevadas, eletrorremediação, entre outros) e químicos (adição de ácidos, substâncias iônicas e quelantes) e também é economicamente mais viável (CAMARGO et al., 2016; PATHAK; DASTIDAR; SREEKRISHNAN, 2009) que técnicas químicas tradicionais. A presente pesquisa teve como principal objetivo avaliar a possibilidade de obtenção de biossólido por meio do tratamento de lodo de esgoto anaeróbio pela técnica de biolixiviação.

## MATERIAL E MÉTODOS

A amostra de lodo de esgoto anaeróbio foi coletada diretamente do reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB) em uma estação de tratamento de esgoto do município de Porto Feliz-SP. As concentrações de nitrogênio total e de fósforo total foram determinadas em triplicata de acordo com os métodos 4500-N<sub>org</sub> e 4500B, respectivamente (APHA, 2005).

A determinação dos metais cádmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), níquel (Ni), chumbo (Pb) e zinco (Zn) foi realizada em Espectrômetro de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) após a digestão das amostras sólidas por meio do método 3050B (EPA, 1996) e líquidas pelo método 3030E (APHA, 2005).

Os experimentos foram realizados em frascos de vidro contendo 445 mL de lodo de esgoto autoclavado. No ensaio controle (EC) utilizou-se apenas lodo de esgoto autoclavado e 2 g.L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> (como FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) e 2 g.L<sup>-1</sup> enxofre elementar (S<sup>0</sup>) e no ensaio de biolixiviação (EB) utilizou-se lodo de esgoto e 5% de cultura mista de bactérias acidófilas (*A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans*) como inóculo, além de 2 g.L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> (como FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) e 2 g.L<sup>-1</sup> enxofre elementar (S<sup>0</sup>) (ZHOU et al., 2013). Todos os frascos foram incubados a 30°C sob agitação de 150 rpm por 10 dias. O coeficiente de correlação e valor de P para os ensaios realizados foram estimados no software Graph Pad Instat para o teste paramétrico ANOVA com intervalo de confiança de 95%.

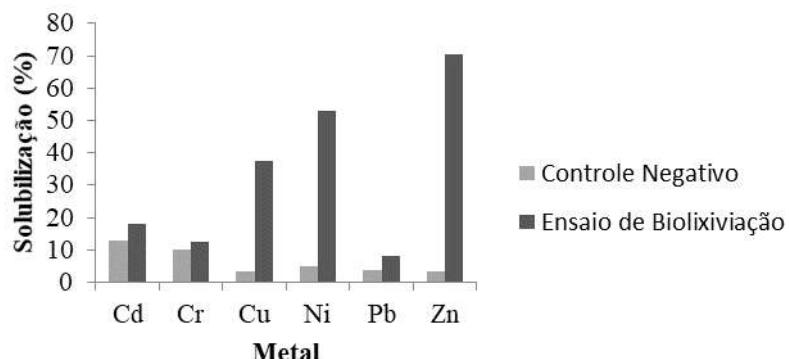
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 é possível notar que todos os elementos tiveram percentual de solubilização maior no EB do que no EC. Este resultado está relacionado à acidificação do EB causado pela atividade metabólica das bactérias acidófilas do gênero *Acidithiobacillus*.

Os metais cobre (37,4%), níquel (53,1%) e zinco (70,3%) foram o que mais solubilizaram se comparados ao EC, em que o percentual de solubilização foi de apenas

3,4; 5,2 e 3,2%, respectivamente. Para os metais cádmio (17,9%), cromo (12,6%) e chumbo (8,1%) também houve maior solubilização em relação ao EC (12,7; 10 e 3,8% de solubilização, respectivamente), porém a diferença entre os tratamentos foi menor. Todos os tratamentos apresentaram diferença estatística significativa em relação ao EC ( $p<0,001$ ).

**Figura 1-** Percentual de solubilização de metais da fase sólida do lodo de esgoto.



Em relação às concentrações de nitrogênio total e fósforo total, há pouca diferença entre o EB e o EC. A concentração de nitrogênio foi reduzida 26,7% no EC, enquanto no EB houve 22,8% de perda deste nutriente. A perda de fósforo foi de 12,5% para o EC e 1,2% para o EB.

Na Tabela 1 há uma comparação entre as concentrações máximas permitíveis de metais no biossólido para uso agrícola em diferentes localidades, as concentrações iniciais de metais no lodo de esgoto anaeróbio e as concentrações obtidas na fase sólida do lodo de esgoto após o Ensaio de Biolixiviação. Nota-se que o lodo de esgoto utilizado neste estudo encontrava-se ao início dos experimentos dentro dos limites das concentrações máximas permitidas no Estado de São Paulo e nos Estados Unidos, exceto para o elemento zinco. Entretanto, quando leis mais restritivas, de países que favorecem mais os fatores ambientais, são levadas em consideração, como da Comunidade Europeia e Canadá, percebe-se que todos os metais analisados, com exceção do chumbo, estariam acima dos limites máximos permitidos.

Após o EB, o produto obtido atingiu as concentrações máximas permitidas para o elemento zinco no Estado de São Paulo/Estados Unidos. Além disso, se encontra dentro dos limites para os demais metais pelas exigências da Comunidade Europeia.

**Tabela 1-** Comparação entre as concentrações máximas permissíveis de metais no biossólido para uso agrícola segundo diferentes legislações, as concentrações iniciais de metais no lodo de esgoto anaeróbio e as concentrações obtidas na fase sólida do lodo de esgoto após o ensaio de biolixiviação.

Local	Concentração máxima permitida por lei, mg.kg <sup>-1</sup>					
	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
<b>Concentração Inicial</b>	21	620	2201	356	451	8217
<b>Ensaio de Biolixiviação</b>	17	542	1379	167	415	2439
São Paulo/Estados Unidos	85	-	4300	420	840	7500
Comunidade Europeia	20/40	-	1000/ 1750	300/ 400	750/ 1200	2500/ 4000
Canadá	20	-	-	180	500	1850

## CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que as características finais do lodo de esgoto anaeróbio obtido após o tratamento pela técnica de biolixiviação bacteriana indicam que este material possui potencial para ser utilizado como biossólido/fertilizante em solos agrícolas, uma vez que atende as normas exigidas no Estado de São Paulo (Norma Técnica vigente P4.230) e também em países da Comunidade Europeia, Canadá e Estados Unidos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental da UFSCar *campus* Sorocaba, ao Prof. Dr. André Henrique Rosa pela ajuda com a análise de metais e ao Laboratório de Biohidrometalurgia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” *campus* Araraquara pela concessão das cepas de *Acidithiobacillus*. Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (número de processo 442833/2014-8) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## REFERÊNCIAS

- TSUTIYA, M.T., 2015. Metais pesados: o principal fator limitante para o uso agrícola de biossólidos das estações de tratamento de esgotos. In *28º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, 2015. Rio de Janeiro: ABES. pp. p.753- 761.
- APHA 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21. ed. Washington DC: American Public Health Association.

EPA 1996. *Method 3050B: Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Soils*. Revision 2.

CETESB, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, 1999. *Norma P4.230: Aplicação de lodos de sistemas de tratamento biológico em áreas agrícolas – Critérios para projeto e operação, São Paulo*.

CAMARGO, F.P; TONELLO, P., DOS SANTOS, A. C. A., DUARTE, I. C. S., 2016.

Removal of Toxic Metals from Sewage Sludge Through Chemical, Physical, and Biological Treatments- a Review. *Water, Air, and Soil Pollution*, 227(12), p.433.

<http://dx.doi.org/10.1007/s11270-016-3141-3>

DU, F., FREGUIA, S., YUAN, Z., KELLER, J. and PIKAAR, I., 2015. Enhancing Toxic Metal Removal from Acidified Sludge with Nitrite Addition. *Environmental Science and Technology*, vol. 49, pp. 6257-6263. <http://dx.doi.org/10.1021/es504507m>

FANG, D., ZHANG, R., ZHOU, L. and LI, J., 2011. A combination of bioleaching and bioprecipitation for deep removal of contaminating metals from dredged sediment.

*Journal of Hazardous Materials*, vol. 192, pp. 226-233.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.05.008>

PATHAK, A., DASTIDAR, M. G. and SREEKRISHNAN, T. R., 2009. Bioleaching of heavy metals from sewage: a review. *Journal of Environmental Management*, vol. 90, pp. 2343-2353. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2008.11.005>

ZHOU, J., ZHENG, G., ZHOU, L., LIU, F., ZHENG, C. and CHUNHONG, C., 2013. The role of heterotrophic microorganism *Galactomyces* sp. Z3 in improving pig slurry bioleaching. *Environmental Techonology*, vol. 34, pp. 35-43.

## **Atividade antibacteriana de extratos fúngicos contra a *Xanthomonas vesicatoria***

Gabrielle Vieira<sup>1</sup>, Luana Galvão Morão<sup>1</sup>, Marina Vitti Vianna<sup>1</sup>, Lara Durães Sette<sup>1</sup>, Henrique Ferreira<sup>1</sup>,  
Maria Lúcia Carneiro Vieira<sup>2</sup>, Daiane Cristina Sass<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo, Brasil. \*e-mail (autor para correspondência): daiane\_sass@rc.unesp.br

<sup>2</sup>Departamento de Genética Molecular de Plantas e Biotecnologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, São Paulo, Brasil.

---

### **RESUMO**

Bactérias do gênero *Xanthomonas* afetam importantes culturas agrícolas no Brasil e o controle dessas doenças é realizado por meio de práticas que tem efeito negativo na saúde e ambiente, assim, tratamentos alternativos para esses fitopatógenos são necessários. A mancha bacteriana é uma doença causada por *Xanthomonas vesicatoria* em cultivos de tomates. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito inibitório de 36 extratos brutos produzidos por fungos, isolados de solo abaixo de madeira em decomposição na Antártica, em *X. vesicatoria*. Os extratos intracelulares foram obtidos por extração com metanol e os extratos extracelulares via extração com acetato de etila. A análise da ação inibitória dos extratos foi realizada pelo método Resazurin Microtiter Assay method (REMA). O controle positivo usado foi a canamicina e o controle negativo consistiu de meio líquido inoculado com a bactéria. O crescimento bacteriano foi verificado através da fluorescência da resazurina e os resultados mostraram que 7 extratos foram positivos, com inibição maior que 90%. A concentração inibitória mínima para 90% de morte celular foi calculada para os extratos bioativos e os valores variaram de 1,00 a 2,11 mg/mL.

**Palavras-chave:** Metabólitos, bioativos, micro-organismos, fitopatógeno, mancha bacteriana

---

**Antibacterial activity of fungal extracts against *Xanthomonas vesicatoria***

### **ABSTRACT**

Bacteria of the *Xanthomonas* genus affect important agricultural crops in Brazil and the control of these diseases is carried out through practices that have a negative effect on health and environment, thus, alternative treatments for these phytopathogens are necessary. Bacterial spot is a disease caused by *Xanthomonas vesicatoria* in tomato crops. The present study had as objective to evaluate the inhibitory effect of 36 raw extracts produced by fungi isolated from soil below decomposing wood in Antarctica in *X. vesicatoria*. Intracellular extracts were obtained by extraction with methanol and extracellular extracts via extraction with ethyl acetate. The analysis of the inhibitory action of the extracts was performed by the Resazurin Microtiter Assay method (REMA). The positive control used was kanamycin and the negative control consisted

of liquid medium inoculated with the bacterium. Bacterial growth was verified by resazurin fluorescence and the results showed that 7 extracts were positive, with inhibition greater than 90%. The minimum inhibitory concentration for 90% cell death was calculated for the bioactive extracts and values ranged from 1.00 to 2.11 mg/mL.

**Keywords:** Metabolites, bioactive, microorganisms, phytopatogen, bacterial spot.

---

## INTRODUÇÃO

A busca por compostos antimicrobianos tem crescido devido ao surgimento de novas doenças e ao desenvolvimento de mecanismos de resistência em patógenos aos produtos atualmente no mercado (Anderson and Hughes, 2011). Nesse âmbito, os fungos se destacam como uma importante fonte para novos compostos antimicrobianos e, tendo sido submetidas a longos períodos de isolamento e baixos níveis de perturbação, as comunidades microbianas antárticas se tornam alvo de grande interesse científico e comercial (Clarke, 2003; Vincent, 2000). Estudos recentes demonstram o grande potencial dessas comunidades para a produção de metabólitos secundários com atividade biológica (Furbino et al., 2014; Gonçalves et al., 2015; Svahn et al., 2015).

O emprego de metabólitos bioativos de origem microbiana na agricultura é uma alternativa que oferece impacto ambiental mínimo ou inexistente quando comparado aos produtos químicos atualmente utilizados. Dentro desse cenário, os estudos de metabólitos secundários tem ganhado destaque no combate a diversas espécies de *Xanthomonas* (Spago et al., 2014; Encheva-Malinova et al., 2014; Silber et al., 2013).

A mancha bacteriana, uma das doenças mais importantes da cultura do tomate no Brasil, é causada por *X. vesicatoria* e tem causado grandes perdas no cultivo do tomate, reduzindo a produtividade através da destruição do tecido foliar e derrubada dos frutos em formação, além de comprometer o valor e qualidade comercial do produto (Lopes and Quezado-Soares, 2000). O controle da doença é normalmente realizado pela adição de produtos químicos cúpricos, erradicação das plantas contaminadas e uso de variedades resistentes (Sanches et al., 2014; Lopes e Quezado-Soares, 2000). No entanto essas medidas são ineficientes, levando à acumulação de metal no ambiente, perdas de área plantada, suscetibilidade de variedades supostamente resistentes e desenvolvimento de resistência dos fitopatógenos aos produtos empregados.

O presente estudo visa contribuir para a descoberta de novos compostos produzidos por fungos isolados de solo da Antártica com potencial para atividade inibitória contra a bactéria causadora da mancha bacteriana em tomates, *X. vesicatoria*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Dezoito fungos isolados de solo abaixo de madeira podre na Ilha Deception, Antártica, foram inoculados em meio líquido malte 2% e incubados por 20 dias à 15°C e 150 rpm. Em seguida a biomassa e o sobrenadante foram separados por filtração à vácuo. Para obtenção dos extratos extracelulares os sobrenadantes foram submetidos à extrações líquido-líquido com acetato de etila. Para obtenção dos extratos intracelulares as biomassas foram submetidas à maceração com metanol.

Após a evaporação do solvente, os extratos foram dissolvidos em solução de Dimetilsulfóxido (DMSO) 10% para concentração final de 30 mg/mL. Os extratos contendo metabólitos secundários foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana contra *X. vesicatoria* através de ensaio em microplaca de resazurina (Resazurin Microtiter Assay Plate – REMA), conforme descrito por Silva e Ferreira (2013). O ensaio utilizou canamicina em concentração de 20 µg/mL como controle positivo (CP), DMSO 1% como controle do veículo (CV) e concentração máxima dos extratos de 2,1 mg/mL. Todos os bioensaios foram realizados em triplicata.

A capacidade de inibição de cada extrato foi expressa pela porcentagem de morte celular, calculada em relação ao controle negativo, os dados obtidos foram utilizados para a determinação da MIC90, que é o valor mínimo de concentração da substância necessário para inibir em 90% o crescimento das bactérias.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da metodologia descrita em materiais e métodos os 18 fungos produziram 36 extratos (intracelulares e extracelulares).

Os extratos foram submetidos ao bioensaio de atividade antibacteriana e de acordo com os resultados obtidos foi possível verificar que 3 extratos extracelulares (produzidos pelos fungos 3MP, 6MP e 10.6MP) e 4 intracelulares (produzidos pelos fungos 5MP, 10.1MP, 10.8MP e CMP) apresentaram atividade contra a *X. vesicatoria*, com taxa de inibição do crescimento bacteriano superior a 90%. Os resultados obtidos no bioensaio com estes extratos bioativos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 3. Porcentagem de inibição do crescimento in vitro de *X. vesicatoria*, cultivada em meio líquido com diferentes concentrações dos extratos bioativos.

C (mg/mL)	3MP <sup>e</sup>	6MP <sup>e</sup>	10.6MP <sup>e</sup>	5MP <sup>i</sup>	10.1MP <sup>i</sup>	10.8MP <sup>i</sup>	CMP <sup>i</sup>
<b>2,100</b>	90,14	97,71	93,62	98,04	98,20	97,68	98,07
<b>1,050</b>	12,13	11,10	0,00	7,88	22,72	0,09	97,11
<b>0,525</b>	0,00	0,15	0,00	0,00	2,61	0,00	9,38
<b>0,263</b>	0,00	0,01	0,00	0,00	0,09	0,00	2,79
<b>0,131</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>0,066</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>0,033</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>0,016</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

e: extrato de origem extracelular; i: extrato de origem intracelular

Analizando a Tabela 1 é possível verificar que os extratos obtidos dos fungos 6MP, 5MP, 10.1MP, 10.8MP e CMP apresentaram resultados de inibição superiores a do controle positivo, que foi de 97,63%. Os extratos dos isolados 3MP e 10.6MP apresentaram atividade inibitória menor do que a do controle positivo, porém acima de 90%, com valores respectivos de 90,14% e 93,62%.

Com base nos dados adquiridos de atividade inibitória, apresentados na Tabela 1, esboçou-se uma curva de regressão polinomial para cada extrato bioativo e a partir da equação da reta obtida, calculou-se o valor mínimo de concentração do extrato necessário para inibir em 90% o crescimento das bactérias (MIC90), os dados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 4. Valores das MIC90 obtidas para os extratos bioativos frente à espécie *X. vesicatoria*. **Extrato MIC90 (mg/mL)**

<b>3MP<sup>e</sup></b>	2,114
<b>6MP<sup>e</sup></b>	2,027
<b>10.6MP<sup>e</sup></b>	2,073
<b>5MP<sup>i</sup></b>	2,029
<b>10.1MP<sup>i</sup></b>	1,998
<b>10.8MP<sup>i</sup></b>	2,042
<b>CMP<sup>i</sup></b>	1,006

e: extrato de origem extracelular i: extrato de origem intracelular

De acordo com a Tabela 2, é possível verificar que seis extratos apresentaram a MIC90 próxima à concentração máxima testada (2,1 mg/ml) e apenas o extrato intracelular CMP apresentou a MIC90 menor de 1,0 mg/ml.

## CONCLUSÕES

Foi possível concluir que dos 36 extratos testados, 7 apresentaram atividade contra *X. vesicatoria*, com taxa de inibição bacteriana superior a 90%, sendo que o extrato intracelular produzido pelo fungo CMP foi o que apresentou o melhor resultado, inibindo 90% do crescimento bacteriano em uma menor concentração. Por fim, os extratos produzidos pelos fungos da Antártica apresentam componentes com potencial atividade contra a *X. vesicatoria*, causadora da mancha bacteriana em tomates.

## AGRADECIMENTO

FAPESP e a CAPES pelos auxílios financeiros.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSSON, D.I. and HUGHES, D., 2011. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS Microbiol Rev.* v. 35, pp. 901–911.
- CLARKE, A., 2003. Evolution, adaptation and diversity: global ecology in an Antarctic contexto. In: HUIKES AHL, GIESKES WWC, ROZEMA J, SCHORNO RML, VAN DER VIES SM, WOLFF WJ. (Ed.) Antarctic biology in a global contexto. Leiden: *Backhuys Publishers*, pp. 3-17.
- DAYAN, F.E., CANTRELL, C.L., DUKE, S.O., 2009. Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 17, pp. 4022-4034.
- ENCHEVA-MALINOVA, M., STOYANOVA, M., AVRAMOVA, H., PAVLOVA, Y., GOCHEVA, B., IVANOVA, I., MONCHEVA, P., 2014. Antibacterial potential of streptomyces strains from Antarctic soils. *Biotechnol. Biotec. Eq.* v. 28, pp. 721-727.
- FURBINO, L.E., GODINHO, V.M., SANTIAGO, I.F., PELLIZARI, F.M., ALVES, T.M.A., ZANI, C.L., JUNIOR, P.A.S., ROMANHA, A.J., CARVALHO, A.G.O., GIL, L.H.V.G., ROSA, C.A., MINNIS, A.M., ROSA, L.H., 2014. Diversity Patterns, Ecology and Biological Activities of Fungal Communities Associated with the Endemic Macroalgae Across the Antarctic Peninsula. *Microbial Ecology*. v. 67, pp. 775-787.
- GONÇALVES, V.N., CARVALHO, C.R., JOHANN, S., MENDES, G., ALVES, T.M.A., ZANI, C.L., JUNIOR, P.A.S., MURTA, S.M.F., ROMANHA, A.J., CANTRELL, C.L., ROSA, C.A., ROSA, L.H., 2015. Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica. *Polar Biol.* v. 38, pp. 1143-1152.
- LOPES, C.A. and QUEZADO-SOARES, A.M., 2000. Doenças causadas por bactérias em tomate. In: ZAMBOLIM L; VALE FXR; COSTA H. (ed). *Controle de doenças de plantas: hortaliças*. Viçosa: UFV. pp. 754-784.
- SANCHES, A.L.R., DE MIRANDA, S.H.G., BELASQUE JUNIOR, J., BASSANEZI, R.B., 2014. Análise Econômica da Prevenção e Controle do Cancro Cítrico no Estado de São Paulo. *Econ. Sociol. Rural.* v. 52, pp. 549-566.

SILBER, J., OHLENDORF, B., LABES, A., ERHARD, A., IMHOFF, J.F., 2013. Calcarides A–E, Antibacterial Macrocyclic and Linear Polyesters from a *Calcarisporium* Strain. *Mar. Drugs*, v. 11, pp. 3309-3323.

SILVA, I.C. and FERREIRA, H., 2013. Drug Sensitivity Assay of *Xanthomonas. citri* subsp. *citri* Using REMA Plate Method. *Bio-protocol*. v. 3, pp. 1-4.

SPAGO, F.R., ISHII MAURO, C.S., OLIVEIRA, A.G., BERANGER, J.P.O., CELY, M.V.T., STANGANELLI, M.M., SIMIONATO, A.S., MELLO, J.C.P., ANDRADE, G., 2014. *Pseudomonas aeruginosa* produces secondary metabolites that have biological activity against plant pathogenic *Xanthomonas* species. *Crop Protection*. v. 62, pp. 46-54.

SVAHN, K.S., CHRYSSANTHOU, E., OLSEN, B., BOHLIN, L., GÖRANSSON, U., 2015. *Penicillium nalgiovense* Laxa isolated from Antarctica is a new source of the antifungal metabolite amphotericin B. *Fungal Biology and Biotechnology*. v. 2, pp. 1-8. VINCENT, W.F., 2000. Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism. *Antarct. Sci.* v. 12, pp. 374-385.

## **Potencial inibitório contra *Sclerotinia sclerotiorum* utilizando composto natural e semissintético**

Guilherme Fonseca Reis<sup>1\*</sup>; Ricardo Augusto Alves da Silva<sup>1</sup>; Tatiany Monique Nunes<sup>1</sup>; Patricia Canteri de Souza<sup>1</sup>; Maria Isabel Balbi<sup>1</sup>; Ricardo Sergio de<sup>1</sup>; Luciano Aparecido Panagio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituição: Universidade Estadual de Londrina; \*e-mail: greis.bio@gmail.com

---

### **RESUMO**

*Sclerotinia sclerotiorum*, conhecido como mofo branco, é um fungo necrotrófico que ataca mais de 400 espécies de eudicotiledôneas economicamente importantes para o mundo. Compostos são utilizados para a redução do crescimento fúngico nas culturas. Entretanto, os fungos desenvolvem resistência aos defensivos agrícolas em cinco anos. Somado a isso, muitos antifúngicos são tóxicos para seres vivos, inclusivamente o homem. Por este panorama, novos compostos devem ser desenvolvidos para contornar a ineficácia de alguns produtos e ainda, os novos compostos devem ser atóxicos ou apresentar baixa toxicidade colateral. O objetivo deste trabalho foi utilizar o óleo essencial de orégano (um composto natural) isoladamente e em combinação com sinvastatina (composto semi-sintético) na redução do crescimento de *S. sclerotiorum*. A sinvastatina é benéfica na redução de colesterol em seres humanos, mas também apresenta ação antimicrobiana. Para averiguar a atividade antifúngica dos componentes, utilizamos a técnica de, impregnação dos compostos isoladamente e conjugados em ágar. Na impregnação isolada, a sinvastatina apresentou uma DE<sub>50</sub> de 0.97 µg/mL e uma DE<sub>80</sub> de 1.95 µg/mL. O óleo de orégano apresentou uma DE<sub>50</sub> de aproximadamente 0.0039% e uma DE<sub>80</sub> de 0.0156%. Quando associados, a sinvastatina e o óleo de orégano apresentaram uma DE<sub>80</sub> 4x e 6x, respectivamente, inferior se comparado a seu uso isolado. Os resultados demonstram que o óleo de orégano e sinvastatina, isoladamente ou conjugados, apresentam potencial para serem utilizados para eliminação da fase miceliana do *S. sclerotiorum*. Novos experimentos estão em curso verificando se óleo de oréganos e sinvastatina inibem a formação ou germinação de escleródios.

**Palavras-chave:** *Sclerotinia sclerotiorum*, óleo de orégano, sinvastatina.

---

**Inhibitory potential against *Sclerotinia sclerotiorum* using compounds natural and semisynthetic**

### **ABSTRACT**

*Sclerotinia sclerotiorum*, also known as white mold, it's a necrotrophic fungus that affects up to 400 eudicotyledons species with economical importance. Several agricultural techniques are used to reduce fungal growth in crops. However, records

demonstrate the resistance expression to the crops defenses. Furthermore, many antifungal compounds does not present selective toxicity, causing damage to humans. From this point of view, non-toxic compounds must be developed to prevent side effects. The objective of this work was to test the activity of oregano essential oil, (isolated and in combination with simvastatin) in reducing to the growth of *S. sclerotiorum*. Simvastatin has hypocholesterolemic effect in humans, but also an antimicrobial activity. To inquire the antifungal activity of the compounds aforementioned, we used the diffusion agar technique with the isolated and conjugated compounds. Simvastatin isolated presented ED50 of 0.97 µg / mL and an ED80 of 1.95 µg / mL. Oregano oil presented ED 50 of approximately 0.0039% and an ED80 of 0.0156%. Associated, simvastatin and oregano oil showed a DE 80 4x and 6x, respectively, compared to isolated. Taken together, the results show that both compounds present properties against the mycelial form of *S. sclerotiorum*. New assays are underway to determine if oregano oil and simvastatin inhibit development or germination of sclerotia.

**Keywords:** *Sclerotinia sclerotiorum*, oregano oil, simvastatin.

---

## INTRODUÇÃO

A agricultura comercial utiliza diversos defensivos agrícolas para o controle de doenças e pragas. O uso indiscriminado de defensivos químicos, no curto prazo, é benéfico aos produtores em termos econômicos (maior produtividade) mas, em longo prazo, seleciona organismos resistentes a estes mesmos defensivos. A despeito dos ganhos econômicos, muitos defensivos agrícolas podem ser prejudiciais ao meio ambiente, podendo também causar graves riscos à saúde humana e de outros animais (Dalio et al., 2012).

Em 2008 o Brasil ultrapassou os Estados Unidos se tornou detentor do título de líder mundial no uso de agrotóxicos. De acordo com a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), em 2012, entre os defensivos agrícolas usuais no Brasil, os fungicidas representam 14% do mercado. As plantas sofrem doenças causadas por agentes infecciosos, denominados fitopatógenos. Dentre deles, podemos citar fungos, bactérias, vírus e nematóides.

Dentre os fungos fitopatógenos encontra-se o *Sclerotinia sclerotiorum*, causador da doença popularmente conhecida como mofo branco. *S.sclerotiorum* pode infectar mais de 400 espécies, incluindo culturas importantes economicamente, como feijão, soja e girassol (Azevedo et al, 2016). Possui a característica de sobreviver em condições ambientais desfavoráveis, formando estruturas vegetativas densas, revestidas por melanina denominados escleródios. Esta estrutura pode permanecer quiescente por anos

no solo e retoma o seu desenvolvimento normal quando as condições estão favoráveis (Smith et al., 2015).

Os patógenos apresentam resistência a vários fungicidas disponíveis no mercado. Sendo assim, é necessária a busca de novos fungicidas que sejam eficientes e preferencialmente ambientalmente adequados.

O objetivo desta pesquisa é analisar a atividade antifúngica do óleo essencial de orégano e da simvastatina isoladamente e em conjugados contra *S. sclerotiorum*, determinando a concentração de ambos os compostos que inibem 50% a 80% do crescimento micelial do fungo.

## MATERIAL E MÉTODOS

O microrganismo utilizado nesta pesquisa, *S. sclerotiorum*, foi cedido gentilmente pela Professora Maria Balbi, do Laboratório de Fitopatologia – Universidade Estadual de Londrina – Brasil. A cepa foi cultivada em tubos contendo Batata Dextrose Ágar (HIMEDIA®, Mumbai, Índia), por um período de sete – dez dias a  $20 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 h. Após seu cultivo, a cepa foi armazenada em glicerol a 40% a -20 °C.

A simvastatina foi adquirida comercialmente obtida pela *Henan Topfond Pharmaceutical Co. Ltda, Yicheng, Zhumadian, Henan, China*. O composto está na forma de pró-fármaco, e sua ativação ocorre através de hidrólise com NaOH 0,25 M à 37 °C durante 60 minutos. O pH foi ajustado até a faixa de 7,4 com HCl 0,25 M e armazenada em -20 °C na concentração de 5000 µg/mL. O óleo essencial de orégano foi adquirido comercialmente obtido pela Ferquima Indústria e Comércio Ltda, Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil. O composto está em forma de óleo essencial e foi armazenado na temperatura de 4 – 7 °C.

Em uma placa de Petri de 90 mm, serão adicionados 19 mL de Ágar Batata Dextrose (HIMEDIA®). No meio ainda fundente (temperatura aproximada de 45 °C), serão adicionados 1 mL de simvastatina ou óleo de orégano, em concentrações que variam entre 1250 – 4.88 µg/mL e 20 – 0.078%, respectivamente. Após a solidificação do meio de cultura, no centro da placa, será escavado um poço de 0,9 cm de diâmetro e substituído por um disco micelial, previamente cultivado por uma semana. A placa será incubada a temperatura de  $\pm 20 \pm 2$  °C com fotoperíodo de 12 h e retirada após o

controle positivo atingir a extremidade da placa. A obtenção dos dados será realizada pela medição do crescimento micelial com o auxílio de um paquímetro.

Em uma placa de Petri de 90 mm, serão adicionados 18 mL de Ágar Batata Dextrose (HIMEDIA®). Incluso ao ágar, em seu estado líquido em temperatura próxima a 45 °C, 1 mL de simvastatina e óleo de orégano, em concentrações a partir de 4 vezes observadas em DE<sub>50</sub> (dose eficaz de 50%), para ambos os compostos, serão incorporadas. Após a solidificação, no centro da placa, será retirado um disco de 0,9 cm de diâmetro e substituído por um disco micelial. A placa será armazenada a temperatura de  $\pm 20 \pm 2$  °C com fotoperíodo de 12 hs até o controle positivo atingir a extremidade da placa.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diante das metodologias descritas foi plotado um gráfico no programa Graphpad Prim 5.0, onde demonstra a relação concentração da substância testada x crescimento micelial da espécie fúngica.

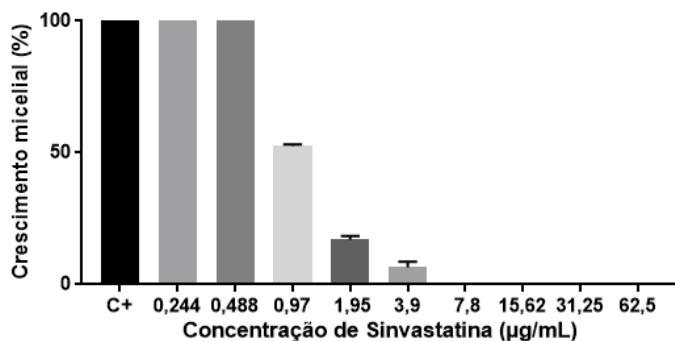


Figura 1: Relação concentração x porcentagem de inibição em diferentes concentrações de simvastatina.

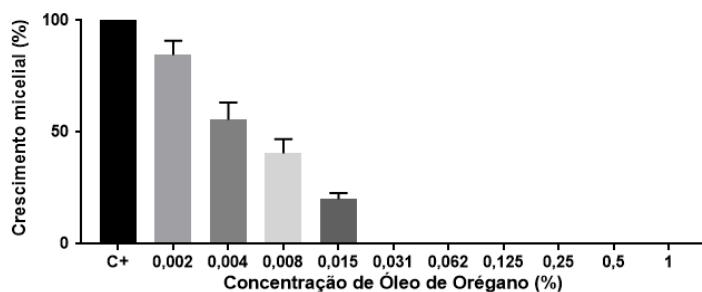


Figura 2: Relação concentração x porcentagem de inibição em diferentes concentrações de óleo de orégano.

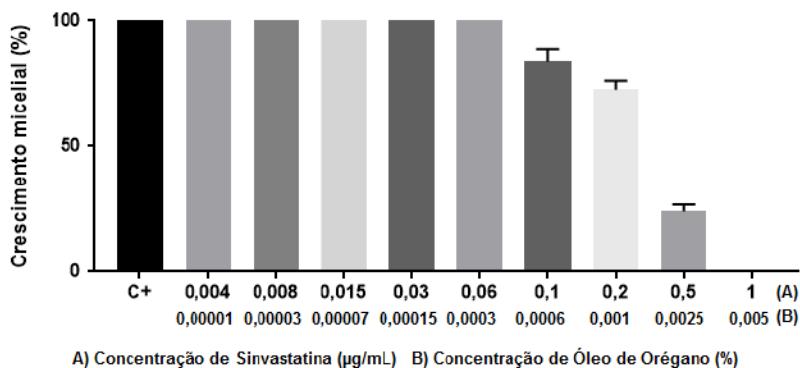


Figura 3: Relação concentração x porcentagem de inibição em diferentes concentrações de sinvastatina e óleo de orégano conjugados.

A sinvastatina apresentou uma dose eficaz 80% de 1,95  $\mu\text{g}/\text{Ml}$  de inibição do crescimento micelial de *S.sclerotiorum*, o óleo de orégano em 0,015% também apresentou uma dose eficaz aproximada de 80%. Quando associados os compostos apresentaram efeitos inibitórios de 80% em concentrações de 4x e 6x mais inferiores para a sinvastatin1a e o óleo de orégano respectivamente. A atividade sinérgica de dois compostos produz o efeito maior do que a simples soma dos efeitos isolados de cada um deles, o que pode levar a aumento da eficiência na redução do crescimento microbiano, diminuição da toxicidade dos compostos, diminuição dos efeitos adversos, menor dose terapêutica e redução da possível resistência microbiana (Van Vuuren and Viljoen, 2011).

## CONCLUSÕES

Diante dos resultados descritos notamos ação antifúngica da sinvastatina e o óleo essencial de orégano como *S. sclerotiorum*. Observamos um efeito sinérgico dos compostos utilizados, esta relação promove uma melhora na eficiência do composto, principalmente pela amplitude no mecanismo de ação dos compostos, reduzindo a chance de expressão de resistência. Além disso, utilizou uma menor concentração das substâncias conjugadas, isso possibilita a baixa toxicidade. Mediante ao fato, podemos demonstrar a aplicabilidade de nossos compostos extrapolando em outras escalas. Por exemplo, podemos utilizar veículos para o armazenamento destas substâncias, como embalagens ou até a utilização de defensivos agrícolas alternativos que podem ser

utilizados intercaladamente com os tradicionais.

## REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, L, et al., 2016. White mold (*Sclerotinia sclerotiorum*), friend or foe: Cytotoxic and mutagenic activities in vitro and in vivo. *Food Research International*, vol. 80, pp. 27-35.
- DALIO, R. J. D. et al., 2012. O triplo modo de ação dos fosfitos em plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, vol. 20, no. 1, pp. 206-243.
- SMITH, M. E. et al., 2015. How many fungi make sclerotia? *Fungal Ecology*, vol. 13, pp. 211–220.
- VAN VUUREN, S and VILJOEN, A., 2011. Plant-based antimicrobial studies—methods and approaches to study the interaction between natural products. *Planta medica*, vol. 77, no. 11, pp. 1168-1182.

## Produção de invertase por *Aspergillus* sp. em condições submersas

Gustavo Carvalho do Nascimento<sup>1\*</sup>; Ryhára Dias Batista<sup>2</sup>; Mariana Carvalho Barbosa<sup>2</sup>; Ezequiel Marcelino da Silva<sup>1</sup>, Alex Fernando de Almeida<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Habite – Incubadora de Empresas de Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi-TO, Rua Badejós, chácara 69/72, Zona Rural, CEP 77.402-970. \*gustavocarvalho@mail.uft.edu.br (autor para correspondência)

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Tocantins, Palmas-TO.

---

### RESUMO

A enzima invertase tem como função a produção de açúcares invertidos que são muito aplicados em diversos ramos da indústria, com destaque para a área de alimentos. Desta forma, o objetivo do trabalho foi à produção de invertase por fungos filamentosos em condições submersas utilizando diferentes fontes de carbono puras e complexas. Os cultivos para a seleção dos fungos filamentosos e da fonte de carbono pura foram realizados por 120 h e os cultivos para a seleção da melhor fonte de carbono complexa foi realizada por 72 h e 120 h, todos a 30°C e 180 rpm. Entre as fontes puras, as que mais se destacaram foram a rafinose e a inulina. Com relação às biomassas complexas, o bagaço da coroa de abacaxi foi a fonte com a qual obteve-se os valores mais elevados para atividade enzimática. Como as biomassas complexas empregadas nos testes foram as que induziram maior atividade enzimática, os resultados trazem uma alternativa viável para algumas destas, que geralmente são descartadas.

**Palavras-chave:** Fungos filamentosos, resíduos agroindustriais, fonte de carbono, enzimas.

---

### Invertase production by *Aspergillus* sp. In underwater conditions

### ABSTRACT

The enzyme invertase has the function of producing inverted sugars that are widely applied in various branches of the industry, especially the food area. Thus, the objective of the work was to produce invertase by filamentous fungi under submerged conditions using different pure and complex carbon sources. The cultures for the selection of the filamentous fungi and the pure carbon source were carried out for 120 h and the cultures for the selection of the best source of complex carbon were carried out for 72 h and 120 h, all at 30 °C and 180 rpm. Among the pure sources, the most outstanding ones were rafinose and inulin. In relation to the complex biomasses, the bagasse of the pineapple crown was the source with which the highest values for enzymatic activity were obtained. As the complex biomasses used in the tests were those that induced higher

enzymatic activity, the results provide a viable alternative for some of these, which are generally discarded.

**Keywords:** Filamentous fungi, agroindustrial residues, carbon source, enzymes.

---

## INTRODUÇÃO

Enzimas têm por função catalisar reações no organismo, sendo assim denominadas como catalisadores biológicos. Estas proteínas favorecem a ocorrência de uma determinada reação, garantindo um alto rendimento na formação do produto e um gasto energético menor. As enzimas têm ainda duas importantes características que são a especificidade que possibilita a diferenciação de estruturas químicas semelhantes e a capacidade de atuar em diversos níveis de temperatura (KULSHRESTHA *et al.*, 2013).

As invertases são capazes de realizar a inversão de açúcares por meio da hidrólise das ligações do tipo  $\beta$ - 1,2 da sacarose. Como resultado desta reação ocorre a formação de D-frutose e D- glicose que são chamados de açúcares invertidos. Este tipo de açúcar tem um potencial elevado para sua utilização na indústria de alimentos e bebidas (NUNES *et al.*, 2013). A hidrólise da sacarose da origem ao chamado xarope invertido, que é formado por glicose e frutose em igual concentração. Este xarope faz parte da formulação de diversos produtos alimentícios como compotas, doces, cremes não cristalizantes e mel artificial. Sua atuação é de umectante, auxiliando na retenção de umidade destes produtos (TASKIN *et al.*, 2016).

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada uma triagem para selecionar o fungo com maior potencial para produção de invertase. Os fungos empregados neste teste foram inoculados em placas de petri, contendo meio BDA e mantidos a 4°C. Para a inoculação no meio de cultivo submerso os fungos reativados foram incubados em estufa de crescimento biológico em tubos inclinados com meio BDA por três dias, após este prazo, realizou-se o inóculo por meio de uma suspensão de esporos com agua destilada. Um ml da suspensão de esporos foi pipetado em erlenmeyers contendo meio de sais de Vogel (VOGEL, 1956). Como fonte de carbono e nitrogênio utilizou-se inulina e extrato de levedura respectivamente. O tempo de cultivo para a seleção teve duração de cinco dias, em shaker rotativo e as condições de cultivo foram mantidas em 28°C e 180 rpm de temperatura e agitação. Com o término da fermentação o caldo fermentado foi filtrado e armazenado a -12°C para posterior realização de atividade enzimática.

Posteriormente realizou-se o teste para seleção da fonte de carbono pura onde empregou-se somente o fungo selecionado anteriormente. As condições de cultivo para realização de tal teste foram as mesmas empregadas para a seleção fúngica. Os extratos proteicos filtrados utilizando, kitassato, funil de Buchner e bomba de vácuo e como filtro tecido Musseline, armazenados a -12°C. A utilização de fonte de carbono complexa seguiu o mesmo protocolo das analise anteriores para inóculo, condições de processo e fonte de nitrogênio, no entanto o cultivo foi realizado em três e cinco dias, o procedimento para os extratos proteicos filtrados seguiu os procedimentos anteriores. Incubou-se a biomassa fúngica retida nos filtros em estufas de secagem por 24 horas a 60°C para pesagem e analise do peso seco.

Para atividade enzimática adicionou-se 800  $\mu$ L de uma solução de sacarose 2% com tampão Mcilvaine em pH 5,0 em tubos de ensaio. Os mesmos foram mantidos a 50°C por 5 minutos. Após este prazo adicionou-se 200  $\mu$ L do extrato proteico nos tubos contendo a solução de sacarose, foram retirados 200  $\mu$ L da reação que foram pipetados em tubos contendo 200  $\mu$ L de solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para cessar a reação. Os 200  $\mu$ L foram retirados em tempos de 0, 5 e 10 minutos após o inicio da reação. Os tubos contendo DNS e a reação enzimática foram fervidos a 90°C por 5 minutos para que pudesse acontecer a reação de coloração, após o termino do tempo de fervura, pipetou-se 2 ml de água destilada nos tubos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 540 nm.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a seleção do fungo o que se pode observar através dos resultados obtidos e demonstrados na Tabela 1, é que o PC-4, apresentou os valores mais elevados tanto para atividade enzimática 3,47 U/ml que foi tratado como o parâmetro principal, quanto para parâmetros tidos como secundários, produtividade 0,46 U/h, rendimento 277,80 U/g. Os demais testes foram realizados com o PC-4.

**Tabela 1.** Atividade enzimática e rendimento para triagem do fungo com maior potencial para produção de invertase.

Fungo	U/ml	Yp/s	Pp	Peso seco(g/L)
PC-1	1,86	163,17	0,27	5,72
PC-2	1,23	110,90	0,18	5,56
PC-3	1,06	95,20	0,16	2,67
PC-4	3,47	277,80	0,46	5,54
PC-5	1,96	151,82	0,25	5,37
PC-6	1,30	97,28	0,16	6,02
MC-1	N/D	N/D	N/D	1,64
MC-2	N/D	N/D	N/D	1,39
Rizhopus	1,76	171,15	0,29	1,75
QF-1	N/D	N/D	N/D	4,04
PR-12	0,91	70,83	0,12	5,77

Condições de cultivo: cultivos realizados em sais de Vogel, pH 6, a 180 rpm, 28 °C por 120 horas.

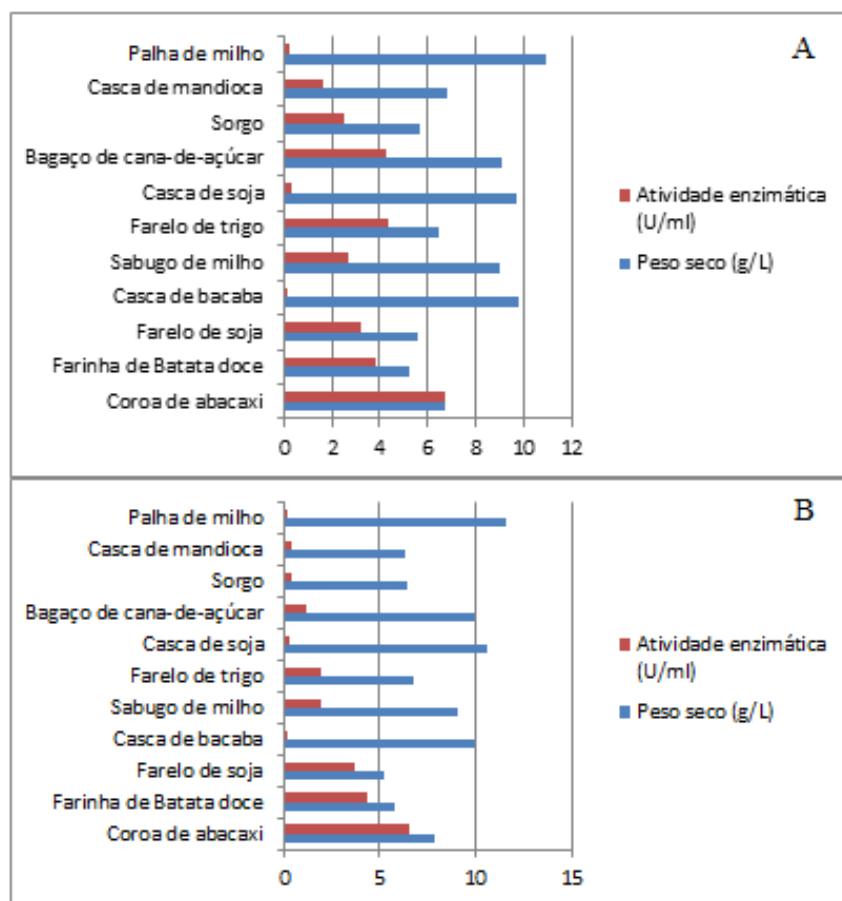
A Tabela 2 assim como a tabela anterior apresenta dados sobre atividade enzimática, rendimento, produtividade e peso seco. A rafinose foi a fonte de carbono pura, com a qual o PC-4 alcançou os melhores níveis de produção da enzima com atividade enzimática de 1,26 U/ml, com destaque também para a inulina que obteve atividade de 0,95 U/ml.

**Tabela 2.** Seleção da melhor fonte de carbono pura para indução de invertases.

Fonte de Carbono	U/ml	Yp/s	Pp	Peso seco(g/L)
Inulina	0,95	75,97	0,13	6,68
Lactose	0,12	13,27	0,02	6,30
Frutose	0,10	9,93	0,02	5,27
Glicose	0,62	47,75	0,08	5,61
Xilose	0,19	10,91	0,02	6,02
Cellobiose	0,19	12,80	0,02	6,21
Maltose	0,40	19,11	0,03	6,27
Sorbitol	0,17	14,59	0,02	6,56

Glicerol	0,32	27,37	0,04	3,64
Rafinose	1,26	100,51	0,16	4,51
Celulose	0,28	23,80	0,04	9,51
Sacarose	0,23	17,47	0,03	6,79

Condições de cultivo: cultivos realizados em sais de Vogel, pH 6, a 180 rpm, 28 °C por 120 horas.



**Figura 1.** Produção de invertase utilizando fonte de carbono complexa (A) 3 dias e (B) 5 dias de cultivo

Na Figura 1 estão representados os dados para atividade enzimática e peso seco, em cultivo utilizando fonte de carbono complexa em três e cinco dias. A coroa de abacaxi demonstrou-se como a fonte que melhor induziu a produção de invertase nos dois tempos de cultivo. Para o crescimento fúngico determinado pelo peso seco a palha de milho superou as demais fontes. Sendo a atividade enzimática o parâmetro principal para seleção da fonte de carbono, a coroa de abacaxi foi à fonte selecionada.

## CONCLUSÕES

Dentre as fontes de carbono puras testadas a rafinose se destacou, e para as fontes de carbono complexas o bagaço de abacaxi teve os valores mais elevados para atividade enzimática de invertase. Comparando as fontes de carbono puras e complexas, as ultimas foram superiores para indução da produção da enzima de interesse. Um resultado interessante por oferecer uma utilidade para tais resíduos que normalmente seriam descartados, podendo baratear os custos para obtenção de invertase para indústria.

## AGRADECIMENTO

Os autores agradecem a Universidade Federal do Tocantins e a incubadora de empresas de base biotecnológica (HABITE) por proporcionar o desenvolvimento do presente trabalho.

## REFERÊNCIAS

- KULSHRESTHA, S. et al. Invertase and its applications - A brief review. *Journal of Pharmacy Research*, v. 7, n. 9, p. 792–797, 2013.
- NUNES, J. et al. Production of Invertases by Anamorphic (*Aspergillus nidulans*) and Teleomorphic (*Emericela nidulans*) Fungi under Submerged Fermentation Using Rye Flour as Carbon Source. *Scientific Research*, v. 2013, n. September, p. 421–429, 2013.
- TASKIN, M. et al. Invertase production and molasses decolourization by cold-adapted filamentous fungus *Cladosporium herbarum* ER-25 in non-sterile molasses medium. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 103, p. 136–143, 2016.
- VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). *Microbiology Genetic Bulletin*, vol. 13, p. 42–43, 1956.

## Produção de frutosiltransferase por *Aspergillus* sp em cultivo submerso

Gustavo do Nascimento<sup>1</sup>; Ryhára Batista<sup>2</sup>; Rafael Silva<sup>1</sup>; Ezequiel M. da Silva<sup>3</sup>; Alex de Almeida<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Habite – Incubadora de Empresas de Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi-TO, Rua Badejós, chácaras 69/72, Zona Rural, CEP 77.402-970. \*alexfernando@uft.edu.br

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Tocantins, Palmas-TO

<sup>3</sup>Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi-TO

### RESUMO

Os frutooligossacarídeos têm ampla aplicação industrial com destaque na indústria de alimentos. Frutooligossacarídeos são usados na produção de alimentos funcionais, pois apresentam características prébióticas. As frutosiltransferases (FTase) são capazes de formar açúcares invertidos e frutooligossacarídeos, respectivamente. Neste trabalho, o objetivo foi a produção de frutosiltransferase por uma linhagem de *Aspergillus* sp. isolada de frutos em conserva, avaliando tanto fontes de carbono puras quanto fontes complexas de origem agroindustrial. Entre as fontes de carbono puras, a rafinose foi a fonte de carbono pura que melhor induziu a produção das enzimas de FTase (3,07 U/mL). A utilização de resíduos agroindustriais promoveu maior produção de FTase (17,36 U/mL) após 5 dias de cultivo utilizando bagaço da coroa de abacaxi. A utilização de resíduos agroindustriais é uma alternativa viável para a produção de FTase e a coroa de abacaxi um resíduo com pouca aplicação em processos industriais, o que favorece a redução nos custos da produção da enzima.

**Palavras-chave:** frutooligossacarídeos, frutosiltrasferases e resíduos agroindustriais.

### Fructosyltransferases production by *Aspergillus* sp. under submerged culture

### ABSTRACT

Fructooligosaccharides have broad industrial applications with prominence in the food industry. Fructooligosaccharides are used in the production of functional foods, since they have prebiotic characteristics. The fructosyltransferases (FTase) are able to produce inverted sugars and fructooligosaccharides, respectively. In this work, the aim was to produce of fructosyltransferase by *Aspergillus* sp. strain isolated from syrup fruits, evaluating both pure carbon sources and complex sources of agroindustrial residues. Among the pure carbon sources, raffinose was the pure carbon source that best induced the production of FTase enzymes (3.07 U/mL). The use of agroindustrial residues promoted higher FTase production (17.36 U/mL) after 5 days of cultivation using pineapple crown. The use of agroindustrial residues is a viable alternative for the production of FTase and the pineapple crown is a residue with little application in industrial processes, which favors the reduction in the costs of the enzyme production.

**Key words:** Fructooligosaccharides; fructosyltransferases; agroindustrial residues

## INTRODUÇÃO

Frutosiltransferases são responsáveis pela produção de frutooligossacarideos (FOS). Estas enzimas atuam clivando as ligações  $\beta$ -1,2 de uma molécula de sacarose e realizando a transferência de uma molécula de frutose para um aceptor final. Este aceptor pode ser outra molécula de sacarose, gerando como produtos finais FOS e glicose (MUNIZ-MÁRQUEZ *et al.*, 2015). Os FOS apresentam uma gama de aplicações tanto para fins farmacêuticos como para diagnósticos. Também possuem funções nutritivas, como os oligômeros de frutano, que são formados por três unidades de frutose que se ligam a sacarose por ligações do tipo  $\beta$ -1,2. Os principais frutooligossacarideos produzidos são, 1-kestose, nistose e 1-fructofuranosilnistose (GANAE; GUPTA, 2014).

Frutosiltransferases podem ser produzidas por bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Entre os fungos filamentosos, o gênero *Aspergillus* possui grande aplicação em processos fermentativos visando a produção destas enzimas devido sua adaptação para se desenvolver em ambientes ricos em compostos sacarolíticos (KULSHRESTHA *et al.*, 2013). Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de frutosiltransferase por uma linhagem de *Aspergillus* sp. isolada de frutos de pêssego em calda, utilizando fontes de carbono puras e resíduos agroindustriais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Microrganismos e condições de cultivo**

A linhagem de *Aspergillus* sp. foi isolada de frutos de pêssegos em calda e mantida em meio batata-dextrose-ágar. A linhagem foi reativada em tubos inclinados contendo o mesmo meio de cultivo por 3 dias, a 30°C. Uma suspensão de esporos de  $10^6$  esporos/mL foi preparada e 1 mL da suspensão foi utilizada para inocular os meios de cultivo. Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 20 mL de meio de Vogel (VOGEL, 1956), suplementado com 1% de fonte de carbono e 0.2% de extrato de levedura. O pH foi ajustado para 6,0. Os meios foram esterilizados em autoclave e após inoculados foram mantidos por 5 dias, a 28°C e 180 rpm.

### **Suplementação com fonte de carbono pura**

Os cultivos foram preparados adicionando-se 1% (m/v) de fontes de carbono puras: frutose, glicose, rafinose, celulose, celobiose, sorbitol, inulina, sacarose, maltose, lactose e xilose para avaliar as características indutiva ou constitutiva da enzima.

### **Suplementação com resíduos agroindustriais**

Os cultivos foram preparados adicionando 1% (m/v) dos seguintes resíduos agroindustriais: bagaço da coroa de abacaxi, farinha de batata doce, bagaço de cana de açúcar, sabugo de milho, casca de mandioca, casca de soja, farelo de soja, palha de milho, casca de bacaba, sorgo e farelo de trigo. Os cultivos foram realizados nas mesmas condições anteriores, no período de 3 e 5 dias.

### **Atividade enzimática**

A atividade de FTase foi realizada seguindo a metodologia descrita por (RAWAT *et al.*, 2015). Formulou-se uma solução de sacarose 20% com tampão acetato de sódio em pH 5,0. Desta solução pipetou-se 400 µL em tubos de ensaio. A reação foi iniciada com a adição de 100 µL do extrato proteico nos tubos contendo a solução de sacarose. Os tubos foram mantidos em banho maria a 50°C por 1 hora. Para interromper a reação ferveu-se a mesma por 10 minutos em temperatura de 90°C. Em seguida, 10 µL da solução reagida foram pipetados em tubos contendo 1 ml da solução de GOD-POD (glicose oxidase peroxidase) e levou-se novamente ao banho maria a uma temperatura de 37 °C por 10 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 510 nm. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade enzima que libera um micromol de produto por minuto de reação.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Efeito de fontes de carbono puras**

Na Tabela 1 são apresentados os resultados para a produção de frutosiltransferase (FTase). O uso de rafinose como fonte de carbono promoveu uma produção de 3,07 U/ml, enquanto que a inulina de 1,47 U/ml. O rendimento e a produtividade destas fontes de carbono foram 143,34 U/g e 0,24 U/), respectivamente.

**Tabela 1.** Fontes de carbono puras usadas para a produção Ftases por *Aspergillus* sp.

Fonte de Carbono	Peso seco (g/L)	FTase U/ml
Inulina	6,68	1,47
Lactose	6,30	0,16
Frutose	5,27	0,40
Glicose	5,61	0,92
Xilose	6,02	0,45
Cellobiose	6,21	0,54
Maltose	6,27	1,09
Sorbitol	6,56	0,54
Glicerol	3,64	0,82
Rafinose	4,51	3,07
Celulose	9,51	0,17
Sacarose	6,79	0,47

Nunes et al. (2013) demonstram resultados onde a inulina obteve o melhor resultado como indutor na síntese desta enzima a partir de *E. nidulans*, já para *Aspergillus nidulans* a sacarose se destacou como melhor fonte de carbono. Rustiguel et al (2015) avaliaram a produção de invertase por *Aspergillus phoenicis*, com três tipos de fontes de carbono pura, glicose, sacarose e rafinose, com destaque para a rafinose.

### **Efeito de fontes de carbono complexas**

A Tabela 2 apresenta valores para produção de FTase após 3 e 5 dias de cultivo, bem como a produção de biomassa fúngica. A maior produção de FTase foi observada utilizando coroa de abacaxi após 3 e 5 dias de cultivo (13,38 U/mL e 17,36 U/mL, respectivamente). O farelo de trigo foi a segunda melhor fonte de carbono para a produção de FTase após 5 dias de cultivo (14,42 U/mL), seguido da farinha de batata doce (12,19 U/mL). O bagaço de cana de açúcar promover a maior produção de FTase após 3 dias de cultivo (11,54 U/mL).

**Tabela 2.** Resíduos agroindustriais usados para a produção de FTases por *Aspergillus* sp.

Fonte de carbono	3 dias		5 dias	
	Biomassa (g/L)	U/ml	Biomassa (g/L)	U/ml
Coroa de abacaxi	6,70	13,38	7,88	17,36
Farinha de Batata doce	5,24	4,28	5,76	12,19
Farelo de soja	5,61	9,40	5,21	9,82
Casca de bacaba	9,80	0,12	9,99	0,80
Sabugo de milho	9,04	9,47	9,08	10,19
Farelo de trigo	6,47	9,00	6,78	14,42
Casca de soja	9,67	0,12	10,57	1,21
Bagaço de cana-de-açúcar	9,10	11,54	9,93	9,57
Sorgo	5,71	3,52	6,48	5,92
Casca de mandioca	6,78	4,60	6,34	5,61
Palha de milho	10,98	0,29	11,63	3,25

Muniz-Marquez et al. (2016) realizaram estudos para obtenção de FTases por *A. oryzae*, onde também se analisou o melhor tempo para produção em intervalos de 2 dias. O melhor tempo de cultivo foi de 42 horas. O meio de cultivo utilizado no artigo foi água mel que é um líquido rico em açúcares, que é extraído de uma planta conhecida como Maguey originária do México, a fermentação foi conduzida em estado sólido. Mussato e Teixeira (2010) avaliaram a produção de FTase por *A. japonicus* em fermentação em estado sólido, onde foram testadas 3 diferentes fontes de carbono: sabugo de milho, café sobreiro e silverskin. O melhor resultado obtido no trabalho foi para o sabugo de milho.

## CONCLUSÕES

A rafinose foi a fonte de carbono pura que melhor induziu a produção das enzimas de FTase por *Aspergillus* sp. PC-4. As fontes de carbono complexas alcançaram valores muito superiores as fontes de carbono puras, sendo a alternativa mais viável para obtenção de tais enzimas, o que é interessante por se tratarem de resíduos agroindustriais que normalmente seriam descartados, podendo diminuir os custos da produção em larga escala que normalmente é elevado. O bagaço de abacaxi se mostrou uma boa fonte de carbono para produção de FTases. O melhor tempo de cultivo para a FTase é de 5 dias.

## REFERÊNCIAS

- GANAEI, M. A.; GUPTA, U. S. Recycling of cell culture and efficient release of intracellular fructosyltransferase by ultrasonication for the production of fructooligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, v. 110, p. 253–258, 2014.
- KULSHRESTHA, S. et al. Invertase and its applications - A brief review. *Journal of Pharmacy Research*, v. 7, n. 9, p. 792–797, 2013.
- MUNIZ-MÁRQUEZ, D. B. et al. Enhancement of fructosyltransferase and fructooligosaccharides production by *A. oryzae* DIA-MF in Solid-State Fermentation using aguamiel as culture medium. *Bioresource Technology*, v. 213, p. 276–282, 2015.
- MUSSATTO, S. I.; TEIXEIRA, J. A. Increase in the fructooligosaccharides yield and productivity by solid-state fermentation with *Aspergillus japonicus* using agro-industrial residues as support and nutrient source. *Biochemical Engineering Journal*, v. 53, n. 1, p. 154–157, 2010.
- NUNES, J. et al. Production of Invertases by Anamorphic (*Aspergillus nidulans*) and Teleomorphic (*Emericela nidulans*) Fungi under Submerged Fermentation Using Rye Flour as Carbon Source. v. 2013, n. September, p. 421–429, 2013.
- RUSTIGUEL , C. B.; JORGE , J. A.; GUIMARÃES , L . H. S. Characterization of a thermo -tolerant mycelial fructofuranosidase from *Aspergillus phoenicis* under submerged fermentation using wheat bran as carbon source . *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 4, n. 3, p. 362–369, 2015.
- VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). *Microbiology Genetic Bulletin*, vol. 13, p. 42–43, 1956.

## Prospecção química de *Nodulisporium sp*: otimização das condições de cultivo

Iatã do Carmo Mendonça<sup>1\*</sup>; Alana Evangelista Honório<sup>1</sup>; Dulce Helena Siqueira Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. \*e-mail: iata.mendonca@hotmail.com

### RESUMO

Considerando a variedade de compostos encontrados em produtos de origem natural, o estudo da biodiversidade de um país é de interesse tanto científico quanto econômico. Dessa forma um melhor conhecimento dos ecossistemas marinhos é essencial para o desenvolvimento de diversas áreas da ciência, já que estes apresentam biodiversidade comparável às florestas tropicais. Os organismos marinhos exibem características bioquímicas diferenciadas apresentando grande potencial para bioprospecção, levando possivelmente a descoberta de novas substâncias com atividades biológicas, importantes para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. As algas vermelhas por exemplo destacam-se dentre os seres aquáticos, sendo conhecidas como as maiores produtoras de compostos halogenados, apresentando diversos metabólitos secundários com atividades biológicas. Assim como muitos organismos, estas algas podem apresentar relação de simbiose com fungos, conhecidos como endofíticos, sendo estes também uma importante fonte de substâncias bioativas. Levando em consideração a importância do estudo de organismos marinhos e os estudos realizados anteriormente pelo grupo de pesquisa, este trabalho apresentou como objetivo aprofundar a prospecção química do fungo endofítico do gênero *Nodulisporium*, isolado anteriormente da alga vermelha *Asparagopsis taxiformis*, buscando otimizar a produção de dois metabólitos secundários de interesse, a N-(2-feniletil)acetamida e o (2E,6E)Nona-2,6,8-trieno-4,5-diol através da variação de alguns fatores na metodologia utilizada para o crescimento do mesmo. Assim pode-se observar após análises dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência e comparação com um padrão, constituído por uma mistura das substâncias de interesse, que o extrato obtido pelo cultivo do fungo em meio de malte por 28 dias apresentou maior produção dos compostos desejados.

**Palavras-chave:** Fungos, marinho, Otimização, N-(2-feniletil)acetamida, (2E,6E)Nona-2,6,8-trieno-4,5-diol.

**Chemistry prospection of *Nodulisporium sp*: growth conditions optimization**

### ABSTRACT

Seeing the variety of compounds found in natural products, study the biodiversity of our country have great matter on scientific and economic field. Therefore, research marine ecosystems it is essential to development of many areas, since the marine environment has a biodiversity comparable to tropical forests.

Moreover, marine organisms exhibit distinct biochemistry character, showing great potential for bioprospecting, leading possibly to the development of new therapeutic compounds. The red algae for example stand out as producer of halogenated substances, with many biological active secondary metabolites. Besides that, as many organisms, algae could exhibit a symbiotic relationship with endophytic fungus, there are also important as source of bioactive compounds. Seeing the importance of marine organisms research, and the previous studies of this research group, this work have as target increase the chemistry prospection of the endophytic fungus *Nodulisporium* sp, isolated previous from the red algae *Asparagopsis taxiformis*, looking for optimize the production of two secondary metabolites diversifying some factors of the methodology used on the fungus growth. So it can be noted by the analysis of the extracts in High-performance liquid chromatography and using a pattern, made by the mixing of the two compounds of interest, that the extract obtained of the fungus growth in malt for 28 days show better results.

**Keywords:** Fungus, marine, optimization, N-(2-phenylethyl)acetamide, (2E,6E)Nona-2,6,8-triene-4,5-diol.

---

## INTRODUÇÃO

A grande diversidade estrutural e bioatividade de substâncias obtidas a partir de produtos de origem natural representam fatores importantes para seu uso no desenvolvimento de fármacos e outros bioproductos. (Bolzani, 2016)

Além das plantas, outros organismos como fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias são também fontes importantes de substâncias biologicamente ativas, sendo que a maioria dos fármacos em uso clínico são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de ou inspirada em produtos naturais. (Barreiro and Bolzani, 2009). Dentre estes organismos as algas recebendo destaque devido a sua biodiversidade, sendo comparável à observada nas florestas tropicais, esta riqueza de espécies torna as algas fonte de uma enorme variedade de estruturas químicas com potencial elevado para descoberta de novos fármacos. (Machado et al., 2010).

As algas vermelhas (*Rhodophyta*) por exemplo são reconhecidas como as maiores produtoras de substâncias halogenadas no meio marinho, destacando-se como uma fonte de novos produtos naturais. Amplamente distribuídas em mares temperados-quentes e tropicais do mundo, o gênero compreende mais de 130 espécies morfologicamente complexas. (Pereira, 1999)

Juntamente aos organismos marinhos os fungos endofíticos, encontrados em simbiose com plantas e algas, tem-se destacado na produção de metabólitos bioativos. Sabe-se que alguns destes seres são capazes de produzir metabólitos característicos de

seus hospedeiros, sendo uma propriedade importante para a utilização de produtos naturais já que pode levar a redução da coleta de plantas ou algas que apresentem crescimento lento ou ameaça de extinção. Além disso a fermentação microbiana como meio de produção de substâncias bioativas apresenta muitas vantagens sobre a utilização de plantas ou algas, em vista da possibilidade de variações nas condições de cultivo, buscando otimizar vias biossintéticas desejadas, maior facilidade em aumentar a produção e melhor resposta a técnicas rotineiras de cultura. (Specian et al., 2015)

Diversas substâncias naturais de uso terapêutico já foram identificadas e isoladas de espécies de fungos, como por exemplo penicilinas e cefaloporinas, utilizadas como antibióticos, a mevinolina um agente redutor de colesterol, bleomicinas, daunorubicinas e análogos utilizados como agentes antitumorais, entre outras. Além disso os fungos filamentosos, grupo no qual estão incluídos os fungos endofíticos, têm como característica a capacidade de biossintetizar uma grande quantidade de metabólitos secundários, podendo ser 73% mais produtivo que outras classes de microrganismos. (Cafêu et al., 2005)

Em um trabalho realizado anteriormente no grupo de pesquisa a mestra Camila Souza Santos verificou a produção e identificou em mistura duas substâncias produzidas pelo fungo *Nodulisporium sp*, a N-(2-feniletil)acetamida e o (2E, 6E) Nonano-2,6,8-trieno-4,5-diol, moléculas importantes pois estudos envolvendo compostos semelhantes relataram atividades biológicas como antimicrobiana, no caso de algumas ariletilamidas (Maskey et al., 2002), e inibitória contra a enzima isocitrato-liase, antifúngica contra *cândida albicans* e citotóxica frente a células de carcinoma de cólon para alguns poliois alifáticos insaturados, isolados da bactéria *Streptomyces sp* (Bae et al., 2013). Porém, os compostos não apresentaram massa significativa, dificultando seu isolamento e impedindo a realização de testes biológicos. Com base nessas informações este trabalho visa identificar como variações no meio e no tempo de cultivo podem afetar a produção de metabólitos secundários, bem como das substâncias citadas a cima, buscando aumentar a produção das mesmas facilitando os estudos químicos e biológicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para realização do planejamento experimental as variáveis escolhidas foram: tempo de fermentação (7, 14, 21 e 28 dias) e meio de cultivo líquido pobre e rico em

nutrientes, respectivamente, (Czapeck e Extrato de Malte), totalizando 8 experimentos realizados em duplicata.

O fungo *Nodulisporium sp* foi cultivado em placas de Petri contendo PDA e incubada por 7 dias a 25°C, a fim de se obter maior massa micelar.

Após este período, 1/3 de cada placa foi inoculado em frascos de Erlenmeyers de 500 mL (5 cm diâmetro) contendo 200 mL de meio de cultivo, sendo mantidos sob temperatura de 25°C, em modo estático.

Ao final dos períodos de crescimento, separou-se o micélio do caldo fermentado através do processo de filtração a vácuo. O caldo foi submetido à três partições líquido/líquido com acetato de etila (AcOEt). Após evaporação do solvente foram obtidos os extratos brutos, que em seguida foram submetidos a etapa de preparo de amostra (clean-up). Todas as amostras foram preparadas na concentração 2 mg.ml<sup>-1</sup> e analisados por CLAE-DAD, visando obter os perfis químicos dos mesmos, podendo assim, comparar a produção metabólica do fungo em diferentes condições de crescimento.

As análises foram realizadas em coluna analítica Luna Phenomenex tipo octadecil silano (C-18) e eluição em gradiente H<sub>2</sub>O/MeOH (95:05→0:100) por 40 min., permanecendo nesta condição por mais 10 min., com fluxo de 1,0 mL/min. e comprimento de onda de 254 nm.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao analisarmos os resultados obtidos dos cultivos da linhagem *AT-02*, verificou-se que os perfis químicos dos extratos se mostraram semelhantes, apresentando diversos picos com mesmo tempo de retenção e espectros de UV/Vis (Figura 1). A principal diferença entre os extratos se deu quanto a intensidade dos picos. Ao observar, por exemplo, o pico eluido no tempo de retenção 31,5 minutos nota-se um aumento significativo na sua produção conforme aumentamos o tempo de fermentação, o que nos ajuda a confirmar que, a variação dos parâmetros propostos afeta consideravelmente a produção metabólica do micro-organismo em estudo.

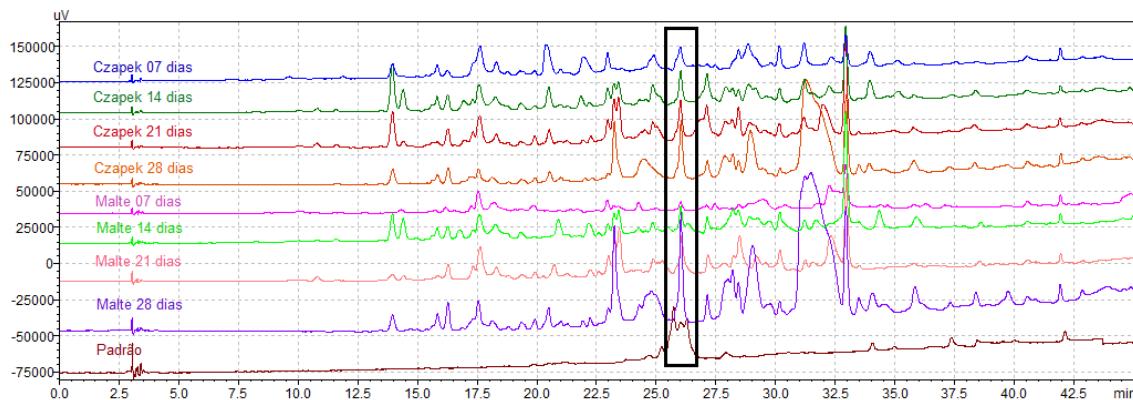


Figura 2: Cromatogramas correspondentes aos diferentes extratos obtidos pela variação do meio de cultivo e tempo de crescimento do fungo *Nodulisporium sp* e à mistura utilizada como padrão para identificação das substâncias de interesse.

A fim de verificar se houve produção/aumento dos compostos N-(2-feniletil) acetamida e (2E, 6E) Nona-2,6,8-trieno-4,5-diol, comparou-se os cromatogramas dos extratos com o da mistura das substâncias obtida no trabalho realizado anteriormente. Pode-se observar que a mistura eluiu em 16,03 minutos, sendo possível confirmar a presença dessas substâncias em todos os experimentos realizados além de significativas variações em relação a suas quantidades.

Assim, visando maior produção das substâncias de interesse, o cultivo do fungo em Extrato de Malte fermentado por 28 dias foi selecionado para o cultivo em escala ampliada de forma a evitar gastos desnecessários de tempo e material, poupando recurso e diminuindo o impacto ambiental da pesquisa.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que as diferentes metodologias utilizadas neste trabalho resultaram em variações na concentração e quantidade de metabolitos secundários produzidos, demonstrando assim a importância de verificar as melhores condições de cultivo para cada micro-organismo. Além disso, foi possível confirmar que o uso de planejamento experimental é uma ferramenta excelente para otimização da produção de compostos bioativos de interesse com maior reprodutibilidade dos experimentos e melhora nos resultados obtidos. Estes resultados demonstram ainda a importância da investigação das algas marinhas e seus fungos associados, uma vez que estes ainda foram pouco estudados e podem trazer grandes avanços no âmbito da pesquisa brasileira.

**AGRADECIMENTO:** Biota, Capes, CEPID

## REFERÊNCIAS

- BAE, M., et al, 2013. Separacenes A–D, novel polyene polyols from the marine Actinomycete, *Streptomyces* sp. *Marine Drugs*, vol. 11, no. 8, pp. 2882-2893.
- BARREIRO, E. J. and BOLZANI, V. S., 2009. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova*, vol. 32, no. 3, pp. 679-688.
- BOLZANI, V. S., 2016. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. *Ciencia e Cultura*, vol. 68, no. 1, pp. 4-5.
- CAFÊU, M. C. et al, 2005. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). *Química Nova*, vol. 28, no. 6, pp. 991-995.
- MACHADO, F. L. da S. et al, 2010. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 20, no. 3, pp. 441-452.
- MASKEY, R. P., et al, 2002. Phytotoxic arylethylamides from limnic bacteria using a screening with microalgae. *Journal of Antibiotics*, vol. 55, no. 7, pp. 643-649.
- PEREIRA, R. C.; TEIXEIRA, V. L., 1999. Sesquiterpenos das algas marinhas *Laurencia lamouroux* (Ceramiales, Rhodophyta). 1. Significado ecológico. *Química Nova*, vol. 22, pp. 369-374.
- SPECIAN, V. et al, 2015. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. *Journal of Health Sciences*, vol. 16, no. 4, pp. 345-351.

## Caracterização da atividade tanásica produzida por fungos isolados da biomassa

Isabela Teresa Santos Corrêa<sup>1</sup>, Boutros Sarrouh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de São João del-Rei. E-mail: isabela.tscorrea@gmail.com

---

### RESUMO

O estudo da enzimologia abrange uma vasta gama de enzimas de origem animal e vegetal, contudo as de origem microbiana apresentam grande potencial para aplicação industrial, já que podem ser produzidas em larga escala, via processos fermentativos. Contudo, a produção destas exigem o isolamento e identificação de microrganismos capazes de produzir de forma eficiente o bioproduto de interesse. O objetivo deste trabalho foi obter a avaliação da atividade enzimática e caracterização da tanase produzida por *Fusarium* sp. e *Aspergillus* sp. isolados a partir da casca de café. As cepas foram cultivadas meio a fermentação submersa utilizando meio mineral suplementado com ácido tânico 1%, a 28°C e 180 rpm durante 10 dias. Em intervalos de 24 horas as amostras foram recolhidas para obtenção do extrato enzimático bruto. A quantificação foi feita meio a técnica de precipitação de proteína modificada e o sobrenadante foi lido a 260 nm. Uma unidade de enzima tanase equivale a 1  $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  de ácido gálico. Pelos resultados obtidos observou-se que, *Fusarium* sp. apresentou uma atividade tanásica de  $1,5 \pm 0,032 \text{ U/mL}$  após 8 dias de fermentação, enquanto *Aspergillus* sp. alcançou valor máximo de  $1,2 \pm 0,003 \text{ U/mL}$  após 5 dias. Por fim, foi feita a caracterização da enzima frente a diferentes variações de pH e temperatura, da cepa de melhor produtividade, obtendo melhor produção tanásica de  $1,88 \pm 0,009 \text{ U/mL}$  em pH ideal 5,0 e  $1,61 \pm 0,019 \text{ U/mL}$  em temperatura de 40°C. Então, conclui-se que tais fungos apresentam um potencial promissor para a produção da tanase, utilizada em diferentes processos biotecnológicos indústrias.

**Palavras-chave:** Tanase, Casca de café, *Fusarium* sp, *Aspergillus* sp.

---

### Characterization of the tannase activity produced by fungi isolated from biomass

### ABSTRACT

The study of enzymology encompasses a wide range of enzymes of animal and vegetable origin, but those of microbial origin present great potential for industrial application, since they can be produced in large scale, via fermentative processes. However, the production of these requires the isolation and identification of microorganisms capable of efficiently producing the bioproduct of interest. The objective of this work was to obtain the evaluation of the enzymatic activity and characterization of the tannase produced by *Fusarium* sp. and *Aspergillus* sp. isolated from the coffee husk. The strains were grown under submerged fermentation using mineral medium supplemented with 1% tannic acid at 28 °C and 180 rpm for 10 days. At 24 hour intervals the samples were collected to obtain the crude enzyme extract.

Quantification was done using the modified protein precipitation technique and the supernatant was read at 260 nm. One unit of enzyme tannase is equivalent to 1  $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$  of gallic acid. From the results obtained it was observed that, *Fusarium* sp. showed a tanase activity of  $1.5 \pm 0.032 \text{ U} / \text{mL}$  after 8 days of fermentation, while *Aspergillus* sp. reached a maximum value of  $1.2 \pm 0.003 \text{ U} / \text{mL}$  after 5 days. Finally, the enzyme characterization was performed against different pH and temperature variations of the best yield strain, obtaining a better tanase yield of  $1.88 \pm 0.009 \text{ U} / \text{mL}$  at ideal pH 5.0 and  $1.61 \pm 0.019 \text{ U} / \text{mL}$  at  $40^\circ\text{C}$ . Therefore, it is concluded that such fungi present a promising potential for the production of the tannase, used in different biotechnological processes industries.

**Keywords:** Tannase, Coffee husk, *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp.

---

## INTRODUÇÃO

Diversas técnicas e produtos biotecnológicos vem possuindo aplicações nas mais diferentes áreas como a da saúde, indústria, ambiente e agropecuária. As enzimas, por exemplo, são excelentes bioproductos que podem ser originados dos mais diversos tipos de animais, vegetais e micro-organismos, sendo utilizados nos mais variados processos biológicos existentes. A tanase mais especificamente é uma enzima que hidrolisa ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis, como o ácido tântico, gerando glicose e ácido gálico (Battestin, 2004).

Na natureza encontra-se uma ampla gama de fungos capazes de produzir enzimas de interesse biotecnológico, tais fungos permitem o isolamento e seleção de linhagens fúngicas com grande potencial biotecnológico. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi a avaliação da atividade enzimática da tanase produzida por fungos filamentosos isolados a partir da casca de café, bem como a caracterização da mesma frente a diferentes valores de pH e temperatura.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Produção de extratos enzimáticos por fermentação submersa

As colônias dos fungos previamente isolados e inoculados em placas foram inoculados retirando discos com diâmetros de 7 mm de cada placa e colocados em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido mineral e ácido tântico 1% (p/v) como única fonte de carbono. O meio mineral foi composto de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,7% (p/v),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,4% (p/v),  $\text{MgSO}_4$  0,02% (p/v),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1% (p/v) e extrato de levedura 0,06% (p/v) o qual foi previamente autoclavado a 120 atm. por 15 min. Os frascos foram colocados em um agitador sob temperatura de  $28^\circ\text{C}$  e rotação de 180

rpm. As amostras da fermentação foram coletadas com o auxílio de uma micropipeta, em intervalos de, aproximadamente, 24h durante 10 dias de fermentação. As mesmas foram transferidas para um microtubo tipo eppendorf, e centrifugadas a 10.000 xg durante 5 min. O extrato enzimático bruto foi obtido a partir do sobrenadante e encaminhado para análise posterior.

### **Quantificação da atividade da enzima tanase**

A atividade tanásica dos extratos enzimáticos brutos foi quantificada utilizando a técnica de precipitação de proteína modificada (Deschamps; Otuk; Lebeault, 1983). A mistura da reação foi formada por 250 µL de ácido tânico 1% (p/v) e 250µL do extrato enzimático da cultura em tampão de fosfato de pH 6,0. A mistura foi incubada a 40°C durante 30 min em um banho Maria. A reação foi parada adicionando uma solução de 1 mL de 2% (c/v) de albumina de soro bovino (BSA) antes da incubação. Todos os tubos foram conservados à temperatura ambiente por 20 min e centrifugados a 3.000 xg durante 20 min. Posteriormente, a leitura da absorbância do sobrenadante foi feita em espectrofotômetro (Bioespectro SP 22®), a 260 nm. As concentrações do ácido gálico, produzido pela hidrólise do ácido tânico, foram calculadas utilizando uma curva padrão de ácido gálico previamente construída. Uma unidade de enzima (U) corresponde a liberação de 1 µmol de ácido gálico por mL por min sob condições padrões de ensaio. Todos os experimentos foram realizados em duplícata.

### **Caracterização da enzima tanase produzida pelos fungos isolados.**

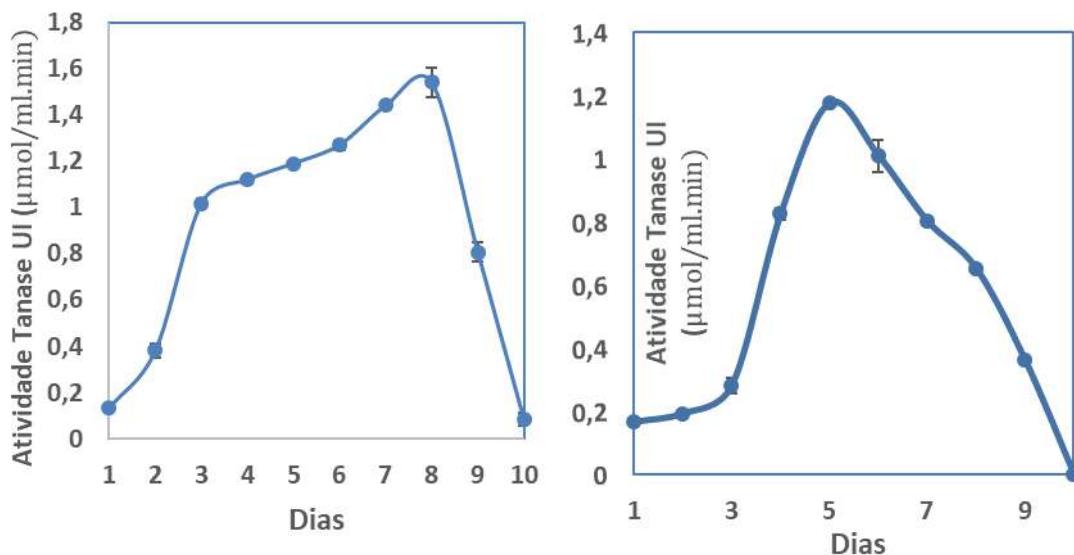
#### Efeito do pH e temperatura na atividade enzimática

A especificidade da enzima foi estudada frente a diferentes valores de pH entre 4,0 e 8,0. A variação do pH foi realizada utilizando os tampões fosfato-fosfato a 0,2M para a caracterização da enzima. O ensaio foi realizado conforme descrito no item da quantificação da enzima, alterando apenas o pH do tampão na qual o ensaio foi incubado.

Por sua vez, a atividade da enzima tanase foi avaliada nas temperaturas de 30 a 60°C. Analogamente, o ensaio foi realizado conforme descrito no item da quantificação da enzima, alterando apenas a temperatura na qual o ensaio foi incubado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método da fermentação submersa foi utilizado para os estudos cinéticos, tendo como parâmetros o crescimento celular e a quantidade de enzima produzida pelos microrganismos. Iniciou-se o experimento determinando a atividade da enzima tanase dos fungos *Fusarium* sp. e *Aspergillus* sp. presentes no meio de crescimento. No perfil da curva de crescimento dos fungos (Figuras 1), observa-se uma rápida adaptação dos mesmos no meio líquido enriquecido com ácido tânico 1%.



**Figura 1:** Produção de tanase por *Fusarium* sp. e *Aspergillus* sp. em função do tempo de cultivo.

Segundo a Figura 1 observou-se que, a produção da enzima tanase pelo fungo *Fusarium* sp. foi máxima após 8 dias de fermentação, sendo que a sua atividade enzimática foi de  $1,5 \pm 0,032$  U/mL. Da mesma forma, a máxima atividade de tanase produzida pelo fungo *Aspergillus* sp. foi alcançada após 5 dias do cultivo, apresentando um valor de  $1,2 \pm 0,003$  U/mL. A partir dos resultados obtidos observou-se que, o fungo *Fusarium* sp. obteve uma atividade tanásica 25% maior que a atividade máxima observada no caso do fungo *Fusarium* sp.

Conforme apresentado pela literatura, Riul, (2011) relatou que os fungos que apresentaram maiores produções enzimáticas extracelulares foram *Aspergillus phoenicis* com 0,42 U/mL e *Aspergillus ochraceus* com 0,39 U/mL. Segundo Costa, (2012) *Aspergillus* sp. apresentou por fermentação em estado sólido atividade de 1,44 U/mL em folhas de jamum e 0,36 U/mL em casca de café.

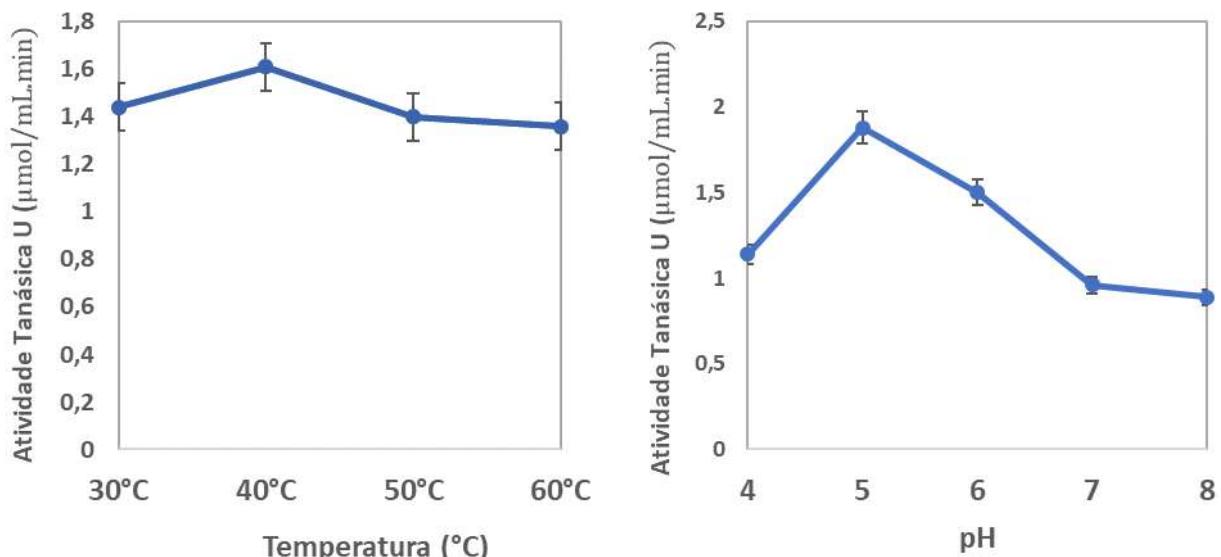
Posteriormente foi feito a caracterização enzimática do fungo de gênero

*Fusarium* sp., a cepa que mostrou uma melhor produção da enzima tanase. Os dados obtidos sob diferentes valores de pH e temperatura nos ensaios estão representados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Atividade enzimática da tanase obtida a partir do fungo *Fusarium* sp. em diferentes valores de pH e temperatura.

pH	Atividade Tanásica (U/mL)	Temperatura (°C)	Atividade tanásica (U/mL)
4	1,14±0,013	30	1,44±0,006
5	1,88±0,009	40	1,61±0,019
6	1,50±0,011	50	1,40±0,021
7	0,96±0,019	60	1,36±0,012
8	0,89±0,023	—	—

A Figura 2 descreve a influência do pH e temperatura na atividade enzimática da tanase.



**Figura 2:** Caracterização da tanase em distintas variações de temperatura e pH, respectivamente.

Pode-se observar analisando a Tabela 1 e a Figura 2, que a enzima tanase presente no extrato enzimático apresentou atividades máximas de  $1,88 \pm 0,009$  U/mL e  $1,61 \pm 0,019$  U/mL em pH ótimo de 5,0 e temperatura ótima de 40°C, respectivamente.

Segundo Lekha e Lonsane (1997), as tanases são proteínas ácidas com pH ótimo em torno de 5,5. Da mesma forma Sabu et al. (2005) também descreveram um pH ótimo inicial de 5,5 para a produção de tanase por *Aspergillus niger* ATCC 16620. Por sua vez, em relação a temperatura, Pinto (2003) observou temperatura ótima entre 32 e 40°C utilizando *Aspergillus niger* 3T5B8. Da mesma forma, uma temperatura ótima de 40°C

foi observada em *Aspergillus caespitosum*, *Penicillium charlesii* e *Penicillium crustosum*.

## CONCLUSÕES

Conclui-se que os fungos *Fusarium* sp. e *Aspergillus* sp., isolados de uma fonte lignocelulósica, a casca de café, apresentaram uma atividade tanásica promissora após 8 e 5 dias de cultivo, com atividade tanásica de  $1,5 \pm 0,032$  e  $1,2 \pm 0,003$  U/mL respectivamente. Visando alcançar condições ótimas de atividade, a caracterização da enzima em estudo exibiu pH ótimo de 5,0 com atividade de  $1,88 \pm 0,009$  U/mL e temperatura de 40°C com atividade de  $1,61 \pm 0,019$  U/mL.

## REFERÊNCIAS

BATTESTIN, V., 2004. *Produção, purificação, caracterização e aplicação da tanase de Paecilomyces Variotii*. Campinas. Universidade Estadual de Campinas. 99 p. Tese de Doutorado em processos enzimáticos.

COSTA, P. N., 2012. *Otimização da produção de tanase por Aspergillus sp. em fermentação em estado sólido (FES)*. Lavras. Universidade Federal de Lavras. 73 p. Dissertação de mestrado em enzimologia.

DESCHAMP, A., OTUK, G. and LEBEAULT, J. 1983. *Production of tannase and degradation of chestnut tannin by bacteria*. J. Ferment. Technol. 61, 55-59. Available from: [http://scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000074&pid=S1516-8913199900030001400007&lng=en](http://scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000074&pid=S1516-8913199900030001400007&lng=en)

RIUL, A. J., 2011. *Purificação e Caracterização Bioquímica de Tanases Produzidas pelo Fungo Filamentoso Aspergillus phoenicis*. Araraquara. Universidade Estadual Paulista 116 p. Dissertação de Mestrado em biotecnologia.

LEKHA, P.K.; LONSANE, B.K., 1997. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Advances in Applied Microbiology*, v. 44. 215-260 p.

PINTO, G.A.S., 2003 *Produção de tanase por Aspergillus niger*. Rio de Janeiro. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 208 p. Tese de Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

**Produção de  $\beta$ -Glicosidase por bactérias das amêndoas do *Theobroma cacao*.**

Jean Maurício Leão Pinheiro<sup>1</sup>; Gyorgy Ronaldo Sampaio Ferreira<sup>2</sup>; Claudio David Mendes Gibson<sup>3\*</sup>  
José Messias Perdigão do Santos Junior<sup>4</sup>;

<sup>1</sup>Universidade Federal do Pará. ganpinheiro88@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro.

<sup>3</sup>Universidade da Amazônia.

<sup>4</sup>Universidase Federal do Pará

---

### **RESUMO**

Atualmente pouco se tem conhecimento da detecção de enzima  $\beta$ -glicosidase utilizando o cacau (*Theobroma cacao*) como fonte. O objetivo dessa trabalho é avaliar o potencial biotecnológico das bactérias lácticas do cacau de diferente mesorregiões do estado do Pará e fazer a detecção da enzima de diferentes tempos de fermentação. Para o isolamento bacteriano utilizou-se amostras do 2º ao 7º dia de fermentação e a inoculação foi realizada em meio de cultura seletivo MRS ágar 36°C/48h. Após o isolamento foram realizados testes de Gram e catalase para caracterização da bactérias. Para a detecção da enzima, transferiu-se a colônias para placas de Petri contendo LB ágar com 0,1% de esculina sesquihidratada, 0,05% de citrato de ferro (III) amoniacal e 2% de ágar. A cada 24h era analisado a produção de enzima, que se dá pela formação de um halo negro envolta da colônia bacteriana, devido a hidrolise da esculina. Apenas 28,8% das colônias achadas, produziram o halo de BGL sendo a bactéria de número 59 de maior halo, com 6,4 cm de diâmetro.

**Palavras-chave:** cacau, enzima, forasteiro, biotecnologia.

---

**Detection of  $\beta$ -Glycosidase produced by bacteria isolated during the fermentation of *Theobroma cacao* almond.**

### **ABSTRACT**

Currently little is known about the detection of  $\beta$ -glucosidase enzyme using cocoa (*Theobroma cacao*) as the source. The objective of this work is to evaluate the biotechnological potential of the lactic acid bacteria of cacao from different

mesoregions of the state of Pará and to detect the enzyme of different fermentation times. For the bacterial isolation samples were used from the 2nd to the 7th day of fermentation and the inoculation was carried out in medium of selective culture MRS agar 36°C / 48h. After isolation, Gram and catalase tests were performed to characterize the bacteria. For detection of the enzyme, colonies were transferred to Petri dishes containing LB agar with 0.1% sesquihydrate esculin, 0.05% ammoniacal iron (III) citrate and 2% agar. Every 24 hours the production of enzyme was analyzed, which occurs by the formation of a black halo enveloped by the bacterial colony, due to the hydrolysis of esculin. Only 28.8% of the colonies found produced the halo of BGL being the bacterium of number 59 of greater halo, with 6.4 cm of diameter.

**Keywords:** cocoa, enzyme, forasteiro, biotechnology

---

## INTRODUÇÃO

As bactérias lácticas na fermentação do cacau, são responsáveis por degradar o açúcar da polpa e converter ácido cítrico e málico em ácido láctico (Mozzi et al., 2010). E são constituídas por um grupo de bactérias gram positivas, na forma de cocos ou bacilos, catalase negativa não patogênica e anaeróbias facultativas (Axelsson, 2004).

A  $\beta$ -Glicosidase ( $\beta$ -D-glucoside glucohidrolase, EC 3.2.1.21) pode ser encontrada em bactérias, fungos, plantas e animais. Esta enzima exerce funções fundamentais em muitos processos biológicos. Em microorganismos celulolíticos, o BGL está envolvido na indução da celulase e na hidrólise da celulose (Tomme et al., 1995). Normalmente, todos os microorganismos celulolíticos são produtores de  $\beta$ -Glicosidases. A BGL possuem ampla especificidade de substrato e exercem papéis indispensáveis à natureza, incluindo a fragmentação de flavonóides glicosilados em plantas (Singhania and Patel, 2017).

O presente trabalho teve como objetivo isolar as bactérias encontradas nas amêndoas de cacau de 3 regiões do Pará e em 7 dias de fermentação. A caracterização foram segundo sua morfologia e coloração de Gram e teste de catalase e sua produção de enzimas como a  $\beta$ -glicosidase em placa.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente estudo foram coletados sementes de cacau da variedade Forasteiro no período de agosto à outubro de 2015, oriundos de três municípios

paraenses distintos: Placas que está situado na mesorregião do Baixo Amazonas, Medicilândia situado na mesorregião da Transamazônica e Tomé-Açú situado na mesorregião do Nordeste Paraense.

A **Fermentação** ocorreu logo após a quebra dos frutos de cacau e remoção das sementes e da polpa. Em seguida a polpa foi homogeneizada de forma manual para obter a massa de cacau. Após esse processo, preencheu-se o local de fermentação comumente conhecido como cocho, onde ocorreu a fermentação por uma semana.

Realizaram-se as retiradas de 300g de amostras em todos os dias de fermentação de forma asséptica e armazenadas embalagem de plástico estéril sob refrigeração a - 18°C. Porém o primeiro revolvimento ocorreu a partir 48 horas de fermentação para escoação do mel e aeração.

TABELA 1. Tempo de fermentação

Revolvimento	Descrição	Fermentação
1°	48 h após o preenchimento do cocho	3° dia
2°	24 h após o primeiro revolvimento	4° dia
3°	24 h após o segundo revolvimento	5° dia
4°	24 h após o terceiro revolvimento	6° dia
5°	24 h após o quarto revolvimento	7° dia

Fonte: elaborado pelo autor

Após a realização das 7 coletas de diferentes dias de fermentação, a amostra foi transportada até Belém-PA e as análises foram desenvolvidas no Centro de Valorização Agroalimentar e Compostos Bioativos da Amazônia (CVACBA).

Para o isolamento das bactérias ácido lácticas, foram necessário 25g do cacau e se realizou a diluição seriada até  $10^{-7}$  e em seguida, aplicou-se a técnica de semeadura por superfície em meio ágar MRS transferindo-se 0,1 ml de cada diluição e homogeneizada com alça de Drigalski. Para a incubação, utilizou-se jarras de anaerobiose onde se armazenou as placas de Petri com o meio MRS Ágar e juntamente com o kit de anaerobiose à 36 °C por 48h. (Papalexandratou et al., 2011).

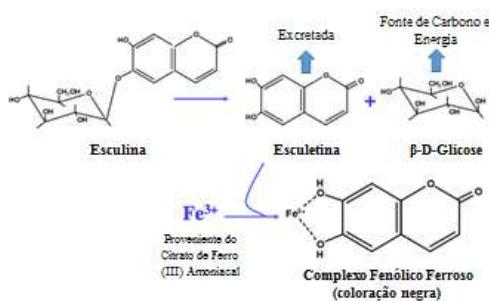
**Coloração diferencial de Gram.** Preparou-se um esfregaço da cultura da seguinte forma: Sobre uma lâmina de vidro colocou-se uma gota da solução de água glicerinada à 10%, onde emulsionou-se uma alçada da colônia com o auxílio da alça de platina. A fixação é feita passando a lâmina de brevemente sobre a chama do bico de Bünsen até secar (Silva et al., 2001).

Gram Negativa – As células são descolorizadas por solução de álcool-acetona e assumem uma cor rosa à cor vermelha contrastada com o corante safranina. Gram Positiva – As células retêm o corante cristal violeta e permanecem roxas a azul-escuro (Woodland, 2004).

O **Teste de catalase** foi realizado, retirando-se as colônias com auxílio de uma alça metálica e homogeneizar em solução de Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a 3% (v/v) em uma lâmina de vidro. Formação de bolhas de gás indica reação de catalase positiva, isso acontece quando o oxigênio molecular é libertado na reação. As bactérias lácticas não reagem com o Peróxido de Hidrogênio, isto é, não possuem a enzima catalase (Peh and Pyah, 2014).

**Para a detecção de bactérias produtoras de  $\beta$ -Glicosidase.** Após o isolamentos das colônias, transferindo do meio MRS e inoculando em placas de Petri contendo ágar LB (Luria-Bertani). A composição do meio incluiu 0,1% de esculina sesquihidratada, 0,05% de citrato de ferro (III) amoniacal e 2% de ágar. Em seguida, para o crescimento bacteriano, as placas foram incubadas em estufa à temperatura de 36° C. A produção de BGL é identificada pelo surgimento de halo escuro ao redor da colônia. Isso se deve à clivagem enzimática da esculina, conforme a reação ilustrada na figura 1. A avaliação do desenvolvimento da colônia e formação de halo foi realizada a cada 24 horas de incubação.

FIGURA 1. Reação de hidrólise da Esculina, aplicada para detecção de atividade enzimática da  $\beta$ -glicosidase.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 52 colônias encontradas, apenas 15 colônias (28,8%) distribuídas em 3 municípios diferente, hidrolisaram a esculina e evidenciada através dos halos de  $\beta$ -glicosidases, no qual mediou-se o diâmetro. As tabelas 2, 3 e 4 mostram a detecção de halo da enzima das 3 regiões distintas, produzidas por bactérias do cacau. De todos os

halos formados a maioria foi por bactéria com o formato de bacilo e apenas uma com o formato cocos.

TABELA 2. Município de Tomé-Açú

<b>Dia de fermentação</b>	<b>MO</b>	<b>Catalase</b>	<b>Gram</b>	<b>Morfologia</b>	<b>Crescimento (horas)</b>	<b>BGL (cm)</b>
<b>3º</b>	3	-	+	Bacilo	48	2,1
	4	-	+	Bacilo	24	2,3
<b>4º</b>	10	+	-	Bacilo	48	2,6
	18	+	-	Cocos	48	1,3

TABELA 3. Município de Medicilância

<b>Dia de fermentação</b>	<b>MO</b>	<b>Catalase</b>	<b>Gram</b>	<b>Morfologia</b>	<b>Crescimento (horas)</b>	<b>BGL (cm)</b>
<b>2º</b>	31	-	+	Bacilo	48	1,5
	32	-	+	Bacilo	24	1,5
	33	-	+	Bacilo	24	1,3
	36	-	+	Bacilo	48	1,5
	37	-	+	Bacilo	48	2,2
<b>4º</b>	42	-	+	Bacilo	24	3,6

TABELA 4. Município de Placas

<b>Dia de fermentação</b>	<b>MO</b>	<b>Catalase</b>	<b>Gram</b>	<b>Morfologia</b>	<b>Crescimento (horas)</b>	<b>BGL (cm)</b>
<b>4º</b>	59	-	+	Bacilo	24	6,4
	60	-	+	Bacilo	24	3,1
	61	-	+	Bacilo	24	1,7
<b>7º</b>	75	-	+	Bacilo	24	2,5
	76	-	+	Bacilo	24	2,3

Todas as regiões tiveram bactérias formadoras de BGL no 4º dia de fermentação do cacau. Em relação a coloração de Gram, a maioria encontrada foi de Gram negativo e o formato de bacilo, sendo características de *Lactobacillus*. A bactéria de número 59 demonstrou ser excelente produtora da enzima BGL, onde, em 24 horas produziu um halo de 6,4 cm de enzima, evidenciado na figura 2.

FIGURA 2. Presença/ausência da hidrolise da esculina



## CONCLUSÕES

Atualmente existem poucos estudos que avaliem a produção da enzima BGL por bactérias ácido lácticas ou que associem a produção dessa enzima com o cacau.

De acordo com os resultados, demonstrou-se ter potência biotecnológico e sendo possível produzir a enzima  $\beta$ -Glicosidase a partir de bactérias ácido-lácticas do cacau. Sendo essa por sua vez, uma bactéria muito resistente a pH baixos.

## REFERÊNCIAS

- AXELSSON, L., 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S; LAHTINEN, S.; OUWEHAND A.C. and WRIGHT A.V. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. New York: Marcel Decker. 30 p.
- MOZZI F., RAYA R. R. and VIGNOLO G. M., 2010. *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*. Wiley-Blackwell, Ames, IA. 383 p.
- PEH, K. K and PYAR, H., 2013. Characterization and identification of (*Lactobacillus acidophilus*) using biolog rapid identification system. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6v. pp. 189-193.
- PAPALEXANDRATOU, Z. VRANCKEN, G. and DE VUYST, L., 2011. *Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria*. Food Microbiol. pp. 964-973.
- SILVA, N; JUNQUEIRA, V. C. A and SILVEIRA, N. F. A., 2001. *Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos*. São Paulo: Editora Varela, 2 ed. 317 p.
- SINGHANIA, R.R and PATEL, A.K., 2017. Capítulo 5: Industrial Enzymes: b-Glucosidases. In. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Edited by Ashok Pandey, Sangeeta Negi. The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX, United Kingdom.
- TOMME P.R; WARREN A.J. and GILKES N.R., 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Advances in Microbial Physiology*.
- WOODLAN, J., 2004. Bacteriology – chapter 5. in *NWFHS Laboratory Procedures Manual*, 2ed. pp. 1 – 44.

## **Avaliação da atividade dos metabólitos secundários contra *Xanthomonas vesicatoria***

Jelena Purić<sup>1</sup>; Mora, L. G.<sup>1</sup>; Inforsato, F. J.<sup>1</sup>; Sette, L. D.<sup>1</sup>; Ferreira, H.<sup>1</sup>; Vieira, M.L.C.<sup>2</sup>; Santos, A. M.<sup>1</sup>; Sass, D. C.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Genética Molecular de Plantas e Biotecnologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, São Paulo, Brasil. \*e-mail: daiane\_sass@rc.unesp.br

---

### **RESUMO**

A mancha bacteriana, causada por *Xanthomonas vesicatoria* é uma das doenças mais importantes da cultura do tomate. O controle químico da mancha bacteriana tem sido feito com antibióticos para uso em agricultura e produtos à base de cobre. No entanto, vários relatos apontam para a baixa eficiência dos mesmos, tendo como uma possível causa o aparecimento de indivíduos resistentes nas populações bacterianas, assim como a acumulação de material químico no ambiente, e consequentemente perdas de área plantada. Uma alternativa no controle da *X. vesicatoria* é a descoberta de novos compostos produzidos por fungos isolados de sedimentos marinhos da Antártica. Nesse sentido, os metabólitos secundários foram obtidos utilizando 39 fungos filamentosos isolados de sedimentos marinhos da Antártica com potencial atividade contra *X. vesicatoria*. Os fungos foram inoculados nos frascos Erlenmeyer contendo 2% de meio líquido de malte e mantidos durante 20 dias sob agitação constante (150 rpm) a 15°C. A biomassa microbiana e o sobrenadante foram separados. O sobrenadante foi submetido a extração líquido-líquido com acetato de etila para extração de metabólitos secundários extracelulares. A fracção orgânica foi concentrada e submetida a bioensaio contra *X. vesicatoria*, utilizando o ensaio em microplaca com resazurina (REMA). A partir dos dados obtidos nesta análise, foi determinado que 8 amostras apresentaram atividade significativa contra a bactéria, com uma percentagem média de inibição do crescimento bacteriano de 96,12%, superior ao controle positivo utilizado no teste (Canamicina) que foi de 94,02%.

**Palavras-chave:** Metabólitos secundário, mancha bacteriana, tomate, bioatividade.

---

**Secondary metabolites produced by fungi from Antarctica and evaluation of activity against *Xanthomonas vesicatoria***

### **ABSTRACT**

The bacterial spot caused by *Xanthomonas vesicatoria* is one of the most important diseases of the tomato crop. Chemical control of the bacterial spot has been made with

antibiotics for use in agriculture and copper-based products. However, several reports point to the low efficiency of the same, having as a possible cause the emergence of resistant individuals in bacterial populations, as well as the accumulation of chemical material in the environment, and consequently losses of planted area. An alternative in the control of *X. vesicatoria* is the discovery of new compounds produced by fungi isolated from Antarctic marine sediments. In this sense, secondary metabolites were obtained using 39 filamentous fungi isolated from Antarctic marine sediments with potential activity against *X. vesicatoria*. The fungi were inoculated into Erlenmeyer flasks containing 2% malt liquid medium and kept for 20 days under constant stirring (150 rpm) at 15°C. The microbial biomass and the supernatant were separated. The supernatant was subjected to liquid-liquid extraction with ethyl acetate for extraction of extracellular secondary metabolites. The organic fraction was concentrated and submitted to bioassay against *X. vesicatoria* using the resazurin microplate assay (REMA). From the data obtained in this analysis, it was determined that 8 samples presented significant activity against the bacterium, with a mean percentage of inhibition of bacterial growth of 96.12%, higher than the positive control used in the test (Kanamycin), which was 94, 02%.

**Keywords:** Secondary metabolites, bacterial spot, tomato, bioactivity.

---

## INTRODUÇÃO

*Xanthomonas* são bactérias Gram-negativas fitopatogênicas distribuídas mundialmente e são responsáveis por doenças em diversas espécies vegetais economicamente importantes (Ryan et al., 2011; Rodriguez et al., 2012). Espécies do gênero *Xanthomonas* podem ser facilmente espalhadas em água, pela movimentação de material infectado, tais como sementes ou plantas de propagação, e por meios mecânicos, tais como ferramentas de poda infectados. Ao entrar em contacto com um hospedeiro suscetível, as bactérias entram através de feridas ou aberturas naturais das plantas, como um modo para infectar (Ritchie, 2002). No Brasil muitas doenças causadas por bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas* afetam culturas de grande importância econômica e social tais como: citros, mandioca, tomate, feijão, maracujá, cana-de-açúcar (Ryan et al., 2011; Rodriguez et al., 2012).

A mancha bacteriana, causada por *X. vesicatoria* é uma das doenças mais importantes da cultura do tomate para o processamento industrial no Brasil (Malavolta Junior, 2004). Esta doença tem causado grandes perdas no cultivo do tomate reduzindo a produtividade pela destruição de tecido foliar e pela derrubada de frutos em formação, além de comprometer a qualidade e o valor comercial dos frutos (Lopes e Quezado-Soares, 2000).

O controle químico da mancha bacteriana tem sido feito com antibióticos para uso em agricultura e produtos à base de cobre (Lopes e Quezado-Soares, 2000). No

entanto, vários relatos apontam para a baixa eficiência dos mesmos, tendo como uma possível causa o aparecimento de indivíduos resistentes nas populações bacterianas (Nascimento et al. 2013), assim como a acumulação de material químico no ambiente, e consequentemente perdas de área plantada.

Considerando a necessidade atual de novas alternativas no controle a *X. vesicatoria* que visam substituir os produtos químicos ao mesmo tempo minimizar danos ao meio ambiente.

A adaptabilidade dos fungos às condições oceânicas na Antártica pode ser considerada um ponto de interesse no campo da biotecnologia marinha, uma vez que as condições nestes ambientes extremos podem contribuir para a descoberta de moléculas ainda desconhecida produzidas por esses micro-organismos.

O conhecimento da sua diversidade fúngica e o potencial biotecnológico destes micro-organismos são de extrema relevância e estratégico para o conhecimento da dinâmica dos ecossistemas antárticos e para a obtenção de compostos naturais de valor agregado (Pikuta et al., 2007). Dessa maneira o presente trabalho apresenta a obtenção de metabólitos secundários produzidos por fungos isolados de sedimentos marinhos da Antártica e avaliação antibacteriana destes metabólitos contra a bactéria *X. vesicatoria*, causadora da mancha bacteriana no tomate.

## MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram utilizados 39 fungos filamentosos isolados de sedimentos marinhos coletados na Antártica. Os fungos foram replicados em placas de Petri contendo meio malte 2% e incubados em B.O.D. à 15°C por 10 dias e transferidos para frascos Erlenmeyer contendo o meio líquido malte 2% e foram mantidos pelo período de 20 dias em agitação constante (150 rpm) a 15°C.

Após crescimento fúngico, a biomassa microbiana e o sobrenadante (meio metabólico) foram separados. O sobrenadante foi submetido à extração líquido-líquido com acetato de etila para extração de metabólitos secundários extracelulares. Após a evaporação do solvente da fração orgânica, as amostras (extratos extracelulares) foram submetidas aos bioensaios contra a bactéria *X. vesicatoria*.

O bioensaio antibacteriano foi realizado empregando o ensaio em microplaca de 96 poços com resazurina (REMA) (Silva e Ferreira, 2013). Para controle do veículo foi utilizado dimetilsulfóxido 1%, controle positivo a Canamicina e controle negativo

apenas inóculo. Nos demais poços foram testados diferentes concentrações dos extratos. A inibição do crescimento bacteriano foi medida através da emissão fluorescência ocasionada pela transformação da resazurina em resorufina, sendo que os dados foram obtidos pelo espectrofotômetro de fluorescência. Todos os testes foram realizados em triplicata.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme descrito em materiais e métodos foram produzidos extratos extracelulares de 39 fungos. Estes extratos foram submetidos ao bioensaio, a fim de verificar qual dos extratos apresentava atividade antibacteriana contra a *X. vesicatoria*. Os resultados obtidos mostraram que dos 39 extratos testados 9 apresentaram uma porcentagem média de inibição do crescimento bacteriano maior que 90%, como pode ser observado na Tabela 1, que apresenta as porcentagens de inibição do crescimento de *X. vesicatoria* obtidas para os 9 extratos bioativos na concentração de 3,0 mg/mL.

Tabela 1. Porcentagem de inibição do crescimento bacteriano dos extratos bioativos

<b>Código do fungo</b>	<b>Média de inibição de células (%)</b>
2B-1C115IIII	95,82
4A-1C115IIII	94,70
3A-1C315IIII	97,03
2A-1C1III	96,35
6DC415I	96,08
3A-1C215IIIC	97,81
2D-3C115IIII	96,98
6DC215IIII	94,24
5B-1C315IIII	94,01

Observando a Figura 1, que apresenta a média de inibição de células (%) obtidas pelos extratos em relação à média de inibição de células do controle positivo (%), é possível verificar também que 8 extratos apresentaram porcentagens de inibição maior que o controle positivo que foi de 94,02%.

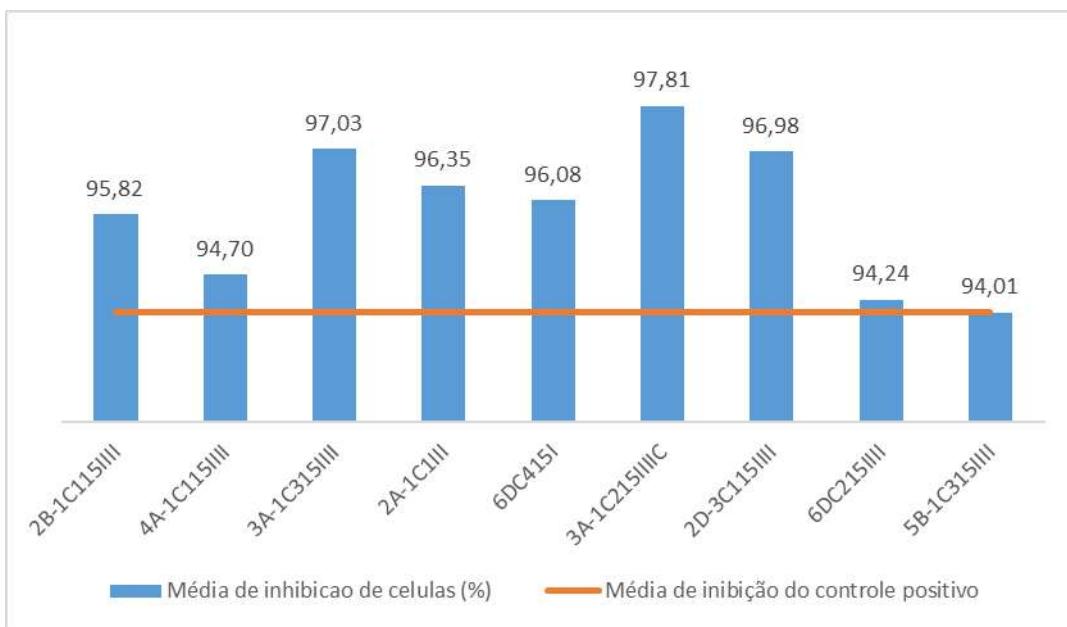


Figura 1. Média de inibição celular (%) dos extratos bioativos em relação com a média de inibição celular do controle positivo.

## CONCLUSÕES

Dentre os 39 extratos extracelulares estudados 9 produziram atividade significativa contra *X. vesicatoria* e 8 extratos apresentaram inibição do crescimento de *X. vesicatoria* maior que o controle positivo.

Considerando que a composição dos extratos não foi ainda identificada, os resultados obtidos revelam quais extratos contém compostos químicos potencialmente ativos contra *X. vesicatoria*.

## REFERÊNCIAS

- LOPES, C.A. and QUEZADO-SOARES, A.M., 2000. Doenças causadas por bactérias em tomate. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; COSTA, H. (ed). *Controle de doenças de plantas: hortaliças*. Viçosa: UFV. p. 754-784.
- MALAVOLTA JUNIOR, V.A., 2004. Doenças bacterianas em tomateiro: etiologia e controle. In: *Seminário de atualização: Cadeia produtiva do tomate*
- NASCIMENTO, A.R., FERNADES, P.M., BORGES, L.L., PONTES, N.C., and QUEZADO- DUVAL, A.M., 2013. Controle Químico da Mancha Bacteriana em Mudas de Tomate Para Processamento Industrial. *Biosci. J.*, v. 29. p. 1878-1879.
- PIKUTA, E.V., Hoover, R.B. and TANG, J., 2007. Microbial Extremophiles at the Limits of Life. *Crit Rev Microbiol.*, v. 33, p. 183-209.

- RITCHIE, D.F., 2000. Bacterial spot of pepper and tomato. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-1027-01
- RODRIGUEZ, L.M., GRAJALES, A., ARRIETA-ORTIZ, M.L., SALAZAR, C., RESTREPO, S. and BERNAL, A., 2012. Genomes-based phylogeny of the genus *Xanthomonas*. *BMC Microbiology*, v. 12, p. 1-14.
- RYAN, R.P., VORHÖLTER, F.J., POTNIS, N., JONES, J.B., SLUYS, V., BOGDANOVE, A.J. and DOW, J.M., 2011. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nature Reviews Microbiolog*, v. 9, p. 344-355.
- SANCHES, A.L.R., DE MIRANDA, S.H.G., BELASQUE, JUNIOR J. And BASSANEZI, R.B., 2014. Análise Econômica da Prevenção e Controle do Cancro Cítrico no Estado de São Paulo. *Econ. Sociol. Rural*, v. 52, p. 549-566.
- SILVA, I.C. and FERREIRA, H., 2013. Drug Sensitivity Assay of *Xanthomonas. citri* subsp. *citri* Using REMA Plate Method. *Bio-protocol*, v. 3, p. 1-4.
- SOUZA, M.A.N., 2006. *Avaliação do efeito do uso de fegatex® no controle de mancha- bacteriana em tomateiro para processamento industrial*. Brasília: Faculdade da Terra de Brasília, p. 43, Monografia Bacharel em Agronomia.

## **Diversidade bacteriana do solo após desastre ambiental em Mariana, Minas Gerais.**

João Paulo Campos Moura Cavalcante<sup>1\*</sup>; Helena Lima Santiago<sup>1</sup>; Lívia Fidelis Carneiro Silva<sup>1</sup>; Marliane Cássia Soares da Silva<sup>2</sup>; Maria Catarina Megumi Kasuya<sup>2</sup>; Marcos Rogério Tótola<sup>3</sup>, Cynthia Canêdo da Silva<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Genética Molecular de Bactérias – (LGMB/BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa (UFV). \*jpcamposmc@gmail.com.,

<sup>2</sup> Laboratório de Associações Micorrízicas (BIOAGRO), UFV.

<sup>3</sup> Laboratório de Biodiversidade e Biotecnologia para o Meio Ambiente (LBBMA), UFV.

<sup>4</sup> Professora Orientadora, Departamento de Microbiologia (DMB) – LGMB/BIOAGRO, UFV.

---

### **RESUMO**

O rompimento da barragem de rejeitos de mineração de ferro em Mariana (MG), resultou em um dos maiores desastres ambientais no Brasil. Aproximadamente 60 milhões de metros cúbicos de rejeitos de mineração foram liberados na bacia do Rio Doce causando uma série de impactos diretos e indiretos ao longo de 663 Km. Até o momento, a comunidade microbiana presente nas regiões foi pouco abordada em estudos. O objetivo deste trabalho foi avaliar se a diversidade bacteriana e indicadores químicos do solo foram alterados após o desastre ambiental. A coleta de amostras de solo foi realizada no distrito de Paracatu de Baixo, município de Mariana, em áreas afetadas pela onda de rejeitos e em áreas de mata natural. Após a extração do DNA realizou-se o sequenciamento da região do gene RNAr 16S pela plataforma Illumina Mi-seq. Os dados obtidos foram analisados utilizando-se Uchime, MG-RAST e PAST. Houve significativa redução da diversidade bacteriana nas regiões afetadas em comparação com as regiões de mata natural e alterações em padrões químicos do solo.

**Palavras-chave:** Rejeito de mineração; Metagenômica; Impacto ambiental; Shannon;

---

**Bacterial diversity in soils after environmental disaster in Mariana, Minas Gerais.**

### **ABSTRACT**

The collapse of the iron tailings dam in Mariana (MG), resulted in one of the biggest environmental disasters in Brazil. Approximately 60 million cubic meters of mining tailings were released in the Rio Doce basin causing a series of direct and indirect impacts along 663 km. Until now, the microbial community present in the regions was little studied. The aim of this study was to evaluate if the bacterial diversity and the chemistry parameter was changed after the environmental disaster. Soil samples were collected in the district of Paracatu de Baixo, Mariana, in regions affected by the tailings wave and in natural forest areas. After DNA extraction, the 16S RNAr gene region was sequenced by the Illumina Mi-seq platform. The data obtained were analyzed using Uchime, MG-RAST and PAST. There was a significant reduction of bacterial diversity in the affected regions compared to natural forest regions and changes in soil chemical patterns were observed

**Keywords:** Mine tailings; Metagenomics; environmental impact; Shannon;

---

## INTRODUÇÃO

O rompimento da barragem de rejeitos de mineração de ferro no município de Mariana (MG) ocasionou um dos piores desastres ambientais já ocorridos no Brasil. A onda de rejeitos de mineração de aproximadamente 60 milhões m<sup>3</sup> liberada na bacia hidrográfica do Rio Doce destruiu por completo dois distritos resultando em 19 mortes, a remoção de mais de 1619 hectares de mata atlântica nativa, entre outros impactos diretos e indiretos ao longo dos 663 Km percorridos (IBAMA., 2015).

Desde o rompimento, diversas medidas foram adotadas para a avaliação dos impactos causados pelo rompimento como forma de buscar subsídios para a implementação de programas de recuperação frente ao passivo ambiental deixado. Entretanto, muito pouco tem se abordado sobre a comunidade microbiana dos solos nas regiões afetadas, conhecimento este que pode ser essencial para o sucesso de programas de revegetação e recuperação dos ecossistemas. O objetivo deste trabalho foi avaliar se a diversidade bacteriana e indicadores químicos do solo foram alterados após o desastre ambiental.

## MATERIAL E MÉTODOS

A coleta de amostras de solo foi realizada no dia 3 de março de 2016, distrito de Paracatu de Baixo, município de Mariana, zona da mata do estado de Minas Gerais e segundo distrito afetado pela onda de rejeitos. Duas áreas foram escolhidas para a coleta, uma de mata natural e outra área anteriormente de mata natural mas que teve a sua vegetação removida pela onda de rejeitos.

A amostragem foi realizada segundo Faoro et al. (2010) e Li et al. (2015) com algumas modificações. Foram realizados transeptos de 50 metros, coletando três amostras compostas, numa profundidade de 0 a 15 cm com aproximadamente 0,5 Kg. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, armazenadas sob refrigeração e levadas ao laboratório onde foram peneiradas e armazenadas. Cada ponto de amostragem foi georreferenciado com auxílio de um aparelho GPS (Garmin).

Uma amostra composta de cada região foi utilizada para as análises das propriedades químicas do solo, realizados nos laboratórios do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

O DNA das amostras foi extraído a partir de 0,5 g de cada amostra de solo, utilizando o Kit *Nucleospin Soil* (Macherey-Nagel Laboratories), de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA obtido foi analisado em eletroforese em gel de

agarose 1,0 %, visualizado em transiluminador (Applied Biosystems) e o DNA quantificado por Nanodrop (Thermo Scientific).

O DNA extraído foi sequenciado pela plataforma Illumina MiSeq após amplificação da região V4 do gene rRNA 16S e utilizando os primers 515f-806r, ambos os processos, de amplificação e sequenciamento, foram executados de acordo com os protocolos propostos por Caporaso et al. (2012).

Os dados de sequenciamento obtidos pela plataforma Illumina MiSeq foram por analisados pelas plataformas Uchime (<http://www.drive5.com/>) e carregados para o servidor MG-RAST (*MetaGenome Rapid Annotation using Subsystem Technology*, <http://metagenomics.anl.gov/>) sendo analisados pela pipeline padrão do servidor utilizando o banco de dados SILVA (<https://www.arb-silva.de/>).

Índices de diversidade de Shannon, Margalef e dominância de Simpsom foram gerados e demais análises estatísticas foram calculados através do software PAST (HAMMER; HARPER; RYAN., 2001).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises químicas do solo mostraram um aumento de quase sete vezes na quantidade de ferro na região na qual a onda de rejeitos passou, também foi verificada a diminuição da matéria orgânica e o aumento do pH (Tabela 1). O aumento do pH é conhecido fator que limita o crescimento microbiano, diminuindo a eficiência da revegetação da área (Olivares et al., 2013). A diminuição da matéria orgânica, pode ser explicada pois quase a totalidade da vegetação presente foi lixiviada pela onda de rejeitos nas regiões afetadas.

Tabela 1. Resultados da análise química\* das amostras de solo coletadas nas áreas que houve deposição do rejeito e de mata natural, não afetada.

	<b>Rejeito</b>	<b>Mata</b>	<b>Rejeito</b>	<b>Mata</b>	
<b>pH</b> (água)	7,6	6,1	<b>Na</b> (mg/dm <sup>3</sup> )	11	5,1
<b>Ca<sup>+2</sup></b> (cmol/dm <sup>3</sup> )	0,5	5,1	<b>ISNa</b> (%)	8,39	0,31
<b>K</b> (mg/dm <sup>3</sup> )	7	130	<b>M.O.</b> (dag/Kg)	0,9	5,7
<b>CTC(t)</b> (cmol/dm <sup>3</sup> )	0,6	6,9	<b>Zn</b> (mg/dm <sup>3</sup> )	2,5	4,6
<b>CTC(T)</b> (cmol/dm <sup>3</sup> )	0,6	11	<b>Fe</b> (mg/dm <sup>3</sup> )	129,3	18,9
<b>Mg<sup>+2</sup></b> (cmol/dm <sup>3</sup> )	0	1,5	<b>Mn</b> (mg/dm)	117,5	90,9
<b>SB</b> (cmol/dm <sup>3</sup> )	0,6	6,9	<b>S</b>	4,2	26,9

\* Métodos de análise: P-Na-K-Fe-Zn-Mn-Cu, extrator Mehlich I; pH em água; B-extrator de água quente, SB – soma das bases trocáveis, H + Al – Extrator Acetato de cálcio 0,5 mol/L; Ca-Mg-Al, extrator KCl 1 mol/L; V= índice de saturação de bases, ISNa –

índice de saturação de sódio; M.O- Matéria orgânica, oxidação de  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  +  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; P-rem=fósforo remanescente; S- extrator fosforo monocálcico em ácido acético.

A diversidade dos micro-organismos avaliada através do sequenciamento do gene RNAr 16S foi avaliada a partir dos índices de diversidade de Shannon, Margalef e dominância de Simpson com três amostras para as regiões de mata natural e rejeito, sendo utilizado o nível de OTU (Unidade taxonômica operacional) (Tabela 2). Como esperado, o teste “T de diversidade” do programa Past mostrou significativa redução da diversidade bacteriana na área afetada pelo rejeito. Essa redução, pode ser justificada em parte pela drástica mudança no ambiente, já que anteriormente se tratava de uma área de mata e passou a ser uma região de solo exposto com restos de rejeito de mineração.

O resultado aqui observado diverge do que foi observado por Segura et al. (2016), que ao avaliar a diversidade de micro-organismos, por meio de técnicas dependentes de cultivo, da região de Bento Rodrigues, também afetada pela onda de rejeitos de mineração, não encontrou diferença significativa entre áreas afetadas e não afetadas. Entretanto, nossos resultados concordam com outros trabalhos quando concluem que a atividade mineradora reduz a diversidade microbiana, principalmente a do Domínio Bacteria (QUADROS et al., 2016; ESCOBAR et al., 2015; Li et al., 2015).

Tabela 2. Índices de dominância de Simpson, diversidade de Shannon e Margalef por áreas de Mata natural e área de solo exposto com rejeitos de mineração.

	<b>Solo/Rejeito</b>	<b>Solo/Mata</b>
<b>Simpson</b>	0,7992	0,891
<b>Shannon</b>	2,88	3,406
<b>Margalef</b>	37,6	39,59

A redução da diversidade microbiana pode trazer como consequência a redução ou perda de diversos serviços ecossistêmicos como a ciclagem de nutrientes, essencial para a recuperação de ambientes degradados como a bacia do Rio Doce (Jung et al., 2016; Smith et al., 2015).

A análise das mudanças na região utilizando-se de técnicas moleculares de avaliação da diversidade é uma ferramenta importante para monitoramento da recuperação, como destacado por Mohapatra et al. (2011) e Escobar et al. (2015). Resultados de estudos em áreas afetadas por rejeitos da atividade mineradora relatam

que sem intervenções, essas áreas podem levar séculos para se aproximarem de áreas naturais conservadas. Medidas como a revegetação podem auxiliar a recuperação da diversidade microbiana, entretanto mesmo esta pode levar entre 20 e 90 anos para fazer com que a diversidade de micro-organismos se aproxime das áreas não afetadas (Li et al., 2014; Quadros et al., 2016; Li et al., 2015).

## CONCLUSÕES

A diversidade de bacteriana foi diminuída de maneira significativa no solo nas regiões afetadas pelo rejeito de mineração liberado da barragem da Samarco.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de amparo a pesquisa de Minas Gerais, FAPEMIG, pelo financiamento das atividades do projeto “Monitoramento da diversidade microbiana e seleção de micro-organismos para favorecer o repovoamento vegetal” do qual este estudo faz parte. À CAPES e ao CNPQ pelo financiamento das bolsas e auxílios recebidos pelos autores do presente estudo.

## REFERÊNCIAS

- CAPORASO, J.G. LAUBER, C.L. WALTERS, W.A. BERG-LUONS, D. HUNTLEY, J. FIERER,N. OWENS, S.M. BETLEY, J. FRASER,L. BAUER,M. GORMLEY, N. GILBERT, J. SMITH,G. KNIGHT, G. 2012.Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME journal* . v.6, pp. 1621-1624, doi:10.1038/ismej.2012.8.
- ESCOBAR , I.E.C. SILVA, V.M. FERNANDES , M.F. CAVALCANTE , U.M. MAIA,L.C. Changes in Microbial Community Structure and Soil Biological Properties in Mined Dune Areas During Re-vegetation . 2015 . *Environmental Management*,v.55, pp. 1433-1445. DOI 10.1007/s00267-015-0470-8.
- FAORO, H. ALVES, A.C. SOUZA, E.M. RIGO, U. CRUZ, L.M. AL-JANABI, S.M. MONTEIRO, R.A. BAURA, V.A. PEDROSA, F.O. 2010. Influence of soil characteristics on the diversity of bacteria in the southern brazilian atlantic forest. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 14, p. 4744–4749.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T. A. T.; RYAN, P. D. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, v. 4(1), n. 1, pp. 1–9.
- IBAMA. Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais. *Laudo Técnico Preliminar*, v. 1, p. 2–35, 2015.
- BRASIL– INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA) [visualizado 1 Março 2017]. Laudo técnico preliminar: Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da

barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais[online]. 38 pg. Nov/2015. Disponível em:[http://www.ibama.gov.br/phocadownload/barragemdefundao/laudos/laudo\\_tecnico\\_preliminario\\_ibama.pdf](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/barragemdefundao/laudos/laudo_tecnico_preliminario_ibama.pdf).

JUNG, J.; PHILIPPOT, L.; PARK, W. 2015. Metagenomic and functional analyses of the consequences of reduction of bacterial diversity on soil functions and bioremediation in diesel-contaminated microcosms. *Scientific Reports*, n.5 , pp. 1-12.

LI, Y. WEN, H. CHEN, L. YIN, T. 2014. Succession of bacterial community structure and diversity in soil along a *chronosequence of reclamation and re-vegetation on coal mine spoils in China*. *PLoS ONE*, v. 9, n. 12, pp. 1-24. DOI:10.1371/journal.pone.0115024.

MOHAPATRA, B.R. GOULD, W.D. DINARDO, O. KOREN, D.W. 2011. Tracking the prokaryotic diversity in acid mine drainage-contaminated environments: A review of molecular methods. *Minerals Engineering*. V.24, pp. 709-718. doi:10.1016/j.mineng.2011.03.012.

OLIVARES, J.; BEDMAR, E. J.; SANJUÁN, J. 2013. Biological nitrogen fixation in the context of global change. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, v. 26, n. 5, p. 486–94.

QUADROS, P.D.; ZHALNINA, N.; DAVIS-RICHARDSON, A.; DREW, J.C.; MENEZES,F.B.; CAMARGO, F.A.D.O.; TRIPPLETT, E.W. 2016. Coal mining practices reduce the microbial biomass, richness and diversity of soil. *Applied soil ecology*, no.98, pp.195-203. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.10.016>.

SEGURA, F.R. NUNES, E.A. PANIZ, F. P. PAULELLI, A.C.C. RODRIGUES, G.B. BRAGA, G.U.L. PEDREIRA-FILHO, W.R. BARBOSA JR, F. CERCHIARO, G.SILVA, F.F. BATISTA, B.L. 2016. Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). *Environmental Pollution*, V. 218, pp. 813-825. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.005>.

SMITH, A. P.; MARÍN-SPIOTTA, E.; BALSER, T. 2015. Successional and seasonal variations in soil and litter microbial community structure and function during tropical postagricultural forest regeneration: A multiyear study. *Global Change Biology*, v. 21, n. 9, p. 3532–3547.

## **Comunidade microbiana em solos com aplicação de vinhaça e tebutilurom**

João Vitor França Pirola<sup>1</sup>; Alessandra Baroni Rodrigues Neves<sup>1</sup>; Mírian Alves de Faria<sup>1</sup>; Paulo Renato Matos Lopes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Dracena. Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros, km 651, CEP 17900-000, Dracena, Brasil.

\*plopes@dracena.unesp.br

### **RESUMO**

O presente trabalho avaliou o efeito da adição de vinhaça associada ao herbicida tebutilurom na comunidade microbiana em amostras de solos cultivados com cana-de-açúcar por manejo orgânico. Os resultados para bactérias e fungos totais revelaram o impacto negativo em praticamente todos os tratamentos propostos pela aplicação de tebutilurom juntamente com vinhaça em diferentes volumes. Além disso, quando adicionados ao solo separadamente, o número de UFC para os grupos analisados também foi reduzido em comparação à amostra controle. Portanto, concluiu-se que o herbicida tebutilurom e a vinhaça, associados ou não, causam um impacto direto na biomassa microbiana do solo.

**Palavras-chave:** Cana-de-açúcar, herbicida, manejo orgânico, micro-organismos e resíduo.

---

### **Microbial community in soils with vinasse and tebuthiuron application**

### **ABSTRACT**

It was evaluated the effect of vinasse addition associated with herbicide tebuthiuron in microbial community of soils samples cultivated with sugarcane by organic management. The results for bacteria and fungi revealed negative impact in practically all treatments proposed by tebuthiuron application with vinasse in different volumes. In addition, CFU number was also reduced in relation to control samples even when vinasse and tebuthiuron were added separately. Therefore, it was concluded that the herbicide tebuthiuron and vinasse, associated or not, have a direct impact on the soil microbial biomass.

**Keywords:** Sugarcane, herbicide, organic management, microorganisms and residue.

## INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é de suma importância para o agronegócio brasileiro, onde ocupa uma área de 8.654 mil hectares e tendo uma produção de 665.586,2 mil toneladas na safra 2015/16. A previsão da safra 2016/2017 é de aproximadamente 694.544,8 mil toneladas, dentro disso tem o estado de São Paulo como maior expoente, representando 55% da produção (CONAB, 2017).

Contudo, a produção de cana-de-açúcar é afetada pela presença de plantas daninhas. Deste modo, faz-se necessário seu controle com herbicidas, cuja utilização aumentou atualmente pela proibição do uso de fogo na colheita (Toniêto et al., 2016). Dentre os compostos mais aplicados no Brasil na cultura da cana-de-açúcar, encontra-se o tebutiurom, um herbicida pré-emergente e de ação sistêmica que age sob 25 tipos de plantas daninhas (Tomlin, 1997).

Além disso, a crescente produção de álcool combustível gerou um aumento no volume de resíduos, visto que para cada litro de álcool, há a geração média de 13 litros de vinhaça. Uma alternativa como destinação deste resíduo é sua aplicação na lavoura que se denomina fertirrigação (Orlando Filho, 1981). Esta prática se deve aos benefícios como o fornecimento de nutrientes para as plantas e o aumento da comunidade microbiana (Camargo, 1954).

O cultivo da cana-de-açúcar geralmente é caracterizado pelo manejo convencional, porém se observa uma crescente mundial e também nacional na utilização do manejo orgânico para lavouras canavieiras (Evangelista et al., 2013). Neste sentido, há diferenças nos atributos biológicos pelos diferentes sistemas de manejos que distinguem suas qualidades como, por exemplo, a biomassa microbiana do solo (Balota et al., 2003). Este parâmetro é sensivelmente afetado quando submetido a fatores de estresse, refletindo em alterações na densidade, diversidade e atividade das populações microbianas (Pankhurst and Lynch, 1994).

Portanto, o trabalho teve como finalidade avaliar o efeito da adição de vinhaça e/ou tebutiurom na comunidade de bactérias e fungos totais em amostras de solos cultivados com cana-de-açúcar por manejo orgânico.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), câmpus de Dracena.

O solo cultivado com cana-de-açúcar e de manejo orgânico foi coletado na fazenda Jacutinga (Planeta Verde) em Lucélia-SP. As amostras foram coletadas até no máximo 30 cm de profundidade do perfil do solo. Posteriormente, as amostras de solo foram peneiradas, homogeneizadas e acondicionadas em recipiente plástico.

A vinhaça foi coletada na usina sucroenergética Caeté, localizada em Paulicéia-SP, e acondicionada em um galão plástico. Já o herbicida tebutiuron foi adquirido em estabelecimento comercial em Dracena-SP na forma do produto comercial Combine® 500SC (Dow AgroSciences Industrial Ltda).

Foram preparadas amostras de solo para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias e fungos totais. Conforme a Tabela 1 abaixo, os seis tratamentos foram propostos de acordo com a dose de tebutiuron recomendada pelo produto comercial (TBT) e o volume de vinhaça comumente utilizado na lavoura canavieira (VV), segundo Lourencetti et al. (2012).

**Tabela 1.** Composição dos tratamentos em solo de manejo orgânico

Tratamentos	TBT	VV
<b>Solo (controle)</b>	-	-
<b>TBT 1x</b>	1,0x	-
<b>VV 1x</b>	-	1,0x
<b>TBT 1x + VV 1x</b>	1,0x	1,0x
<b>VV 2x</b>	-	2,0x
<b>TBT 1x + VV 2X</b>	1,0x	2,0x

A quantificação da comunidade microbiana para os dois grupos foi determinada pela contagem de UFC no método *Pour Plate*. Na Tabela 2, estão apresentados os grupos microbianos, os meios de cultura, as diluições e as condições de incubação.

**Tabela 2.** Parâmetros de inoculação e incubação dos micro-organismos

Grupo microbiano	Meio de cultura	Diluições	Incubação
<b>Bactérias</b>	PCA	$10^{-4}$ e $10^{-5}$	35 °C por 48 h
<b>Fungos totais</b>	BDA	$10^{-3}$ e $10^{-4}$	28 °C por 120 h

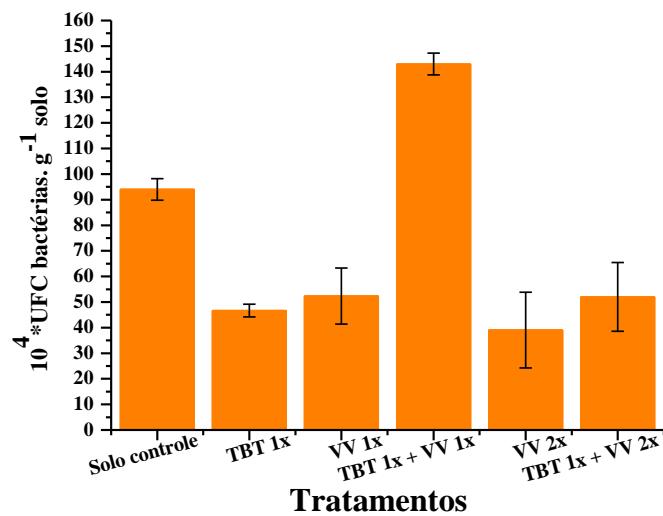
Os dados para cada tratamento foram analisados efetuando-se a análise de variância pelo teste de Tukey a 5,0% de probabilidade para a comparação de médias. Utilizou-se para a análise estatística o software Microcal Origin 8.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

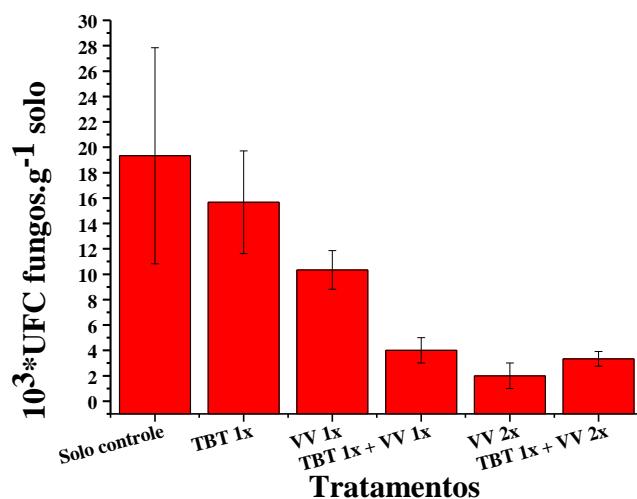
Os resultados demonstraram um comportamento semelhante para o número de UFC de bactérias e fungos totais para o solo de manejo orgânico cultivado com cana-de-açúcar (Figuras 1 e 2 e Tabela 3).

Inicialmente para bactérias (Figura 1 e Tabela 3), observa-se que o solo controle teve menor quantidade de UFC apenas para o tratamento “TBT 1x + Vinhaça 1x”. Quando comparado às amostras com uma dose de TBT e de vinhaça separados, o solo controle teve uma maior quantidade de colônias bacterianas. Assim, revelou-se um impacto negativo destes compostos na comunidade de bactérias.

No entanto, quando associado os dois produtos no solo, o valor de UFC para bactérias por grama de solo foi de  $143 \times 10^4$ , sendo maior que o tratamento controle ( $94 \times 10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> solo). Além disso, quando adicionado o dobro do volume vinhaça (VV 2x), a comunidade bacteriana também foi reduzida.



**Figura 1.** Número de UFC de bactérias nos tratamentos realizados.



**Figura 2.** Número de UFC de fungos totais nos tratamentos.

Com relação ao grupo fúngico (Figura 2 e Tabela 3), observa-se que o solo controle teve a maior quantidade de UFC entre todos os tratamentos. Entretanto, não

houve diferença significativa em comparação com “TBT 1x” e “VV 1x”. Associando “TBT 1x + VV 1x”, foi demonstrada uma redução na comunidade de fungos totais significativamente diferente.

Igualmente aos dados para bactérias, os tratamentos com duas vezes o volume de vinhaça (“VV 2x” e “TBT 1x + VV 2x”) foram aqueles com menor número de colônias para fungos totais.

**Tabela 3.** Análise de variância nos dados de UFC com diferentes doses de tebutirom e volumes de vinhaça em solos cultivados com cana-de-açúcar

	<b><math>10^4</math>*UFC bactérias /g solo</b>	<b><math>10^3</math>*UFC fungos totais /g solo</b>
<b>Solo controle</b>	94,00 $\pm$ 4,243 a	19,33 $\pm$ 8,505 a
<b>TBT 1x</b>	46,67 $\pm$ 2,517 b	15,67 $\pm$ 4,041 a
<b>VV 1x</b>	52,33 $\pm$ 10,970 b	10,33 $\pm$ 1,528 ab
<b>TBT 1x + VV 1x</b>	143,00 $\pm$ 4,243 c	4,00 $\pm$ 1,000 b
<b>VV 2x</b>	39,00 $\pm$ 14,799 b	2,00 $\pm$ 1,000 b
<b>TBT 1x + VV 2x</b>	52,00 $\pm$ 13,435 ab	3,33 $\pm$ 0,577 b

\*letras minúsculas representam diferença significativa das médias entre os tratamentos nas colunas. (teste de Tukey a 0,05% de probabilidade)

Portanto, foi demonstrado o impacto inicial do herbicida tebutirom e da vinhaça na comunidade microbiana, revelando o efeito negativo destes compostos na biomassa microbiana do solo (Pankhurst and Lynch, 1994). Apenas no tratamento “TBT 1x + VV 1x” para bactérias teve maior quantidade de colônias em relação ao solo controle.

Estes resultados diferenciam-se dos estudos de Camargo (1954), no qual a presença de vinhaça proporcionou um maior crescimento fúngico, e de Santos et al. (2009), em que a aplicação de vinhaça aumentou imediatamente as colônias de fungos e após 120 dias a comunidade bacteriana.

## CONCLUSÕES

Concluiu-se que, excetuando-se o tratamento com uma dose de tebutirom e um volume de vinhaça, estes compostos causam impactos diretos na formação de colônias de bactérias e fungos totais imediatamente após sua aplicação.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPe/UNESP), às empresas Usina Caeté (Paulicéia-SP) e Planeta Verde (Lucélia-SP) pela disponibilidade na coleta

das amostras de solo e vinhaça e também ao GAIA (Grupo de Ação de Impactos Ambientais) da FCAT/UNESP, câmpus de Dracena.

## REFERÊNCIAS

- BALOTA, E.B.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S. and DICK, R.P., 2003. Microbial biomass in soils under different tillage and crop rotation systems, *Biology and Fertility of Soils*, vol. 38, no. 1, pp. 15-20.
- CAMARGO, R.O., 1954. *Desenvolvimento da flora microbiana nos solos tratados com vinhaça*. Boletim nº 9, Instituto Zimotécnico da ESALQ, Piracicaba, 44 p.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2017 [viewed 22 February 2017]. Produtos e Serviços. Safras. Séries históricas - Cana-de-açúcar [online]. Brasília. Available from: [http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=2&Pagina\\_objcmsconteudos=2#A\\_objcmsconteudos](http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=2&Pagina_objcmsconteudos=2#A_objcmsconteudos)
- EVANGELISTA, C.R.; PARTELLI, F.L.; FERREIRA. E.P.B. and PIRES, F.R., 2013. Atributos microbiológicos do solo na cultura da cana-de-açúcar sob manejo orgânico e convencional, *Semina: Ciências Agrárias*, vol. 34, pp. 1549-1562.
- LOURENCETTI, C.; DE MARCHI, M.R.R. and RIBEIRO, M.L., 2012. Influence of sugar cane vinasse on the sorption and degradation of herbicides in soil under controlled conditions, *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, vol. 47, pp. 949-958.
- ORLANDO FILHO, J., 1981. Sistema de aplicação de vinhaça em cana-de-açúcar. *Revista Álcool & Açúcar*, vol.1, no.1, pp.28-36, 1981.
- PANKHURST, C.E. and LYNCH, J.M., 1994. The role of the soil biota in sustainable agriculture. In: PANKHURST, C.E.; DOUBE, B. M.; GUPTA, V.V.S.R. and GRACE, P.R. (Ed.). *Soil biota: management in sustainable farming systems*. Melbourne: Elsevier Science, pp. 3-12.
- SANTOS, T.M.C.; SANTOS, M.A.L.; SANTOS, C.G.; SANTOS, V.R. and PACHECO, D.S., 2009. Efeito da fertirrigação com vinhaça nos microrganismos do solo. *Revista Caatinga*, vol. 22, pp.155-160.
- TOMLIN, C., 1997. *The pesticide manual: A world compendium*. 10a ed. British Crop Protection Council and Royal Society of Chemistry, Thornton Heath.
- TONIÉTO, T.A.P.; DE PIERRI, L.; TORNISIELO, V.L. and REGITANO, J.B., 2016. Fate of tebuthiuron and hexazinone in green-cane harvesting system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 64, no. 20, pp. 3960–3966.

## **Vinho de jabuticaba: análise físico-química e cariotipagem das leveduras**

Juliana A. Pires<sup>1\*</sup>; Erika M. R. Gutierrez<sup>1</sup>; Daniela D. Nascimento<sup>1</sup>; Marcia N. C. Harcer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Tecnologia Dep. “Roque Trevisan” de Piracicaba. \*e-mail: juliana.angelo@gmail.com

---

### **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi a fabricação de vinhos de jabuticaba visando a criação de um produto novo para o mercado de bebidas fermentadas com qualidade superior. Antes da fermentação utilizou-se metabissulfito de sódio para controle microbiano e a fermentação ocorreu por dez dias. Realizou-se as análises físico-químicas de teor alcoólico, acidez total e volátil, cinzas e análise de DNA por PCR das leveduras do pé de cuba e industriais. Conclui-se que possível um desenvolvimento de uma nova bebida, com parâmetros físico-químicos dentro da legislação, e também que o método utilizado de controle microbiano e de higienização durante o processamento garantiu apenas o crescimento das leveduras de panificação utilizadas.

**Palavra-chave:** bebida fermentada, *Plinia cauliflora*, análise de DNA

---

**Wine of Brazilian grape tree: physical-chemical analysis and karyotyping of yeasts**

### **ABSTRACT**

The objective of this work was the manufacture of Brazilian grape tree wines aiming the creation of a new product for the market of fermented beverages with high quality. Before the fermentation, sodium metabisulfite was used for microbial control and fermentation occurred for ten days. Was made physicochemical analyzes of alcoholic content; total and volatile acidity; ashes and were carried out DNA analysis by PCR of the alcoholic yeast and industrial yeast. It was concluded that it is possible to develop a new beverage with physico-chemical parameters within the legislation, and also that the method used for microbial control and hygiene during processing guaranteed only the growth of bakery yeast used.

**Keywords:** fermented beverage, *Plinia cauliflora*, DNA analysis.

---

### **INTRODUÇÃO**

A jabuticaba é uma fruta tropical, tipicamente brasileira, sendo originária da região centro-sul (SASSO et al., 2010). Popularmente apreciada por suas características

sensoriais *in natura*, mas também pela utilização em produtos processados como geleias, licores e bebidas fermentadas (MACHADO et al., 2013).

Apesar da designação vinho referir-se segundo a Lei 5.823 de 14 de novembro de 1973 (BRASIL, 1988b) como “bebida proveniente da fermentação alcoólica de mosto de uva sã, fresca e madura”, é permitido pela Lei 7.678 de 8 de novembro de 1988 a produção de vinhos de outras frutas (BRASIL, 1988a), desde que se indique o nome da fruta no rótulo após a palavra vinho, como por exemplo vinho de jabuticaba.

Qualquer fruta que contenha níveis razoáveis de açúcar é possível de se produzir um bom vinho, com sabores característicos de cada fruta (CORAZZA et al., 2001).

Como a jabuticaba é uma fruta com características físico-químicas parecidas com as uvas, como taninos e antocianinas presentes em suas cascas, porém em maior quantidade e presença de açúcares fermentescíveis, sendo possível de fermentação e de produção de um bom vinho (CORAZZA et al., 2001; GUEDES, 2009; FORTES, 2012).

O objetivo deste trabalho foi a fabricação de vinhos de jabuticaba visando a criação de um produto novo para o mercado de bebidas fermentadas com qualidade superior. Tendo como parâmetros características físico-químicas e cariotipagem da levedura.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Preparo do vinho**

Os frutos de jabuticaba foram colhidos nas árvores pertencentes a Fazenda Areião, localizada na cidade de Piracicaba no interior de São Paulo. O mosto para o vinho tinto de jabuticaba foi preparado segundo Fortes (2012). Utilizou-se 24,82 Kg de jabuticabas maduras previamente higienizadas e 595g de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. A correção da quantidade de sólidos solúveis foi realizada com adição de sacarose até atingir 22°Brix, sendo utilizados 2,7 Kg de açúcar no total. Também foi adicionado 2,4g de metabissulfato de potássio, para controle bacteriano.

A temperatura foi controlada para ficar entre 28 a 30°C. As cascas das jabuticabas permaneceram em contato com o mosto durante toda a fermentação alcoólica, que durou 10 dias, e a remontagem foi feita 2 vezes ao dia, para evitar o avinagrar (RIZZON and MANFROI. 1994; GUERRA et al.. 2009).

O vinho foi envasado em garrafas de 255mL de material inerte devidamente esterilizadas em água fervente. Foram retiradas amostras das leveduras permanecentes ao pé de cuba.

## **Análises físico-químicas**

As análises acidez total e cinzas segundo as Normas do Instituto Adolfo Lutz (2008). O Teor Alcóolico foi mensurado através do ebuliômetro (NOGUEIRA, 2003). Para Acidez Volátil foi utilizado o REDUTEC, para a extração de toda substância volátil contida nas amostras de vinho tinto de jabuticaba (PEREIRA, 2003).

## **Análise das leveduras por PCR**

As leveduras utilizadas na fermentação (pé de cuba) foram colhidas e postas em placas de petri com meio rico em açúcar para crescimento e o mesmo foi feito com as leveduras industrializadas adquiridas em estabelecimento comercial da mesma marca e lote utilizadas na fermentação.

Após o crescimento foram retiradas pequenas amostras das colônias e as mesmas foram estriadas em placas com meio YPD. Depois do estriamento foi retirada as amostras das placas e transferência para o tubos com meio de cultura líquido com propósito de multiplicação. Retirou-se 1,5mL do meio de cultura líquido (solução celular) e transferido para eppendorfs que foram centrifugados em rotação de 3000 rpm por 5 min para a sedimentação das células. Descartou-se o sobrenadante e acrescentou-se mais 1,5mL da solução celular. Depois mais uma vez foi centrifugado e o sobrenadante descartado.

Para análise de Extração de DNA, foi utilizada a metodologia de CTAB (Doyle, Doyle, 1987).

A reação de PCR do DNA genômico das leveduras com 4 pares de primers específicos para caracterização molecular de cepas (CARVALHO-NETTO et al., 2012), será feita para um volume final de 20 $\mu$ L.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

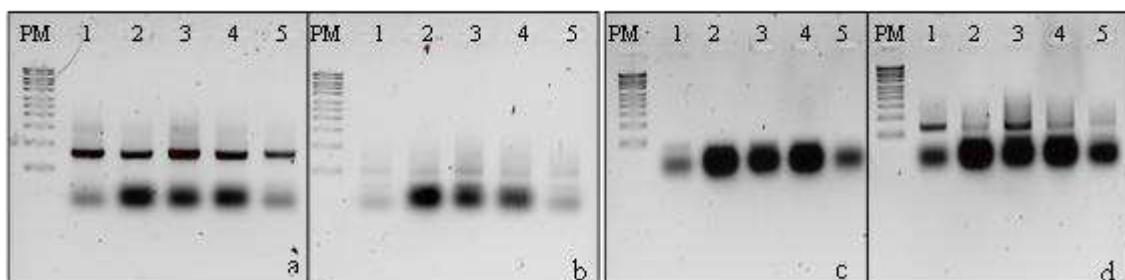
Na Tabela 1 é possível averiguar os resultados das análises físico-químicas, estando dentro do valor descrito na legislação Brasileira de vinhos descrita na forma da Portaria nº 229, de 25 de outubro de 1988 (BRASIL, 1988).

**Tabela 1:** Resultados obtidos nas análises físico-químicas das amostras de vinho de jabuticaba pronto e após envase.

	Vinho de Jaabuticaba	Parâmetros da legislação Brasileira*	
		mínimo	máximo
Acidez Total (%)	5,59	5,5	13
Acidez Volátil(%)	0,75	-	2,0
Teor alcoólico (°GL)	11	7	14
Cinzas (%)	0,44	-	1,5

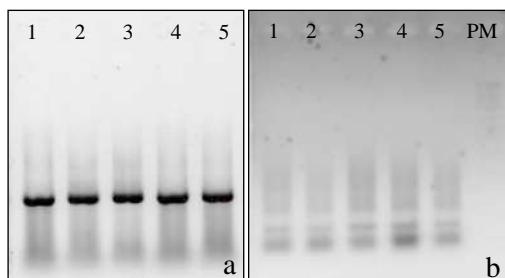
\*Fonte: Portaria nº 229, de 25 de outubro de 1988

Resultados das análises de 5 amostras isoladas na análise de PCR estão apresentadas na figura 1. Pode-se observar que o padrão de bandas obtido da análise com os *primers* P1 (Figura 1a), P2 (Figura 1b), P3 (Figura 1c) e P4 (Figura 1d), o padrão de bandas foi semelhante para todas as amostras (1 a 5). Com base nestes resultados, pode-se concluir que a levedura não foi substituída ao longo de um ciclo de produção do vinho de jabuticaba, também não foi detectado qualquer contaminação no processo com leveduras selvagens.



**Figura 1:** Padrão de bandas dos *primers* P1 (a) e P2 (b), a 54°C, e P3 (c) e P4 (d), a 57°C, das amostras 1 a 5 de levedura remanescente da produção de um vinho de jabuticaba utilizando-se levedura comercial Fleishmann, para caracterização molecular, comparados com o padrão de peso molecular (PM).

Para que se tivesse um padrão de comparação da levedura resultante da fermentação do vinho de jabuticaba, em comparação com a levedura comercial Fleishmann, amostra da embalagem usada foi coletada e analisada através de caracterização molecular. Resultados das análises de 5 amostras isoladas estão apresentadas na figura 2. Pode-se observar que o padrão corresponde ao padrão obtido com as amostras de leveduras remanescentes da produção do vinho de jabuticaba, comprovando que a levedura Fleishman de pão foi capaz de permanecer no processo e produção do vinho e que não foram detectadas leveduras selvagens nesse processo.



**Figura 2.** Padrão de bandas dos primers P1 (a) e P2 (b), a 54°C das amostras 1 a 5 de levedura comercial Fleishmann, para caracterização molecular, comparados com o padrão de peso molecular (PM).

## CONCLUSÕES

Conclui-se que possível um desenvolvimento de uma nova bebida, com parâmetros físico-químicos dentro da legislação, e também que o método utilizado de controle microbiano e de higienização durante o processamento garantiu apenas o crescimento das leveduras de panificação utilizadas.

## REFERÊNCIAS

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis of AOAC International*. 16 ed., v.2. Washington: AOAC, 1995

BRASIL (a) Lei nº 7.678, de 08 de Novembro de 1988. Art. 9º. Available from:<[http://www.uvibra.com.br/legislacao\\_lei7678.htm](http://www.uvibra.com.br/legislacao_lei7678.htm)>

BRASIL (b) Portaria nº 229, de 25 de outubro de 1988. Ministro de Estado da Agricultura. Available from:<[http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:DTLrVbz2BXIJ:www2.agricultura.rs.gov.br/uploads/126989498929.03\\_enol\\_p\\_229\\_88\\_mapa.doc+&cd=3&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:DTLrVbz2BXIJ:www2.agricultura.rs.gov.br/uploads/126989498929.03_enol_p_229_88_mapa.doc+&cd=3&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br)>

CARVALHO-NETTO, O.V.; *et. al.* High specificity PCR-based molecular markers for the efficient monitoring of yeast cell populations during bioethanol production. London: *Biotechnology for Biofuels*, (submitted on 05/2012)

CORAZZA, M. L.; RODRIGUES, D. G.; NOZAKI, J. Preparação e Caracterização do vinho de laranja. *Quim. Nova*, v.24, n. 4., p. 449-452, 2001

DOYLE, J.J.T.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue Focus, v. 12, p. 13-15, 1987.

FORTES, G. A. C. *Análise multiparamétrica da qualidade dos frutos, mostos e vinhos de jabuticaba*. Goiania: Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, 2012

GUEDES. M. N. S. *Diversidade de acessos de jabuticabeira sabará em diamantina por meio de caracterização biométrica e físico-química dos frutos e fisiológica das sementes*. Diamantina: Universidade Federal do Jequitinhonha, 2009

GUERRA, C.C. et al., Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos. Documento n. 48, Bento Gonçalves, jun. 2009

INSTITUTO ADOLFO LUTZ, *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo, 2008

MACHADO, A.M.R. et al., Identificação de Antocianinas na Casca de Jabuticaba Liofilizada. *In: XVIII Encontro Nacional de Analistas de Alimentos*, São Paulo, 13, set. 2013.

NOGUEIRA, A. et al. Análise dos indicadores físico-químicos de qualidade da sidra brasileira. *SEMINA: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 24, n.2 p. 289-298, jul.-dez. 2003. Available from:  
<<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/2190/1880>>  
Acessado em: 05 jun. 2014

PEREIRA, N. E. et al. Compostos secundários em cachaças produzidas no estado de Minas Gerais. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.27, n°5, out. 2003.

SASSO, S.A.Z., CITADIN, I., DANNER, M. A. Propagação de Jabuticabeira por estaquia. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, v. 32, n. 2, p. 577-583, jun. 2010

RIZZON, L. A.; MANFROI, L.. Fermentação. Sistema de produção de vinho tinto. Embrapa,. São Paulo, 1994. Available from:  
<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Vinho/SistemaProducaoVinhoTinto/fermentacao.htm>> Acessado em: 15 fev. 2017.

## **Fungos micorrízicos nativos e nutrição do morangueiro em sistemas orgânicos**

Juliana Cristina Scotton<sup>1\*</sup>; Diego Fontebasso Pelizari Pinto<sup>1</sup>; Amália Aparecida Busoni Campos<sup>1</sup>; Wesley Luiz Fialho Costa<sup>1</sup>, Sérgio Kenji Homma<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Pesquisa Mokiti Okada. \*juliana.scotton@cpmo.org.br

---

### **RESUMO**

O objetivo do trabalho foi avaliar as possíveis relações entre os fungos micorrízicos nativos e a resposta nutricional no morangueiro, cultivado sob dois sistemas de produção orgânica. No tratamento com manejo orgânico convencional (OC) foi feito o preparo do solo com 2 t.ha<sup>-1</sup> de fertilizante orgânico Magmaton®, 1 t.ha<sup>-1</sup> de fertilizante organomineral Biorin®, 1 t.ha<sup>-1</sup> bokashi e 4 t.ha<sup>-1</sup> de cama de poedeira. Enquanto que no tratamento com manejo orgânico natural (ON) foi aplicado apenas 2 t.ha<sup>-1</sup> de bokashi. Os resultados demonstraram associações significativas entre as variáveis analisadas ( $p<0,01$ ). A colonização micorrízica correlacionou-se negativamente com S e B, enquanto os teores de glomalina facilmente extraível foram afetados negativamente pelos teores de P e Ca. Para a variável esporo não houve associação significativa com nenhum elemento avaliado. O maior aporte de adubo no sistema, mesmo que de procedência orgânica, diminui a colonização e atividade dos fungos micorrízicos arbusculares nativos do solo.

**Palavras-chave:** adubação orgânica, micorrizas, morangueiro.

---

## **Native mycorrhizal fungi and strawberry nutrition in organic systems**

### **ABSTRACT**

This work objective was to evaluate the possible relations between the native mycorrhizal fungi and the nutritional response in strawberry cultivated under two systems of organic production. In the treatment with conventional organic management (OC) the soil was prepared with 2 t.ha<sup>-1</sup> of Magmaton® organic fertilizer, 1 t.ha<sup>-1</sup> of Biorin® organomineral fertilizer, 1 t.ha<sup>-1</sup> bokashi and 4 t.ha<sup>-1</sup> of poultry litter. Whereas the treatment with natural organic management (ON) only 2 t.ha<sup>-1</sup> of bokashi were applied. The results showed significant associations between the analyzed variables ( $p<0,01$ ). Mycorrhizal colonization correlated negatively with S and B, and the contents of easily extractable glomalin were negatively affected by P and Ca contents. There was no significant association with any evaluated elements for the spore variable. The higher fertilizer input in the system, even from organic source, decreases the colonization and activity of arbuscular mycorrhizal fungi native of the soil.

**Keywords:** organic fertilization, mycorrhizae, strawberry.

---

## INTRODUÇÃO

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) desempenham importante papel na aquisição de nutrientes para as plantas (Cardoso et al., 2010), especialmente em modelos ecológicos de produção, onde há uma maior dependência dos processos biológicos do solo para o equilíbrio e produtividade do sistema.

No cultivo orgânico é permitido o uso de diversos tipos de adubos. Entretanto, sabe-se que a adubação em grandes quantidades, mesmo de procedência orgânica, pode provocar desequilíbrio nutricional na planta e inibir a atividade dos FMA, que possuem taxa de crescimento inversamente proporcional ao aporte desses insumos (Trindade et al., 2000).

O objetivo do trabalho foi avaliar as possíveis relações entre os fungos micorrízicos nativos e a resposta nutricional no morangueiro, cultivado sob dois sistemas de produção orgânica.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em Latossolo Vermelho eutrófico. A caracterização química de fertilidade do solo foi: pH = 6,3; MO = 39 g kg; P = 43 mg dm<sup>-3</sup>; Ca = 84 mmolc dm<sup>-3</sup>; Mg = 22 mmolc dm<sup>-3</sup>; K = 5,0 mmolc dm<sup>-3</sup>; H+Al = 18 mmolc dm<sup>-3</sup>; CTC = 129 mmolc dm<sup>-3</sup>; V% = 86% (Raij et al., 2001). O experimento foi instalado em área comercial de produção orgânica de morango (*Fragaria x ananassa*), em Atibaia-SP. O ensaio foi composto por dois tratamentos: manejo orgânico convencional (OC) e manejo orgânico natural (ON). No preparo de ambas as áreas, o solo foi gradeado e foi plantado milho para a produção de fitomassa, sendo incorporado ao solo no florescimento. Posteriormente, foi realizado o transplantio das mudas de morango. Os tratamentos estão demonstrados conforme abaixo (Tabela 1).

Tabela 1 – Adubos orgânicos e suas respectivas dosagens utilizados nos tratamentos, manejo orgânico convencional (OC) e manejo orgânico natural (ON).

Tratamentos	Composto bokashi (3% N)	Fertilizante orgânico Magmaton® (--)	Fertilizante organomineral Biorin® (18% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> e 15% Ca)	Cama de poedeira (3% N, 3% P e 3% K)
----- t.ha <sup>-1</sup> -----				
OC	1	2	1	4
ON	2*	0	0	0

\*1 t.ha<sup>-1</sup> de bokashi foi incorporado ao solo junto com o milho e 1 t.ha<sup>-1</sup> antes do transplante das mudas.

Aos oito meses após o transplantio, foi realizada a amostragem. Inicialmente retirou-se a parte aérea da planta do morangueiro para determinação de macro e micronutrientes, e posteriormente, solo e raiz na profundidade de 0-20 cm, para avaliação de colonização micorrízica (COL), número de esporos viáveis (ESP) e glomalina facilmente extraível (EE-BRSP).

A COL foi avaliada pelo método da clarificação e coloração das raízes (Phillips and Hayman, 1970), seguida de contagem em placa de Petri (Giovannetti and Mosse, 1980). O ESP foi determinado pela técnica de peneiramento úmido (Gerdemann and Nicholson, 1963), seguida de centrifugação em água e sacarose 70% (Jenkins, 1964).

A extração de EE-BRSP seguiu a metodologia de Wright and Updahyaya (1998), com quantificação segundo Bradford (1976). A avaliação dos teores minerais da parte aérea do morango foi realizada de acordo com Malavolta et al. (1997).

Os dados foram submetidos à correlação de Pearson a 1% de probabilidade. Adicionalmente foi realizada análise de componentes principais (PCA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram associações significativas entre as variáveis analisadas ( $p<0,01$ ). A COL correlacionou-se negativamente com enxofre (S) e boro (B), enquanto os teores de EE-BRSP foram afetados negativamente pelas concentrações de fósforo (P) e cálcio (Ca). Para a variável esporo não houve associação significativa com nenhum elemento avaliado (Tabela 1).

Tabela 1 – Coeficiente de Pearson (R) para correlações entre colonização micorrízica (COL), número de esporos viáveis (ESP) e glomalina facilmente extraível (EE-BRSP) e teores minerais da parte aérea na cultura do morango.

Correlações	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Mn	Cu	Zn	B
COL	-0,12	-0,27	-0,43	-0,06	-0,17	<b>-0,59</b>	-0,20	0,43	-0,38	-0,11	<b>-0,64</b>
ESP	0,20	0,29	-0,05	-0,06	-0,25	0,16	0,23	-0,10	0,06	0,10	-0,38
EE-BRSP	0,42	<b>-0,72</b>	-0,27	<b>-0,55</b>	0,20	-0,17	-0,24	0,15	0,15	-0,41	-0,31

Valores em negrito indicam correlações significativas a 1% de probabilidade.

A medida que os teores de S e B aumentam na planta a colonização micorrízica diminui. Pouco se sabe sobre o papel dos FMA na absorção de enxofre e boro (Marschner, 2012). No entanto, a adubação fosfatada favorece a disponibilidade de S, pois o P apresenta maior energia de ligação e desloca o S adsorvido no solo, deixando-o

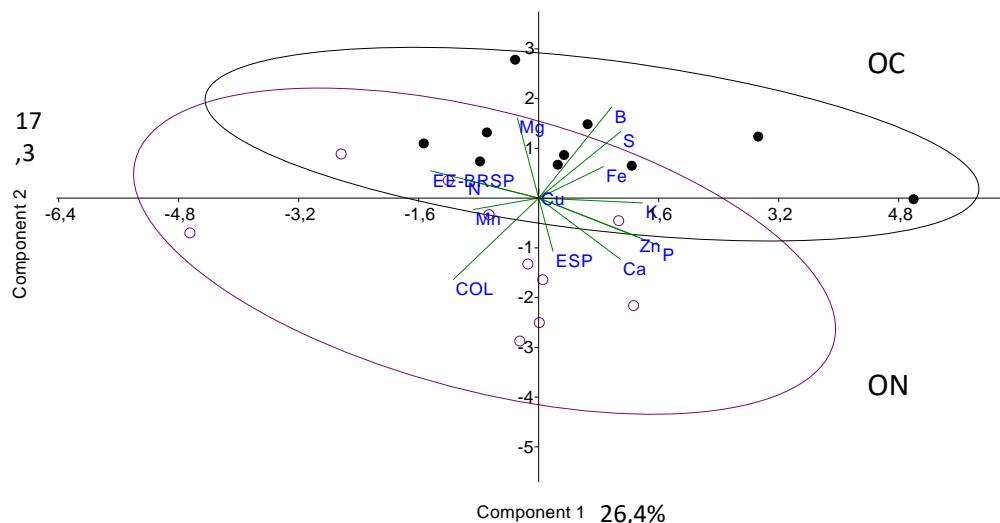
mais disponível (Alvarez V et al., 2007). Neste sentido, os resultados demonstram que os FMA são inibidos em altas concentrações de S, assim como ocorre com P (Cardoso et al., 2010). O OC recebeu um aporte de 310 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> contra 20 kg ha<sup>-1</sup> do ON.

Ruuhola and Lehto (2014) demonstraram acúmulo transitório de B nas raízes de *Betula pendula* inoculadas com ectomicorizas e fertilizadas com o elemento, resultando em captação foliar em fase posterior. Dessa forma, o acúmulo de B nas raízes, quando em endomicorizas, pode também contribuir para inibição da colonização.

Os resultados para EE-BRSP indicam que quanto maior teor de P e Ca na planta, menor a produção da proteína. O OC recebeu maior aporte de P e Ca (Biorin® e cama de poedeira). Fatores que afetam a simbiose micorrízica influenciam na produção desta proteína no solo (Sousa et al., 2012). A inibição da associação micorrízica em solos com alta fertilidade já é bem conhecida (Cardoso et al., 2010). Como consequência há um decréscimo nas taxas de produção da proteína, sendo encontrado menores teores em solos com altas concentrações de P, Ca e SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Purin and Klauberg Filho, 2010).

A análise de componentes principais (Figura 1), por meio das elipses em torno de cada tratamento, demonstram que o ON apresentou maior variação dos dados em comparação com o OC.

Figura 1 – Análise de componentes principais (PCA) entre as variáveis microbiológicas e de teores minerais da parte aérea na cultura do morango.



Sistemas orgânicos de produção apresentam maior heterogeneidade em termos de microbiota do solo (Lupatini et al., 2017), pois apresentam alta dependência dos atributos biológicos, conforme verificado no ON. Assim, verifica-se que os manejos

orgânicos nem sempre asseguram que as funções biológicas do solo sejam executadas, sendo importante a escolha criteriosa de insumos que serão aplicados no sistema.

## CONCLUSÕES

O maior aporte de adubo no sistema, mesmo que de procedência orgânica, diminui a colonização e atividade dos fungos micorrízicos arbusculares nativos do solo.

## REFERÊNCIAS

- ALVAREZ V., V.H., ROSCOE, R., KURIHARA, C.H., PEREIRA, N.F., 2007. Enxofre. In: R.F. NOVAIS, V.H. ALVAREZ V, N.F. BARROS, R.L.F. FONTES, R.B. CANTARUTTI, J.C.L. NEVES, ed. *Fertilidade do solo*. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, pp. 595-644.
- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. vol. 72, no.1-2, pp. 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- CARDOSO, E.J.B.N., CARDOSO, I.M., NOGUEIRA, M.A., BARETTA, C.R.D.M., PAULA, A.M, 2010. Micorrizas arbusculares na aquisição de nutrientes pelas plantas. In: J.O. SIQUEIRA, F.A. SOUZA, E.J.B.N. CARDOSO, S.M. TSAI, ed. *Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil*. Lavras: UFLA, pp. 153-214.
- GERDEMANN, J.W. and NICOLSON, T.H., 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of British Mycological Society*, vol. 46, no. 2, pp. 235-244. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80079-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80079-0).
- GIOVANNETTI, M. and MOSSE, B., 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytology*, vol. 84, no. 3, pp. 489-500. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x>
- JENKINS, W.R., 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Report*, vol. 48, no. 7, pp. 692. <https://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=mdp.39015001262529;view=1up;seq=12>.
- LUPATINI, M., KORTHALS, G.W., HOLLANDER, M., JANSSENS, T.K.S., KURAMAE, E. 2017. Soil Microbiome Is More Heterogeneous in Organic Than in

- Conventional Farming System. *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, no. 1, pp. 1 -13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02064>.
- MALAVOLTA, E., VITTI , G.C., OLIVEIRA, A.O., 1997. *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. 2 ed. Potafos: Piracicaba. 319 p.
- MARSCHNER, P., 2012. Rhizosphere Biology. In: \_\_\_\_\_ . *Mineral nutrition of higher plants*. 3 ed. London: Elsevier, pp. 369-388.
- PHILLIPS, J.M., and HAYMAN, D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, vol. 55, no. 3, pp. 158 -161. [http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536\(70\)80110-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3).
- PURIN, S. and KLAUBERG FILHO, O., 2010. Glomalina: Nova abordagem para entendermos a biologia dos fungos micorrízicos arbusculares. In: J.O. SIQUEIRA, F.A. SOUZA, E.J.B.N. CARDOSO, S.M. TSAI, ed. *Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil*. Lavras: UFLA, pp. 503-524.
- RAIJ, B. VAN; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A., 2001. *Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais*. Campinas: Instituto Agronômico. 285 p.
- RUUHOLA, T. and LEHTO, T., 2014. Do ectomycorrhizas affect boron uptake in *Betula pendula*? *Canadian Journal of Forest Research*, vol. 44, no. 9, pp. 1013 –1019. <http://dx.doi.org/10.1139/cjfr-2014-0115>.
- SOUSA, C.S., MENEZES, R.S.C., SAMPAIO, E.V.S.B., LIMA, F.S., 2012. Glomalina: características, produção, limitações e contribuição nos solos. *Semina: Ciências Agrárias*, vol. 33, no. 6, pp. 3033–3044. <http://doi:10.5433/1679-0359.2012v33Sup1p3033>.
- TRINDADE, A.V., FARIA, N.G., ALMEIDA, F.P., 2000. Uso de esterco no desenvolvimento de mudas de mamoeiro colonizadas com fungos micorrízicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 35, no. 7, pp. 1389-1394. <http://www.scielo.br/pdf/pab/v35n7/1389>.
- WRIGHT, S.F. and UPADHYAYA, A., 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, vol. 198, no. 1, pp. 97-107. <http://doi:10.1023/A:1004347701584>.

## **Fungos da Antártica: Metabólitos bioativos contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.**

Juliano Henrique Ferrarezi<sup>1</sup>; Gabrielle Vieira<sup>1</sup>; Marina Vitti Vianna<sup>1</sup>; Luana Galvão Morão<sup>1</sup>; Lara Durães Sette<sup>1</sup>; Henrique Ferreira<sup>1</sup>; Daiane Cristina Sass<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biociências de Rio Claro-UNESP. \*daiane\_sass@rc.unesp.br

---

### **RESUMO**

O Brasil se destaca na agricultura, principalmente na citricultura, sendo o maior produtor mundial de laranja. Esta grande produção está relacionada à sua grande extensão territorial e ao clima propício para produção da fruta. Ao mesmo tempo, o clima do país é ideal para o desenvolvimento da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, causadora da doença cancro cítrico. Esta doença ataca todas as principais variedades de citros de importância econômica, causando perdas nos pomares do mundo todo. Atualmente, utiliza-se de pulverização de bactericidas contendo metais pesados para controle da doença, porém tendo em vista o grande dano ambiental causado principalmente devido ao acúmulo de cobre no solo, torna-se necessária a busca de alternativas sustentáveis de combate ao cancro cítrico. Neste sentido, metabólitos secundários de origem microbiológica despertam grande interesse como alternativa aos produtos químicos, devido a seu grande potencial fitossanitário. Este trabalho teve como objetivo investigar o potencial de atividade antibacteriana dos metabólitos secundários, produzidos por fungos isolados do solo abaixo de barra de ferro na Ilha Deception (Antártica), frente à *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, causadora do cancro cítrico em frutas cítricas. Para isto, foram utilizados 22 fungos que produziram 44 extratos (intracelulares e extracelulares), todos os 44 extratos foram submetidos ao teste de inibição de crescimento bacteriano. Oito extratos apresentaram atividade antibacteriana significativa contra a *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

**Palavras-chave:** Cancro cítrico; Metabólitos Secundários; Bioatividade

---

**Antarctic's Fungi: Bioactive Metabolites against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.**

### **ABSTRACT**

Brazil stands out in agriculture, especially in citriculture, being the world's largest orange producer. This large production is related to its big territorial extension and the favorable climate for the fruit production. Concurrently, the climate of the country is ideal for the development of the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, which causes citrus canker disease. This disease attacks all main citrus varieties of economic importance, causing losses in orchards all around the world. Nowadays, bactericide sprays containing heavy metals are used to control the disease, but in view of the great environmental damage mainly caused by the accumulation of copper in the soil, it is necessary to search for sustainable alternatives to fight citrus canker. In this sense,

microbiological secondary metabolites arouse great interest as an alternative to chemicals, due to its great phytosanitary potential. The objective of this work was to investigate the antibacterial activity potential of the secondary metabolites of filamentous fungi isolated from the soil below an iron bar in Deception Island (Antarctica), against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, causer of citrus canker in citrus fruits. In order to do that, we used 22 fungi that produced 44 extracts (intracellular and extracellular), all of the 44 extracts were submitted for bacterial growth inhibition tests. Eight extracts showed significant bioactivity against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

**Keywords:** Citrus canker; Secondary Metabolites; Bioactivity

---

## INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores agrícolas do mundo devido a suas condições climáticas e ampla dimensão territorial. Durante a década de 80 devido ao investimento no setor agrícola o Brasil passou a ser também o maior produtor de citros do mundo (Amorin, 2015). O Estado de São Paulo se destaca na produção de laranja (Almeida and Passos, 2011). Porém, bem como todas as demais culturas, a citricultura é frequentemente afetada por diversas doenças, comprometendo sua produtividade (Sanches et al., 2014). Assim, torna-se necessária a busca por formas de prevenir e controlar essas doenças nos pomares.

Uma das doenças que atacam todas as espécies de citros é o cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. A bactéria é disseminada por ventos e chuvas e entra nos tecidos através de estômatos, hidatódios e ferimentos (Gottwald et al., 2002), causando lesões circulares, salientes de cor castanho e aspecto eruptivo, podendo atingir folhas, frutos e ramos (Amaral, 2003).

Em geral, o controle desta doença se da por meio de aplicações regulares de bactericidas, porém, estes produtos costumam ter em sua constituição metais pesados, principalmente cobre, o que é muito danoso para o meio ambiente, devido a sua toxicidade e seu acúmulo pela cadeia trófica (Rocha e De Azevedo, 2015). Como alternativa menos danosa, tem sido proposta a utilização de metabólitos secundários no combate ao cancro cítrico (Murata et al., 2015). Essas substâncias são produzidas em resposta a estresses ambientais (Knight et al., 2006) e podem ter caráter antimicrobiano. Alguns estudos (Svahn et al., 2015; Furbino et al., 2014) evidenciam o potencial de fungos do ambiente antártico para fins fitossanitários.

Dessa forma, este trabalho apresenta a avaliação de bioatividade de extratos brutos produzidos por fungos filamentosos isolados do solo abaixo de barra de ferro na Antártica contra a bactéria *X. citri* subsp. *citri*, sendo que alguns destes extratos já foram

avaliados em um estudo preliminar apresentando resultados promissores (Ferrarezi, 2016).

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 22 fungos filamentosos isolados de solo coletado na Ilha Deception (Antártica) em novembro/dezembro de 2013. Os fungos, até então preservados em ultracongelamento a -80°C foram reativados em placa contendo meio de cultura malte (2%) sólido e estéril. Após crescimento foram submetidos à fermentação em shaker, em meio malte (2%) líquido durante 21 dias.

A biomassa foi separada do sobrenadante. A biomassa foi triturada com metanol, originando extratos intracelulares. O sobrenadante foi submetido à extração líquido-líquido com acetato de etila, para obtenção dos extratos extracelulares.

A análise de atividade antibacteriana contra a *X. citri* subsp. *citri* foi realizada pelo método REMA (resazurin microtiter assay) em placas de 96 poços (Silva e Ferreira, 2013). Para controle do veículo foi utilizado dimetilsulfóxido 1%, controle positivo a Canamicina e controle negativo apenas inóculo. Nos demais poços foram testados diferentes concentrações dos extratos. A inibição do crescimento bacteriano foi medida através da emissão fluorescência ocasionada pela transformação da resazurina em resorufina, sendo que os dados foram obtidos pelo espectrofotômetro de fluorescência. Todos os testes foram realizados em triplicata.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da metodologia descrita em materiais e métodos foram produzidos 44 extratos (22 intracelulares e 22 extracelulares). Primeiramente com o objetivo de selecionar os extratos bioativos foi realizado um teste inicial com os 44 extratos, utilizando quatro concentrações de cada extrato (2100; 1050; 525 e 262,5 µg/ml).

Os resultados obtidos neste teste mostraram que 8 extratos inibiram, em no mínimo 90%, o crescimento bacteriano. Sendo que estes 8 extratos são origem extracelular, isto provavelmente está associado ao fato desses metabólitos serem lançados no meio ambiente para impedir a competição por nutrientes com outros microrganismos.

Os 8 extratos foram submetidos a uma nova avaliação antibacteriana, seguindo o mesmo protocolo, entretanto neste teste foram adicionadas mais quatro concentrações dos extratos (131,2; 65,6; 32,8 e 16,4 µg/ml). Com os resultados obtidos neste último

teste foi possível esboçar um gráfico de regressão polinomial, onde a equação da reta gerada foi utilizada para calcular a concentração inibitória mínima de cada extrato para inibir o crescimento de 90% da *X. citri* subsp. *citri* (MIC90). Os valores de MIC90 obtidos, para cada extrato, estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Valores de MIC90 para os oito extratos avaliados contra a *X. citri* subsp. *citri*.

Códigos dos Extratos	MIC 90 ( $\mu$ g/mL)
E3	2009,26
E6	285,29
E8	1995,73
E16	805,40
E19	1714,07
E20	784,44
E21	600,88
E22	1995,74

Quatro dos oito extratos apresentaram a MIC90 próxima à concentração máxima testada (2100  $\mu$ g/ml) (E3, E8, E19 e E22), ou seja, não demonstram resultados significativos em menores concentrações. Os extratos E6, E16, E20 e E21 apresentaram resultados melhores, sendo E6 o extrato que apresentou a menor MIC90 (258,29  $\mu$ g/ml) e inibição do crescimento bacteriano maior que 90% em três concentrações testadas. Tendo em vista que as amostras em questão se tratam de extratos brutos, é possível que os testes apenas com os compostos responsáveis pela atividade bacteriana, em cada extrato, apresentem resultados de MIC90 ainda mais satisfatórios.

## CONCLUSÕES

Podemos concluir que oito dos 22 fungos filamentosos produziram extratos brutos extracelulares com potencial de bioatividade contra *X. citri* subsp. *citri*, inibindo o crescimento bacteriano de forma significativa (>90%) quando comparados à Canamicina, com destaque para a amostra E6 que possui a menor MIC90, ou seja, menor concentração de extrato bruto necessária para inibir 90% do crescimento da *X. citri* subsp. *citri*. Assim, este trabalho demonstra do ponto de vista biotecnológico a importância de pesquisas no ramo de metabólitos secundários para fins fitossanitários.

## AGRADECIMENTO

Agradeço a FAPESP pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C.O. and PASSOS, O.S., 2011. Citicultura brasileira em busca de novos rumos: Desafios e oportunidades na região nordeste. Cruz das Almas: *Embrapa Mandioca e Fruticultura*. 145 p.
- AMARAL, A.M., 2003. Cancro cítrico: permanente preocupação da citicultura no Brasil e no mundo. *Comunicado técnico* 86. Brasil, Brasília, DF.
- AMORIM, M. da S., 2015. *Desempenho inicial de combinações copa e porta-enxerto de citros no litoral norte do estado da Bahia*.
- FERRAREZI, J.H.; VIEIRA, G.; VIANNA, M.V.; MORÃO, L.G.; SETTE, L.D.; FERREIRA, H. and SASS, D.C., 2016. Extratos de fungos da Antártica: avaliação da atividade contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Ciência e Tecnologia* (FATEC-JB), v. 8, n. especial.
- FURBINO L.E., GODINHO V.M., SANTIAGO I.F., PELLIZARI F.M., ALVES T.M.A., ZANI C.L., JUNIOR P.A.S., ROMANHA A.J., CARVALHO A.G.O., GIL L.H.V.G., ROSA C.A., MINNIS A.M. and ROSA L.H., 2014. Diversity Patterns, Ecology and Biological Activities of Fungal Communities Associated with the Endemic Macroalgae Across the Antarctic Peninsula. *Microbial Ecology*. v. 67, p. 775-787.
- GOTTWALD, T.R., SUN, X., RILEY, T., GRAHAM, J.H., FERRANDINO, F. and TAYLOR, E.L., 2002. Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. *Phytopathology*, v.92, p.361-377.
- KNIGHT V., SANGLIER J.J., DITULLIO D., BRACCILI S., BONNER P., WATERS J., KOLLER O.C., DE OLIVEIRA R.B.L., NUNES D.S., SOGLIO F.D., PANZENHAGEN N.V., SARTORI I.A. and MANTEZA F., 2006 Controle químico do cancro cítrico em plantas jovens sob manejo convencional e orgânico. *Ciência Rural*, v. 36, p. 1043-1048.
- LEYNS, F., DE CLEENE, M., SWINGS, J. and DE LEY, J., 1984. The host range of the genus *Xanthomonas*. *The Botanical Review*, 50, p. 308-355.
- ROCHA, C.H.B., DE AZEVEDO, L.P., 2015. Avaliação da presença de metais pesados nas águas superficiais da Bacia do Córrego São Mateus, Juiz de Fora (MG), Brasil. *Revista Espinhaço*.
- MURATE L.S., DE OLIVEIRA A.G., HIGASHI A.Y., BARAZETTI A.R., SIMIONATO A.S., DA SILVA C.S., SIMÕES G.C., DOS SANTOS I.M.O., FERREIRA M.R., CELY M.V.T., NAVARRO M.O.P., DE FREITAS V.F., NOGUEIRA M.A., DE MELLO J.C.P., LEITE JUNIOR R.P. and ANDRADE G.,

2015. Activity of Secondary Bacterial Metabolites in the Control of Citrus Canker. *Agricultural Sciences*. v. 6, p. 295-303.

SANCHES A.L.R., DE MIRANDA S.H.G., BELASQUE JUNIOR J. and BASSANEZI R.B., 2014. Análise Econômica da Prevenção e Controle do Cancro Cítrico no Estado de São Paulo. *Econ. Sociol. Rural.* v. 52, p. 549-566.

SILVA IC, FERREIRA H. 2013. Drug Sensitivity Assay of *Xanthomonas. citri* subsp. *citri* Using REMA Plate Method. *Bio-protocol.*, v. 3, p. 1-4.

SVAHN K.S., CHRYSSANTHOU E., OLSEN B., BOHLIN L. and GÖRANSSON U., 2015. *Penicillium nalgiovense* Laxa isolated from Antarctica is a new source of the antifungal metabolite amphotericin B. *Fungal Biology and Biotechnology*. v. 2, p. 1-8.

## Seleção de meios de cultivo para produção de poli(3-hidroxibutirato)

Karine Laste Macagnan<sup>1</sup>; Mariane Igansi Alves<sup>2</sup>; Leonardo Zanetti Fonseca<sup>1</sup>; Matheus Marques Torres<sup>1</sup>; Camila Rios Piecha<sup>1</sup>; Lígia Furlan<sup>3</sup>; Patrícia Diaz de Oliveira<sup>1</sup>, Angelita da Silveira Moreira<sup>1,2,3\*</sup>, Claire Tondo Vendruscolo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

<sup>2</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas.

<sup>3</sup>Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

\*angelitadasilveiramoreira@gmail.com

### RESUMO

Poli(3-hidroxibutirato) ou P(3HB) é um biopolímero biodegradável acumulado no citoplasma de alguns microrganismos como inclusões de poliésteres. O custo de produção de P(3HB) pode ser diminuído aumentando-se as concentrações celulares e poliméricas, utilizando-se combinações adequadas de nutrientes no meio de cultivo e matéria-primas mais baratas como componentes de meio. Objetivou-se avaliar o efeito de diferentes meios de cultivo (F4, BEI e MM) e fontes de carbono (glicose, sacarose e glicerol), na fase de produção de polímero, utilizando-se a bactéria acumuladora *Ralstonia solanacearum*. Para a fase de inóculo utilizou-se o meio de cultivo *Yeast Malt* adicionado de sacarose (35 g/L). Na fase de produção de P(3HB) foram avaliados diferentes meios minerais - F4 (meio controle), BEI e MM - e diferentes fontes de carbono - glicose, sacarose e glicerol - na concentração de 40 g/L. Os processos foram conduzidos em frascos *Erlenmeyers* de 500 mL em incubador agitador orbital, 32 °C e agitação de 250 e 200 rpm, durante 24 h e 72 h, respectivamente. Avaliou-se a concentração de biomassa pela análise de massa celular seca (MCS) e o acúmulo de P(3HB). Os melhores resultados para MCS foram obtidos utilizando-se o meio MM adicionado de glicose (4,8 g/L) ou sacarose (5,7 g/L). O acúmulo de P(3HB) médio foi 46,8% utilizando-se o meio MM adicionado de sacarose. O meio MM possibilitou os melhores resultados [MCS e %P(3HB)], tanto usando glicose como sacarose.

**Palavras-chave:** Biopolímero, Bioprocesso, Polihidroxialcanoato, *Ralstonia solanacearum*.

---

**Selection of culture media for poly(3-hydroxybutyrate) production**

### ABSTRACT

Poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] is a biodegradable biopolymer accumulated in the cytoplasm of some microorganisms as inclusions of polyesters. The cost of production to the P(3HB) can be lower by increasing cellular and polymer concentrations with suitable combinations of nutrients in the culture medium and cheaper raw materials as media components. The objective was to evaluate the effect of different culture media (F4, BEI and MM) and carbon sources (glucose, sucrose and glycerol) in the polymer production phase with *Ralstonia solanacearum* RS bacterium. In the inoculum phase was added 35 g/L sucrose on the Yeast Malt culture medium. In the production phase of P(3HB), were evaluated the mineral medium, F4 (control medium), BEI and MM as the

carbon sources, glucose, sucrose and glycerol in the concentration of 40 g/L. The experiments were carried out in 500 mL Erlenmeyer flasks and shaking at 250 and 200 rpm for 24 h and 72 h, respectively in an orbital shaker incubator, at 32 °C. The biomass concentration was evaluated by dry cell weight (DCW) analyses and accumulation of P(3HB). The best results for DCW were for the medium MM added glucose (4.8 g/L) or sucrose (5.7 g/L). The average P(3HB) accumulation was 46.8% with the MM medium added sucrose. However, the MM medium allowed the best results of DCW and P(3HB), with both glucose and sucrose.

**Keywords:** Biopolymer, Bioprocess, Polyhydroxyalkanoate, *Ralstonia solanacearum*.

---

## INTRODUÇÃO

O crescente interesse científico pela área ambiental, associado ao ainda crescente consumo de plásticos, têm tornado necessário a pesquisa e o desenvolvimento de substitutos ecologicamente corretos. É uma das principais linhas de pesquisa desses novos materiais que tem despertado interesse é a obtenção de biopolímeros biodegradáveis, produzidos por microrganismos com o uso de fontes renováveis, com características térmicas e mecânicas relevantes que permitam a sua industrialização (Vinhos et al., 2007). Por possuir propriedades físicas comparáveis ao polipropileno (PP), o polihidroxibutirato P(3HB) é o plástico biopolimérico mais estudado dentre os polihidroxiacanoatos (PHAs).

O processo de síntese do P(3HB) ocorre, normalmente, em duas etapas: crescimento celular utilizando meio de cultura complexo, seguida de uma fase de produção de polímero, a qual ocorre sob a condição de excesso de fonte de carbono e, geralmente, associada à limitação de um nutriente essencial como P, Fe, Mg ou N (Khanna e Srivastava, 2005). O rendimento polimérico varia muito, em função do microrganismo produtor, dos meios utilizados e das condições operacionais; podem ser citadas produções de 2,39 a 63,0 g/L do polímero (Kulprecha et al., 2009; Atlic et al., 2011).

O P(3HB) ainda é considerado de custo elevado, o que limita seu uso. Entretanto, o custo de produção por biotecnologia microbiana pode ser diminuído aumentando-se o acúmulo polimérico intracelular e/ou a concentração celular no caldo para produzir uma quantidade maior de polímero, adequando-se a combinação de nutrientes no meio de cultivo, ou ainda utilizando matérias-primas mais baratas como componentes de meio (Kulprecha et al., 2009). O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes meios de cultivo (F4, BEI e MM) e de diferentes fontes de carbono

(glicose, sacarose e glicerol) na fase de produção de polímero pela bactéria acumuladora *Ralstonia solanacearum* RS.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Microrganismo, meios de cultivo e condições operacionais**

A linhagem de *Ralstonia solanacearum* RS utilizada foi cedida pelo Laboratório de Bacteriologia da FAEM, UFPel. A bactéria está sendo preservada por meio das técnicas de liofilização e repiques mensais em *Nutritive Yeast Agar* (NYA) (Schaad et.al, 2001), e estocadas sob congelamento a -80 °C e refrigeração a 4 °C.

Para a fase de inóculo foi utilizado o meio de cultivo *Yeast Malt* (YM) (Jeanes, 1974), composição demonstrada na tabela 1, adicionado de sacarose na concentração de 35 g/L, pH 6,0, adicionado de óleo de arroz 1 mL/L. O inóculo, com DO<sub>600nm</sub> 20, foi produzido a partir de pré-inóculos formados pela suspensão de células frescas oriundas de cultivos multiplicativos, crescidos em placas com meio sólido NYA durante 72 h a 32 °C. Na fase de produção de P(3HB) foram avaliados 3 diferentes meios minerais, denominados F4 (meio de cultivo controle), BEI (Oliveira et al., 2010) e MM (Atlic, 2011), composições também demonstradas na tabela 1, adicionados de solução de oligoelementos (Oliveira et al., 2010) e de óleo de arroz (Irgovel®), ambos 1 mL/L. Além disso, foram avaliadas 3 diferentes fontes de carbono - glicose, sacarose e glicerol - na concentração de 40 g/L, em pH 7,0. Os processos foram conduzidos em frascos *Erlenmeyers* de 500 mL, em incubador agitador orbital, 32 °C e agitação de 200 rpm, durante 24 h para o inóculo e 250 rpm e 72 h para a fase de produção.

**Tabela 1.** Composição dos meios de cultivo para produção de P(3HB) em g/L.

	<b>YM</b>	<b>F4</b>	<b>BEI</b>	<b>MM</b>
<b>Ácido Cítrico</b>	-	0,2	-	-
<b>Citrato de Sódio</b>	-	4,0	-	-
<b>Cloreto de Cálcio</b>	-	-	-	0,02
<b>Extrato de Levedura</b>	2,7	-	0,2	-
<b>Extrato de Malte</b>	2,7	-	-	-
<b>Fosfato de Potássio Dibásico</b>	-	-	13,62	-
<b>Fosfato de Potássio Monobásico</b>	-	-	2,0	1,5
<b>Fosfato de Sódio</b>	-	-	-	4,5
<b>Peptona</b>	4,5	-	-	-
<b>Sulfato de Amônio</b>	-	-	-	1,5
<b>Sulfato de Magnésio</b>	-	-	2,7	0,2
<b>Triptose</b>	-	-	2,0	-
<b>Ureia</b>	-	3,0	-	-

### **Determinação de crescimento celular e acúmulo de P(3HB)**

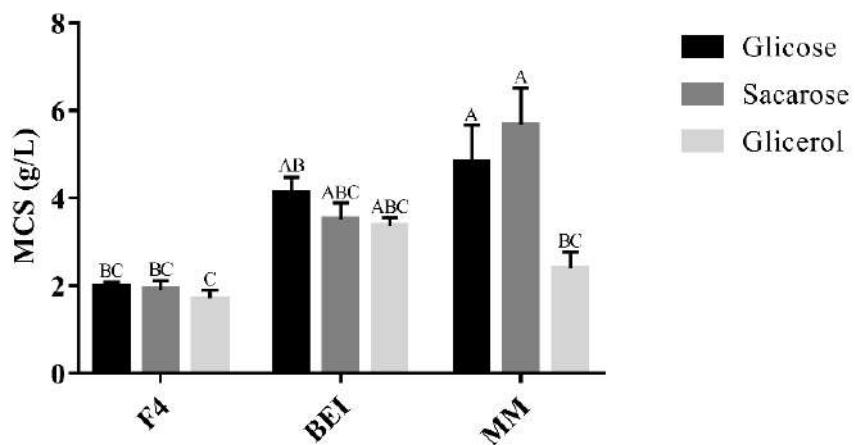
O crescimento celular foi avaliado pela análise de massa celular seca (MCS) determinada por gravimetria e expressa em g/L. Para determinação do acúmulo de P(3HB), o polímero foi extraído, segundo metodologia de extração química utilizando MCS e clorofórmio na proporção 40:1 (v/m), e quantificado por gravimetria (Macagnan et al., 2017). As médias foram analisadas estatisticamente pelo teste de Tukey  $p<0,05$  no programa *Statistix 8.0*.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

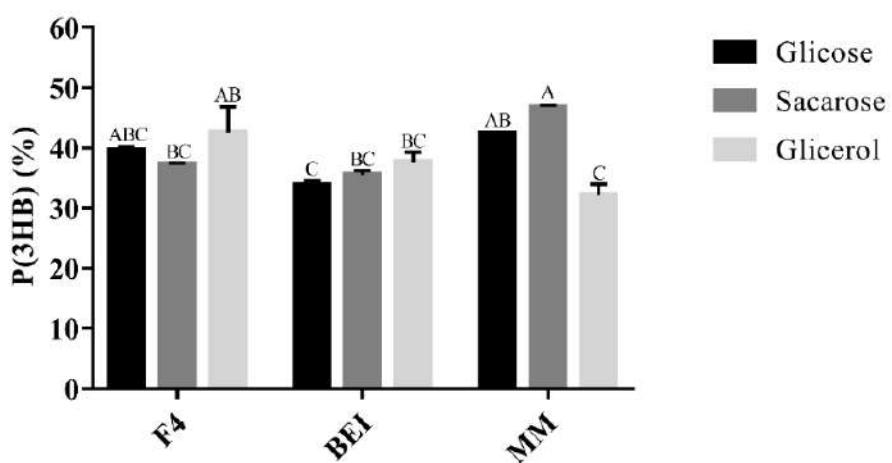
Os resultados para MCS e porcentagem de P(3HB), após 72h de cultivo, estão representados nas figuras 1 e 2, respectivamente.

Os melhores resultados para MCS foram obtidos utilizando-se o meio MM adicionado de glicose (4,8 g/L) ou sacarose (5,7 g/L). Embora os meios de cultivo estudados sejam bastante distintos em composição, a principal diferença do meio MM é a presença de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, não contido nos outros meios. Apesar da ureia, presente no meio de cultivo F4, ser uma fonte de nitrogênio de baixo custo e ser muito utilizada na literatura, a cepa pode apresentar baixa eficiência em utilizá-la, o que explica o baixo desenvolvimento e multiplicação celular quando utilizou-se esse meio de cultivo. A ureia é uma pequena molécula polar não carregada e, em contraste com o sulfato de amônia, que existe na forma iônica, a taxa de absorção de ureia através da membrana celular é menos dependente do pH e mais rápida. O uso de uma fonte de nitrogênio barata como a ureia pode reduzir o custo de produção de P(3HB) se a cepa bacteriana puder utilizá-la eficientemente (Bormann et al., 1998). Porém, melhores resultados foram encontrados utilizando-se o sulfato de amônio no meio MM e extrato de levedura, no meio BEI.

Para o acúmulo de P(3HB), as médias variaram entre 33,8 a 46,8 %, utilizando-se o meio MM adicionado de glicerol e sacarose, respectivamente. Pode-se verificar, ainda, que o acúmulo de polímero foi similar para as fontes de carbono testadas nos meios F4, BEI e MM, com exceção do meio MM adicionado de glicerol em que a porcentagem foi menor. O mesmo perfil foi observado para a concentração de biomassa, em que as fontes de carbono não diferiram estatisticamente para o mesmo meio de cultivo. Isso pode ter acontecido devido à diferença de disponibilidade e tipo de fonte de nitrogênio em cada meio de cultivo.



**Figura 1.** Massa celular seca (g/L) após 72h de cultivo nos meios de produção F4, BEI e MM adicionados de glicose, sacarose ou glicerol.



**Figura 2.** Rendimento em porcentagem de P(3HB) após 72h de cultivo nos meios de produção F4, BEI e MM adicionados de glicose, sacarose ou glicerol.

## CONCLUSÕES

O meio de cultivo selecionado para pesquisas futuras é o meio MM adicionado da fonte de carbono sacarose, pois apresentou melhores resultados nas análises realizadas, concentração de biomassa e P(3HB).

## REFERÊNCIAS

ATLIĆ, A., KOLLER, M., SCHERZER, D., KUTSCHERA, C., GRILLO-FERNANDES, E., HORVAT, P., CHIELLINI, E., and BRAUNEGG, G., 2011. Continuous production of poly([R]-3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* in a

- multistage bioreactor cascade. *Applied Microbiology Biotechnology*, vol. 91, pp. 295–304. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3260-0>
- BORMANN, E.J., LEIBNER, M., and BEER, B., 1998. Growth-associated production of polyhydroxybutyric acid by *Azotobacter beijerinckii* from organic nitrogen substrate. *Applied Microbiology Biotechnology*, vol. 49, pp. 84–88. JEANES, A., 1974. Extracellular microbial polysaccharides – New hydrocolloids of interest to the food industry. *Food Technology*, vol. 28, pp. 34-40.
- KHANNA, S. and SRIVASTAVA, A.K., 2005. Recentadvances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, vol. 40, no. 2, pp. 607-619. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.053>
- KULPREECHA, S., BOONRUANGTHAVORN, A., MEKSIRIPORN, B. AND THONGCHUL, N., 2009. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 107, no. 3, pp. 240–245.
- MACAGNAN, K.L., RODRIGUES, A.A., ALVES, M.I., FURLAN, L., KESSERLINGH, S.M., MOURA, A.B., OLIVEIRA, P.D., McBRIDE, A.J.A., MOREIRA, A.S. and VENDRUSCOLO, C.T., 2017. Simplified recovery process of *Ralstonia solanacearum*-synthesized polyhydroxyalkanoates via chemical extraction complemented by liquid-liquid phase separation. *Química Nova*, vol. 40, no. 2, pp. 125-130. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20160162>
- OLIVEIRA, C., 2010. *Produção de polihidroxibutirato: bioprospecção de Beijerinckia sp. da coleção de bactérias do Laboratório de Biopolímeros do CDTec - UFPel*. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas. 96 p. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia.
- REDDY, C.S.K., GHAI, R., RASHMI, T. and KALIA, V.C., 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, vol. 87, no. 2, pp. 137-146. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00212-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00212-2)
- SCHAAD, N.W., JONES, J.B. and CHUN, W., 2001. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. APS Press. 373 p.
- VINHAS, G.M., ALMEIDA, Y.M.B. and LIMA, M.A.G.A., 2007. Estudo das propriedades e biodegradabilidade de blendas de poliéster/amido submetidas ao ataque microbiano. *Química Nova*, vol. 6, pp. 1587-1598. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000700016>

## **Produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia solanacearum* sob diferentes condições salinas**

Karine Laste Macagnan<sup>1</sup>; Mariane Igansi Alves<sup>2</sup>; Matheus Marques Torres<sup>1</sup>, Camila Rios Piecha<sup>1</sup>; Patrícia Diaz de Oliveira<sup>1</sup>, Lígia Furlan<sup>3</sup>, Angelita da Silveira Moreira<sup>1,2,3\*</sup>, Claire Tondo Vendruscolo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

<sup>2</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas.

<sup>3</sup>Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

\*angelitadasilveiramoreira@gmail.com

---

### **RESUMO**

Poli(3-hidroxibutirato) ou P(3HB) é um biopolímero plástico biodegradável acumulado no citoplasma bacteriano de alguns microrganismos como inclusões lipofílicas. Em relação a *Ralstonia solanacearum*, há pouca informação disponível na literatura sobre a influência da concentração de sal no crescimento celular e na produção de polímero. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar a influência de diferentes concentrações de sal, tanto no crescimento celular quanto na produção de P(3HB) da cepa RS. Para a fase de inóculo utilizou-se o meio de cultivo *Yest Malt* adicionado de sacarose na concentração de 35 g/L. Na fase de produção de P(3HB) adicionou-se diferentes concentrações de sal (0, 5, 50 e 100 g/L) ao meio mineral MM acrescido de sacarose 40 g/L. Os processos foram conduzidos em frascos *Erlenmeyers* de 500 mL, em incubador agitador orbital, a 32 °C e agitação de 200 rpm, durante 72 h. Foram avaliadas a concentração de biomassa por densidade óptica (DO<sub>600nm</sub>), massa celular seca (MCS) e rendimento de P(3HB). A adição de altas concentrações de sal (50 e 100 g/L) no meio de produção resultou em baixo rendimento de biomassa e de polímero em todos os tempos. Já a adição de baixa concentração (5 g/L) não ocasionou diferença significativa em relação ao tratamento controle, sem adição de sal, para as análises de DO<sub>600nm</sub>, rendimentos de MCS e de P(3HB) nos tempos de 48 e 72h; valores intermediários merecem ser avaliados. *R. solanacearum* RS comportou-se como halotolerante.

**Palavras-chave:** Biopolímero, Bioprocesso. Polihidroxialcanoato, Cloreto de sódio, biomassa.

---

### **Selection of culture media for poly(3-hydroxybutyrate) production**

### **ABSTRACT**

Poly(3-hydroxybutyrate) or P(3HB) is a biodegradable plastic biopolymer accumulated in the bacterial cytoplasm of some microorganisms as lipophilic inclusions. Regarding *Ralstonia solanacearum*, there is a little information available in the literature on the influence of salt concentration on cell growth and on polymer production. Thus, the main purpose of this study was to analyze the influence of different salt concentrations, on the cell growth as well on the production of P(3HB) of the RS strain. In the inoculum phase was added 35 g/L sucrose on the Yest Malt culture medium. In the production phase of P(3HB), salt concentrations from 0, 5, 50 and 100 g/L were added to the mineral medium MM containing 40 g/L of sucrose. The experiments were carried out in

500 mL Erlenmeyer flasks and shaking at 200 rpm for 72 h with an orbital shaker incubator at 32 °C. The biomass concentration was evaluated by optical density (OD<sub>600nm</sub>), as well the dry cell weight (DCW) and yield of P(3HB). The addition of high salt concentrations (50 and 100 g/L) on the production medium resulted in low biomass and polymer yields at all the times for this study. However, the addition of low concentration (5 g/L) did not cause significant difference in relation to the control treatment, without salt addition, to the OD<sub>600nm</sub> analyzes, DCW and P(3HB) yields on times of 48 and 72h; intermediate values which ones were deserve should be evaluated.

**Keywords:** Biopolímero, Bioprocess, Sodium chloride, Polyhydroxyalkanoate, *Ralstonia solanacearum*.

---

## INTRODUÇÃO

O crescente interesse científico pela área ambiental, associado ao ainda crescente consumo de plásticos, têm tornado necessário a pesquisa e o desenvolvimento de substitutos ecologicamente corretos. E uma das principais linhas de pesquisa desses novos materiais que tem despertado interesse é a obtenção de biopolímeros biodegradáveis, produzidos por microrganismos com o uso de fontes renováveis, com características térmicas e mecânicas relevantes que permitam a sua industrialização (Vinhos et al., 2007).

Polihidroxialcanoatos (PHAs) são acumulados no citoplasma bacteriano como inclusões de poliésteres insolúveis em água e utilizados como material de reserva de energia e carbono. Esses bioplásticos se degradam completamente em curto período de tempo pela ação enzimática de microrganismos e sob condições apropriadas no meio ambiente, sendo esta a principal característica desses materiais; além disso, são termoplásticos e biocompatíveis ao ser humano (Reddy et al., 2003).

Por possuir propriedades físicas comparáveis ao polipropileno (PP), o poli(3-hidroxibutirato [P(3HB)]) é o biopolímero mais estudado dentre os PHAs. O processo de síntese de P(3HB) ocorre, normalmente, em duas etapas: crescimento celular, utilizando meio de cultura complexo, seguida de uma fase de produção de polímero, a qual ocorre sob a condição de excesso de fonte de carbono e, geralmente, associada à limitação de um nutriente essencial como P, Fe, Mg ou N (Khanna e Srivastava, 2005).

A *Ralstonia solanacearum* é uma bactéria Gram-negativa em forma de bacilo. Naturalmente habitante do solo e da água, é aeróbica e não formadora de esporos. Os isolados virulentos não possuem flagelos e são imóveis, enquanto os isolados avirulentos têm alta motilidade, possuindo de 1 a 4 flagelos. Cresce em temperatura entre 25 a 35 °C, variando de acordo com os isolados; acumula P(3HB) como reserva de

carbono e energia e é tolerante a sais (Mehan et al., 1994). Os halófilos constituem um grupo versátil de microrganismos caracterizados pela sua necessidade de ambientes hipersalinos onde NaCl constitui o componente de sal predominante (Kogej et al., 2007). A maioria dos autores distingue três tipos de bactérias halófilas: halotolerante (toleram 0 a 15% de NaCl), halófilos moderados (requerem 1 a 15% de NaCl) e halófilos extremos (requerem 15 a 30% de NaCl) (Quillaguana'n et al., 2006).

O custo da produção biotecnológica de P(3HB) pode ser diminuído melhorando-se o rendimento do processo, mediante aumento da concentração celular dos cultivos e do acúmulo polimérico intracelular (Kulprecha et al., 2009). Em relação a *Ralstonia solanacearum*, dispõem-se de pouca informação sobre a influência da concentração de sal no crescimento e na produção de polímero. Assim, objetivou-se analisar a influência de diferentes concentrações de NaCl (0, 5, 50 e 100 g/L) na concentração celular e na produção de P(3HB) por *Ralstonia solanacearum* RS na fase de produção.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Microrganismo, meios de cultivo e condições operacionais**

A linhagem de *Ralstonia solanacearum* RS utilizada foi cedida pelo Laboratório de Bacteriologia da FAEM, UFPel. A bactéria está sendo preservada por meio das técnicas de liofilização e repiques mensais em *Nutritive Yest Agar* (NYA) (Schaad et.al, 2001) estocadas sob congelamento a -80 °C e refrigeração a 4 °C.

Para a fase de inóculo foi utilizado o meio de cultivo *Yest Malt* (YM) (Jeanes, 1974), adicionado de sacarose 35,0; pH 6,0, adicionado de óleo de arroz 1 mL/L. O inóculo foi produzido a partir de pré-inóculos formados pela suspensão de células frescas obtidas a partir de cultivos multiplicativos, crescidos em placas com meio sólido NYA durante 48 h a 32 °C. Na fase de produção de P(3HB) foi utilizado o meio de cultivo MM composto em g/L de cloreto de cálcio 0,02; fosfato de potássio monobásico 1,5; fosfato de sódio 4,5; sulfato de amônio 1,5; sulfato de magnésio 0,2 (Atlic, 2011), e sacarose 40,0, adicionado de solução de oligoelementos (Oliveira et al., 2010) e de óleo de arroz 1 mL/L. Além disso foi adicionado cloreto de sódio nas concentrações de 0, 5, 50 e 100 g/L em pH 7,0.

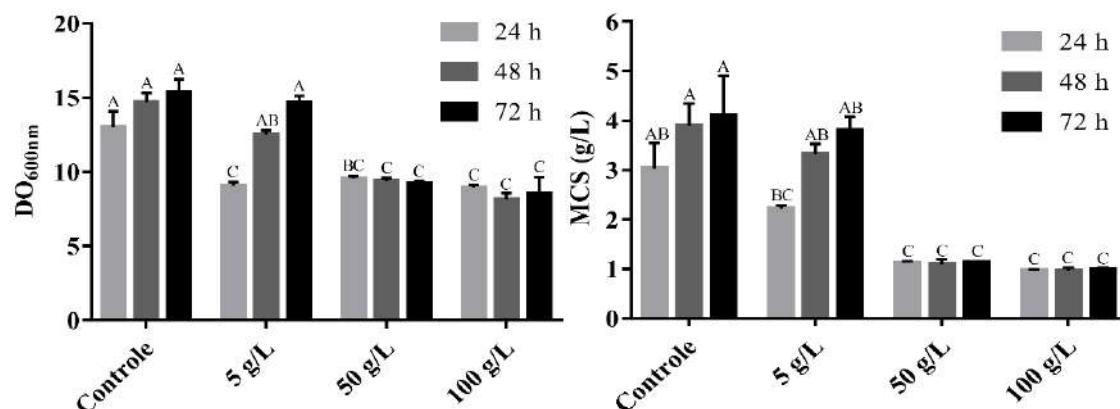
Os processos foram conduzidos em frascos *Erlenmeyers* de 500 mL em incubador agitador orbital, 32 °C e agitação de 200 rpm, durante 24 h para o inóculo e 250 rpm e 72 h para a fase de produção.

## Determinação de crescimento celular e acúmulo de P(3HB)

As análises foram realizadas com amostras coletadas nas 24, 48 e 72h de cultivo. O crescimento celular foi avaliado pela concentração de biomassa ( $DO_{600\text{nm}}$ ), medida por espectrofotometria a 600 nm, e pela concentração de massa celular seca (MCS), determinada por gravimetria. Para determinação do acúmulo de P(3HB), o polímero foi extraído segundo metodologia de extração química utilizando MCS e clorofórmio na proporção 40:1 (v/m) (Macagnan et al., 2017). As médias foram analisadas estatisticamente pelo teste de Tukey  $p<0,05$  no programa *Statistix 8.0*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

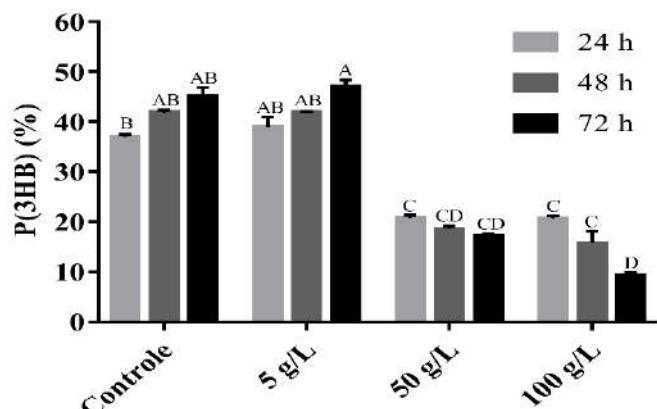
Os resultados para  $DO_{600\text{nm}}$  e rendimento de MCS e porcentagem de P(3HB), após 24, 48 e 72h de cultivo, estão representados nas figuras 1 e 2, respectivamente. Os melhores resultados para  $DO_{600\text{nm}}$  foram obtidos com o tratamento controle, independentemente do tempo utilizado (13,0 a 15,3) e no tempo de 72 h utilizando-se 5 g/L de sal no meio de cultivo (14,6). Para a MCS o melhor tratamento foi o meio de cultivo sem adição de sal nos tempos de 48 e 72 h, obtendo-se 3,9 g/L e 4,1 g/L, respectivamente.



**Figura 1.** Densidade Óptica e Massa celular seca em 24, 48 e 72h de cultivo no meio de produção MM adicionado de NaCl nas concentrações de 0 (controle), 5, 50 e 100 g/L.

O rendimento de P(3HB) foi maior quando utilizou-se 5 g/L de NaCl no tempo de 72 h, quando a bactéria acumulou 47% do seu peso em polímero. Porém, não diferiu estatisticamente dos acúmulos de 41,3 e 45% obtidos no tratamento controle nos tempos de 48 e 72 h, respectivamente, e também não diferiu dos acúmulos de 39,0 e 41,9%

obtidos nas 24 e 48h do mesmo tratamento. Através desses resultados pode-se observar que a adição de NaCl não proporcionou o aumento da multiplicação celular e do acúmulo polimérico; em alguns tempos de cultivo a adição de baixa concentração de sal apenas não diferiu estatisticamente do tratamento controle. Já a adição de 50 ou 100 g/L influenciou negativamente, tanto no crescimento celular quanto no acúmulo de P(3HB).



**Figura 2.** Rendimento de P(3HB) em 24, 48 e 72h de cultivo no meio de produção MM adicionado de NaCl nas concentrações de 0 (controle), 5, 50 e 100 g/L.

## CONCLUSÕES

A adição de baixa concentração de NaCl (5 g/L) no meio de cultivo não ocasionou diferenças significativas em relação ao tratamento controle para as análises de  $DO_{600nm}$ , e rendimentos de MCS e de P(3HB) nos tempos de 48 e 72h de cultivo. Já a adição de altas concentrações de sal (50 e 100 g/L) resultou em baixo rendimento de biomassa e de polímero. *R. solanacearum* RS comportou-se como micro-organismo halotolerante.

## REFERÊNCIAS

- ATLIĆ, A., KOLLER, M., SCHERZER, D., KUTSCHERA, C., GRILLO-FERNANDES, E., HORVAT, P., CHIELLINI, E., and BRAUNEGG, G., 2011. Continuous production of poly([R]-3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* in a multistage bioreactor cascade. *Applied Microbiology Biotechnology*, vol. 91, pp. 295–304. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3260-0>
- JEANES, A., 1974. Extracellular microbial polysaccharides – New hydrocolloids of interest to the food industry. *Food Technology*, vol. 28, pp. 34-40.

- KHANNA, S. and SRIVASTAVA, A.K., 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, vol. 40, no. 2, pp. 607-619. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.053>
- KOGEJ, T., STEIN, M., VOLKMANN, M., GORBUSHINA, A.A., GALINSKI, E.A., and GUNDE-CIMERMAN, N., 2007. Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: role of osmolytes and melanization. *Microbiology*, vol. 153, pp. 4261–4273. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2007/010751-0>
- KULPRECHA, S., BOONRUANGTHAVORN, A., MEKSIRIPORN, B. AND THONGCHUL, N., 2009. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 107, no. 3, pp. 240–245.
- MACAGNAN, K.L., RODRIGUES, A.A., ALVES, M.I., FURLAN, L., KESSERLINGH, S.M., MOURA, A.B., OLIVEIRA, P.D., McBRIDE, A.J.A., MOREIRA, A.S. and VENDRUSCOLO, C.T., 2017. Simplified recovery process of *Ralstonia solanacearum*-synthesized polyhydroxyalkanoates via chemical extraction complemented by liquid-liquid phase separation. *Química Nova*, vol. 40, no. 2, pp. 125-130. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20160162>
- MEHAN, V.K., LIAO, B.S., TAN, Y.J., ROBINSON-SMITH, A., McDONALD, D. and HAYWARD, A.C., 1994. Bacterial wilt of groundnut patancheru: international crops research institute for the semi-arid tropics. *Information Bulletin*, vol. 35, pp. 28-34.
- OLIVEIRA, C., 2010. *Produção de polihidroxibutirato: bioprospecção de Beijerinckia sp. da coleção de bactérias do Laboratório de Biopolímeros do CDTec - UFPel*. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas. 96 p. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia.
- QUILLAGUANÁN, J., DELGADO, O., MATTIASSON, B., and HATTI-KAUL, R., 2006. Poly(b-hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1. *Enzyme Microbiology Technology*, vol. 38, pp. 148–154. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.05.013>
- REDDY, C.S.K., GHAI, R., RASHMI, T. and KALIA, V.C., 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, vol. 87, no. 2, pp. 137-146. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00212-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00212-2)
- SCHAAD, N.W., JONES, J.B. and CHUN, W., 2001. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. APS Press. 373 p.

VINHAS, G.M., ALMEIDA, Y.M.B. and LIMA, M.A.G.A., 2007. Estudo das propriedades e biodegradabilidade de blendas de poliéster/amido submetidas ao ataque microbiano. *Química Nova*, vol. 6, pp. 1587-1598. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000700016>

## **Acumulação de lipídio e produção de lipase por *Candida viswanathii***

Kleydiane B. Dias<sup>1</sup>; Lucas P. da Silva<sup>1</sup>; Alex F. Almeida<sup>1\*</sup>; Bruno S. A. F. Brasil<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Gurupi, TO. \*alexfernando@uft.edu.br

<sup>2</sup>EMBRAPA Agroenergia, Brasilia -DF.

---

### **RESUMO**

Este estudo objetivou avaliar as condições de cultivo para a produção de lipase e acúmulo de lipídio pela levedura *Candida viswanathii* utilizando diferentes fontes de carbono e condições limitantes de nitrogênio em cultivos submersos. A maior produção de lipase foi observada utilizando azeite de oliva (26,78 U/mL), enquanto que a maior acumulação de lipídio ocorreu com trioleína (44,6%). A adição de glicose ao meio de cultivo causou repressão na produção de lipase, mas aumentou a acúmulo de lipídio, provavelmente devido ao excesso de carbono e condições limitantes de nitrogênio. A avaliação do perfil dos ácidos graxos revelou predominância de ácido oleico, obtendo porcentagem de 69,31% usando trioleína como fonte de carbono. Conclui-se que a linhagem *C. viswanathii* pode ser considerada como uma linhagem oleaginosa capaz de acumular altas concentrações de lipídios intracelular e simultaneamente produzir altos níveis de lipase.

**Palavras-chave:** Levedura, azeite de oliva, triacilglicerol

---

### **Lipid accumulation and lipase production by *Candida viswanathii***

### **ABSTRACT**

This study aimed to evaluate the culture conditions for lipase production and lipid accumulation by *Candida viswanathii* using different carbon sources and limiting conditions of nitrogen in submerged cultures. The highest lipase production was observed using olive oil (26.78 U/mL), while the highest lipid accumulation occurred with triolein (44.6%). Addition of glucose to the culture medium caused repression of lipase production, but increased lipid accumulation, probably due to excess of carbon

sources and nitrogen limiting conditions. The evaluation of the fatty acid profile showed a predominance of oleic acid, obtaining a percentage of 69.31%, using triolein as carbon source. It is concluded that the *C. viswanathii* strain can be considered as an oleaginous strain capable of accumulating high concentrations of intracellular lipids and simultaneously producing high levels of lipase.

**Keywords:** Yeast, olive oil, triacylglycerol.

---

## INTRODUÇÃO

Lipases (E.C. 3.1.1.3) são enzimas responsáveis por catalisar a hidrólise de óleos e gorduras em diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos livres e glicerol em condições aquosas, mas também podem facilitar reações como esterificação e transesterificação, na presença de solventes orgânicos. Algumas de suas aplicações são na indústria de detergentes, processamento de couro, em cosméticos, perfumaria, produção de biocombustíveis, química fina, indústria de papel e celulose, alimentos humanos e animais, diagnósticos médicos e produtos farmacêuticos (BARRIUSO et al., 2016).

Algumas espécies microbianas, além de produzirem lipases, tem potencial em sintetizar e armazenar quantidades relevantes de lipídios em sua biomassa (CHANG et al., 2015). Microrganismos que armazenam teores de óleo em cerca de 20% de sua biomassa são considerados microrganismos oleaginosos. Leveduras oleaginosas apresentam grande potencial na produção de lipídios em função da sua alta taxa de acúmulo. Os lipídios acumulados podem ser utilizados em diversos segmentos, como geração de produtos especiais - lubrificantes e polímeros, ou produtos de base - biocombustíveis. Este trabalho teve como objetivo avaliar as condições de cultivo para a produção de lipase e acúmulo de lipídio pela levedura *Candida viswanathii* utilizando diferentes fontes de carbono em condições submersas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Microrganismo e condições de cultura**

A levedura *C. viswanathii* é mantida no Laboratório de Biotecnologia, Análise de alimentos e produtos de purificação (LABAP), Habite – Incubadora de Empresas de Base Biotecnológica, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi-TO. As culturas periódicas foram realizadas em tubo inclinado ágar extrato de malte e incubadas a 28

°C, durante 72 horas. O inóculo foi preparado em solução de NaCl a 0,85%, e padronizado para  $10^7$  células por ml.

Os cultivos foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 125 ml contendo 20 ml de meio de Sais de Vogel (VOGEL, 1956). As culturas foram suplementadas com fontes de carbono e nitrogênio. Os cultivos foram autoclavados a 121°C durante 20 min, inoculados com 1 ml do inóculo padronizado e mantidos a 180 rpm, a 28 °C durante 72 horas. O extrato bruto foi obtido por centrifugação do caldo fermentado a 7500 g a 4°C durante 15 min. O sobrenadante foi recolhido e utilizado para quantificação de enzima e proteína. As biomassas foram lavadas com água destilada e centrifugadas para remover o meio de cultura residual. As biomassas foram secas a 60 °C em estufa até peso constante.

### **Atividade de lipase**

A atividade de lipase foi determinada utilizando palmitato de p-nitrofenila (p-NPP) como substrato (ALMEIDA et al., 2013). A absorbância foi medida a 405 nm e a atividade foi determinada de acordo com a curva padrão feita com p-nitrofenol (coeficiente de extinção molar de pNP:  $1,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Os controles foram preparados sem enzima. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de pNP por ml por min.

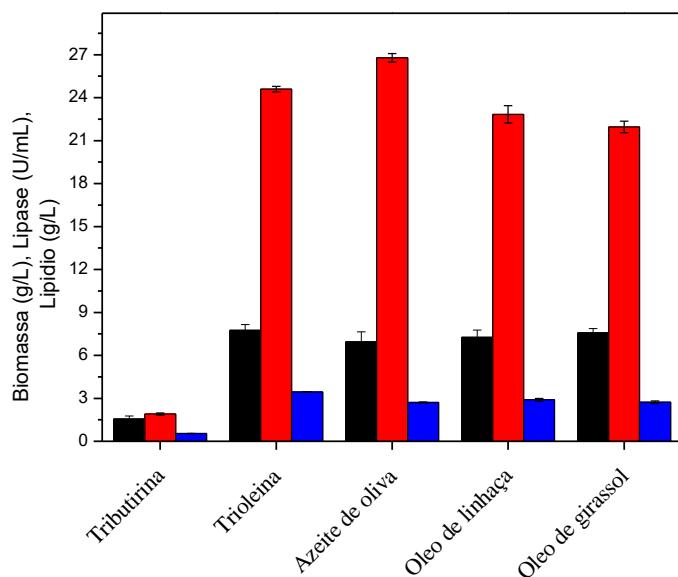
### **Determinação de lipídio microbiano**

A extração de lipídios foi realizada após a biomassa ter sido seco a 60 °C, utilizando o método de Folch (FOLCH et al., 1956). O teor total de lipídio foi determinado por gravimetria.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A linhagem *C. viswanathii* foi analisada quanto ao potencial em produzir lipase e acumular lipídios em cultivos submersos utilizando diferentes fontes de carbono de origem lipídica (Figura 1). As fontes lipídicas tributirina (4:0) e trioleína (18:1) foram escolhidas devido a sua composição no triacilglicerol, enquanto que as fontes de lipídios renováveis, azeite de oliva, óleo de linhaça e óleo de girassol foram escolhidas por comporem em seus triacilgliceróis 79% de ácido oleico, 66% ácido linoleico (18:2 *cis*- $\Delta^{9,12}$ ) e 53% de ácido linolênico (18:3 *cis*- $\Delta^{6,9,12}$ ). O perfil dos ácidos graxos presentes

nos triacilgliceróis pode influenciar diretamente no crescimento microbiano e na produção de lipase.



**Figura 1.** Efeito de fontes de carbono puras e complexas sobre o crescimento de *C. viswanathii*, produção de lipase e acumulação de lipídio. Legenda: (■) Biomassa; (■) Lipase; (■) Lipídio.

A linhagem de *C. viswanathii* foi capaz de se desenvolver em todos os triacilgliceróis analisados apresentando os maiores valores de biomassa seca com trioleína e óleo de girassol (7,75 g/L e 7,57 g/L, respectivamente) e o menor crescimento com tributirina (1,56 g/L). A maior produção de lipase foi observada com azeite de oliva (26,78 U/mL) seguido por trioleína (24,60 U/mL). O maior acúmulo de lipídio intracelular foi observado com a fonte de lipídio puro trioleína (3,45 g/L), que correspondeu a 44,57% do peso seco da biomassa. O acúmulo de lipídio utilizando fontes renováveis de óleo de linhaça, azeite de oliva e óleo de girassol não apresentou diferença significativa (~2,7 g/L).

O perfil dos ácidos graxos produzidos por *C. viswanathii* são apresentados na Tabela 1. Observa-se que a linhagem produziu 86,06% de ácidos graxos insaturados e 13,94% de ácidos graxos saturados do total de lipídios acumulados pela linhagem. Este percentual de acumulação de lipídios insaturados indica que esta linhagem apresenta grande potencial para a aplicação em processos para produção de lipídios com apelo para a produção de alimentos funcionais. O ácido oleico foi produzido em maior quantidade (69,31%) com relação aos demais ácidos graxos insaturados. O ácido oleico

pertence à família ômega-9, que é usado como precursor para a síntese de colesterol HDL.

Parâmetros (%)	Nomenclatura	Trioleína
Lipídio total		25,35 ± 1,89
Ácido graxo saturado		13,94 ± 0,40
Ácido graxo insaturado		86,06 ± 2,87
Ácido mirístico	C 14:0	n.d.
Ácido palmítico	C 16:0	10,80 ± 0,28
Ácido palmitoléico	C 16:1 Δ <sup>cis-9</sup>	1,19 ± 0,05
Ácido esteárico	C 18:0	3,14 ± 0,12
Ácido oleico	C 18:1Δ <sup>cis-9</sup>	69,31 ± 2,33
Ácido vacênico	C 18:1 Δ <sup>trans-11</sup>	1,80 ± 0,05
Ácido linoleico	C 18:2 Δ <sup>cis-9,12</sup>	12,55 ± 0,40
Ácido linolênico	C 18:3 Δ <sup>cis-6,9,12</sup>	0,79 ± 0,03
Ácido eicosadienoíco	C 20:2 Δ <sup>cis-11,14</sup>	0,42 ± 0,01

**Tabela 1.** Perfil dos ácidos graxos produzidos por *C. viswanathii* em condições submersas.

## CONCLUSÕES

O cultivo da linhagem em diferentes substratos hidrofóbicos para a produção de lipase e acumulação de lipídio mostrou que a linhagem de *C. viswanathii* pode ser classificada como uma linhagem pertencente ao grupo dos microrganismos oleaginosos. Este é o primeiro estudo que relata a produção e acumulação de lipídios por esta linhagem. Os lipídios produzidos por *C. viswanathii* possui grande potencial para seu uso como suplementos alimentares. Estudos envolvendo o controle fisiológico para a produção de lipase e acumulação de lipídios em outros substratos hidrofóbicos e com resíduos agroindustriais devem ser realizados para otimizar a co-produção destes metabólitos e aprofundar o entendimento nos mecanismos de biotransformação dos lipídios dos substratos em lipídios microbianos.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. F.; TAUK-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Acid lipase from *Candida viswanathii*: Production, biochemical properties, and potential application. *BioMed Research International*, v. 2013, 2013.
- BARRIUSO, J, et al, Structural traits and catalytic versatility of the lipases from the *Candida rugosa*-like family: A review, *Biotechnology Advances*, 2016.

CHANG, Y, H, et al, Microbial lipid production by oleaginous yeast *Cryptococcus* sp, in the batch culturas using corncob hydroysate as carbono source, *Biomass and Bioenergy*, v. 72, p, 95-103, 2015.

Folch, J.; Lees, M., Sloane Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 226, p. 450–497, 1957.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). *Microbiology Genetics Bulletin*, vol. 13, p. 42–43, 1956.

## **Avaliação da composição de micro-organismos de lodo de esgoto durante o processo de biorremediação**

Lais Roberta Deroldo Sommaggio<sup>1\*</sup>; Flávio A. Oliveira<sup>2</sup>; Carlos Emílio Levy<sup>2</sup>; Dânia Elisa Christofoletti Mazzeo<sup>1,3</sup>; Maria Aparecida Marin-Morales<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro. \*rds.lais@gmail.com

<sup>2</sup>Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas

<sup>3</sup>Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, UNESP, Araraquara.

### **RESUMO**

O lodo de esgoto (LE) é um resíduo proveniente de Estações de Tratamento de Esgoto, que tem potencial para uso agrícola, devido à sua composição rica em matéria orgânica e nutrientes. No entanto, o LE pode apresentar substâncias potencialmente tóxicas para os seres vivos e o ambiente. A biorremediação é uma tecnologia amplamente empregada para descontaminação de resíduos tóxicos, por utilizar de micro-organismos capazes de decompor e/ou modificar poluentes. A identificação dos micro-organismos presentes nesse processo é de extrema importância, já que os mesmos podem ser utilizados para a otimização da biorremediação. Dessa forma, este trabalho buscou identificar os micro-organismos presentes nas diferentes amostras de LE e suas misturas com solo(S) e casca de arroz(CA). As amostras biorremediadas foram: LE puro (LEP); LE misturado com S (LE+S) e LE misturado com S e CA (LE+S+CA), durante 3(T1) e 6(T2) meses. As análises microbiológicas foram realizadas antes do início da biorremediação e em T1 e T2. Amostras foram semeadas em placas de Petri contendo diferentes meios de cultivo e incubadas por 7 dias. A identificação foi realizada pelo aparelho Phoenix™ – BD Biosciences. Os resultados mostraram 18 gêneros de bactérias e 4 de fungos, que se alternaram ao longo do tempo. O gênero *Pseudomonas* e a família Bacillaceae apresentaram representantes em todas as amostras analisadas. Também foi observado uma predominância de bactérias aeróbias em todos os períodos e amostras testadas. Dessa forma, este estudo demonstra a importância do monitoramento microbiológico para a avaliação da sucessão microbiana presente na biorremediação do LE.

**Palavras-chave:** Resíduo sólido; biorremediação; sucessão microbiológica; casca de arroz

---

**Microbial composition assessment of sewage sludge during the bioremediation process**

### **ABSTRACT**

Sewage sludge (SS) is a residue derived from Sewage Treatment Plants with agricultural use potential due to its rich composition in organic matter and nutrients. However, SS can present potentially toxic substances to living beings and the environment. Bioremediation is a widely applied technology to decontaminate toxic

residues by using microorganisms capable of decompose and/or modify pollutants. The identification of the microorganisms that are present in this process is of extreme importance, once they can be used to the enhancement of the bioremediation. Thus, this work aimed to identify the microorganisms present in different SS samples and their mixtures with soil (S) and rice hulls (RH). The bioremediated samples in this study were: pure SS (PSS); SS combined with S (SS+S) and SS combined with S and RH (SS+S+RH), during 3 (T1) and 6 (T2) months. The microbiological analyses were performed before the beginning of the bioremediation and in T1 and T2. Samples were sowed in Petri dishes containing different types of Agar and incubated for 7 days. The identification was performed by Phoenix™ – BD Biosciences. The results showed 18 genres of bacteria and 4 of fungi, which were alternated along the period. *Pseudomonas* and *Bacillaceae* family presented representatives in all analyzed samples. It was also observed a dominance of aerobic bacteria in all periods and tested samples. Therefore, this study demonstrates the importance of microbiological monitoring for an evaluation of the microbial succession in SS bioremediation.

**Keywords:** Solid waste; Bioremediation; Microbiological succession; Rice hull

---

## INTRODUÇÃO

O lodo de esgoto (LE), um resíduo gerado em Estações de Tratamento de Esgoto (ETE), está diretamente relacionado com o aumento da industrialização e urbanização (KHAN et al., 2013). A utilização do LE como fertilizante agrícola, devido à sua composição rica em matéria orgânica e nutrientes, tem se mostrado uma opção vantajosa de destinação desse resíduo, tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental (GIANICO et al., 2013). No entanto, o LE pode conter compostos tóxicos, como metais, compostos orgânicos perigosos e micro-organismos patogênicos, altamente prejudiciais aos organismos expostos (PARAIBA and SAITO, 2005).

Pensando nos benefícios que o LE possa trazer para a agricultura, esforços tem sido direcionado para o desenvolvimento de novas tecnologias que possam minimizar a toxicidade deste resíduo (TAS, 2010). Dentre elas, o processo de biorremediação tem sido largamente utilizado para a descontaminação de resíduos tóxicos, por utilizar tratamentos biológicos na extração/transformação de compostos perigosos presentes no ambiente (SEMPLE et al., 2003). Uma estratégia da biorremediação é a bioestimulação, que consiste na adição de agentes estimulantes, como nutrientes e oxigênio, para impulsionar o desenvolvimento da microbiota autóctone (MAZZEO et al., 2014). A casca de arroz é um resíduo agroindustrial, que pode atuar como um bom agente descompactante e contribuir para a aerobiose do sistema, devido à sua constituição fibrosa.

Em ambientes naturais, as bactérias são os principais organismos que atuam nos processos de biodegradação dos contaminantes (WATANABE, 2001). A identificação dos micro-organismos biodegradadores é uma etapa muito importante, pois fornece informações sobre quais micro-organismos estão presentes no sistema, dando assim a possibilidade de magnificá-los e, consequentemente, de melhorar a velocidade do processo de biorremediação.

Dessa maneira, este trabalho buscou identificar os micro-organismos presentes no LE e em suas misturas com solo e casca de arroz, visando compreender a sucessão microbiológica envolvida em cada etapa do processo de biorremediação.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O LE de origem doméstica foi coletado, em 2014, na ETE Praia Azul da cidade de Americana (São Paulo/Brasil). As amostras foram preparadas com LE, solo de textura argilosa, coletado no Jardim Experimental da UNESP (Rio Claro, São Paulo/Brasil) e casca de arroz. O arroz foi utilizado como agente descompactante para permitir uma melhor aeração.

As amostras foram preparadas nas seguintes associações e proporções: LE puro (LEP); LE+solo (LE+S: 3:1 – v/v); LE+solo+casca de arroz (LE+S+CA: 3:1:1 – v/v).

As misturas foram dispostas em cubas de aço inox (14 L), mantidas no Jardim Experimental da UNESP (Rio Claro), em local coberto e sob temperatura ambiente. Os períodos escolhidos para avaliação da biorremediação foram: tempo zero (T0), momento do preparo das associações; tempo 1 (T1) e tempo 2 (T2), referente aos períodos de 3 e 6 meses de biorremediação/bioestimulação, respectivamente.

Para a identificação dos micro-organismos, após cada período estudado, foram adicionados, individualmente, 1 g de cada uma das amostras (LEP; LE+S e LE+S+CA) em 100 mL de solução salina estéril. Para a avaliação da diversidade de micro-organismos nas amostras, 10  $\mu$ L dessa solução foi semeada, por esgotamento, em placas de Petri contendo Ágar Sangue, Ágar MacConkey, Ágar Sabouraud ou Cromoágár UriSELECT 4 (Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquete, França). As placas foram incubadas a 35°C, exceto as de Ágar Sabouraud, que foram mantidas a temperatura ambiente, por 7 dias. Os micro-organismos foram isolados e, inicialmente, identificados por meio de testes bioquímicos convencionais. Posteriormente, esses micro-organismos foram reidentificados por meio do equipamento de automação Phoenix™ – BD Biosciences.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram prevalência de 18 gêneros de bactérias e 4 gêneros de fungos (Figura 1). As bactérias comuns em todas as amostras, nos três diferentes tempos, foram Bacilos gram positivos (BGP), Bacilos gram negativos não fermentadores (BGN-NF) e enterobactérias. A adição de casca de arroz e/ou solo ao LE parece ter contribuído para uma alteração na diversidade microbiana, pois foram encontrados gêneros e espécies específicas, não observadas para a amostra de LEP. Viñas et al. (2005) também notaram uma alternância da comunidade bacteriana em seus estudos realizados antes e após a adição de nutrientes nas amostras, comprovando que diferentes grupos filogenéticos podem estar associados com as diferentes fases da degradação.

A presença da espécie *Acinetobacter lwoffii* foi observada para as três diferentes amostras estudadas (LEP, LE+S e LE+S+CA), apenas no período inicial, indicando que tal espécie pode ter atuado apenas no início do processo de biorremediação. Abdel-El-Haleem (2003) afirma que algumas espécies de *Acinetobacter* estão envolvidas com a biodegradação de muitos compostos, como o fenol, o óleo bruto, a acetonitrila, e também com a remoção de metais pesados. Essas características destacam a espécie como um organismo de grande importância para o ambiente.

Representantes do gênero *Pseudomonas* estavam presentes em todas as amostras analisadas, independente do período de biorremediação amostrado. O mesmo também foi observado para alguns representantes da família Bacillaceae, onde o gênero *Bacillus* foi o mais prevalente em todas as amostras testadas. Também foi observada uma diversidade de enterobactérias, já esperado pela própria origem do LE, que persistiram por todo o período do estudo (6 meses). Esses resultados corroboram os resultados obtidos por Mazzeo et al. (2015), que também encontraram algumas espécies de enterobactérias nas associações que continham LE, mesmo após 6 meses de biorremediação.

Em relação aos fungos, estes estiverem presentes em todos os tempos estudados. O gênero *Penicillium* é um fungo anemófilo, que foi isolado, mas não identificado, foram comum às três amostras avaliadas. Embora os fungos apresentem crescimento mais lento, quando comparados com as bactérias (LEITÃO, 2009), eles também atuam com eficiência na degradação ou deterioração de uma grande variedade de materiais

(SINGH et al., 2011). Por essa razão, esses micro-organismos devem também ser considerados nas avaliações microbiológicas.

A utilização de micro-organismos adaptados ao poluente alvo melhora a efetividade da biorremediação (EL FANTROUSSI and AGATHOS, 2005). Dessa forma, a identificação dos micro-organismos presentes nas amostras é de extrema relevância para a compreensão do processo e pela possibilidade de isolamento e utilização dos mesmos para ensaios futuros.

**Figura 1:** Caracterização microbiológica das amostras de LEP, LE+S e LE+S+CA, em três períodos distintos: T0 (momento da mistura das associações) e após 3 (T1) e 6 (T2) meses de biorremediação. BGN-NF: Bacilo gram negativo não fermentador; BGP: Bacilo gram positivo

Micro-organismo		LEP			LE+S			LE+S+CA		
		T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
BGN-NF	<i>Achromobacter</i> sp									
	<i>Acinetobacter iowoffii</i>									
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>									
	<i>Alcaligenes faecalis</i>									
	<i>Chryseobacterium indologenes</i>									
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>									
	<i>Klebsiella</i> sp									
	<i>Ochrobactrum anthropi</i>									
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>									
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>									
	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>									
	<i>Pseudomonas putida</i>									
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>									
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>									
	<i>Vibrio</i> sp									
BGP	<i>Bacillus</i> sp									
	<i>Bacillus cereus</i>									
	<i>Bacillus megaterium</i>									
	BGP não identificado									
	<i>Nocardia</i> sp									
Enterobactéria	<i>Citrobacter freundii</i>									
	<i>Citrobacter koseri</i>									
	<i>Enterobacter aerogenes</i>									
	<i>Enterobacter cloacae</i>									
	<i>Escherichia coli</i>									
	<i>Kluvera ascorbata</i>									
	<i>Leclercia adecarboxylata</i>									
	<i>Serratia marcescens</i>									
Fungo	<i>Aspergillus</i> sp									
	Fungo anemófilo									
	<i>Mucor</i> sp (Zigomiceto)									
	<i>Penicillium</i> sp									

## CONCLUSÕES

Nas análises microbiológicas, foi observado que a via de degradação preferencial do LE foi a aeróbia, com uma predominância de espécies bacterianas. Além disso, este estudo demonstrou a importância da realização de monitoramento microbiológico nos processos de biorremediação do LE, para se obter informações importantes sobre a sucessão microbiológica da biodegradação. Esses dados permitem

otimizar o processo de biodegradação, por exemplo, por magnificação dos micro-organismos específicos de cada etapa do processo.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-EL-HALEEM, D. *Acinetobacter*: environmental and biotechnological applications. *African Journal of Biotechnology*, vol.2, pp. 71-74, 2003.
- FANTROUSSI , S. and AGATHOS, S. N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation. *Current Opinion in Microbiology*, vol. 8, pp. 268-275, 2005.
- GIANICO, A., BRAGUGLIA, C.M., MASCOLO, G. and MININNI, G. Partitioning of nutrients and micropollutants along the sludge treatment line: a case study. *Environmental Science and Pollution Research*, vol.20, pp.6256-6265, 2013.
- KHAN, S., WANG, N., REID, B.J., FREDDO, A. and CAI, C. Reduced bioaccumulation of PAHs by *Lactuca sativa* L. grown in contaminated soil amended with sewage sludge and sewage sludge derived biochar. *Environmental Pollution*, vol. 175, pp. 64-68, 2013.
- LEITÃO, A. L. Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 6, pp. 1393 - 1417, 2009.
- MAZZEO, D. E. C., FERNANDES, T. C. C., LEVY, C. E., FONTANETTI, C. S. and MARIN-MORALES, M. A. Monitoring the natural attenuation of a sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. *Ecological Indicators*, vol. 56, pp. 60-69, 2015.
- PARAIBA, L.C and SAITO, M.L. Distribuição ambiental de poluentes encontrados em lodos de esgoto. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol.40, no.9, pp.853-860, 2005.
- SEMPLE, K. T., MORRISS, A. W. J. and PATON, G. I. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *European Journal of Soil Science*, vol. 54, pp. 809-818, 2003.
- SINGH, A., PARMAR, N. and KUHAD, R.C. Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol. Springer, vol. 28, pp.364, 2011.
- TAS, D.O. Respirometric assessment of aerobic sludge stabilization. *Bioresource Technology*, vol.101, pp.2592-2599, 2010.
- VINAS, M., SABATÉ, J., ESPUNY, M. J. and SOLANAS, A. M. Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation during

Bioremediation of Heavily Creosote-Contaminated Soil. *Applied Environmental Microbiology*, vol. 71, pp. 7008-7018, 2005.

WATANABE, K. Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 12, pp. 237-241, 2001.

## **OSMAC: Ferramenta útil para a exploração racional da microbiota subterrânea associada a *Senna spectabilis*.**

Laura V. Simões<sup>1\*</sup>; Victor D. Pavani<sup>1</sup>; Ian Castro-Gamboa<sup>1</sup>;

<sup>1</sup> Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. \*E-mail: lauravsimoes@gmail.com

---

### **RESUMO**

Nos últimos anos, com a diminuição na descoberta de novos fármacos de origem de produtos naturais, novas fontes de exploração têm surgido, como exemplo a rizosfera e suas interações microbianas, assim como novas abordagens de estudo estão sendo aplicadas, como a quimiometria e a OSMAC (*One Strain MAny Compounds*). Dentro deste contexto, este trabalho visou o estudo metabolômico do fungo *Rhinocladiella similis*, que possui escassos estudos na literatura, pertencente à rizosfera da planta *Senna spectabilis*, a qual contém uma vasta variedade de metabólitos com propriedades farmacológicas. Assim, foi realizado o planejamento fatorial de crescimento do fungo, visando encontrar as melhores condições de cultivo para a maior variedade de produção de metabólitos secundários. Os cultivos foram extraídos com acetato de etila e os extratos foram analisados por CLAE-DAD. Os dados das análises quimiométricas revelaram que a presença de luz, ausência de agitação sob incubação em um período de 21 dias, foram as condições de cultivo que resultaram em uma maior variedade de metabólitos.

**Palavras-chave:** *Rhinocladiella similis*, rizosfera, quimiometria

---

**OSMAC: An useful tool for the rational exploration from underground microbiota associated to *Senna spectabilis*.**

### **ABSTRACT**

In recent years, with the decrease in the discovery of drugs from natural products, new sources of exploration have been emerged, such as the rhizosphere and its microbial interaction. New approaches to rationally explore it have been applied, such as chemometrics and OSMAC (One Strain MAny Compounds). In this context, this work aimed for the metabolomic study from the fungus *Rhinocladiella similis* isolates from the rhizosphere of the plant *Senna spectabilis*. Studies related to this fungus are still scarce, even though representatives of this species present a wide variety of metabolites with pharmacological properties. Therefore, a factorial planning was conducted aiming a bettering of the fungus growth, towards the best growing conditions for the greater variety of secondary metabolites production. The experiments were extracted with ethyl acetate and analyzed by HPLC-DAD. Data from chemometrics analyses revealed that the presence of light, absence of agitation under incubation in a period of 21 days were the culture condition that resulted in a great variety of metabolites.

**Keywords:** *Rhinocladiella similis*, rhizosphere, chemometrics

---

## INTRODUÇÃO

Produtos naturais sempre foram uma importante fonte de novos compostos químicos bioativos, porém, nos últimos anos a descoberta de novos fármacos tem decrescido, em virtude do conhecimento dos principais quimiotipos produzidos por plantas e o uso de abordagens reducionistas que incentivam a pesquisa por mecanismos químicos e farmacológicos em nível molecular (VERPOORTE; CHOI; KIM, 2005). Para solucionar esse problema, a química de produtos naturais tem buscado alternativas por fontes naturais ainda pouco exploradas, como exemplo, a rizosfera e suas interações microbianas, associando ainda novas metodologias de pesquisa, como a OSMAC (One Strain MAny Compounds), que estimula a variabilidade química, e a quimiometria, que permite a análise dos complexos processos multifatoriais e sua interpretação (NICHOLSON; LINDON, 2008).

Dentro dessa perspectiva de exploração por novas fontes e uso de novas técnicas, o estudo metabolômico do fungo *Rhinocladiella similis*, pertencente à rizosfera da planta *Senna spectabilis*, propõem uma nova fonte para enriquecer os dados das relações moleculares presentes em matrizes exóticas da planta, a qual se destaca pela vasta gama de atividades farmacológicas, como antibacteriana, citotóxica, antifúngica, antioxidante e hepatoprotetora (SELEGATO et al., 2017).

## MATERIAL E MÉTODOS

Para realizar a exploração dos metabólitos secundários produzidos pelo fungo *Rhinocladiella similis*, foi aplicado o planejamento fatorial, com seleção de três variáveis de cultivo: luz, agitação e dias de incubação. Esses três parâmetros foram testados em dois níveis diferentes: ausência de luz (-1) e presença de luz (+1); ausência de agitação (-1) e presença de agitação (+1); 21 dias de cultivo (-1) e 28 dias de cultivo (+1), gerando, portanto, 8 ensaios, dos quais foram feitas duplicatas, resultando em 16 experimentos, conforme mostrado na Tabela 1.

**Tabela 1:** Condições de crescimento dos ensaios feitos.

<b>nº</b>	<b>Agitação(A)</b>	<b>Luz(L)</b>	<b>Dias(D)</b>
<b>1</b>	1	1	1
<b>2</b>	1	1	1
<b>3</b>	1	1	-1
<b>4</b>	1	1	-1
<b>5</b>	1	-1	-1
<b>6</b>	1	-1	-1
<b>7</b>	1	-1	1

<b>8</b>	1	-1	1
<b>9</b>	-1	-1	-1
<b>10</b>	-1	-1	-1
<b>11</b>	-1	1	1
<b>12</b>	-1	1	1
<b>13</b>	-1	-1	1
<b>14</b>	-1	-1	1
<b>15</b>	-1	1	-1
<b>16</b>	-1	1	-1

Seguindo o planejamento fatorial, foram preparados 16 frascos contendo 300 mL do meio de cultivo PDB que foram posteriormente autoclavados por 20 minutos. Em seguida, o fungo foi incubado nos frascos e foram mantidos à temperatura de 21 °C. Os meios submetidos à agitação, permaneceram na frequência de 23 Hz. Após o período de incubação, procedeu-se à filtração à vácuo e a extração líquido-líquido (ELL) dos metabólitos, utilizando três porções de 100 mL de acetato de etila (AcOEt) para cada 300 mL de filtrado. Posteriormente, o solvente extrator (AcOEt) foi destilado em evaporador rotatório à vácuo, obtendo-se os extratos brutos, que foram submetidos à corrida cromatográfica CLAE-CAD para obtenção dos perfis cromatográficos.

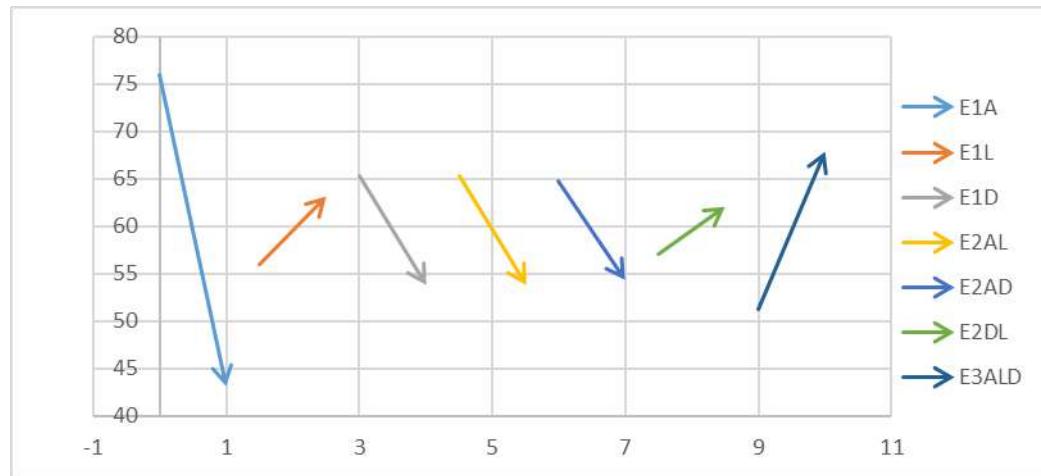
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após obtenção dos perfis cromatográficos de cada extrato, foi quantificado o número total de bandas cromatográficas (picos) com o objetivo de encontrar a condição de cultivo que resulta em maior quantidade de metabólitos secundários produzidos pelo fungo. Este estudo foi feito, calculando-se os efeitos de primeira, segunda e terceira ordem dos parâmetros estudados no número total de picos do cromatograma. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 2. A partir dos efeitos calculados, foi produzido o gráfico da Figura 1.

**Tabela 2:** Efeitos de primeira, segunda e terceira ordem do número de picos.

Efeitos: nº picos						
1 <sup>a</sup> ordem			2 <sup>a</sup> ordem		3 <sup>a</sup> ordem	
Agitação (A)	Luz (L)	Dias (D)	A+L	A+ D	L + D	A+L+D
<b>-32,875</b>	7,125	-11,375	-11,375	-10,375	5,125	16,625

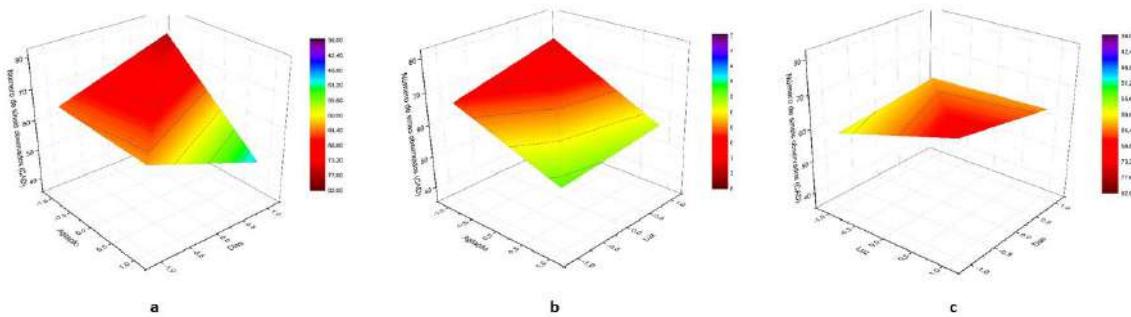
**Figura 1:** Efeitos de primeira, segunda e terceira ordem das variáveis selecionadas. E 1, E2, E3: efeito de primeira, segunda e terceira ordem respectivamente. A : agitação, L : luz e D: dias.



Os dados apresentados na Figura 01 revelam que o efeito mais expressivo foi o E1A, com variação entre o nível baixo (-1) e alto (+1) de aproximadamente -33, o que indica que a ausência de agitação influência positivamente na quantidade de metabólitos secundários produzidos pelo fungo.

Para auxiliar na análise, também foram construídos os gráficos de superfície mostrados na Figura 2.

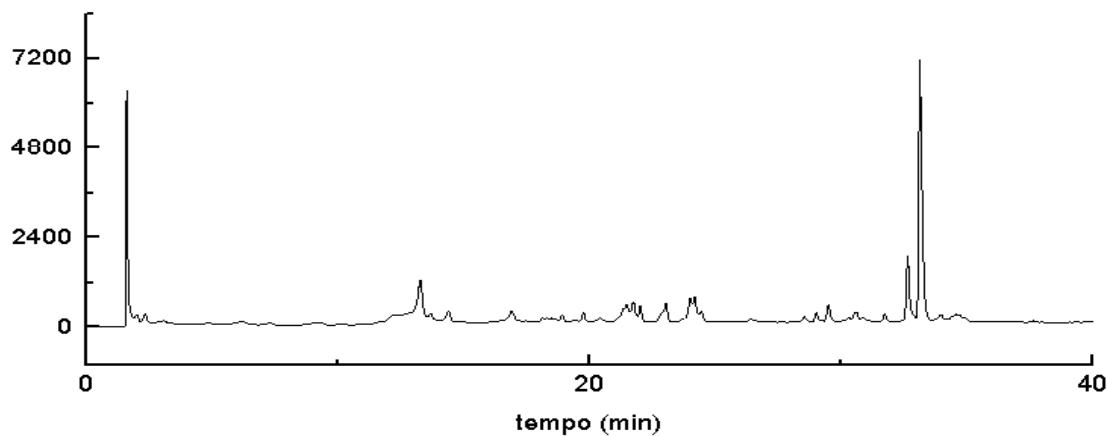
**Figura 2:** Gráficos de superfície do número de picos totais do cromatograma em função da agitação e luz (a), agitação e luz (b) e quantidade de dias de cultivo e luz (c)



Os gráficos de superfície mostram que o maior número de picos foi obtido na combinação da presença de luz (+1), menor quantidade de dias de cultivo (-1) e

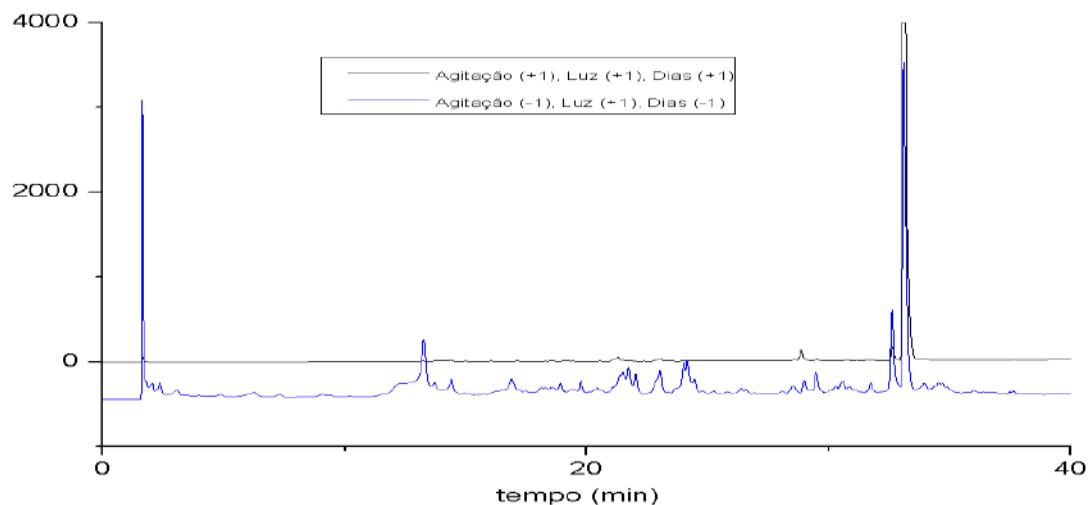
ausência de agitação (-1), resultado assim, como opção de melhor condição de cultivo, os ensaios 15 e 16. O perfil cromatográfico destes ensaios está ilustrado na Figura 03.

**Figura 3:** Perfil químico de *R. similis* obtido por análise em CLAE-DAD.



A partir das condições de cultivo otimizadas, é possível fazer uma comparação entre os perfis cromatográficos da condição otimizada e o anterior ao tratamento quimiométrico, que foi obtido da incubação sob agitação, na presença de luz em um período de 28 dias (**Figura 4**).

**Figura 4:** Comparação entre os perfis cromatográficos obtidos por análise em CLAE-DAD para o extrato bruto otimizado e o das condições iniciais.



Os dados apresentados na Figura 4, revelam que o cultivo nas condições otimizadas resultou na produção de maior número de picos cromatográficos, ou seja, maior número de metabólitos secundários.

## CONCLUSÕES

O estudo do planejamento fatorial realizado permitiu a obtenção dos melhores parâmetros de cultivo do fungo *Rhinocladiella simillis* que resultam em maior número de metabólitos secundários produzidos. Isto é fundamental para desenhos experimentais posteriores que visem processo de desreplicação de substância conhecidas e etapas de “scale-up” de substâncias com atividades biológicas promissoras.

## AGRADECIMENTO

Ao NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais) e ao IQ-UNESP pela infraestrutura e plataforma instrumental. L.V.S agradece à FAPESP (Processo 2016/04004-9) pela bolsa concedida. À CAPES e CNPq (processo: CNPq [449523/2014-4] - MCTI/CNPQ/Universal 14/2014 - Faixa B) e ao Centro de Pesquisa e Inovação em Biodiversidade e Fármacos – CIBFar – (FAPESP processo 2013/07600-3).

## REFERÊNCIAS

- VERPOORTE, R.; CHOI, Y.H.; KIM, H.K., 2005. Ethnopharmacology and systems biology: A perfect holistic match. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 100, pp. 53–56, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.033>.
- NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C., 2008. Metabonomics. *Nature*, vol. 455, pp. 1054-1056.
- SELEGATO, D. M. et al, 2017. Update: Biological and Chemical Aspects of *Senna spectabilis*. *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 28, no 3, pp 415-426. <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20160322>

## **Influência de biocarvão e rizosfera na microbiota do ciclo do metano em solo amazônico**

Leandro Fonseca de Souza<sup>1\*</sup>; Johnny Carlos Campos Cedano<sup>2</sup>; Jessica Adriele Mandro<sup>1</sup>; Newton Paulo de Souza Falcão<sup>2</sup>; Siu Mui Tsai<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Celular e Molecular - Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Universidade de São Paulo \*e-mail: leandro\_fonseca@usp.br

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

---

### **RESUMO**

O metano é um gás de efeito estufa 25 vezes mais potente que o CO<sub>2</sub> em seu potencial de reter calor. Sua concentração atmosférica tem aumentado nos últimos 100 anos, e atividades agrícolas respondem por parte significativa deste incremento. Microrganismos são fonte (arqueias metanogênicas) e dreno (bactérias metanotróficas) biológicos do gás, sendo possível investigar estes grupos através de genes como *mcrA* (metanogênicas) e *pmoA* (metanotróficas). Compreender como o biocarvão influencia esses microrganismos e qual o efeito da rizosfera em solos amazônicos contribui com informações para tomada de decisões sobre práticas sustentáveis de manejo do solo. Neste sentido, experimento com aplicação de distintas concentrações de biocarvão há 10 anos, foi avaliado com plantio de feijão-caupi e o DNA total de solo e rizosfera utilizado para qPCR dos genes *mcrA* (mlas-F, *mcrA*-R) e *pmoA* (A189-F e MB661-R). Observou-se que o uso de biocarvão em concentração alta (120 t/ha) aumentou significativamente a abundância de metanogênicas e reduziu a abundância de metanotróficas. Entretanto, a rizosfera nestes solos levou a uma redução da abundância de metanogênicas independente da concentração de carvão utilizada (40, 80 ou 120 t/ha). Assim, sugere-se que a rizosfera de feijão-caupi exerce uma redução significativa da comunidade metanogênica em solos remediados com biocarvão, nas condições avaliadas, sendo recomendada a manutenção de cobertura vegetal sobre áreas que utilizem esta prática agrícola. Novos testes estão em avaliação para confirmação destes resultados.

**Palavras-chave:** agricultura tropical, GEE, metanogênese, metanotrofia, qPCR

---

**Influence of biochar and rhizosphere on methane cycle microbiota in Amazonian soil**

### **ABSTRACT**

Methane is a greenhouse gas 25 times as strong as CO<sub>2</sub> in its potential to heat retention. Its atmospheric concentration has increased in the last 100 years, and agricultural production has contributed to this increase. Microorganisms are a biological source (methanogenic archaea) and sink (methanotrophic bacteria) in methane cycle, and it is possible to investigate these biological groups through studies of genes such *mcrA*

(methanogenic) and *pmoA* (methanotrophic). Understanding how the biochar influences these microorganisms and the effect of rhizosphere in the Amazon region contribute with decision-making process for sustainable practices in soil management. In this context, an experiment with the application of different concentrations of biochar 10 years ago was evaluated with cowpea culture and the total DNA from soil and rhizosphere used for qPCR of genes *mcrA* (mlas-F, *mcrA*-R) and *pmoA* (A189-F and MB661-R). It was realized that the use of high concentration of biochar (120 t/ ha) significantly increased the abundance of methanogens and reduced abundance of methanotrophs in soil. Nonetheless, the rhizosphere in these soils led to a reduction in methanogens abundance to pre-application levels, not depending on biochar concentration (40, 80 or 120 t/ ha). The results suggest that the cowpea rhizosphere exerts a significant reduction of the methanogenic community in soils remediated with biochar, in evaluated conditions, as soon it is recommended the maintenance of vegetal cover in areas with biochar application.

**Keywords:** tropical agriculture, GHG, methanogenesis, methanotrophy, qPCR

---

## INTRODUÇÃO

Atividades agrícolas respondem por aproximadamente 50% das emissões globais de metano. Este gás, 20 vezes mais potente que o CO<sub>2</sub> em seu potencial de efeito estufa, é produto natural da ação de arquéias metanogênicas e tem como único dreno biológico bactérias metanotróficas.

As funções bioquímicas relacionadas aos processos de produção e assimilação do metano são conhecidas e dois genes destas vias são comumente utilizados como marcadores funcionais em estudos ambientais: *mcrA* (methyl-coenzima M redutase), na produção de metano, e *pmoA* (metano monooxigenase), em sua assimilação.

Práticas agrícolas que incrementam fertilidade do solo têm sido investigadas com objetivo de reduzir emissões de metano, como ocorre com o uso de biocarvão (BC) (principalmente em culturas alagadas). O biocarvão é o produto da queima de materiais orgânicos sob baixa concentração de oxigênio (pirólise), e se distingue do carvão por seu uso para melhorar as condições do solo (LEHMANN *et al.*, 2011). Em trabalhos recentes HAN *et al.* (2016) e REDDY *et al.* (2014) avaliaram o efeito da adição de biocarvão ao solo sobre a emissão de metano e sobre a abundância de metanotróficas. Ainda que partindo de solos e/ou culturas e ambientes distintos, todos observam redução da emissão de metano no solo e aumento da abundância de metanotróficas.

A rizosfera influencia a comunidade microbiana do solo em sua atividade, abundância e composição, impactando diretamente a emissão de Gases do Efeito Estufa (GEEs) dos solos. Trabalhos investigando culturas de arroz, uma das maiores fontes

antropogênicas de emissão de metano, apontam para um aumento da comunidade de metanotróficas nesta região (HAN *et al.*, 2016; WU; MA; LU, 2009).

Neste contexto, biocarvão e rizosfera de feijão foram avaliados em sua influência sobre a comunidade microbiana associada ao ciclo do metano, buscando compreender como a prática de uso de biocarvão e a presença de rizosfera influenciam metanogênicas e metanotróficas, analisando a abundância destes microrganismos através de genes marcadores de funções ecológicas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi realizado em estação experimental do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus/AM (02°37'12" S, 060°02' 27" W), em Latossolo Amarelo distrófico típico “LA d”. A aplicação de BC foi realizada no período de fevereiro a março de 2006, 10 anos antes deste experimento. O biocarvão foi obtido por meio da coleta de resíduo da produção de carvão das carvoarias da região metropolitana de Manaus, moído e peneirado a 2mm. Utilizou-se delineamento em blocos casualizados com quatro repetições em esquema fatorial 4x4, sendo quatro níveis 40, 80 e 120 e a testemunha 0 t ha<sup>-1</sup> de BC na parcela principal, totalizando 16 tratamentos e 4 repetições. O plantio de feijão-caupi (variedade BRS Novaera, inoculada com *Bradyrhizobium sp.* INPA 3-11b) foi realizado por semeadura direta e tamanho da parcela principal foi de 10 x 10 m e as secundárias foram de 5,0 m x 5,0 m, com área útil de 7 m<sup>2</sup>.

### **Coleta do Solo**

Para cada tratamento, cinco plantas foram escolhidas aleatoriamente e o solo aderido diretamente às raízes foi removido cuidadosamente com auxílio de espátulas, separado dos fragmentos de biocarvão, homogeneizado, acondicionado em tubos de polipropileno e imediatamente armazenados a -20°C.

Solos adjacentes às plantas de feijão foram coletados em área distante a 10m do local do experimento e entre si, com e sem adição de biocarvão, na camada de 0-10cm (cinco pontos homogeneizados).

### **Extração de DNA total e quantificação por PCR (qPCR) dos genes *pmoA* e *mcrA***

O DNA total do solo de cada tratamento e controles foi extraído em duplicata com o kit *PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit* (MoBio Laboratories), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. A quantidade e qualidade das amostras de

DNA foi analisada em espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific) com densidade ótica de 260 nm.

A técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foi utilizada para quantificar os genes associados ao ciclo do metano *mcrA* e *pmoA* (Tabela 1) a partir das amostras de DNA total do solo. Para cada gene, foi construída uma curva padrão entre 10 e 10<sup>7</sup>, obtido previamente por PCR a partir de isolados DSMZ (Deutsch Collection of Microorganism and Cell Cultures). A técnica foi realizada em triplicata para cada amostra no equipamento *StepOne Plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems), com um volume final de 10 µL, contendo 5 µL do *SYBR ® Green ROX qPCR* (Thermo Fisher Scientific), 1 µL de cada *primer* (5 pmols), 1 µL de DNA (10 ng/µL), 0,2 µL de BSA a 20 mg/mL (Thermo Fisher Scientific) e 1,8 µL de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada.

Gene	Primer	Sequência (5' - 3')	Desnaturação Inicial	Ciclos	Desnaturação
<i>mcrA</i>	Mlas-F	GGYGGTGTGGDTTCACMCARTA	95°C – 10 min	45	95°C – 30 seg
	mcrA-R	CGTTCATBGCCTAGTTGGRTAGT			
<i>pmoA</i>	A189F	GGNGACTGGGACTTCTGG	95°C – 10 min	45	95°C – 30 seg
	MB661r	CCGGMGCAACGTCYTTAAC			

Tabela 1: *Primers*, sequência e condições de reação

### Análise dos dados

As quantificações obtidas foram analisadas quanto a diferenças estatísticas utilizando os testes t-student, para comparações Rizosfera x Solo Adjacente e ANOVA (analysis of variance) com teste post-hoc tukey hsd, para comparação entre mais de dois tratamentos, utilizando programa PAST.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A abundância de microrganismos associados tanto à metanogênese, quanto à metanotrofia, sofre influência de práticas agrícolas, tanto pela rizosfera como pelo uso de biocarvão. A abundância de arquéias metanogênicas é aumentada no solo rizosférico, sem adição de biocarvão (Fig. 1a), porém a abundância de metanotróficas é reduzida (Fig. 1b). Isto implica que a rizosfera pode contribuir com emissões de CH<sub>4</sub> nestes solos. Este efeito pode estar associado às condições de anaerobiose e maior umidade do solo rizosférico, necessárias para produção de metano, além da disponibilização de

amônia (competidor com metano pelo sítio da monooxigenase) (PHILIPPOT *et al.*, 2009).

### Quantificação dos genes *mcrA* e *pmoA* em solo rizosférico sob uso de biocarvão

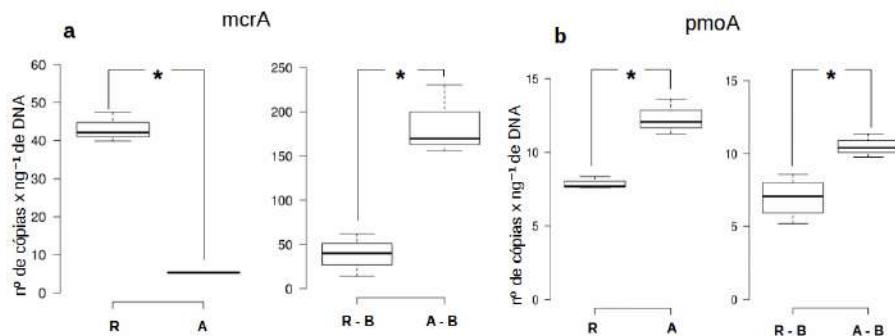


Figura 1: Quantificação dos genes *mcrA* (a) e *pmoA* (b) em solo rizosférico amazônico sob cultivo de feijão caupi e uso de biocarvão. R = Rizosfera, A = Solo Adjacente, B = Solo com adição de biocarvão na concentração 120 t/ha. Asterisco representa diferenças estatísticas significativas ( $P > 0,01$ ).

A adição de biocarvão a concentrações de 120 t/ha, nas condições avaliadas, leva a um aumento significativo da abundância de arquéias metanogênicas, porém não altera significativamente a comunidade metanotrófica. Isto indica que o uso de biocarvão nesta concentração pode levar a aumento das emissões de  $\text{CH}_4$  a partir do solo. Todavia, a rizosfera do solo com biocarvão reduz a abundância de metanogênicas significativamente a valores próximos ao observado em solo natural (Fig. 1a). A presença de rizosfera regula as comunidades de metanogênicas e metanotróficas mantendo-as nos mesmos valores de abundância, sem distinção significativa entre as três concentrações de biocarvão aplicadas (ANOVA,  $\alpha = 0,05$ ). Este resultado ressalta a importância da cobertura vegetal através da rizosfera na mitigação de emissão de metano a partir de solos agrícolas, ainda que distintas espécies tragam diferentes contribuições ao processo.

Na ausência de rizosfera, o solo favorece bactérias metanotróficas, o que permite inferir capacidade de assimilação de metano natural. Esta resposta está ligada à presença de oxigênio no solo, que é tanto requerida no desenvolvimento das metanotróficas quanto restritiva ao desenvolvimento de metanogênicas. A adição de biocarvão leva a um aumento da abundância de metanogênicas/ metanotróficas em mais de 15 vezes, à medida que eleva também a capacidade de campo do solo e favorece o desenvolvimento destes microrganismos (NESBIT; BREITENBECK, 1992). Este aumento, no entanto, pode ser mitigado pela rizosfera, capaz de reduzir esta relação a valores próximos ao observado em solos naturais.

## CONCLUSÕES

O uso de biocarvão em altas concentrações (120 t/ha) pode favorecer o aumento da comunidade metanogênica e a redução da comunidade metanotrófica nas condições avaliadas. No entanto, manter cobertura vegetal sobre a área leva a uma redução da comunidade metanogênica para níveis de um solo sem adição de biocarvão, devido ao efeito da rizosfera que atua como fator mitigador.

## AGRADECIMENTO

Às instituições CAPES, CNPq e FAPESP pelo financiamento da pesquisa e bolsas de estudo concedidas.

## REFERÊNCIAS

- HAN, X. *et al.*, 2016. Mitigating methane emission from paddy soil with rice-straw biochar amendment under projected climate change. *Scientific Reports*, vol. 6, no. 24731, pp. 1-10. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27090814>>.
- LEHMANN, J. *et al.*, 2011. Biochar effects on soil biota - A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 19th International Symposium on Environmental Biogeochemistry. vol. 43, no. 9, p. 1812–1836. doi:10.1016/j.soilbio.2011.04.022
- NESBIT, S. P.; BREITENBECK, G. A., 1992. A laboratory study of factors influencing methane uptake by soils. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, vol. 41, no. 1, pp. 39–54, . <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016788099290178E>.
- PHILIPPOT, L. *et al.*, 2009. Spatial patterns of bacterial taxa in nature reflect ecological traits of deep branches of the 16S rRNA bacterial tree. *Environmental Microbiology*, vol. 11, no. 12, pp. 3096–3104. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02014.x/abstract.
- REDDY, K. R. *et al.* Enhanced Microbial Methane Oxidation in Landfill Cover Soil Amended with Biochar. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, vol. 140, no. 9, pp. 4014047, 2014. doi:10.1061/(ASCE)GT.1943-5606.0001148.
- WU, L.; MA, K.; LU, Y., 2009. Rice roots select for type I methanotrophs in rice field soil. *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 32, no. 6, pp. 421–428 <http://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.05.001>.

**Seleção de bactérias ácido láticas da silagem de capim Mombaça (*Panicum maximum*) baseada nas suas propriedades funcionais *in vitro***

Lorena Resende Oliveira Amaral<sup>1\*</sup>; Paola de Oliveira Maciel<sup>1</sup>; Claudia Cristina Auler do Amaral Santos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Tocantins. \*lorenaresendeo@gmail.com (autor para correspondência)

---

**RESUMO**

Os inoculantes na forma de bactérias produtoras do ácido lático são aditivos capazes de reduzir a perda de matéria seca, limitar fermentações secundárias, aumentar o valor nutritivo e a estabilidade aeróbia do material ensilado. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo isolar e selecionar potenciais bactérias ácido-láticas (BAL) com características probióticas da silagem de capim Mombaça (*Panicum maximum*). Foram isoladas 101 bactérias em meios PCA e MRS e estas, foram submetidas a testes morfológicos e fisiológicos para seleção de estirpes com características específicas de BAL. Oito estirpes da silagem de capim Mombaça e 2 estirpes isoladas de inoculante comercial (controle) foram submetidas a testes *in vitro* para seleção de potenciais BAL probióticas. Dentre estas, foi possível observar que 60% dos isolados conseguiram sobreviver em valores de pH=3,0. No pH=2,0, 80% dos isolados mantiveram a população de células viáveis acima de 6,77 Log UFC/mL e a resistência a bile foi variável entre as estirpes. Além disso, observou-se que os isolados apresentaram uma superfície celular hidrofílica (70%), com características ácidas (80%). Dessa forma, foi possível selecionar estirpes com potencial para serem utilizadas na produção de inoculantes específicos para a silagem de capim Mombaça, que apresentem características funcionais benéficas à saúde dos ruminantes.

**Palavras-chave:** BAL; Ensilagem; Nutrição de ruminantes; Probióticos; Sucessão microbiológica.

---

**Selection of lactic acid bacteria from Mombasa silage grass (*Panicum maximum*) based on *in vitro* functional properties**

**ABSTRACT**

Lactic acid bacteria inoculants are additives that reduce the loss of dry matter, limiting secondary fermentation, improving the nutritional value and the aerobic stability of silage. In this way, the objective of this study was isolate and select potential lactic acid bacteria (LAB) with probiotic characteristics in Guinea grass silage (*Panicum maximum*). 101 bacteria were isolated in PDA, PCA and MRS medium and its were submitted to morphological and physiological tests for selection of strains with specific characteristics of LAB. Eight strains of Mombasa grass silage and 2 strains isolated from commercial inoculant (control) were submitted to *in vitro* tests for selection of potential probiotic LAB. Between them, it was possible to observe that 60% of isolates were able to survive on values of pH=3.0. At pH=2,0, 80% of the isolates maintained

the population of viable cells above 6.77 Log CFU/mL and the resistance to bile was variable among the strains. In addition, it was observed that the isolates showed a hydrophilic cell surface (70%), with acid characteristics (80%). In this way, it was possible to select strains with potential to be used in the production of specific inoculants for grass silage Mombasa, presenting beneficial functional characteristics to ruminants health.

**Keywords:** LAB, Ensiling, ruminant nutrition, probiotics, microbial succession.

---

## INTRODUÇÃO

A conservação de forrageiras na forma de silagem é uma das alternativas que garante o fornecimento de material fibroso e de alta qualidade aos ruminantes durante os períodos de escassez de alimento. Embora existam diversos tipos de forrageiras, como por exemplo, o milho, o sorgo, a cana-de-açúcar, o girassol e o capim-elefante, que são comumente utilizados para a produção de silagem, a obtenção de forragem conservada de gramíneas tropicais perenes, como a de capim Mombaça tem se mostrado viável e segura para o consumo de ruminantes (Vieira et al., 2010).

No Brasil, os resultados do uso de aditivos presentes no mercado sobre a qualidade das silagens ainda não são satisfatórios (Zopollatto; Daniel; Nussio, 2009). A falta de respostas favoráveis na maioria dos estudos envolvendo o uso de aditivos bacterianos em regiões de clima tropical possivelmente está vinculada à utilização de inoculantes contendo cepas isoladas de plantas forrageiras de clima temperado (Rufino, 2014). Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi selecionar bactérias ácido-láticas (BAL) da silagem de capim Mombaça (*Panicum maximum*) que sejam potencialmente probióticas.

## MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram realizadas no LABAP (Laboratório de Biotecnologia/Análise de Alimentos e Purificação de Produtos), na Habite – Incubadora de Empresas de biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins (UFT), Câmpus de Gurupi. As amostras foram obtidas da empresa SPI confinamentos, localizada nas proximidades da BR-242, km 382, Zona Rural, Gurupi-TO. Foram coletadas 3 amostras aleatórias do silo recém-aberto e 2 amostras da pilha separada para uso diário em dezembro de 2015.

As amostras foram avaliadas utilizando meios de cultura seletivos comerciais (MRS, PCA e MacConkey) para cada grupo de microrganismos potencialmente presente na silagem de capim Mombaça (Bactérias ácido lácticas, bactérias mesófilas

aeróbias e enterobactérias). O isolamento de bactérias ácido-láticas presentes no inoculante comercial (SIL-ALL 4X4®) também foi realizado e estas foram utilizadas como controle durante a realização dos testes *in vitro* das potenciais BAL probióticas. Após a caracterização morfológica das colônias, os isolados bacterianos purificados dos meios comerciais MRS e PCA foram submetidos a testes de coloração diferencial de Gram, método KOH de Halebian et al. (1981), catalase, oxidase, motilidade e esporulação (Holt et al., 1994). E então, testes específicos foram realizados com as potenciais BAL: Resistência a diferentes valores de pH (7.2 - controle, 3.0 e 2.0) (PRASAD et al., 1999); Tolerância a sais biliares (0%-controle, 1% e 2%) (Mishra e Prasad, 2005; Menconi et al., 2014); Hidrofobicidade da superfície celular (adaptado de Barbosa et al., 2005) e teste de coexistência (adaptado de Guo et al., 2010).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A população de potenciais BAL foi maior (6,85 Log UFC/g) quando comparada com os outros grupos microbianos. Entretanto, sua diferença em relação a bactérias mesófilas aeróbias e enterobactérias não foi significativa (0,06 Log UFC/g e 1,11 Log UFC/g, respectivamente). Isso nos mostra que durante as fases de estabilização e deterioração aeróbia da silagem de capim Mombaça, a população de BAL não foi suficiente para impedir o crescimento de microrganismos indesejáveis.

Dos isolados presentes no ágar MRS, 27,6% apresentaram as seguintes características: Gram positivas, catalase negativas, raramente com motilidade e não formadoras de esporos; e foram selecionadas para a realização de testes específicos para selecionar cepas de potenciais probióticos. A tolerância ao ácido e à bile foi estudada para prever a sobrevivência das bactérias selecionadas após a alimentação animal. Os resultados mostraram que em baixos valores de pH, as bactérias selecionadas (27,6%) perderam viabilidade em uma faixa que variou de 0,70% a 36,8%, ou seja, as células viáveis de todos os isolados foram afetadas pela alta acidez, principalmente no pH=2,0. Os resultados mostraram também que, dos 10 isolados selecionados, 60% exibiram tolerância ao pH=3,0, durante 3h. E no pH=2,0, 80% dos isolados mantiveram a população de células viáveis acima de 6,77 Log UFC/mL.

A tolerância a sais biliares tem sido considerada uma condição para colonização e atividade metabólica das bactérias no intestino do hospedeiro, além disso, estes sais podem influenciar a microbiota intestinal agindo como molécula antimicrobiana (Menconi et al., 2014). Nas concentrações de 1 e 2% de Oxbile houve uma variação na

susceptibilidade dos isolados, que é esperada, já que esta propriedade é específica entre espécies e estirpes (Gilliland; Staley; Bush, 1984). Os isolados do inoculante comercial apresentaram resistência distinta nos teores de 1 e 2% de bile. A concentração de 1% de oxbile favoreceu o crescimento do isolado SIL1 até o tempo 3h e após este período, ocorreu uma redução de 29,7% nas células viáveis. E as células do isolado SIL2 mantiveram constante para as 2 concentrações (1% e 2%) para todos os períodos de tempo (0, 3 e 12h). Os isolados SPI10 e SPI12 (isolado do capim Mombaça) foram os microrganismos que apresentaram maior resistência a diferentes concentrações de bile, com quedas de células viáveis menores que 1,0 Log UFC/mL nas duas concentrações de bile nos três períodos de tempo avaliados. Entretanto, o isolado SPI12.1 não conseguiu sobreviver a diferentes concentrações de bile (1 e 2%).

A determinação da adesão de microrganismos a hidrocarbonetos estima a capacidade das estirpes em aderir à células epiteliais, que é uma das características importantes das BAL probióticas (Dhewa et al., 2008). A hidrofobicidade em solvente apolar (xilol) das bactérias selecionadas variaram em uma faixa entre 0,1% - 34,3%, ou seja, 70% das estirpes testadas demonstraram uma superfície hidrofílica. Em solvente ácido (clorofórmio) a hidrofobicidade dos isolados variou em uma faixa de 6,36% - 40,78% e em solvente básico (acetato de etila), obteve-se uma variação de 15,39% - 83,65%. Estes dados nos mostram que as potenciais BAL isoladas apresentam afinidade a solventes básicos e um caráter ácido, sendo forte acceptoras de elétrons. O caráter ácido da superfície celular dos isolados pode estar associado à presença de polissacarídeos ácidos e neutros, proteínas e também ao ácido teicóico, que são determinantes para que ocorra a interação da bactéria e o seu ambiente. Além disso, eles podem influenciar indiretamente as propriedades de adesão das bactérias, através da modificação das propriedades físico-químicas da parede celular bacteriana (Burgain et al., 2014).

O teste de coexistência foi conduzido para determinar se os isolados selecionados podem ser co-cultivados. Os isolados testados não mostraram antagonismo uns com os outros. Desta forma, os mesmos poderão ser analisados posteriormente em processos fermentativos mistos, o que é vantajoso, pois multi-espécies e multi-cepas de bactérias ácido-láticas probióticas podem apresentar uma melhor colonização no trato gastrointestinal como também podem combinar diferentes mecanismos de ação de forma sinérgica e assim, melhorar o processo de fermentação (Timmerman et al., 2004).

## CONCLUSÕES

A partir deste trabalho, foi possível obter cepas de potenciais BAL, que poderão ser utilizadas para a produção de inoculantes específicos a silagem de capim Mombaça e que são potencialmente estirpes probióticas, devido aos resultados obtidos pelos testes *in vitro*. As potenciais BAL probióticas conseguiram resistir a valores de pH=3,0, fator interessante tanto para a utilização delas em futuras fermentações, como também para prever a resistência das cepas no rúmen. E como, as cepas isoladas não apresentaram antagonismo entre si, as mesmas poderão ser testadas em co-cultivos na fermentação da silagem.

## AGRADECIMENTO

À UFT, pelo apoio financeiro, o LABAP (Laboratório de Biotecnologia/Análise de Alimentos e Purificação de Produtos) e a Habite – Incubadora de Empresas de Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins (UFT), Câmpus de Gurupi, por disponibilizarem o espaço do laboratório para a realização dos experimentos.

## REFERÊNCIAS

- BARBOSA, F. H. et al. Perfil de hidrofobicidade da superfície celular de *Bifidobacterium lactis* Bb12 e *Bifidobacterium longum* Bb46 em função do meio de cultura. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 5, 2005.
- BURGAIN , J. et al. Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 213, p. 21–35, 2014.
- DHEWA, T. et al. Adhesive properties of food and faecal potential probiotic *lactobacilli*. *Journal of Applied and Natural Sciences*, p. 138–140, 2008.
- GILLILAND , S. E.; STALEY , T. E.; BUSH , L. J. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *Journal of Dairy Science*, v. 67, n. 12, p. 3045–51, 1984.
- GUO , X. H. et al. Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on *in vitro* functional properties . *Anaerobe* , v. 16, n. 4, p. 321–326, 2010.
- HALEBIAN , S. et al. Rapid method that aids in distinguishing Gram -positive from Gram -negative anaerobic Bacteria . *Journal of Clinical Microbiology*, v. 13, n. 3, p. 444–448, 1981.
- HOLT, J. F. et al. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th ed.). Lippincott Williams & Wilkins., 1994.

MENCONI , A. et al. Identification and characterization of lactic Acid bacteria in a commercial probiotic culture. *Bioscience of microbiota , food and health* , v. 33, n. 288110, p. 25–30, 2014.

MISHRA , V.; PRASAD , D. N. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics . *International Journal of Food Microbiology*, v. 103, n. 1, p. 109–115, 2005.

PRASAD, J. et al. Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics . *International Dairy Journal* , v. 8, n. 12, p. 993–1002, 1999.

RUFINO , L. D. DE A. *Bactérias Lácticas bacteriocinogênicas em silagem de amendoim forrageiro e desempenho de bovinos de corte alimentados com silagem e feno de estilosantes associados ou não à silagem de milho* . Universidade Federal de Viçosa, 2014.

TIMMERMAN , H. M. et al. Monostrain , multistrain and multispecies probiotics - A comparison of functionality and efficacy . *International Journal of Food Microbiology*, v. 96, n. 3, p. 219–233, 2004.

VIEIRA, B. R. et al. Consumo, digestibilidade dos nutrientes e parâmetros ruminais em bovinos alimentados com silagem de capim -mombaça . *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, v. 62, n. 5, p. 1148–1157, 2010.

ZOPOLLATTO, M.; DANIEL, J. L. P.; NUSSIO, L. G. Aditivos microbiológicos em silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 38, p. 170–189, 2009.

## Potencial micotoxigênico de fungos isolados de solos de vinha

Luísa Freire<sup>1\*</sup>; Fabiana Reinis Franca Passamani<sup>2</sup>; Guilherme Prado<sup>3</sup>; Giuliano Elias Pereira<sup>4</sup>, Luís Roberto Batista<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Campinas. \*luisa\_freire16@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Lavras.

<sup>3</sup>Fundação Ezequiel Dias.

<sup>4</sup>Embrapa - Semiárido.

---

### RESUMO

A incidência de fungos nas uvas varia de acordo com a região vinícola, práticas agrícolas, condições climáticas, colheita, variedade das uvas e da microbiota presente no solo. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* produtores de micotoxinas isolados de solo de vinha da região tropical semiárida do Brasil. Utilizou-se o Método Plug Ágar em Cromatografia de Camada Delgada para avaliar o potencial toxigênico de *Aspergillus*. Para avaliar a produção de citrinina por *Penicillium* utilizou-se o Método Agar Creme de Coco. A incidência fúngica nos solos dos vinhedos variou de  $2,34 \times 10^3$ UFC/g a  $4,35 \times 10^4$ UFC/g. As espécies identificadas foram: *A. aculeatus*, *A. japonicus*, *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. niger* Agregado, *A. foetidus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. flavus*, *A. sojae*, *P. citrinum*, *P. sclerotiorum*, *P. implicatum*, *P. chrysogenum* e *P. coryophilum*. Todos os isolados de *A. carbonarius*, 18,18% de *A. niger*, 14,29% de *A. niger* Agregado e 60% de *A. ochraceus* foram produtores de ocratoxina A (OTA). Todos *A. parasiticus* foram produtores de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, enquanto que apenas 14,28% de *A. flavus* foram produtores de aflatoxina B1, B2. 98,67% de *P. citrinum* foram produtores de citrinina. A incidência de fungos variou de acordo com o solo da vinha. A presença destas espécies indica a sua ocorrência natural em áreas de vinho.

**Palavras-chave:** Aflatoxina. Citrinina. Ocratoxina A. Uvas. Viticultura.

---

### Mycotoxicogenic potential of fungi isolates of vineyard soil

### ABSTRACT

The incidence of fungi in grapes varies depending on the variety, the wine region, agricultural practices, weather conditions, the harvest and microbiota present in the soil. In this sense, the objective of this study was to evaluate the diversity of *Aspergillus* and *Penicillium* fungi mycotoxin producers isolated from vineyard soil of the semi-arid tropical region of Brazil. To evaluate the toxigenic potential of *Aspergillus*, we used the Agar Plug Method on Thin Layer Chromatography and to assess the production of citrinin by *Penicillium* we used the Coconut Cream Agar Method. Contamination of vineyard soil ranged from  $2.34 \times 10^3$ CFU/g to  $4.35 \times 10^4$ CFU /g. The species found were *A. aculeatus*, *A. japonicus*, *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. niger* Agregado, *A. foetidus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. flavus*, *A. sojae*, *P. citrinum*, *P. sclerotiorum*, *P. implicatum*, *P. chrysogenum* e *P. coryophilum*. All isolates of *A. carbonarius*, 18,18% of *A. niger*, 14,29% of *A. niger* Agregado and 60% of *A. ochraceus* were OTA producers. All *A. parasiticus* were producers of aflatoxins B1, B2, G1 and G2, while only 14,28% of *A. flavus* were producers of aflatoxin B1, B2. 98,67% of *P. citrinum* were citrinin producers. The incidence of fungi varied according to the vineyard soil. The presence of these species indicates their natural occurrence in vineyard areas.

*P. citrinum*, *P. sclerotiorum*, *P. implicatum*, *P. chrysogenum* and *P. corylophilum*. All isolates of *A. carbonarius*, 18.18% of *A. niger*, 14.29% of *A. niger* Aggregate and 60% of *A. ochraceus* were OTA producers. All *A. parasiticus* were producers of B1, B2, G1 and G2 aflatoxins, whereas only 14.28% of *A. flavus* were producers of B1, B2 aflatoxin. 98.67% of *P. citrinum* were citrinin producers. It was observed that the fungi incidence vary according to the vineyard soil. The presence of identified species shows that are naturally present in wine areas.

**Keywords:** Aflatoxin. Citrinin. Grapes. Ochratoxin A. Viticulture.

---

## INTRODUÇÃO

As uvas (*Vitis vinifera L.*) estão sujeitas à contaminação por micro-organismos presentes no ambiente da lavoura, colheita e na elaboração dos vinhos. Estes, estão naturalmente presentes na camada superior do solo de cultivo das videiras e são carreados para os cachos, podendo se desenvolver nas bagas (Leong et al., 2006). No entanto, têm-se observado que a incidência destes fungos e os níveis de produção de micotoxinas variam em função da variedade das uvas, da região vitivinícola, das práticas agrícolas adotadas, das condições climáticas, da safra e do processo de elaboração dos vinhos.

O principal fungo filamentoso responsável pela podridão da uva é *Botrytis cinerea*, um patógeno que danifica as bagas e tem um efeito prejudicial nas propriedades organolépticas das uvas e seus derivados. No entanto, a maioria dos estudos sobre fungos filamentosos em uvas tem-se concentrado nos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, os quais também causam podridão nas uvas, tornando-as secas e com aspecto enrugado e têm sido associados à deterioração de uvas e produção de micotoxinas (Rousseaux et al., 2014). Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* produtores de micotoxinas isolados de solo de vinha da região tropical semiárida do Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Área de estudo e amostragem

Foram coletadas doze amostras de solos em que são cultivadas as variedades de uvas: Barbera, Cheni Blanc, Moscato Itália, Moscato Canelli, Ruby Cabernet, Syrah, Tempranillo e Touriga Nacional na safra 2014/2 na região vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco. Um transepto diagonal ao longo do vinhedo foi traçado e as amostras de solo foram coletadas no entorno de três plantas equidistantes (P1, P2, P3) desprezando-se as extremidades. Quatro subamostras (p1, p2, p3, p4) foram retiradas na

profundidade de 10 cm, em um raio de 20 cm no entorno da planta. As subamostras foram homogeneizadas formando uma amostra composta em cada ponto.

#### **Análise micológica dos solos de cultivo de uvas (*Vitis vinifera L.*)**

Para o plaqueamento dos solos utilizou-se a técnica de diluição seriada em meio de cultura DG-18 – Ágar Dicloran Glicerol a 18% (HIMEDIA®). As placas foram incubadas a 25°C por sete dias, e os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia de fungos filamentosos (UFC/g), conforme Pitt e Hocking (1997).

#### **Identificação fenotípica das espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium***

A partir das culturas puras, foram identificados os fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* de acordo com Klich (2002) e Pitt (2000). Os isolados foram incubados em meios de cultura CYA - Ágar Czapek Levedura (SYNTH) a 25°C e a 37°C e MEA - Ágar Extrato de Malte (ACUMEDIA) a 25°C. Após sete dias de incubação foram observadas as características macroscópicas e microscópicas dos fungos filamentosos.

#### **Avaliação do potencial toxigênico de fungos do gênero *Aspergillus***

O potencial micotoxigênico dos fungos foi avaliado através do método de Plug Agar em cromatografia de camada delgada conforme Filtenborg e Frisvad (1980). Os isolados considerados produtores de ocratoxina A (OTA) e Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 apresentaram um fator de retenção e um spot de fluorescência semelhante ao do padrão.

#### **Detecção da produção de citrinina por fungos do gênero *Penicillium***

A avaliação da produção de citrinina foi realizada pelo método de Ágar Creme de Coco segundo Mohamed et al. (2013). Os isolados considerados produtores de citrinina apresentaram fluorescência verde-amarelo intenso ao redor da colônia.

#### **Análises estatísticas**

Para avaliar se houve diferença na frequência de ocorrência de *Aspergillus* e *Penicillium* nos solos de vinha utilizou-se uma análise de variância (ANOVA), com um teste a posteriori de Tukey.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 1 Percentual de contaminação por fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos de vinha

A presença de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* foi detectada em todas as amostras de solos analisadas (Gráfico 1) e sua densidade variou de  $2,34 \times 10^3$  UFC/g a  $4,35 \times 10^4$  UFC/g.

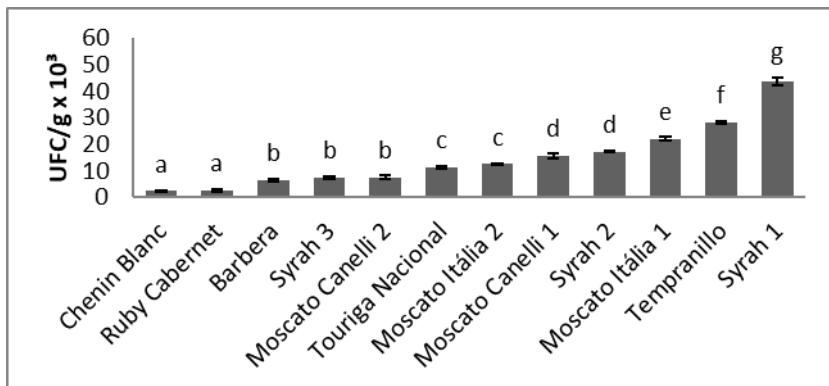


Gráfico 1- Densidade de incidência de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* nas amostras de solos de vinha. Letras diferentes mostram diferença estatística significante a  $p<0,05$

O solo é considerado um inóculo para as uvas, já que antes da suscetibilidade das bagas os fungos precisam sobreviver no vinhedo. Fatores como a atividade de água e temperatura afetam a sobrevivência dos esporos destes fungos, influenciando no inóculo inicial quando as uvas se tornam suscetíveis (Bellí et al., 2005). A contaminação das bagas pode estar relacionada com a dispersão dos esporos do solo, através do ar, para as bagas. Porém, segundo Garbeva et al. (2004), as interações entre as plantas e solo são complexas, com ambos exercendo efeito sobre a comunidade microbiana.

## 2 Incidência de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos de vinha

Foram isolados um total de 508 fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* a partir de solos de cultivo de uva viníferas da região do Vale do Submédio São Francisco. Destes, 68,70% pertencentes ao gênero *Aspergillus* e 31,30% ao gênero *Penicillium*.

*Aspergillus* Seção *Nigri* foram encontrados em todos os solos avaliados, *Aspergillus* Seção *Flavi* em 83,33% e *Aspergillus* Seção *Circumdati* em apenas 46,67% dos solos. *A. niger* foi a espécie de maior incidência, seguido por *P. citrinum*, estando ambos presentes em todas as amostras. *Aspergillus aculeatus* foram isolados em todas as amostras, exceto no solo de cultivo da variedade Moscato Itália 1. Já *A. japonicus* foi

encontrado em apenas 33,33% das amostras avaliadas. *Aspergillus niger* Agregado, *A. foetidus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. flavus*, *A. sojae*, *P. sclerotiorum*, *P. implicatum*, *P. chrysogenum* e *P. corylophilum* também estavam presentes nos solos de vinhedo, porém em baixa frequência e sua distribuição variou de acordo com as amostras.

### **3 Capacidade toxigênica de espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium***

Das espécies pertencentes à Seção *Nigri*, 24,23% foram produtoras de OTA. *Aspergillus carbonarius* mostrou-se a única espécie 100% produtora, enquanto as espécies *A. japonicus*, *A. aculeatus* e *A. foetidus* não mostraram habilidade para produção desta toxina. 18,18% das cepas de *A. niger* e 14,29% das cepas de *A. niger* Agregado também foram produtores de OTA. Dos isolados de *A. ochraceus*, 60% foram produtores de OTA. A porcentagem de cepas de *A. ochraceus* produtores de OTA relatada na literatura é bastante variável, variando de 10 a 54,5% (Abarca et al., 2001; Pitt e Hocking, 1997).

Dos 56 *Aspergillus* Seção *Flavi* isolados, todos os *A. parasiticus* (4) foram produtores de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, enquanto que apenas 14% de *A. flavus* foram produtores de aflatoxina B1, B2. Além disto, nenhum *A. sojae* foi produtor de toxina. Estas espécies não são consideradas membros comuns da micobiota das uvas e estudos conduzidos em países mediterrâneos reportaram baixa incidência das mesmas (Martínez-Culebras; Ramon, 2007; Medina et al., 2005).

Todos os *P. citrinum* foram produtores de citrinina, no entanto, esta toxina tende a ser degradada no processo de fermentação ao longo da elaboração de vinhos, não conferindo um risco potencial para à saúde do consumidor (Rousseaux et al., 2014).

## **CONCLUSÕES**

*A. carbonarius* e *P. citrinum* foram as principais espécies produtoras de micotoxinas, o que indica que estas espécies sejam responsáveis pela contaminação de uvas por micotoxinas no Vale do Submédio São Francisco.

## **REFERÊNCIAS**

ABARCA, M.L., ACCENSI, F., BRAGULAT, M.R. and CABANES, F.J., 2001. Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. *Journal of Food Protection*, vol. 64, pp. 903–906. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-64.6.903>

- BAU, M., BRAGULAT, M.R., ABARCA, M.L., MINGUEZ, S. and CABANÉS, F.J., 2005. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 98, pp. 125-130. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.015>
- BELLÍ, N., MITCHELL, D., MARÍN, S., ALEGRE, I., RAMOS, A.J., MAGAN, N. and SANCHIS, V., 2005. Ochratoxin A - producing fungi in Spanish wine grapes and their relationship with meteorological conditions. *European Journal of Plant Pathology*, vol. 113, pp. 233-239. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-005-5547-4>
- FILTENBORG, O. and FRISVAD, J.C. 1980. A simple screening method for toxigenic moulds in pure cultures. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*, vol. 13, no. 3, pp. 128-130.
- GARBEVA, P., VAN VEEN, J. A. and VAN ELSAS, J.D., 2004. Microbial diversity in soil: selection microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, v. 42, pp. 243-270. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.012604.135455>
- KLICH, M.A., 2002. *Identification of common Aspergillus species*. Utrecht: CBS. 116 p.
- LEONG, S.L., HOCKING, A.D., PITT, J.I., KAZI, B.A., EMMETT, R.W. and SCOTT, E.S., 2006. Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 111, pp. 10-17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.02.005>
- MARTÍNEZ-CULEBRAS, P.V. and RAMÓN, D., 2007. An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 113, pp. 147-153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.023>
- MEDINA, A., MATEO, R., LÓPEZ-OCAÑA, L., VALLE-ALGARRA, F.M. and JIMÉNEZ, M., 2005. Study of spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, no. 8, pp. 4696-4702. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.8.4696-4702.2005>
- MOHAMED, S., FLINT, S., PALMER, J., FLETCHER, G.C. and PITT, J.I., 2013. An extension of the Coconut Cream Agar method to screen *Penicillium citrinum* isolates for citrinin production. *Letters in Applied Microbiology*, vol. 57, no. 3, pp. 214-219. <http://dx.doi.org/10.1111/lam.12102>

- PITT, J.I. and HOCKING, A.D., 1997. *Fungi and food spoilage*. 2nd ed. London: Blackie Academic and Professional. 593 p.
- PITT, J.I., 2000. *A laboratory guide to Common Penicillium Species*. Sydney: Food Science Australia. 187 p.
- ROUSSEAU, S., DIGUTAB, C.F., RADOÏ-MATEIC, F., ALEXANDREA, H. and GUILLOUX-BÉNATIERA, M., 2014. Non-Botrytis grape-rotting fungi responsible for earthy and moldy off-flavors and mycotoxins. *Food Microbiology*, vol. 38, pp. 104-121.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.08.013>

## **Tolerância de *Stenotrophomonas acidamiliphila* a ácido ferúlico**

Maitê Bernardo Correia dos Santos<sup>1,2</sup>; Guillermo Ladino Orjuela<sup>1</sup>; Eleni Gomes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Departamento de microbiologia - Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada - IBILCE-UNESP/ Campus de São José do Rio Preto-SP

\*e-mail (autor para correspondência): maite.bernardo2@hotmail.com

---

### **RESUMO**

Na produção de bioetanol, pré-tratamentos que tem como objetivo extrair a lignina da biomassa tornando os açúcares disponíveis, geram uma série de compostos fenólicos que exercem efeitos tóxicos, dentre eles o ácido ferúlico. Os quais para eliminação têm sido utilizados métodos físicos, químicos e biológicos. Entre os biológicos, os microrganismos e/ou suas enzimas podem ser aplicados para diminuir os níveis de toxicidade ou até para a mineralização total do composto. A cepa bacteriana *Stenotrophomonas acidamiliphila*, relatada como degradadora de compostos aromáticos, foi cultivada em meio nutritivo na presença de ácido ferúlico sob as concentrações de 100 mg L<sup>-1</sup>, 200 mg L<sup>-1</sup>, 300 mg L<sup>-1</sup>, 400 mg L<sup>-1</sup> e 500 mg L<sup>-1</sup>, incubados durante 22 horas, numa incubadora orbital a 30°C e agitação de 150 rpm, com o intuito de observar o crescimento na presença deste composto e estipular a tolerância da cepa. Os resultados mostraram que até a concentração de 300 mg L<sup>-1</sup>, quando comparado com o controle, não há inibição do crescimento, e acima de 400 mg L<sup>-1</sup> já é notável o prejuízo ao crescimento. A cepa demonstrou níveis de tolerância acima dos relatados na literatura para estirpes bacterianas testadas em tais condições.

**Palavras-chave:** Bioetanol, inibidor, composto fenólico, tolerância, detoxificação.

---

### **Tolerance of *Stenotrophomonas acidamiliphila* to ferulic acid**

#### **ABSTRACT**

In the bioethanol production, pre-treatments aim to extract lignin from biomass and release fermentable sugars, generating a series of phenolic compounds that exert toxic effects, among them the ferulic acid. Physical, chemical and biological methods have been used to eliminate phenolic compounds. Among the biological methods, microorganisms and / or their enzymes can be applied to decrease the levels of toxicity or even to the total phenolic compounds mineralization. The bacterial strain, *Stenotrophomonas acidamiliphila*, reported as degrading of aromatic compounds, was cultivated in nutrient medium in the presence of ferulic acid with concentrations of 100 mg L<sup>-1</sup>, 200 mg L<sup>-1</sup>, 300 mg L<sup>-1</sup>, 400 mg L<sup>-1</sup> and 500 mg L<sup>-1</sup>, incubated for 22 hours in an orbital incubator at 30°C and 150 rpm, in order to observe the growth in the presence of this compound and stipulate the tolerance of the strain. The results showed that under concentrations of 300 mg L<sup>-1</sup>, when compared to the control, there is no growth inhibition, and above 400 mg L<sup>-1</sup>, growth impairment is notable. The strain demonstrated ferulic acid tolerance in levels above those reported in the literature.

**Keywords:** Bioethanol, inhibitor, phenolic compound, tolerance, detoxification.

---

## INTRODUÇÃO

Os principais componentes dos materiais lignocelulósicos são celulose, hemicelulose e lignina. Os dois primeiros correspondem aos polímeros de açúcar, aproveitáveis para os processos de fermentação alcoólica ou para obtenção de outros bioproductos. A lignina, por outro lado, corresponde a um polímero fenilpropano, constituído por alcoóis p-cumaril, coniferílico, sinapílico. A constituição aromática e as ligações éter conferem a esse composto elevada estabilidade frente a agentes químicos e biológicos, o que torna a molécula altamente recalcitrante (Campbell and Sederoff, 1996).

Quando da utilização do material lignocelulósico para a produção de bioetanol, essa característica constitui uma barreira para a obtenção dos açúcares fermentescíveis, sendo necessário que tal biomassa seja submetida a processos de pré-tratamento e hidrólise, a fim de quebrar suas estruturas e adaptá-las a formas acessíveis por enzimas para fermentação e bioconversão, liberando diversos compostos fenólicos como resíduos de degradação da lignina (Adeboye et al., 2014).

A composição dos compostos fenólicos formados durante o pré-tratamento depende tanto da espécie da planta como do método de pré-tratamento. Em geral, a mistura resultante é normalmente constituída por ácidos fenólicos, aldeídos fenólicos, alcoóis fenólicos e cetonas fenólicas, todas eles inibidores das células, impactando diretamente na produtividade do etanol de *S. cerevisiae* (Larsson et al., 1999).

Determinados compostos fenólicos, tais como o ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico), podem ser assimilados e convertidos por *S. cerevisiae*, no entanto existem concentrações nas quais a mesma não pode sobreviver, inibindo ainda enzimas importantes para a sacarificação como a  $\beta$ -glucosidase. O ácido ferúlico é um dos ácidos fenólicos mais abundantes na matéria lignocelulósica, existindo de forma livre ou ligada covalentemente a lignina e outros polímeros da planta como a hemicelulose (Adeboye et al., 2014).

Para a eliminação destes compostos os métodos biológicos apresentam-se como uma alternativa eficiente e sustentável, o gênero *Stenotrophomonas* é metabolicamente versátil e ocorre ubliquamente no ambiente (Ryan et al., 2009). Muitas espécies de *Stenotrophomonas* vêm sendo isoladas de ambientes diversos e implantadas na degradação de uma gama de compostos aromáticos orgânicos e inorgânicos (Batisson et al., 2007; Dwivedi and Singh; 2010).

Dessa forma, este estudo procedeu-se com a finalidade de identificar a capacidade de *Stenotrophomonas acidamiliphila* tolerar a presença de ácido ferúlico, sendo a mesma isolada em solo com registro de contaminação por hidrocarbonetos aromáticos, em São José do Rio Preto, São Paulo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Microrganismo

Foi utilizada a cepa bacteriana de *Stenotrophomonas acidamiliphila*, depositada em coleção do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”.

## Meio de cultivo

Meio nutritivo “*Lysogeny broth*” (LB) (Bertani, 1951): Glicose 0,2%, Cloreto de sódio 0,1%, triptona 1% e extrato de levedura 0,5%.

## Cultivo

O pré-inóculo foi preparado em meio nutritivo, o qual foi incubado a 30°C, a 150 rpm, densidade óptica analisada em espectrofotômetro (DO 600>0,9). Dessa suspensão, foi utilizado 0,2 mL para inocular cada unidade experimental.

O cultivo ocorreu em erlenmeyers contendo 15 mL de meio líquido nutritivo com adição de ácido ferúlico sob as concentrações de 100 mg L<sup>-1</sup>, 200 mg L<sup>-1</sup>, 300 mg L<sup>-1</sup>, 400 mg L<sup>-1</sup> e 500 mg L<sup>-1</sup>, em triplicatas; com controles biótico (sem a adição de ácido ferúlico) e abiótico (sem a adição do microrganismo), incubados numa incubadora orbital a 30°C e agitação de 150 rpm, durante 22 horas.

O crescimento foi mensurado através de alíquotas de 0,2 mL a cada 2 horas analisadas em espectrofotômetro (DO 600nm), modelo leitor de microplacas SpectraMax Plus 384.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comparando as unidades experimentais com o controle biótico foi possível observar que não houve crescimento na presença de ácido ferúlico sob a concentração de 500 mg L<sup>-1</sup>, e observando-se que o crescimento sob a concentração de 400 mg L<sup>-1</sup> apresenta uma maior *fase lag* o que representa prejuízo ainda que a mesma apresente crescimento significante após este retardo. Nas unidades experimentais com concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>, 200 mg L<sup>-1</sup> e 300 mg L<sup>-1</sup> a cepa apresentou crescimento inalterado em relação ao controle biótico (figura 1). A tolerância apresentada pela cepa ultrapassa a concentração de ácido ferúlico para inibição do crescimento de microrganismos proposta por outros trabalhos para estirpes bacterianas (Larsson et al., 2000; Lemos et al., 2014).

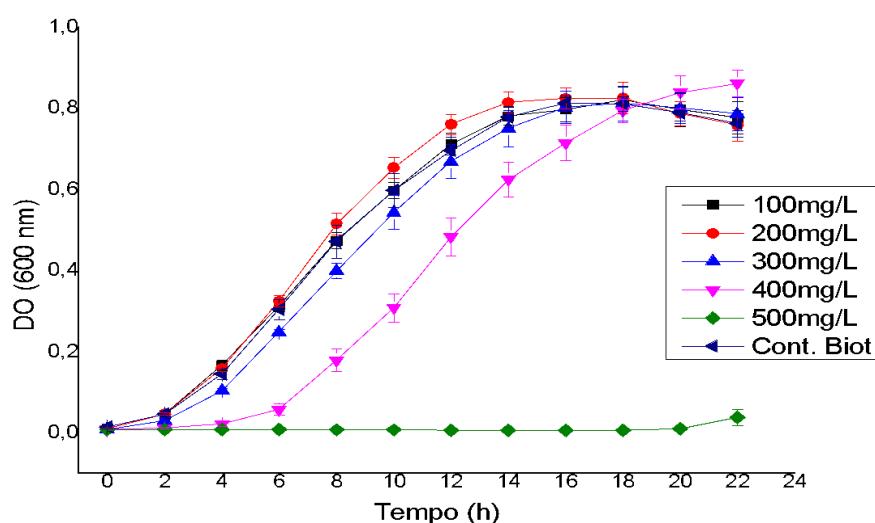


Figura 1. Crescimento de *Stenotrophomonas acidamiliphila* na presença de ácido ferúlico.

## CONCLUSÕES

Conclui-se, nas condições deste estudo, que a cepa apresenta tolerância significante até concentração de 300 mg L<sup>-1</sup> de ácido ferúlico, pois o crescimento não sofre alterações em relação ao controle biótico. Tais resultados evidenciam a necessidade da continuidade deste estudo a fim de identificar possíveis vias de degradação do ácido ferúlico, uma vez que tal microrganismo é relatado como degradador de compostos aromáticos.

## REFERÊNCIAS

- ADEBOYE, Peter Temitope, BETTIGA, Maurizio and OLSSON, Lisbeth, 2014. The chemical nature of phenolic compounds determines their toxicity and induces distinct physiological responses in *Saccharomyces cerevisiae* in lignocellulose hydrolysates. *AMB Express* [online]. 2014. Vol. 4, p. 46. DOI 10.1186/s13568-014-0046-7.
- BATISSON, Isabelle, PESCE, Stéphane, BESSE-HOGGAN, Pascale, SANCELME, Martine and BOHATIER, Jacques, 2007. Isolation and characterization of diuron-degrading bacteria from lotic surface water. *Microbial ecology* [online]. November 2007. Vol. 54, no. 4, p. 761–70. [Accessed 8 January 2016]. DOI 10.1007/s00248-007-9241-2.
- BERTANI, G, 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* [online]. September 1951. Vol. 62, no. 3, p. 293–300. [Accessed 26 October 2014]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- CAMPBELL, M. M. and SEDEROFF, R. R., 1996. Variation in Lignin Content and Composition (Mechanisms of Control and Implications for the Genetic Improvement of Plants). *Plant physiology* [online]. January 1996. Vol. 110, no. 1, p. 3–13.
- DWIVEDI, S and SINGH, BR, 2010. Isolation and characterization of butachlor-catabolizing bacterial strain *Stenotrophomonas acidaminiphila* JS-1 from soil and assessment of its. *Letters in applied...* [online]. 2010. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2010.02854.x/full>
- LARSSON, S, QUINTANA-SÁINZ, A, REIMANN, A, NILVEBRANT, N O and JÖNSSON, L J, 2000. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied biochemistry and biotechnology* [online]. 2000. Vol. 84–86, p. 617–32.
- LARSSON, Simona, PALMQVIST, Eva, HAHN-HÄGERDAL, Bärbel, TENGBORG, Charlotte, STENBERG, Kerstin, ZACCHI, Guido and NILVEBRANT, Nils-Olof, 1999. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. February 1999. Vol. 24, no. 3–4, p. 151–159. [Accessed 31 May 2015]. DOI 10.1016/S0141-0229(98)00101-X.
- LEMOS, Madalena, BORGES, Anabela, TEODÓSIO, Joana, ARAÚJO, Paula, MERGULHÃO, Filipe, MELO, Luís and SIMÕES, Manuel, 2014. The effects of ferulic and salicylic acids on *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* single- and dual-

species biofilms. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. January 2014. Vol. 86, p. 42–51. [Accessed 29 July 2015]. DOI 10.1016/j.ibiod.2013.06.011.

RYAN, R P, MONCHY, S, CARDINALE, M, TAGHAVI, S, CROSSMAN, L, AVISON, M B, BERG, G, VAN DER LELIE, D and DOW, J M, 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat Rev Microbiol* [online]. 2009. Vol. 7, no. 7, p. 514–525. DOI 10.1038/nrmicro2163.

## **Qualidade microbiológica de salgado recheado com hambúrguer vegano artesanal**

Marcia Nalesso Costa Harder<sup>1\*</sup>; Luciane Regina de Siqueira Barrichello<sup>1</sup>; Gabriela de Jesus Oliveira<sup>1</sup>;  
Rosana Maria de Oliveira Freguglia<sup>1</sup>; Érika Maria Roel Gutierrez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Tecnologia de Piracicaba “Dep. Roque Trevisan” – FATEC Piracicaba. \*e-mail (autor para correspondência): marcia.harder@fatec.sp.gov.br

---

### **RESUMO**

Os hambúrgueres vegetarianos surgiram como opção para quem não é adepto ao consumo de carne. Podem ser preparados de várias formas e costumam agradar a todos os gostos. Como uma opção de alimentação saudável, pode ser formulado a base de grão-de-bico, lentilha, ervilha e até feijão, opções ricas em proteínas. Este trabalho teve como objetivo elaborar um salgado vegano utilizando massa com fermentação natural e avaliar as condições sanitárias do produto, através das análises microbiológicas. A massa do salgado foi elaborada a partir de fermentação natural, o hambúrguer foi elaborado a partir de grãos e temperado. De acordo com os parâmetros microbiológicos determinados por lei, os resultados encontrados em 24h de incubação, apresentaram ausentes para bactérias totais, fungos e leveduras e *Staphilococcus aureus* e ausência de formação de gás para Coliformes totais. Em 48h de incubação, foram determinados  $6,2 \times 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup> para bactérias totais,  $<10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> para fungos e leveduras, ausente para *S. aureus* e ausência de formação de gás para Coliformes totais. Os resultados obtidos atestam a qualidade microbiológica do produto, que apresentou condições sanitárias satisfatórias, respeitando os padrões estabelecidos pela legislação, não somente pelos valores nutricionais, mas quanto às condições higiênicas que propiciem segurança alimentar e saúde ao consumidor.

**Palavras-chave:** alimento vegetariano, fermentação natural, grãos, análise microbiológica

---

**Microbiological quality of salted stuffed with artisan vegan hamburger**

### **ABSTRACT**

Vegetarian burgers have emerged as an option for those who are not adept at consuming meat. They can be prepared in a variety of ways and are usually to suit all tastes. As a healthy eating option, it can be formulated based on chickpeas, lentils, peas and even beans, choices that are rich in protein. The aim of this work was to elaborate a vegan salty using a natural fermentation mass and to evaluate the health conditions of the product through microbiological analyzes. The salty mass was elaborated from natural fermentation, the hamburger was prepared from grains and seasoned. According to

microbiological criteria adjusted by law, the results found in 24h incubation were absent for total bacteria, fungi and yeast and *Staphilococcus aureus* and absence of gas formation for total Coliforms. In 48h of incubation,  $6.2 \times 10^4$  CFU.mL<sup>-1</sup> was determined for total bacteria,  $<10^3$  CFU.mL<sup>-1</sup> for fungi and yeasts, absent for *S. aureus* and absence of gas formation for total Coliforms. The results obtained attest to the microbiological quality of the product, which presented satisfactory sanitary conditions, respecting the standards established by the legislation, not only for the nutritional values, but also for the hygienic conditions that provide food safety and consumer health.

**Keywords:** vegetarian food, natural fermentation, grains, microbiological analysis.

---

## INTRODUÇÃO

Não é fácil atender às necessidades de consumidores vegetarianos e aqueles que desejam adotar a alimentação vegetariana. As dietas vegetarianas, quando bem planejadas, como todas as dietas devem ser, promovem crescimento e desenvolvimento adequados e podem ser adotadas em todos os ciclos da vida, inclusive por atletas, na gestação, infância e terceira idade (SLYWITCH, 2012).

A indústria vem trabalhando para produzir em escala comercial a “carne análoga”, que irá funcionar como um substituto à carne e ao peixe (CALLIMACI, 2016). Tem benefícios a nível ambiental e nutricional, sendo dois aspectos apreciados pelo consumidor. Comparativamente com a proteína animal a “carne análoga” não contém colesterol, tem menos gordura total e saturada, é rica em substâncias protetoras (antioxidantes, fitoquímicos e fibras) e aminoácidos essenciais (VALE, 2016).

Os hambúrgueres vegetarianos remetem ao seu análogo, tanto em aparência, quanto em sabor e, surgiram como opção para quem não é adepto ao consumo de carne, mas, hoje em dia, também são muito consumidos pelo público em geral. Podem ser preparados de várias formas e costumam agradar a todos os gostos.

Como apresentado acima, possuem baixo teor de gorduras saturadas em sua composição, e utilizam opções como grão-de-bico, lentilha, ervilha e até feijão em sua formulação, como alternativas saudáveis e ricas em proteínas.

A contaminação de alimentos por micro-organismos pode ocorrer desde o início da produção da matéria prima ou em qualquer outra etapa do processamento. Para alimentos destinados ao consumo humano a ANVISA estabeleceu a RDC nº 12 (BRASIL, 2001) que determina padrões microbiológicos sanitários para alimentos.

Justificado pela potencial demanda de mercado, este trabalho teve como objetivo desenvolver um salgado vegano utilizando massa com fermentação natural e avaliar as condições sanitárias do produto, através das análises microbiológicas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

A elaboração do produto foi desenvolvida no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Fatec Piracicaba “Dep. Roque Trevisan”, localizado em Piracicaba-SP. Foram adotados todos os procedimentos de BPF (Boas Práticas de Fabricação), desde a etapa de obtenção da massa do salgado e do hambúrguer utilizado no recheio.

A massa do salgado foi elaborada a partir de uma fermentação natural, adaptado de Honorato de Jesus et al. (2016), com o crescimento, apesar de mais lento devido a ação dos micro-organismos, mais homogêneo, deixando a massa mais leve.

O hambúrguer foi elaborado a partir de grãos (soja – 33,33%, feijão – 33,33% e lentilha 33,33%) obtidos no comércio local de Piracicaba-SP e, levados ao Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Fatec Piracicaba, onde foram processados.

Primeiramente os grãos foram colocados de molho, principalmente para eliminação de taninos e depois cozidos com água até atingir o ponto de maciez desejado. Após esta etapa foram temperados de acordo com as características de um hambúrguer tradicional de carne, sendo utilizadas proporções iguais (33,33%) de cada grão.

A análise microbiológica do produto foi realizada no produto final, salgado assado segundo critérios definidos pela Resolução RDC nº (ANVISA, 2001). Foram determinados: Fungos e leveduras (YPD), Bactérias totais (NA), *Staphylococcus aureus* (BPA) e presença de coliformes totais através da técnica de tubos múltiplos (OLIVIERA et al., 2015).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados experimentais da avaliação microbiológica do salgado de hambúrguer são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Análise microbiológica do salgado de hambúrguer

Tempo (h)	Bactérias Totais (NA) <sup>1</sup>	Fungos e Leveduras (YPD) <sup>2</sup>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> (BPA) <sup>3</sup>	Coliformes Totais (CL) <sup>4</sup>
24	-----	-----	Ausente	Ausência de formação de gás.
48	$6,2 \times 10^4$ UFC.mL <sup>-1</sup>	$<10^3$ UFC.mL <sup>-1</sup>	Ausente	Ausência de formação de gás. Negativo para Coliformes Totais

<sup>1</sup>Nutriente Agar; <sup>2</sup>Yeast Peptone Dextrose; <sup>3</sup>Baird-Parker Agar; <sup>4</sup>Caldo Lactosado.

Para os fungos e leveduras, o plaqueamento seguiu a técnica de superfície, sendo cada diluição realizada em triplicada. As placas apresentaram crescimento inferior a 30 colônias nas placas de menor diluição ( $10^{-2}$ ).

Para bactérias utilizou-se a técnica de plaqueamento por profundidade, com as diluições em triplicata. As colônias observadas foram avaliadas através do teste de gram e foram classificadas como “gram positivo”. Ainda assim, foi realizada avaliação para presença de *S. aureus*, se apresentando ausente, o que garante a segurança do produto do ponto de vista da presença deste micro-organismo.

A determinação de bactérias totais foi realizada mais como um parâmetro de comparação entre outros produtos elaborados por fermentação natural, porém ele não está solicitado pela resolução da ANVISA (2001). A análise de coliforme total teve como resultado negativo para Coliformes totais e, por se tratar de um indicador, não foi necessário analisar *Salmonella sp.*

Os resultados obtidos atestam a qualidade microbiológica do salgado de hambúrguer pois estão dentro das normas definidas pela RDC nº 12/2001 (BRASIL, 2001). O produto apresentou condições sanitárias satisfatórias. Do ponto de vista das determinações estabelecidas em lei pela ANVISA, os alimentos se apresentaram seguros, de boa qualidade e respeitam os padrões estabelecidos pela legislação, não somente pelos valores nutricionais, mas quanto às condições higiênicas que propiciem segurança alimentar e saúde ao consumidor.

## CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados, pode-se concluir que é possível obter um alimento vegano a partir das condições de fermentação natural e, pela avaliação microbiológica pode-se observar que as condições de BPF exigidas em legislação foram atendidas satisfatoriamente.

Enfim, conclui-se que foi elaborado um alimento que atende a um mercado diferenciado atendendo as qualidades exigidas de consumo.

## REFERÊNCIAS

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos e seus Anexos I e II. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, Distrito Federal, n. 7, 10 Jan. 2001. Seção 1, p. 45-53.

CALLIMACI, G. 2016. Carne análoga - Sebenta teórica, GAC-Ingredientes & Produtos Alimentares.

OLIVEIRA, N.M.; REZENDE, M.P.G.; CARDOSO, I.L., 2015. Determinação de coliformes termotolerantes e totais nas mãos de pescadores amadores. *REB*, vol. 8, no. 1, pp 138-145.

HONORATO DE JESUS, J. et al., 2016. Padaria como instrumento motivador para o ensino da química orgânica. *Revista Científica FAEMA*, vol. 7, no. 1, pp. 178-188, jul. 2016.

SLYWITCH, E., 2012. *Guia alimentar de dietas vegetarianas para adultos*. 66p.

VALE, D.P.R., 2016. *Carne análoga: Desenvolvimento e criação de formulações/receitas portuguesas e internacionais como substituição à carne/peixe*. 75 p. Lisboa: Universidade de Lisboa, 75 p. Dissertação de Mestrado em Engenharia Alimentar.

## **Caracterização da endoglucanase usando casca de café como substrato**

Maria Júlia Flores Fernandes Dias Leandro<sup>1</sup>; Boutros Sarrouh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química, Biotecnologia e Bioprocessos –DQBIO, Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Alto Paraopeba. Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil.  
E-mail (autor para correspondência): mariajuliaffd@gmail.com

---

### **RESUMO**

As biomassas vegetais, tais como a casca do café, são resíduos lignocelulósicos constituídos de hemicelulose, lignina e celulose. Uma solução sustentável para a eliminação final destes resíduos é a sua utilização como fonte de energia renovável. Este estudo propõe caracterizar e avaliar a atividade celulolítica do fungo *Trichoderma sp.* isolado da madeira para hidrólise da casca de café, liberando açúcares fermentáveis e visando a produção de etanol de segunda geração. O processo de bioconversão da casca requer pré-tratamentos mecânicos e químicos, como moagem e hidrólises ácida, alcalina e enzimática. O fungo isolado foi cultivado em fermentação submersa, sob agitação a 28°C e 180 rpm, utilizando meio mineral (0,7% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,4% de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,02% de MgSO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1%), 0,06% de extrato de levedura e casca de café a 2% (p/v) como única fonte de carbono. Amostras foram coletadas em intervalos de 24 horas durante 11 dias, centrifugadas e submetidas ao método do ácido dinitrosalicílico (DNS) para determinação da atividade da endoglucanase através de seu potencial na liberação de açúcares redutores. Observou-se uma rápida adaptação do fungo isolado ao meio contendo casca de café e máxima produção da enzima endoglucanase após 8 dias de fermentação com atividade enzimática de 0,2408655 ± 0,00000 UI / mL em condições ótimas de 50°C e pH 5. Os resultados obtidos demonstraram atividade celulolítica promissora do fungo isolado para uso futuro na produção de etanol de segunda geração.

**Palavras-chave:** Atividade celulolítica, Temperatura, pH, Fungo.

---

### **Characterization of endoglucanase using coffee husk as substrate**

### **ABSTRACT**

Vegetal biomasses, such as coffee husk, are lignocellulosic residues basically composed of hemicellulose, lignin and cellulose. A sustainable solution for the final disposal of this waste is its usage as a source for renewable energy. This study proposes to characterize and evaluate the cellulolytic activity of *Trichoderma sp.* fungus, isolated of wood for coffee husk hydrolysis to release fermentable sugars aiming at the second generation ethanol production. The bioconversion process of the husks requires mechanical and chemical pretreatments, like grinding, acid hydrolysis, alkaline hydrolysis and enzymatic hydrolysis. The isolated fungus was cultivated in a submerged fermentation using coffee husk 2% (w/v) as the sole carbon source, and placed in a shaker under 28°C and 180 rpm. The mineral medium consisted of 0.7% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.02% MgSO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1% and yeast extract 0.06%. Samples were collected in 24 h intervals

for 11 days and were centrifuged and submitted to the method of dinitrosalicílico acid (DNS) to determine endoglucanase activity through its potential in the release of reducing sugars. Was observed a fast adaptation of the isolated fungus to the medium containing coffee husk, and maximum production of endoglucanase enzyme after 8 days of fermentation with an enzymatic activity of  $0.2408655 \pm 0.00000$  IU/mL under optimal conditions of 50°C and pH 5. The obtained results demonstrated a promising cellulolytic activity of the isolated fungus for future use in the production of second generation ethanol.

**Keywords:** Cellulolytic activity, Temperature, pH, Fungi.

## INTRODUÇÃO

As celulases são um complexo de enzimas extracelulares que atuam sinergicamente, produzidas por microrganismos que hidrolisam a celulose, o polímero natural mais abundante na natureza. Elas são divididas em três classes: as endoglucanases que quebram as ligações glicosídicas das cadeias de celulose criando novos terminais, as exoglucanases que agem sobre os terminais gerando a celobiose, e por último as  $\beta$ -glucosidases que hidrolisam a celobiose a glicose. As celulases têm numerosas utilizações: no processamento de café, na indústria têxtil, na composição de detergentes e na produção de papel e celulose. Sua utilização permite o uso de biomassa celulósica como matéria-prima para a produção de etanol.

Percival Zhang et al. (2006) afirmam que a biomassa lignocelulósica é o mais abundante recurso biológico renovável da terra, devido a isso e a sua composição existe uma tendência mundial para a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, buscando açúcares fermentescíveis para a produção de bioetanol em larga escala. A expectativa é de que o mercado de celulases pode ser superior a 400 milhões de dólares por ano com a possível utilização das enzimas na hidrólise de palha de milho nos Estados Unidos da América para a produção de etanol de biomassa.

Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar e caracterizar a atividade enzimática da endoglucanase produzida pelo fungo isolado da madeira atacada pela podridão branca, visando a sua aplicação na transformação de resíduos fibrosos em bioproductos de valor.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Produção de extratos enzimáticos por fermentação submersa e determinação da atividade da Enzima Endoglucanase

Primeiramente foram isoladas e cultivadas, em meio sólido, colônias de *Trichoderma sp.* isolado da madeira, conhecido popularmente como fungo da podridão branca. O isolado apresenta coloração branca. As culturas foram mantidas em placas contendo o meio BDA.

Para a inoculação do fungo isolado em meio líquido, contendo a casca de café como única fonte de carbono, três fragmentos de ágar contendo hifas do fungo em estudo foram retirados de uma placa de petri com auxílio de uma espátula. Em seguida, os mesmos foram inoculados em Erlenmeyers de 125mL contendo 50mL de meio líquido mineral e casca de café 2% (p/v). O meio mineral foi composto de (p/v): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,7%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4%, MgSO<sub>4</sub> 0,02%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1% e extrato de levedura 0,06%. O meio foi previamente autoclavado a 121 °C por 15 min. Os frascos foram incubados em shaker sob temperatura de 28°C e agitação de 180rpm durante onze

dias, a cada 24 horas foram coletadas amostras dos inóculos com o auxílio de uma micropipeta e transferidas para um microtubo tipo eppendorf e centrifugadas durante 20 minutos, a 4°C e rotação de 10000 xg.

A atividade de Endoglucanase foi determinada em função da sua capacidade de degradação da casca de café, sendo os açúcares redutores liberados foram quantificados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS). Foram retirados 0,250mL do extrato enzimático bruto do fungo e colocados em tubos de ensaio contendo 0,250mL de carboximetilcelulose. Para o controle, adicionou-se 0,250mL de tampão acetato 0,1M pH 4,8, em substituição do extrato enzimático. Os tubos foram colocados em banho-maria a 50°C por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se nos tubos de ensaio 0,75 mL da solução de DNS que posteriormente foram submetidos a banho fervente de 100°C por 5 minutos, seguidos de mais 5 minutos em banho de gelo para encerrar a atividade enzimática. Finalmente os tubos foram completados com 3,75mL de água destilada. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm e os valores de absorbância foram convertidos em quantidades equivalentes de glicose a partir de curva padrão previamente construída; considerando que 1 Unidade Internacional (IU) equivale a 1  $\mu$ mol de glicose liberada por minuto.

### Caracterização enzimática

A atividade da enzima Endoglucanase foi caracterizada submetendo o extrato enzimático bruto obtido no dia de cultivo que apresentou a melhor atividade durante o teste de crescimento do fungo isolado. As condições utilizadas para os ensaios de caracterização foram a temperatura de 40 a 70°C e pH de 3,0 a 6,0. Os testes foram realizados conforme descrito no item anterior, alterando-se a temperatura em que o ensaio foi incubado por 30 minutos no caso de caracterização do efeito da temperatura sobre a atividade enzimática. Já a avaliação do efeito do pH foi realizada utilizando tampões de fosfato-citrato nos valores de 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esse estudo teve como objetivo avaliar o crescimento celular e a produção da enzima endoglucanase produzida pelo fungo isolado. A Figura 1 mostra a curva da velocidade da reação enzimática, representada pela atividade da enzima Endoglucanase em função do tempo de cultivo.

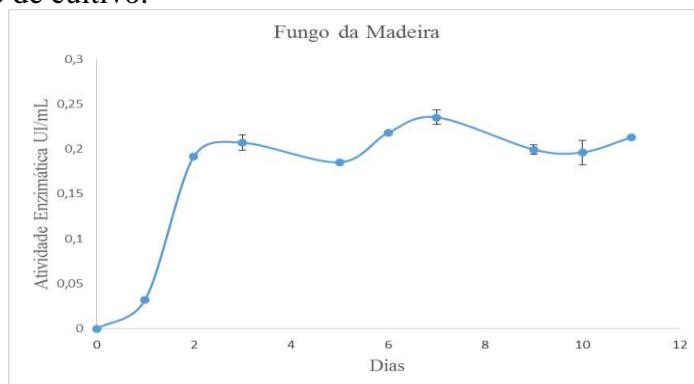


Figura 1- Cinética enzimática da endoglucanase produzida por *Trichoderma sp.*

Conforme mostrado na Figura 1, observou-se uma rápida adaptação do fungo isolado no meio de cultivo utilizando a casca de café como única fonte de carbono. O mesmo apresentou uma atividade celulolítica máxima de  $0,24 \pm 0,00$  UI/mL, após oito dias de fermentação.

Aguiar and Menezes (2000), ao utilizar *Aspergillus niger* IZ-9 após sete dias de incubação, utilizando bagaço de cana de açúcar como único substrato, obtiveram valores de atividade de Endoglucanase de 0,2 UI/ml, valores próximos ao observado com o fungo estudado neste trabalho.

A caracterização da atividade enzimática celulolítica em relação às condições ótimas de pH e temperatura foi realizada utilizando os extratos enzimáticos brutos obtidos após o oitavo dia de cultivo por ter apresentado a maior atividade enzimática, conforme mostrado na Figura 1.

Os dados obtidos neste estudo na caracterização da Endoglucanase em relação à variação de temperatura e pH estão apresentados na Figura 2.

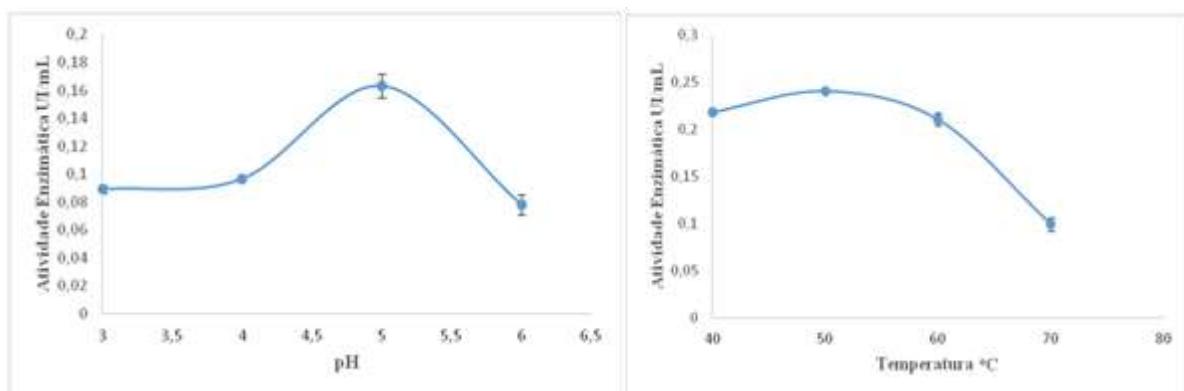


Figura 2 – Efeito do pH e da temperatura na atividade de Endoglucanase expressada nos extratos brutos do fungo isolado da madeira.

Observou-se que em pH 3 e 4 não houve aumento significativo na atividade enzimática da Endoglucanase do fungo de podridão branca, por outro lado em pH 5 a mesma alcançou uma atividade máxima de  $0,16 \pm 0,0085$  UI/mL, utilizando tampão fosfato-citrato.

Observa-se também que a temperatura da reação teve uma influência direta na atividade enzimática da Endoglucanase do fungo isolado. Dessa forma constatou-se uma atividade enzimática máxima de  $0,24 \text{ UI/ml} \pm 0,00$  a uma temperatura ótima de 50°C. Por outro lado, observou um decréscimo da mesma a uma temperatura de 60°C alcançando um valor mínimo de  $0,0994941 \pm 0,0068$  UI/mL a 70°C.

## CONCLUSÕES

A produção da enzima Endoglucanases pelo fungo da podridão branca em fermentação submersa alcançou um valor máximo de  $0,24 \pm 0,00$  UI/mL após oito dias de fermentação. Os extratos enzimáticos brutos submetidos às diferentes condições de temperatura e pH, apresentaram uma atividade endoglicolítica máxima a uma temperatura de 50°C e pH 5. Os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados na literatura para outros fungos que apresentam atividade celulolítica e demonstraram uma atividade celulolítica promissora visando uso futuro do fungo de podridão branca, isolado da madeira, na produção de etanol de segunda geração.

## AGRADECIMENTO

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

## REFERÊNCIAS

- Agência Embrapa de Informação Tecnológica – ageitec [Acesso em 10/02/2017] Disponível em:  
[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia\\_de\\_alimentos/arvore/CONT000fid5sgif02wyiv80z4s473v6o7sud.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000fid5sgif02wyiv80z4s473v6o7sud.html).
- AGUIAR, C.L. and MENEZES, T.J.B, 2000. Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* IZ9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, vol. 18, no. 1, pp.57-70. <http://dx.doi.org/10.5380/cep.v18i1.1125>.
- CASTRO, A. M., PEREIRA Jr., N., 2010. Produção, Propriedades e Aplicação de Celulases na Hidrólise de Resíduos Agroindustriais. *Quim. Nova*, vol. 33, no. 1, pp.181-188. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000100031>.
- FREITAS, W. L. C., 2016. *Estudo da casca de café como matéria prima em processos fermentativos*. Lorena: Universidade de São Paulo. 118p. Tese de Doutorado em Ciências.
- PERCIVAL ZHANG, Y.H., HIMMEL, M.E. and MIELENZ, J.R., 2006. Outlook for cellulose improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, vol. 24, no. 5, pp. 452-481. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.03.003>.
- SAHA, B. C., 2004. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. *Process Biochemistry*, vol. 39, no. 12, pp. 1871-1876. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2003.09.013>.

## **Fungos Antárticos: Bioatividade contra *Xanthomonas vesicatoria* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis***

Mariana Gabriela Fonseca<sup>1</sup>; Gabrielle Vieira<sup>1</sup>; Jelena Purić<sup>1</sup>; Marina Vitti Vianna<sup>1</sup>; Luana Galvão Morão<sup>1</sup>; Lara Durães Sette<sup>1</sup>; Henrique Ferreira<sup>1</sup>; Maria Lucia Carneiro Vieira<sup>2</sup>; Daiane Cristina Sass<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Genética Molecular de Plantas e Biotecnologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, São Paulo, Brasil. \*e-mail: daiane\_sass@rc.unesp.br

---

### **RESUMO**

Bactérias do gênero *Xanthomonas* são agentes causadores de fitopatologias em diversas culturas, dentre elas a mancha bacteriana do tomate e pimentão e a bacteriose da mandioca, causando perdas significativas nas safras. Como alternativa ao combate químico atualmente empregado, diversos estudos apontam o uso de extratos advindos de metabólitos secundários produzidos por outros tipos de micro-organismos. O presente trabalho apresenta resultados de testes contra *Xanthomonas vesicatoria* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, causadoras, respectivamente, da mancha bacteriana e da bacteriose, de extratos metabólicos produzidos por trinta fungos coletados na Ilha Rei George, Antártica. No total foram testados 47 extratos, sendo 30 intracelulares e 17 extracelulares. O extrato intracelular com maior ação bioativa contra *Xanthomonas vesicatoria* indicou 88,27% de células mortas. Dentre os extratos extracelulares, os resultados apontaram 95,19 % de células mortas contra *X. axonopodis* pv. *manihotis*, e um segundo extrato apontou 95,19% e 92,49% de inibição das bactérias *X. axonopodis* pv. *manihotis* e *X. vesicatoria*, respectivamente.

**Palavras-chave:** mandioca; tomate; fitopatologias; bioatividade; metabólitos secundários.

---

### **Antarctic Fungi: Bioactivity against *Xanthomonas vesicatoria* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis***

### **ABSTRACT**

Bacteria of the genus *Xanthomonas* are agents that cause phytopathologies in diverse cultures, among them the bacterial spot of the tomato and pepper and the cassava bacterial blight, causing significant losses in the crops. As an alternative to the currently chemical combat, several studies point to the use of extracts derived from secondary metabolites produced by other types of microorganisms. The present work presents test results against *Xanthomonas vesicatoria* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, that cause, respectively, the tomato and pepper bacterial spot and cassava bacterial blight, of metabolic extracts produced by thirty fungi collected on King George Island, Antarctica. In total, 47 extracts were tested, 30 of which were intracellular and 17 extracellular. The intracellular extract with the highest bioactive action against *X. vesicatoria* indicated 88.27% of dead cells. Among the extracellular extracts, the results

indicated 95.19% of dead cells against *X. axonopodis* pv. *manihotis*, and a second extract with 95.19% and 92.49% inhibition of the *X. axonopodis* pv. *manihotis* and *X. vesicatoria*, respectively.

**Keywords:** cassava; bacterial blight; bioactivity; phytopatologias, secondary metabolities.

---

## INTRODUÇÃO

Dentre os inúmeros cultivos de importância econômica produzidos no Brasil, encontram-se os da mandioca, pimentão e tomate. Todavia, muitas fitopatologias acometem as safras, levando a perdas de parte ou toda a colheita.

Causada por *X. axonopodis* pv. *manihotis*, a bacteriose tem sido encarada como a principal doença da mandioca, sobretudo no Sul, Sudeste e Centro-Oeste brasileiros. Quando acometida pela doença, a planta tem folhas, folíolos, pecíolos e feixes vasculares afetados, ocasionando a sua morte. O combate à enfermidade ainda não conta com nenhum tipo de agente químico ou bioativo, sendo a utilização de variedades resistentes a medida mais eficiente para o controle da bacteriose, aliada a práticas culturais como a utilização de manivas sadias e a adequação das épocas de plantio (Souza and Fialho, 2003).

Já a mancha bacteriana, causada por *X. vesicatoria*, é uma das doenças mais devastadoras e de difícil combate que acomete as safras de pimentão e tomate. Quando em condições favoráveis, o patógeno ataca folhas, frutos e caules do hospedeiro, no entanto, seu controle torna-se praticamente impossível, levando a perdas de safras inteiras. Atualmente o controle químico baseia-se na aplicação de antibióticos e de produtos à base de cobre, contudo, o uso indiscriminado tem levado ao surgimento de estirpes resistentes de bactérias, além de acarretar em riscos ambientais e para a saúde humana (Lopes and Quezado-Soares, 2000).

Devido à falta de recursos eficazes, atualmente aplicados, no combate e controle da bacteriose e mancha bacteriana, tem-se buscado alternativas que respondam por melhor desempenho, menor impacto ambiental e baixo risco para o consumo humano. Dentre as possibilidades recentemente propostas, está a utilização de metabólitos secundários produzidos por outros micro-organismos no combate a doenças bacterianas causadas por diversas espécies do gênero *Xanthomonas* (Murata et al., 2015), além de estudos que destacam o potencial antimicrobiano, para fins fitossanitários, de extratos de fungos advindos da Antártica (Svahn et al., 2015).

O presente trabalho apresenta os resultados obtidos da análise do potencial de ação antibacteriana de metabólitos secundários extraídos de fungos filamentosos da Antártica, frente às espécies bacterianas *X. axonopodis* pv. *manihotis* e *X. vesicatoria*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Trinta fungos filamentosos, coletados na Ilha Rei George, na Antártica, foram reativados e submetidos a fermentação em *shaker*, em meio malte (2%) líquido, por 21 dias. Em seguida, a biomassa foi separada do sobrenadante por filtração a vácuo e macerada com metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), originando os extratos intracelulares. Os extratos extracelulares foram obtidos do sobrenadante resultante da filtração por extração líquido-líquido, utilizando acetato de etila ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ) como solvente. A evaporação dos solventes foi feita em evaporador rotativo a vácuo e, em seguida, os extratos foram dissolvidos em solução de dimetilsulfóxido – DMSO- ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ ).

Os bioensaios com os extratos seguiram o método REMA (resazurin microtiter assay), previamente proposto por Silva and Ferreira (2013). O protocolo descrito pelos autores, entretanto, refere-se à aplicação para *X. citri* subsp. *citri*, assim foi realizada uma checagem de validade do método para *X. vesicatoria* e *X. axonopodis* pv. *manihotis*. As células bacterianas de interesse, previamente cultivadas em placas de Petri contendo meio nutriente ágar (2%), foram inoculadas em meio nutriente (2%) líquido e submetidas à agitação em *shaker* a 29 °C, 200 rpm, por 18 horas. Após este período, foi realizada medida de densidade óptica (D.O.) por espectrofotometria ( $\lambda = 600$  nm). A D.O. foi então ajustada para concentração igual a 0,8. A partir deste inóculo, foram realizadas diluições em 12 microtubos de centrífuga contendo solução salina NaCl (0,9%). As quatro primeiras diluições foram desconsideradas, e a partir da quinta diluição, foi realizado plaqueamento em meio nutriente ágar (2%) e incubado em B.O.D a 29 °C por 12 horas. Em seguida, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia e comparadas com o proposto no protocolo REMA de Silva and Ferreira (2013).

Para aplicação dos bioensaios pela metodologia REMA, utilizou-se microplaca de 96 poços, sendo quatro deles preenchidos com canamicina para controle positivo (CP), outros quatro com DMSO 2% para controle do veículo (CV) e oito poços contendo inóculo bacteriano ajustado a D.O. = 0,8 para controle negativo (CN). Dezesseis poços foram preenchidos com diferentes extratos em concentração 2100  $\mu\text{g}$

por mL, a partir dos quais foram realizadas três diluições dos mesmos. Após receberem o inóculo bacteriano, as placas foram incubadas por 18 horas, seguindo-se a aplicação da resazurina. Após duas horas da aplicação do corante nas placas mantidas a 29°C, a inibição do crescimento bacteriano foi medida através de emissão de fluorescência.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram produzidos 30 extratos intracelulares e 17 extracelulares a partir de 30 fungos filamentosos coletados na Ilha Rei George, na Antártica. No total, 47 extratos fúngicos foram submetidos a testes contra *X. axonopodis* pv. *manihotis* e *X. vesicatoria*. A validação do protocolo REMA, de Silva and Ferreira (2013), foi confirmada para ambas as *Xanthomonas* de interesse. Dessa maneira os bioensaios contra as *X. axonopodis* pv. *manihotis* e *X. vesicatoria* foram realizados.

Os extratos foram enumerados de 1 a 47, sendo os de 1 a 30 intracelulares e de 31 a 47 extracelulares. Os resultados dos bioensaios realizados com os extratos, na concentração máxima de 2100 µg/ml, contra *X. axonopodis* pv. *manihotis* e *X. vesicatoria* estão apresentados na Tabelas 1 e 2, respectivamente.

**Tabela 1:** Resultados, em porcentagens de células mortas, para os extratos intracelulares (1-30), na concentração de 2100 µg/ml, contra *X. axonopodis* pv. *manihotis* e *X. vesicatoria*.

Extrato	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>X. vesicatoria</i>	Extrato	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>X. vesicatoria</i>
1	25,85	27,04	16	39,95	54,14
2	65,31	88,27	17	25,83	11,59
3	51,74	18,37	18	0,00	3,63
4	23,73	5,08	19	0,00	18,96
5	57,93	11,82	20	16,30	33,23
6	49,68	18,73	21	13,61	9,36
7	24,41	4,79	22	31,67	15,37
8	65,39	18,66	23	0,00	18,46
9	48,35	46,00	24	33,52	23,34
10	30,33	30,17	25	0,00	15,31
11	41,48	42,60	26	33,52	0,00
12	50,38	24,36	27	0,00	9,42
13	49,10	13,71	28	0,00	4,91
14	47,77	13,94	29	0,00	10,29
15	29,09	13,21	30	0,00	47,22

**Tabela 2:** Resultados, em porcentagens de células mortas, para os extratos extracelulares (31-47), na concentração de 2100 µg/ml, contra *X. axonopodis* pv. *manihotis* e *X. vesicatoria*.

Extrato	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>X. vesicatoria</i>	Extrato	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>X. vesicatoria</i>
31	0,00	6,65	40	0,00	15,95
32	0,00	0,18	41	14,29	20,55
33	95,19	92,49	42	0,00	0,00
34	37,94	0,00	43	0,00	0,00
35	41,93	6,60	44	0,00	0,00
36	0,00	53,39	45	95,19	50,72
37	0,00	11,20	46	41,49	0,56
38	0,00	2,83	47	41,93	41,91
39	5,87	6,47			

Analisando a Tabela 1 é possível verificar que dentre os extratos intracelulares, o extrato 2 foi o que apresentou o melhor resultado frente a *X. vesicatoria*, com 88,27% de inibição de crescimento celular, enquanto que o extrato 8 obteve 65,39% de inibição frente a *X. axonopodis* pv. *manihotis*. Já para os extratos extracelulares (Tabela 2), o extrato 45 inibiu em 95,19 % o crescimento celular de *X. axonopodis* pv. *manihotis* e o extrato 33 inibiu significativamente o crescimento bacteriano frente às duas *Xanthomonas*, apresentando 95,19% e 92,49% de inibição das bactérias *X. axonopodis* pv. *manihotis* e *X. vesicatoria*, respectivamente.

Considerando que a composição dos extratos testados ainda não foi identificada, os resultados revelam que os mesmos contêm compostos químicos ativos contra *X. axonopodis* pv. *manihotis* e *X. vesicatoria*, requerendo assim a separação e identificação dos constituintes desses extratos, além de uma nova análise da atividade antibacteriana.

## CONCLUSÕES

A partir dos dados apresentados neste trabalho foi possível concluir que os fungos coletados na Ilha Rei George na Antártica produziram extratos com compostos químicos ativos contra *X. axonopodis* pv. *manihotis* e *X. vesicatoria*. Estudos como estes apresentam caráter preliminar, mas se mostram como uma opção considerável do ponto de vista biotecnológico na obtenção futura de metabólitos bioativos com importância agronômica.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço às agências de fomento FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro cedido.

## REFERÊNCIAS

- LOPES, C.A. and QUEZADO-SOARES A.M., 2000. Doenças causadas por bactérias em tomate. In: ZAMBOLIM, L; VALE, F.X.R.; COSTA, H. (ed).Controle de doenças de plantas: hortaliças. Viçosa: UFV. p. 754-784.
- MURATE, L.S., DE OLIVEIRA, A.G., HIGASHI, A.Y., BARAZETTI, A.R., SIMIONATO, A.S., DA SILVA, C.S., SIMÕES, G.C., DOS SANTOS, I.M.O., FERREIRA, M.R., CELY, M.V.T., NAVARRO, M.O.P., DE FREITAS, V.F., NOGUEIRA, M.A., DE MELLO, J.C.P., LEITE JR, R.P., ANDRADE, G. Activity of Secondary Bacterial Metabolites in the Control of Citrus Canker. *Agricultural Sciences*. v. 6, p. 295-303, 2015.
- SILVA IC, FERREIRA H. 2013. Drug Sensitivity Assay of *Xanthomonas. citri* subsp. *citri* Using REMA Plate Method. *Bio-protocol.*, v. 3, p. 1-4.
- SOUZA, L. S and FIALHO, J. F. , 2003. [viewed 28 March 2017]. Cultivo da Mandioca para a Região do Cerrado [online]. *Embrapa Mandioca e Fruticultura - Sistemas de Produção*. Available from: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>
- SVAHN K.S., CHRYSSANTHOU E., OLSEN B., BOHLIN L. and GÖRANSSON U., 2015. *Penicillium nalgiovense* Laxa isolated from Antarctica is a new source of the antifungal metabolite amphotericin B. *Fungal Biology and Biotechnology*. v. 2, p. 1-8.

## **Bioacumulação de cobre no biofilme perifítico e seu impacto ecológico.**

Mariana Lopes de Sousa<sup>1\*</sup>; Sheila Cardoso da Silva <sup>2</sup>; Marcelo Luís Martins Pompêo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade de São Paulo - Instituto de Biociências / Laboratório de Limnologia.  
Rua do Matão,321 - Trav. 14., Butantã - São Paulo – SP.

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Campus Experimental de Sorocaba.  
Avenida Três de Março, 511- Aparecidinha – Sorocaba – SP.

\*marianasousa250@gmail.com.

---

### **RESUMO**

O cobre apesar de ser um elemento naturalmente encontrado em ambientes aquáticos, também é um contaminante com sério potencial bioacumulador. O perifítón por sua vez, na forma de um biofilme formado por diversos microrganismos é a base das cadeias alimentares aquáticas, e porta de entrada para o cobre em níveis tróficos superiores. A partir de testes com o biofilme perifítico cultivado em laboratório foi estudado o potencial de bioacumulação do cobre nessa comunidade, bem como sua relação com a produção primária através do peso seco livre de cinzas. Em laboratório, foi observado que nas concentrações até 0,06 mg/L não houve indícios de bioacumulação, mas a partir disso o cobre se acumulou no biofilme, aumentando de acordo com a concentração utilizada. Já a biomassa apresentou um maior crescimento inicial, que cessou a partir da concentração onde se iniciou a bioacumulação. Logo, o biofilme perifítico se mostrou uma ferramenta eficiente para avaliação da contaminação por cobre em ambientes aquáticos.

**Palavras-chave:** Microalgas, ecotoxicologia, toxicidade, cadeias alimentares.

---

**Bioaccumulation of copper on periphytic biofilm and its ecological impact**

### **ABSTRACT**

Despite being naturally found in aquatic environments, copper is a serious contaminant, with a high bioaccumulation potential. Periphyton, on the other hand, is a biofilm composed of several microorganisms and basis of aquatic food chains. For this reason, it is the way copper uses to enter the food chain and bioaccumulates in higher trophic levels. Using ecotoxicological tests with periphytic biofilm, it was observed the copper bioaccumulation in this community and its relation with ash free dry mass weight. It was observed that in concentrations up to 0.06 mg/L of copper, there was no bioaccumulation. But after this point, copper accumulated in biofilm, according to the concentration used in water. There was a higher ash free dry mass weight initially, but

after the point bioaccumulation started it stopped. Therefore, periphytic biofilm was an efficient tool in order to study the bioaccumulation of copper in aquatic environments.

**Keywords:** Microalgae, ecotoxicology, toxicity, food chain.

---

## INTRODUÇÃO

O cobre é uma substância essencial para o funcionamento dos organismos, na forma de micronutriente. Entretanto, em excesso, torna-se um contaminante que causa diversos danos (JORDÃO et al., 1990). Sua entrada em ambientes aquáticos é alta e diversificada, sendo resultante de efluentes industriais, lixiviação de agrotóxicos, e da própria descarga direta por meio do seu uso como algicida (DORES & DELAMONICA-FREIRE, 2001; SAMPAIO et al., 2013). Apenas nos reservatórios de São Paulo, estima-se que o uso chega a 480 toneladas/ano. O cobre excedente se acumula no sedimento, sendo liberado na coluna d'água, e continuando biodisponível para os organismos (ZAGATTO, 1995).

No caso de ambientes lênticos, como lagos e reservatórios, grande parte da produção primária provém do perifíton. Essa comunidade é composta por bactérias, fungos, microalgas e outros microrganismos, formando um biofilme muitas vezes espesso e com capacidade de concentrar nutrientes e consequentemente contaminantes (FELISBERTO & MURAKAMI, 2013). Devido a sua alta palatabilidade e facilidade de pastejo (HORNE & GOLDMANN, 1994), os contaminantes, como no caso o cobre, entram na cadeia trófica, causando danos em cascata (RAI et al., 1998). Este trabalho procurou avaliar a capacidade do biofilme perifítico em bioacumular cobre, mediante testes laboratoriais. Também foi avaliada a relação entre o peso seco livre de cinzas e o total de cobre bioacumulado, de maneira a inferir os possíveis danos causados por esse tipo de contaminação.

## MATERIAL E MÉTODOS

O inóculo de perifíton foi obtido num lago dentro do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (São Paulo - Brasil). Esse material foi transferido para um aquário de 50 L contendo meio LC Oligo (ABNT, 2011) e lâminas de vidro para colonização. Após 20 dias as lâminas homogeneamente colonizadas pelo biofilme foram expostas a diferentes concentrações de cobre, em dois diferentes experimentos. Inicialmente foram testadas as concentrações entre 0,013 mg/L até 0,15 mg/L, e em

seguida o intervalo entre 0,15 mg/L até 2,0 mg/L. Esses valores foram baseados na legislação brasileira de qualidade de água (CONAMA, 2011) e no trabalho desenvolvido por Zagatto (1995). Após 15 dias de exposição o material foi retirado com ajuda de um pincel e separado em alíquotas para as análises.

Para o peso seco livre de cinzas (POMPÉO & MOSCHINI-CARLOS, 2003), o material correspondente foi transferido para cadinhos previamente calcinados, e secos até estabilização do peso. Após isso o material foi calcinado e a diferença entre o peso das cinzas e o peso seco anotada.

Já a bioacumulação de cobre no biofilme foi avaliada através de análise em espectrofotômetro (DEAN, 2003, com adaptações). Toda vidraria utilizada para a análise foi previamente lavada em banho de ácido nítrico 10% por 24 h, e depois lavadas três vezes em água ultrapura. As amostras então foram transferidas para bêqueres de vidro contendo 2,0 mL de HNO<sub>3</sub> (1N) e 5,0 mL de HCl (1N). As amostras foram aquecidas em banho de areia (90°C), até que o volume fosse reduzido à 20 mL, normalizadas para 50 mL e filtradas. Após isso, foi feita a leitura em espectrofotômetro de absorção atômica (Thermo Scientific S Series - AA Spectrometer).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a Figura 1, foi observado que nas concentrações iniciais (0,013 mg/L e 0,06 mg/L) não houve bioacumulação de cobre. Portanto, não ocorreram maiores danos ao biofilme. É importante notar que a primeira concentração utilizada é a recomendada pela lei de águas (CONAMA, 2011) para águas de abastecimento tipo 3. A partir de 0,1 mg/L foi notada bioacumulação no biofilme, aumentando proporcionalmente de acordo com a concentração à que a comunidade foi exposta. O máximo encontrado foi de 0,026 mg de cobre por cm<sup>2</sup> de biofilme.

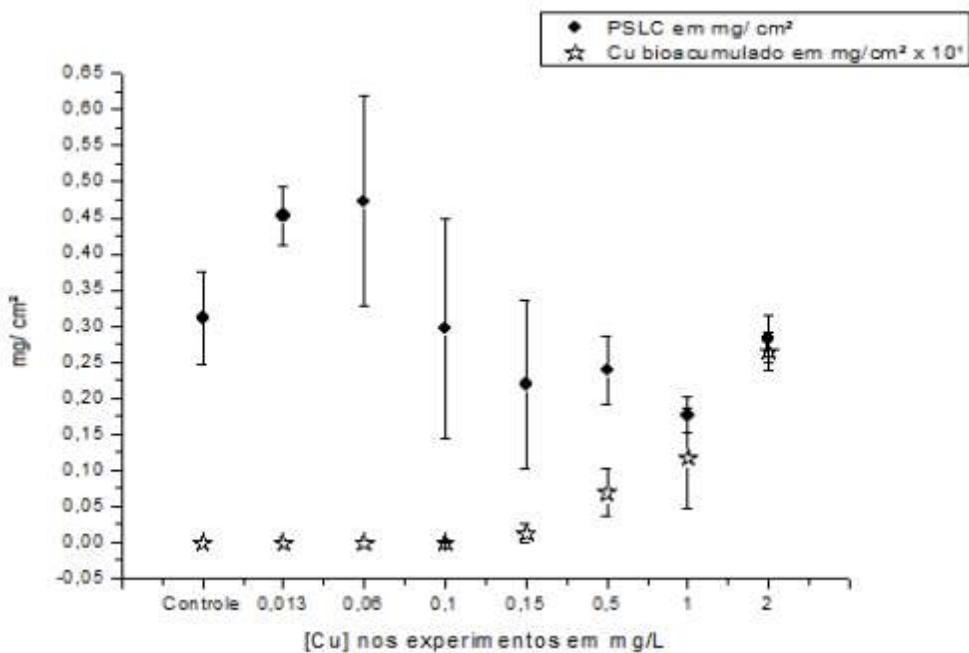


Figura 1: Peso seco livre de cinzas e cobre bioacumulado no biofilme.

Considerando a quantidade total de cobre utilizada nos ensaios, multiplicada pela concentração média encontrada nas amostras onde ocorreu bioacumulação, é possível dizer que todo o cobre disponível na água foi incorporado ao biofilme. Essa é uma característica comum do perifítón em acumular nutrientes, chegando a ficar mais concentrado que o meio à sua volta. De acordo com Felisberto & Murakami (2013), o cobre pode se acumular tanto nas células quanto na mucilagem das algas ou nos exopolissacarídeos bacterianos.

Quanto ao peso seco livre de cinzas, este variou entre as amostras. Foi observado que a adição de cobre (0,013 mg/L), coincidiu com o aumento médio da biomassa, entretanto, a partir do ponto onde foi identificada bioacumulação (0,1 mg/L), a produção primária média cai. Porém, mesmo a concentração mais alta utilizada (2,0 mg/L), esse valor não difere significativamente do controle, apesar de apresentar forte bioacumulação. Isso ocorre devido à tolerância da comunidade ao cobre.

A concentração de 1,0 mg/L de cobre pode ser encontrada em zonas de descarga de efluentes industriais ou de mineração, visto que é a concentração máxima permitida pela lei de águas (CONAMA, 2011). Logo a ingestão desse biofilme pelo zooplâncton ou pequenos peixes implica diretamente na entrada do cobre na cadeia alimentar (RAI et al., 1998), podendo chegar ao ser humano.

## CONCLUSÕES

O perifítion cultivado em laboratório se mostrou satisfatório para analisar a bioacumulação de cobre. Foi possível perceber que a partir de 0,1 mg/L a bioacumulação se torna perceptível, chegando a 0,026 mg/cm<sup>2</sup> quando o biofilme é exposto a 2,0 mg/L de cobre. A produção primária na forma de peso seco livre de cinzas foi menor a partir do ponto onde foi notada bioacumulação, provavelmente por efeito da contaminação. Como concentrações altas de cobre podem ser encontradas em áreas de descargas de efluentes industriais ou mineração, é possível dizer que sua bioacumulação no biofilme é problemática aos ecossistemas aquáticos.

## AGRADECIMENTO

CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT, 2011 *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae)* – Rio de Janeiro. Norma Técnica ABNT NBR 12648:2011.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA, 2011 [viewed 12 march2017]. *Resolução 357.* Brasília. Available from <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>

DORES, E.F.G.C. and DE-LAMONICA-FREIRE, E.M. 2001. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso – Análise Preliminar. *Química Nova*, vol. 24, no. 1, pp. 2736. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422001000100007>

FELISBERTO, S.A. and MURAKAMI, E.A. 2013. Papel do Perifítion na ciclagem de nutrientes e na teia trófica. In SHAWARZBOLD, A.; BURLIGA, A.L. and TORGAN, L.C., orgs. *Ecologia do Perifítion*. São Carlos : Rima, p. 2344.

HORNE, A.J. and GOLDMAN, C.R. 1994. *Limnology* , New York: McGrawHill Book

Company, 576 p.

JORDÃO, C.P.; PEREIRA, J.L.; GOUVES, L.C.; PEREIRA, J.C. and BRUNE, W. 1990. Contaminação de sedimentos fluviais por metais pesados nas proximidades de uma indústria metalúrgica de minas gerais. *Geochimica Brasiliensis*, vol. 4, no. 1, pp.9-15. <http://dx.doi.org/10.21715/gb.v1i4.27>

POMPÊO M.L.M and MOSCHINI-CARLOS, V. 2003. *Macrófitas aquáticas e perifítion: Aspectos ecológicos e metodológicos*. São Carlos: RIMA/FAPESP, 134 p.  
DEAN. J.R. 2003. *Methods for environmental trace analysis*. Chichester: John Wiley & Sons. 267 p.

RAI, P.K.; PRADHAN, S. and RAI, L.C. 1998. Algal responses to heavy metals with special reference to the mechanism of toxicity and tolerance. In VERMA, B.N.; KARGUPTA, A.N. and GOYAL, S.K., orgs. *Advances in Phycology*. New Delhi: Associated Publishing Co. Ltd., p.351365.

SAMPAIO, F.G.; BOIJINK, C.L. and RANTIN, F.T. 2013. *Documentos 91: O uso do sulfato de cobre em ecossistemas aquáticos: fatores que afetam sua toxicidade em peixes de água doce*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 101 p.

ZAGATTO, P. A. 1995. *Évaluation écotoxicologique du réservoir Guarapiranga, Brésil, en relation avec le problème des algues toxiques e algicides*. Metz: Université de Metz, 86 f. Tese de Doutorado em Ecotoxicologia.

## **Agitação e aeração do inóculo visando maior produção de P(3HB)**

**Mariane Igansi Alves<sup>1</sup>; Karine Laste Macagnan<sup>2</sup>; Camila Rios Piecha<sup>2</sup>; Ligia Furlan<sup>3</sup>; Patrícia Diaz de Oliveira<sup>2</sup>; Angelita da Silveira Moreira<sup>3\*</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial - Universidade Federal de Pelotas.

<sup>2</sup>Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia- Universidade Federal de Pelotas

<sup>3</sup>Centro de Ciências Farmacêuticas, Químicas e de Alimentos- Universidade Federal de Pelotas

\*angelitadasilveiramoreira@gmail.com

---

### **RESUMO**

Plásticos convencionais são polímeros derivados de petróleo têm despertado preocupação devido a sua rápida descartabilidade, a lenta degradação e por não reagirem quimicamente com a maioria das substâncias, provocando problemas nos aterros sanitários, dificultando a troca de gases e a decomposição de outros compostos. Polihidroxialcanoatos (PHA) são polímeros plásticos de origem biológica, biodegradáveis e para os quais se utilizam fontes de carbono renováveis na sua síntese. O Poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB)] é o biopolímero mais estudado dentre os PHAs. *Ralstonia solanacearum* RS é uma bactéria que acumula P(3HB) ainda na fase de obtenção do inóculo. Neste trabalho, avaliou-se a Densidade Óptica (DO<sub>600</sub>), Biomassa Celular Seca (BCS) e Rendimento de polímero pela modificação da combinação de agitação e aeração na fase final de obtenção do inóculo, realizada em biorreator, visando o aumento da concentração de biomassa e do rendimento do bioplástico. Incubou-se as células em meio YM e a 32 °C, em biorreator de bancada com capacidade de 8L durante 24 h. As combinações de agitação e aeração utilizadas foram 150 rpm e 0,3 vvm (T1), 200 rpm e 0,65 (T2) e 250 rpm e 1 vvm (T3). Houve diferença significativa positiva, entre todas as variáveis dependentes, causada pelo aumento na agitação/aeração; os maiores valores foram DO<sub>600</sub> 17,38; BCS 4,96 g/L e P(3HB) 42,60%. Análises complementares devem ser realizadas para verificar o rendimento na fase de produção.

**Palavras-chave:** Bioplástico, Poli(3-hidroxibutirato), Fermentação, *Ralstonia solanacearum* RS

---

**Agitation and aeration of the inoculum aiming at higher production of P(3HB)**

### **ABSTRACT**

Conventional plastics which are polymers derived from petroleum due to their fast disposability, slow degradation and failure to react chemically with most substances, causing problems in landfills, and also difficulty to exchange gases and decompose other compounds have aroused many concerns to the environment. Polyhydroxyalkanoates (PHA) are plastic polymers from biological source, biodegradable and for which renewable carbon sources are used in their synthesis. Poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] is the most studied biopolymer among the PHAs. *Ralstonia solanacearum* RS is a bacterium that accumulates P(3HB) still in the stage of

obtaining the inoculum. In this work, the Optical Density (DO<sub>600</sub>), Dry Cell Biomass (BCS) and Polymer yield were evaluated by modifying the combination of parameters, agitation and aeration, in the final stage of obtaining the inoculum. The experiments were carried out in a bioreactor, aiming to increase the biomass concentration and the yield of the bioplastic. Cells were incubated in YM medium and at 32 °C in 8 L capacity, in a bench scale bioreactor for 24 h. The agitation and aeration parameters combinations were 150 rpm and 0.3 vvm (T1), 200 rpm and 0.65 (T2) and 250 rpm and 1 vvm (T3). There was a significant positive difference among all the dependent variables caused by the increase in agitation / aeration parameters; The highest values were DO<sub>600</sub> 17.38; BCS 4.96 g/L and P(3HB) 42.60%. Further analyzes should be performed to verify the yield at the production stage.

**Keywords:** Bioplastic, Poly(3-hydroxybutyrate), Fermentation, *Ralstonia solanacearum* RS

---

## INTRODUÇÃO

O consumo de plásticos não biodegradáveis *per capita* no mundo no ano de 2015 foi de 45Kg/habitante, e no Brasil, o valor foi de 46Kg/habitante. Embora o consumo *per capita* de produtos plásticos no Brasil possa ser considerado modesto em comparação ao consumo dos países desenvolvidos, já que em 2005 o consumo local era de cerca de 25% do consumo *per capita* dos habitantes do Nafta (Estados Unidos, Canadá e México) e da Europa, sua perspectiva de crescimento no consumo entre 2005 e 2015, de 100%, é igualada apenas aquela da Europa Oriental. Porém, mesmo após esse crescimento ocorrer, o consumo per capita brasileiro deverá alcançar apenas 33% do consumo nos países desenvolvidos (Silva et al., 2004).

O crescente interesse científico e popular pela área de preservação ambiental, associado ao da área industrial pela continuidade do crescimento de consumo de plásticos, têm tornado necessários à pesquisa e o desenvolvimento de substitutos ecologicamente corretos. Neste aspecto, a utilização de biopolímeros está se tornando cada vez mais interessante como alternativa à substituição de plásticos convencionais, devido a sua principal característica- a biodegradabilidade - e os produtos que a reação de degradação gera - água (H<sub>2</sub>O) e gás carbônico (CO<sub>2</sub>) (Luvizetto, 2007).

Em geral, a otimização das condições de fermentação tem provado ser bem sucedida em melhorar substancialmente o rendimento do produto e a produtividade de muitos processos biológicos (Choi et al., 1996). Dado que a síntese de P(3HB) é conhecida por ser favorecida por estresses ambientais, tais como limitação de nutrientes essenciais como nitrogênio, fosfato ou oxigênio (Braunegg et al., 1998) tal estratégia vem sendo amplamente utilizada.

*Ralstonia solanacearum* é um bacilo Gram-negativo amplamente distribuído em nossa região, naturalmente habitante do solo e da água. Favoravelmente, é aeróbico e não formador de esporos, e os isolados virulentos são aflagelados e imóveis, enquanto os avirulentos têm alta motilidade. É tolerante a sais e cresce em ampla faixa de temperatura, de 25 a 35 °C, de acordo com o isolado, e acumula P(3HB) como reserva de carbono e energia (Mehan et al., 1994).

Como em trabalhos anteriores com *Ralstonia solanacearum* cepa RS, realizados em incubador agitador orbital (shaker) verificou-se que o microrganismo é capaz de acumular P(3HB) ainda na fase de inóculo, sem a necessidade de restrição de nutrientes, objetivou-se, com o presente trabalho, iniciar o estudo de aumento de escala de produção de inóculo e da influência da combinações dos parâmetros aeração e agitação no processo fermentativo em biorreator de bancada, visando o aumento na concentração de biomassa e no acúmulo de P(3HB) por *Ralstonia solanacearum* RS.

## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se a linhagem *Ralstonia solanacearum* RS, cedida pelo Laboratório de Bacteriologia da FAEM, UFPel. A bactéria foi primeiramente incubada a 32 °C, durante 24 h, em meio sólido *Nutritive Yeast Agar* (AYN) (extrato de levedura: 3 g/L; extrato de malte: 3 g/L; glicose: 10 g/L; peptona: 5 g/L) (Schaad et al., 2001). Depois, as células foram suspensas em meio líquido YM modificado (extrato de levedura: 2,7 g/L; extrato de malte: 2,7 g/L; peptona: 4,5 g/L; sacarose: 35,0 g/L) (Jeanes, 1974); porções de 200 mL da suspensão bacteriana foram colocados em frascos de *Erlenmeyers* de 500 mL. As condições de incubação foram 32 °C e 200 rpm durante 24 h; após, as células foram diluídas em meio líquido YM modificado até atingirem densidade óptica (DO) inicial de 0,5 abs. Para a fase de produção de 8 L, foi utilizado um biorreator de bancada (BIOSTAT®B), pH 6, onde foram analisadas 3 diferentes combinações de agitação e aeração, sendo 150 rpm e 0,3 vvm (T1), 200 rpm e 0,65 vvm (T2) e 250 rpm e 1 vvm (T3); utilizou-se um volume de 20 % de pré-inóculo com DO<sub>600</sub> de 0,5 mantendo-se as demais condições. Para a determinação da DO, em 600 nm, em espectrofotômetro da GE®, modelo Ultrospec 10; a determinação da biomassa celular seca (BCS), os cultivos foram transferidos para tubos Falcon e submetidos a centrifugação em centrífuga Kendro®, modelo Sorvall RC- 6, a 10000 g por 15 min a 4 °C; o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de biomassa seco em estufa à temperatura de 56 °C por 48 h (Macagnan et al., 2017). Para a extração de polímero, a biomassa celular seca (BCS) foi

submetida à agitação com clorofórmio na proporção 40:1 v/m na temperatura de 58 °C. Transferiu-se a solução para funil de decantação e adicionou-se 40 partes de água destilada. Em seguida, repousou-se para a separação de fases e transferiu-se a fase orgânica para placa de Petri semi-fechada. Armazenou-se em capela de exaustão de gases, para a evaporação lenta do solvente e formação dos biofilmes (Macagnan et al., 2017). Após sua obtenção, os biofilmes foram pesados para o cálculo de rendimento, que foi expresso em porcentagem. A análise estatística foi realizada com auxílio do programa Statistix 9, utilizando o Teste de Tukey a 0,05.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos densidade óptica, biomassa celular seca e rendimento de polímero oriundos da produção na fase de inóculo realizada em biorreator, com diferentes condições de aeração e agitação, pode ser observado na Tab. 1

Tabela 1. Densidade Óptica (DO), Biomassa Seca Celular (BSC) e Rendimento de polímero obtidos a partir de diferentes condições de aeração e agitação

Tratamentos	DO $\pm$ DP (600nm)	BCS $\pm$ DP (g/L)	Rendimento (%)
T1	8,81 <sup>c</sup> $\pm$ 0,01	2,16 <sup>c</sup> $\pm$ 0,16	21,96 <sup>c</sup> $\pm$ 0,9
T2	16,03 <sup>b</sup> $\pm$ 0,27	2,56 <sup>b</sup> $\pm$ 0,52	36,49 <sup>b</sup> $\pm$ 0,5
T3	17,38 <sup>a</sup> $\pm$ 0,03	4,96 <sup>a</sup> $\pm$ 0,11	42,60 <sup>a</sup> $\pm$ 1,5

T1: 150 rpm e 0,3 vvm; T2: 200 rpm e 0,65 vvm; T3: 250 rpm e 1 vvm. Letras sobrescritas iguais na mesma coluna significam que não há diferença estatística pelo Teste de Tukey ( $T > 0,05$ ).

Pode-se observar, pela Tabela 1, que em relação aos resultados das análises realizadas no presente estudo, que todos as variáveis dependentes foram significativa e positivamente afetadas; o T3, caracterizado pela combinação dos maiores valores, 250 rpm de agitação e 1 vvm de aeração, ocasionou o melhor resultado frente aos demais tratamentos.

A principal diferença entre os processos fermentativos em agitador incubador orbital e em biorreator reside no fornecimento de oxigênio e velocidade de agitação; no agitador incubador orbital não é possível o controle do fornecimento ou da taxa de oxigênio dissolvido e as velocidades de agitação são menores. Trabalhos encontrados na literatura não relatam os parâmetros usados na produção do inóculo em biorreator, fato esse que seria importante para padronizar o processo desde o início.

Ao realizar a produção no inóculo no agitador incubador orbital, Macagnan (2017, dados não publicados), obteve uma DO de 20,6 abs, BCS de 5,35 g/L e um

rendimento de 45,6% de polímero. Os resultados obtidos pelo autor com os encontrados no presente trabalho não diferem estatisticamente, assim, pode-se perceber que o aumento de escala para a produção do inóculo pode ser realizada com sucesso.

Kulpreecha e colaboradores (2009) avaliaram o efeito do pH (6,0; 7,0 e 8,0) e da concentração de oxigênio dissolvido (OD) (40, 60 e 80% de saturação) no meio de cultivo usado em fermentação em batelada de *Bacillus megaterium* BA-019 na fase de produção. Para o rendimento de biomassa o melhor resultado (9,7 g/L) foi obtido na fermentação sem controle de pH e com nível de DO saturado de 60%, porém não diferiu estatisticamente do resultado obtido com pH 8,0 e saturação de 80% (9,5 g/L).

Faccin e colaboradores (2013) avaliaram a transferência de oxigênio submetendo o cultivo de *Bacillus megaterium* DSM 32 na fase de produção a diferentes agitações (100, 200, 300, 400, 500 e 600 rpm). O maior rendimento de P(3HB), 62%, foi obtido com a agitação de 200 rpm.

## CONCLUSÕES

O aumento da escala de produção do inóculo para 8 L foi realizada com sucesso. O aumento combinado nas variáveis independentes agitação e aeração ocasionou, em todos os níveis estudados, desejável aumento nos parâmetros analisados. Os maiores valores de DO<sub>600</sub>, BCS e rendimento de P(3HB) foram obtidos com a combinação 250 rpm e 1 vvm, que ocasionou a maior aeração. Maiores estudos, ampliando-se o número de combinações dos parâmetros agitação e aeração devem ser realizados, inclusive na fase de produção.

## REFERÊNCIAS

- BRAUNEGG, G., LEFEBVRE, G., and GENSER, K., 1998 Polyhydroxyalkanoates, biopolymers from renewable resources: physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*, n. 65, pp. 127-161. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(98\)00126-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(98)00126-6)
- CHOI, K. H., CHISTI, Y., and MOO-YOUNG, M., 1996. Comparative evaluation of hydrodynamic and gas-liquid mass transfer characteristics in bubble column and airlift slurry reactors. *Chemical Engineering Journal and Biochemical Engineering Journal*, v. 62, pp. 223-229. [http://dx.doi.org/10.1016/0923-0467\(96\)03085-0](http://dx.doi.org/10.1016/0923-0467(96)03085-0)

FACCIN, D. J. L., RECH, R., SECCHI, A. R., CARDOZO, N. S. M. and AYUB, M. A. Z., 2013. Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*. *Process Biochemistry*, v. 48, pp. 420-425. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.02.004>

JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides- New hydrocolloids of interest to the food industry. *Food Technology*, v. 28, pp. 34-40, 1975.

KULPREECHA, S., BOONRUANGTHAVORN, A., MEKSIRIPORN, B. and THONGCHUL, N., 2009. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolated of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bioscience Bioengineering*, v. 107, pp. 240-245. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.10.006>

LUVIZETTO, D. J. 2007. Cultivo da bactéria *Bacillus megaterium* para a produção do biopolímero Poli(3-hidroxibutirato) e modelagem matemática do bioprocesso. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 119p. Dissertação em Engenharia

MACAGNAN, K. L., RODRIGUES, A. A.; ALVES, M. I., FURLAN, L., KESSERLINGH, S. M., MOURA, A. B., OLIVEIRA, P. D., MCBRIDE, A. J. A., MOREIRA, A. S. and VENDRUSCOLO, C. T., 2017. Simplified recovery process of *Ralstonia solanacearum*-synthesized polyhydroxyalkanoates via chemical extraction complemented by liquid-liquid phase separation. *Química Nova*. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20160162>

MEHAN, V. K., LIAO, B. S., TAN, Y. J., ROBINSON-SMITH, A., McDONALD, D. and HAYWARD, A. C., 1994. Bacterial wilt of Groundnut. Patancheru: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. *Information Bulletin*, v. 35, pp. 28

SCAAD, N. W., JONES, J. B. and CHUN, W., 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. *APS Press*, pp. 373

SILVA, M. F. de O., COSTA, L. M., PEREIRA, F. dos S. and COSTA, M. A., 2004. A indústria de transformação de plásticos e seu desempenho recente. *BNDES Setorial*, v. 38, pp. 131-172

## **Análise micrográfica de Poli(3-hidroxibutirato) após ensaio de degradação em solo**

Matheus Marques Torres<sup>1\*</sup>; Mariane Igansi Alves<sup>2</sup>; Karine Laste Macagnan<sup>1</sup>; Cristiane Raubach Ratmann<sup>3</sup>; Angelita da Silveira Moreira<sup>2</sup>; Claire Tondo Vendruscolo<sup>2</sup>; Patrícia Diaz de Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas – RS, Brasil.

<sup>2</sup> Núcleo de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas – RS, Brasil.

<sup>3</sup> Núcleo de Engenharia de Materiais, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas – RS, Brasil.

\*e-mail (autor para correspondência): bilicadiaz@yahoo.com.br

---

### **RESUMO**

Devido a atual situação mundial de descarte e demasiada acumulação de lixo, a procura e pesquisa sobre materiais biodegradáveis têm crescido consideravelmente. O presente trabalho aborda um importante substituinte de plásticos derivados de petróleo: o Poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB)]. Embora biodegradável, a velocidade de degradação do P(3HB) é variável e dependente de características do próprio polímero e do ambiente de descarte, principalmente do tipo e concentração de microrganismos presentes no solo. O trabalho discorre sobre um experimento de degradação em solo, realizado com P(3HB) produzido em laboratório pelo microrganismo *Ralstonia solanacearum*. Foram utilizados quatro tratamentos para o ensaio de degradação, sendo: (1) solo esterilizado (controle negativo); (2) solo esterilizado inoculado com *Ralstonia solanacearum*; (3) solo esterilizado inoculado com *Bacillus megaterium*; (4) solo não esterilizado (controle positivo). A avaliação da degradação foi por análise gravimétrica, expressa como % de perda de massa, e por análise micrográfica. O estudo demonstrou que o tratamento sem processos de esterilização foi o mais efetivo na degradação polimérica devido a variedade da microbiota existente em solo, e que tal degradação é visível não somente macroscopicamente como microscopicamente.

**Palavras-chave:** P(3HB), *Ralstonia solanacearum*, *Bacillus megaterium*, micrografia, biodegradável

---

**Micrographical analysis of Poly (3-hydroxybutyrate) after soil degradation test**

### **ABSTRACT**

Due to the current worldwide disposal situation and too much garbage accumulation, demand and research on biodegradable materials has grown considerably. The present work addresses an important substitute for petroleum-based plastics: Poly (3-hydroxybutyrate) [P (3HB)]. Although biodegradable, the rate of degradation of P (3HB) is variable and dependent on characteristics of the polymer itself and the environment of disposal, especially the type and concentration of microorganisms present in the soil. The work is based on a soil degradation experiment carried out with P (3HB) produced in the laboratory by the microorganism *Ralstonia solanacearum*.

Four treatments were used for the degradation test: (1) sterilized soil (negative control); (2) sterilized soil inoculated with *Ralstonia solanacearum*; (3) sterilized soil inoculated with *Bacillus megaterium*; (4) non-sterile soil (positive control). The evaluation of the degradation was by gravimetric analysis, expressed as% loss of mass, and by micrographic analysis. The study demonstrated that the treatment without sterilization processes was the most effective in the polymer degradation due to the variety of the microbiota in soil, and that such degradation is visible not only macroscopically but also microscopically.

**Keywords:** P(3HB), *Ralstonia solanacearum*, *Bacillus megaterium*, micrography, biodegradable.

---

## INTRODUÇÃO

Plásticos derivados do petróleo têm uma grande incidência na sociedade atual. Devido suas características físicas, é muito comum seu uso em vários ramos industriais (PITT et al. 2011). Mas apesar de seu uso recorrente ser benéfico, quando a questão é analisada sob o ponto de vista ecológico, plásticos derivados de petróleo podem se tornar um problema crescente. Ao serem descartados erroneamente, os plásticos petroquímicos se acumulam no meio ambiente e, devido a sua baixa degradabilidade, poluem tanto os ecossistemas terrestres quanto os aquáticos. Mesmo nos lugares corretos de descarte, sua acumulação se faz de forma demasiada, sobrecarregando aterros sanitários (RÓZ 2003).

Muitos materiais biodegradáveis têm sido estudados para contornar o problema em questão. Uma das alternativas são os Polihidroxialcanoatos (PHAs), polímeros que, por serem de origem microbiana, possuem um grande potencial degradativo em ambientes biologicamente favoráveis (SUDESH et al., 2000). Dentre os PHAs, um dos mais pesquisados é o Poli(3hidroxibutirato), um polímero microbiano de reserva intracelular e que possui muitas características semelhantes ao polipropileno, um dos plásticos petroquímicos mais utilizados mundialmente (SUDESH et al., 2000). Diferentes P(3HB)s variam quanto à massa molar e índice de cristalinidade; e essas diferenças interferem na velocidade de degradação após descarte em ambiente favorável. Fatores ambientais, como umidade, pH do solo, tipo e concentração microbiana também possuem grande influência na velocidade de degradação, que quanto maior, melhor.

Objetivou-se avaliar, quantitativa e qualitativamente, a influência da inoculação das bactérias acumuladoras de P(3HB) *Ralstonia solanacearum* e *Bacillus megaterium* no processo biodegradativo em solo.

## MATERIAL E MÉTODOS

O P(3HB)-RS foi produzido no Laboratório de Biopolímeros (UFPel) por fermentação submersa com a bactéria *Ralstonia solanacearum* cepa RS e a metodologia de síntese e extração do polímero segundo Macagnan et al. (2017).

Após a extração, a solução do polímero dissolvido foi então vertida em placas de Petri semiabertas, para lenta evaporação do solvente e formação do filme. Os corpos de prova de P(3HB), de aproximadamente 3,5 cm<sup>2</sup>, foram pesados e individualizados em envelopes de tecido de poliéster medindo 5x6 cm, enterrados em triplicata e retirados nos períodos de tempo de 20, 40, 60, 80 e 100 dias.

O experimento de degradação foi conduzido em casa de vegetação, com mensuração de temperatura máxima e mínima. Os recipientes utilizados foram sementeiras plásticas com células individualizadas, com dimensões de 6,5 x 6,5 x 6,0 cm, contendo aproximadamente 130 g de solo. O solo, adquirido no comércio local, possuía em sua constituição 25,00% de argila e 5,38% de massa orgânica, com pH 7,64, capacidade de retenção de água de 45,00%, mantido com essa proporção de umidade. Quatro tratamentos foram utilizados: (T1) solo esterilizado, (T2) solo esterilizado e acrescido de inóculo de *R. solanacearum* cepa RS, (DO<sub>600</sub> 10,8) (T3) solo esterilizado e acrescido de inóculo de *B. megaterium* cepa CN3 (DO<sub>600</sub> 5,8), e (T4) solo natural.

Para obtenção dos inóculos utilizados nos tratamentos 2 e 3, foram realizados repiques multiplicativos em meio Nutrient Yeast Agar (NYA) a 32°C e 36 °C por 24h, respectivamente, para *R. solanacearum* cepa RS e *Bacillus megaterium* cepa CN3; após, as células foram transferidas para frascos Erlenmeyers com 200 mL de meio Yeast Malt (YM) e incubados nas temperaturas anteriores a 150 rpm, por 24 h.

Após serem retiradas do solo, as amostras de P(3HB) foram lavadas com água destilada e secas em estufa a 56 °C por 24 horas. Após o processo de secagem, as amostras foram analisadas quanto a sua perda de massa por gravimetria. A caracterização microestrutural foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo Carl Zeiss Supra 35-V, e conduzida à temperatura ambiente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os percentuais de degradação obtidos no transcorrer de 100 dias de ensaio de biodegradação. É possível inferir que o T4 e o T1 foram os mais distantes em taxa de degradação. Enquanto a esterilização do T1 extinguiu toda a microbiota presente responsável pelo processo degradativo, a não esterilização do T4

possibilitou a existência de uma microbiota ampla e diversificada, que resultou na maior degradação. A ocorrência da pequena degradação em T1 é decorrente do fato que, embora a condição inicial do solo tenha sido a esterilidade, o mesmo acaba desenvolvendo uma nova microbiota, em função do contato com a atmosfera e água de irrigação não estéreis. Yew et al.(2006) obtiveram 50% de biodegradação de P(3HB) comercial (Produzido pela Biocycle©) em 40 dias, o que foi alcançado nesse estudo para o T4. Entre T3 e T2, o mais efetivo foi o T3, evidenciando que a bactéria *B. megaterium* é um degradador de P(3HB) mais efetivo.

Tabela 1. Perda de massa dos filmes de P(3HB) RS submetidos à biodegradação em solo em diferente tratamentos.

Tempo (dias)	Percentual de perda de massa (%)			
	T1	T2	T3	T4
20	3,49 <sup>C</sup>	7,24 <sup>BC</sup>	12,51 <sup>B</sup>	19,22 <sup>A</sup>
40	10,22 <sup>C</sup>	12,03 <sup>C</sup>	36,09 <sup>AB</sup>	49,25 <sup>A</sup>
60	23,85 <sup>D</sup>	26,03 <sup>CD</sup>	49,72 <sup>B</sup>	77,32 <sup>A</sup>
80	26,97 <sup>CD</sup>	37,94 <sup>C</sup>	65,34 <sup>B</sup>	89,74 <sup>A</sup>
100	28,56 <sup>D</sup>	33,33 <sup>C</sup>	88,07 <sup>B</sup>	100 <sup>A</sup>

\*(T1) solo estéril; (T2) solo estéril inoculado com *R. solanacearum* cepa RS; (T3) solo estéril inoculado com *B. megaterium* cepa CN3; (T4) solo não estéril. Letras sobrescritas diferentes, na mesma linha representam diferenças significativas.

Na análise das micrografias (figura 1) observa-se, em todos os tratamentos, biodegradação aos 60 dias, evidenciada pelas extensões das fraturas e a porosidade que aumentam consideravelmente. No tempo 0, a micrografia revela as porosidades iniciais do polímero sem qualquer tipo de degradação, produzidos devido ao método de preparação dos filmes por evaporação. No T1 (solo inicialmente estéril) observa-se uma estrutura mais compacta, enquanto que nos corpos dos demais tratamentos as superfícies são mais porosas e irregulares, principalmente no T4. Imagens semelhantes foram apresentadas por Wang et al. (2013), em que a degradação foi realizada utilizando inóculos de *Pseudomonas medoncina* aplicados diretamente nas amostras e o mesmo perfil de biodegradação foi verificado.

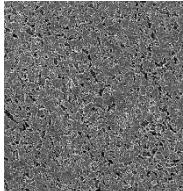
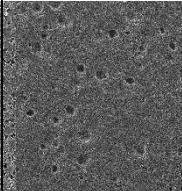
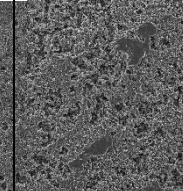
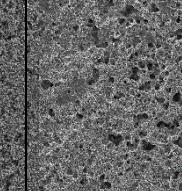
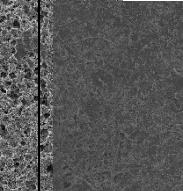
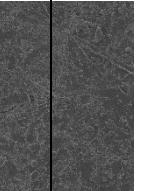
	Tempo 0	T1	T2	T3	T4	
Micrografia						
Fotografias						

Figura 1. Imagens das micrografias (aumento 200 x) e fotografias dos corpos de prova submetidos a diferentes tratamentos, em 60 dias de biodegradação. T1 solo estéril; T2 solo estéril inoculado com *R. solanacearum* cepa RS; T3 solo estéril inoculado com *B. megaterium* cepa CN3; T4 solo não estéril. Letras sobreescritas diferentes, na mesma linha representam diferenças significativas.

As fotografias, obtidas na análise macroscópica, corroboram com a taxa de degradação e perda de massa ocorrida. Com o aumento da degradação, a fragmentação da amostra é evidente, como na amostra T4, que se encontra totalmente particulada. A cor também é um parâmetro importante, visto que onde ocorreu a menor degradação (T1) a cor e opacidade se assemelham à amostra do tempo 0.

## CONCLUSÕES

O P(3HB) RS é biodegradado em um ambiente microbiologicamente favorável, na presença de microrganismos degradadores desse polímero. Ambas bactérias inoculadas, *R. solanacearum* e *B. megaterium*, podem ser consideradas como potenciais degradadoras de P(3HB), sendo *B. megaterium* mais eficiente para o P(3HB) testado.

## REFERÊNCIAS

LOPES, V.C.P., 2011. *Foto e biodegradação de pebd, phb e suas blendas*. Rio Claro: Universidade estadual Paulista. 101 p. Tese de Mestrado em Ciências Biológicas.

MACAGNAN, K. L; RODRIGUES, A. A; ALVES, M. I; FURLAN, L; KESSERLINGHC, S. M; MOURA, A. B; OLIVEIRA, P. D; MCBRIDE, A. J. A; MOREIRA, A. S; VENDRUSCOLO, C. T. 2017. Simplified Recovery Process Of Ralstonia Solanacearum-Synthesized Polyhydroxyalkanoates Via Chemical Extraction Complemented By Liquid-Liquid Phase Separation. *Química Nova*, vol. 40, no. 2, p. 125-130. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20160162>.

MACHADO, M. L. C. (2008). *Estudos das propriedades mecânicas e térmicas do polímero biodegradável poli-3-hidroxibutirato (PHB) e de compósitos PHB/pó de madeira*. Tese de Doutorado, Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo. PITT, F. D., BOING, D., BARROS, A. A. C. Desenvolvimento histórico, científico e tecnológico de polímeros sintéticos e de fontes renováveis. 2011. *Revista da UNIFEBE*, Brusque. RÓZ, A. L., 2003. O futuro dos plásticos: biodegradáveis e fotodegradáveis. *Polímeros*, vol. 13, no. 4, pp. E4-E5. <https://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282003000400003>

SAW-PENG YEW, HUI-YING TANG, KUMAR SUDESH, 2006. Photocatalytic activity and biodegradation of polyhydroxybutyrate films containing titanium dioxide. *Polymer Degradation and Stability*, vol. 91, pp. 1800 -1807. <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2005.11.011>. SUDESH, K., ABE, H., DOI, Y., 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, vol. 25, no. 10, pp. 1503–1555. [http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6700\(00\)00035-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00035-6) WANG, Z., LIN, X., AN, J., REN, C. and YAN, X., 2013. Biodegradation of Polyhydroxybutyrate Film by *Pseudomonas mendocina* DS04-T. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, vol. 52, no. 2, pp. 195-199. <http://dx.doi.org/10.1080/03602559.2012.735738>

## **Determinação de metanol em biorreatores anaeróbios por NIRS-SVM**

Maurílio Gustavo Nespeca<sup>1\*</sup>, Caroline Varella Rodrigues<sup>1</sup>, Kamili Oliveira Santana<sup>1</sup>, José Eduardo de Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Araraquara, São Paulo, Brasil. \*mauriliogn@gmail.com.

---

### **RESUMO**

Nos últimos anos, estudos têm mostrado a possibilidade da aplicação de espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) associada a ferramentas quimiométricas no monitoramento de digestores anaeróbios. Neste trabalho, foi desenvolvido um método rápido de determinação de metanol em biorreatores de produção de hidrogênio por NIRS. Utilizou-se 108 amostras de biorreatores alimentados com glicerol bruto originado do processo de transesterificação de óleos e gorduras residuais para produção de biodiesel. A concentração de metanol nas amostras foi determinada por cromatografia em fase gasosa e usada como valor de referência no método quimiométrico. Desenvolveu-se o modelo de predição através de regressão por Máquina de Vetores Suporte (SVM) e este foi avaliado pelas figuras de mérito: exatidão, precisão, linearidade e tendência. O modelo apresentou-se linear ( $r_{\text{validação}} = 0,9580$ ) e sem tendência significativa, porém com baixa exatidão ( $\text{RMSEP} = 504 \text{ mg L}^{-1}$ ) e precisão ( $602 \text{ mg L}^{-1}$ ), comprometendo a quantificação de metanol em baixas concentrações. Apesar da baixa exatidão e precisão, a alta correlação entre os valores medidos e preditos permitiu a aplicação de NIRS como método de varredura para obtenção de informação do processo fermentativo de forma rápida, de baixo custo e sem gerar resíduos para o meio ambiente.

**Palavras-chave:** monitoramento de biorreator; glicerol bruto; bio-hidrogênio; análise multivariada; infravermelho próximo

---

### **Determination of methanol in anaerobic bioreactors by NIRS-SVM**

### **ABSTRACT**

In recent years, studies have shown the possibility of applying near infrared spectroscopy (NIRS) associated with chemometric tools in the monitoring of anaerobic digesters. In this study, we developed a fast method to determinate methanol in  $\text{H}_2$ -production bioreactors using NIRS. We used 108 samples from bioreactors fed with crude glycerol from transesterification process of waste cooking oil for biodiesel production. The concentration of methanol in the samples was determined by gas chromatography and used as reference value in the chemometric method. The prediction model was developed through the Support Vector Machine (SVM) regression and then evaluated by figures of merit: accuracy, precision, linearity and bias. The model was

linear ( $r_{validation} = 0.9580$ ) and had no significant bias, but presented low accuracy ( $RMSEP = 504 \text{ mg L}^{-1}$ ) and precision ( $602 \text{ mg L}^{-1}$ ), compromising the quantification of methanol in low concentrations. Despite the low accuracy and precision, the high correlation between the measured and predicted values allowed the application of NIRS as a scanning method to obtain information of the fermentation process quickly, low cost and without generating waste to the environment.

**Keywords:** bioreactor monitoring; crude glycerol; biohydrogen; multivariate analysis; near infrared.

---

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o uso de glicerol bruto na fermentação anaeróbia tem ganhado atenção devido à produção de hidrogênio como energia limpa e produtos de valor agregado na fase líquida (Liu et al., 2013). Altos rendimentos de hidrogênio tem sido reportados utilizando-se glicerol puro como substrato, porém, o custo para sua purificação é elevado.

O metanol é uma das principais impurezas presentes no glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel e sua concentração depende do processo de transesterificação. Sua presença no biorreator é considerada como um efeito inibitório para o crescimento microbial e pode interferir na rota de geração de  $H_2$  (Rossi et al., 2011). Assim, a determinação deste analito no digestor anaeróbio é tão relevante quanto o monitoramento de ácidos graxos voláteis (VFA) e outros metabólitos.

A otimização de bioprocessos é frequentemente limitada à incapacidade de medir a concentração de produtos em tempo hábil que permita ajustes no processo. A determinação de álcoois e VFA são usualmente realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou cromatografia em fase gasosa (GC), porém, estes métodos requerem preparação da amostra, equipamento de alto valor, manutenção e técnicos bem capacitados (Holm-Nielsen et al., 2008). Visto que a otimização do bioprocesso requer uma aquisição de dados mais rápida, surge a necessidade de um método analítico simples, rápido, de baixo custo e que necessite de pequeno volume de amostra para monitoramento de biorreatores. Todos estes requisitos podem ser encontrados através aplicação da espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIRS) associada a métodos quimiométricos.

Estudos já demonstraram o potencial de NIRS para o monitoramento de VFA em digestores anaeróbios para produção de biogás, incluindo diferentes matérias-primas (Holm-Nielsen et al., 2008). A aplicação de NIRS é dependente de métodos de

calibração multivariados, como Mínimos Quadrados Parciais (PLS) e Máquinas de Vetor Suporte (SVM), e de valores de referência precisos e exatos para fornecer modelos apropriados para predição. Após o desenvolvimento do modelo de predição, se as figuras de mérito (FOM), tal como exatidão, precisão, linearidade, tendência, etc, apresentarem valores aceitáveis, o modelo poderá ser aplicado em análises de rotina.

Uma vez que digestores anaeróbios podem diminuir a produtividade, serem severamente perturbados ou até mesmo pararem a produção permanentemente devido à falta de monitoramento apropriado, este trabalho objetivou o desenvolvimento de um método NIRS para determinação de metanol em reatores anaeróbios alimentados com glicerol bruto para produção de hidrogênio.

## MATERIAL E MÉTODOS

As amostras utilizadas neste estudo procederam de dois estudos sobre a aplicação de glicerol bruto como substrato em reatores fermentativos anaeróbios em batelada para a geração de H<sub>2</sub> e tratamento de resíduo. No Estudo A (Rodrigues et al., 2016), os biorreatores foram inoculados com lodo granular proveniente de um reator UASB (Upflow anaerobic sludge blanket) termofílico, utilizado no tratamento de vinhaça da Usina São Martinho, localizado em Pradópolis – SP e, no Estudo B (Santana et al., 2016), de um reator UASB da avícola DAKAR, localizada na cidade de Tietê – SP. A biomassa e o meio líquido do efluente dos biorreatores foram separados por centrifugação (9.000 rpm por 10 min) e, finalmente, o meio líquido foi filtrado por uma membrana de 0,22 µm de porosidade para a análise de VFA e álcoois. As operações dos biorreatores dos Estudos A e B estão descritas detalhadamente nas referências citadas acima.

A concentração de metanol no meio líquido foi determinada conjuntamente aos VFA (ácidos acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico e caprônico) e álcoois (etanol, n-propanol e n-butanol) através de GC. Os analitos foram extraídos através de um amostrador headspace (AOC-5000 Plus, Shimadzu) e analisados em um cromatógrafo (GC 2010, Shimadzu) equipado com detector de ionização de chama, injetor split/splitless, coluna capilar de sílica fundida (dimensões 30m x 0.32mm x 3.0 mm, RTX-1, Restek). O forno foi programado inicialmente a 45 °C por 1 min seguido por uma rampa de 50 °C min<sup>-1</sup> até a temperatura final de 250 °C, mantida por 3 min. Três curvas analíticas foram desenvolvidas para abranger a faixa de concentração de metanol de 10 mg L<sup>-1</sup> – 30000 mg L<sup>-1</sup>.

Os espectros NIR das amostras foram obtidos em um espetrômetro Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Scientific) com acessório de esfera de integração, Smart NIR Integrating. Analisou-se 97 amostras do Estudo A, 11 do Estudo B e 31 soluções PYG (com e sem glicerol bruto). Para cada amostra, utilizou-se apenas 0,5 mL para preencher o espaço da cubeta de caminho ótico de 0,2 mm. Os espectros foram coletados na faixa de comprimento de onda  $10.000 - 4.000 \text{ cm}^{-1}$  em uma resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ .

O modelo de predição de metanol foi desenvolvido pelo método de regressão por SVM utilizando-se o software MATLAB (versão R2013a) e PLS Toolbox (versão 7.9.3). As amostras foram separadas em: 102 para calibração e 47 para validação. O modelo foi desenvolvido com a faixa espectral completa e dados centrados na média. As principais figuras de mérito, como exatidão, precisão, linearidade e tendência, foram avaliadas de acordo com a ASTM 1655-05 (2012).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O glicerol bruto utilizado nos reatores anaeróbios em batelada apresentou teor de metanol de 15,85% (v/v). A concentração de metanol nas amostras do Estudo A e B variou entre  $43 - 2.670 \text{ mg L}^{-1}$  e  $122 - 19.863 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente.

Quando os metabólitos estão em meio aquoso, as bandas características de cada composto ficam sobrepostas pelas bandas atribuídas principalmente à água ( $5.400 - 4.600 \text{ cm}^{-1}$  e  $7.300 - 6.500 \text{ cm}^{-1}$ ), contudo a sensibilidade às ligações de hidrogênio na região NIR permite a quantificação de álcoois e ácidos carboxílicos (Gemperline, 2006).

O modelo de predição foi desenvolvido de forma simples, sem algoritmos de seleção de variáveis, exclusão de regiões espetrais ou transformadas matemáticas, além dos dados centrados na média e compressão pelo método PLS. Na Tabela 1, são apresentados os valores medidos e preditos da concentração de metanol de algumas amostras de validação e seus resíduos.

**Tabela 1** - Valores medidos e preditos de concentração e resíduos.

Amostra de validação	Concentração de metanol ( $\text{mg L}^{-1}$ )		
	Medida	Predita	Resíduo
2	424	479	55
13	2037	2113	76
17	1594	1837	243
24	1801	1870	69
42	9932	10503	571
50	0	23	23
51	0	-10	-10

Os erros da modelagem resultaram em valores de RMSEC e RMSEP iguais a, respectivamente, 334 mg L<sup>-1</sup> e 504 mg L<sup>-1</sup>. A análise de quinze replicatas de seis amostras resultou em precisão de 602 mg L<sup>-1</sup>. Apesar da baixa exatidão e precisão, o modelo apresentou boa linearidade, apresentando coeficientes de determinação e correlação acima de 0,90 ( $R^2_{\text{calibração}} = 0,9871$ ;  $R^2_{\text{validação}} = 0,9178$ ;  $r_{\text{calibração}} = 0,9935$ ; e  $r_{\text{validação}} = 0,9580$ ), e nenhuma tendência significativa ( $t_{\text{bias}} = 0,77$ ;  $t_{\text{crítico}} = 2,01$ ).

As bandas intensas da água levaram a um modelo com baixa seletividade e razão Sinal/Ruído. Outros fatores que podem ter contribuído para a falta de precisão e exatidão foram a heterogeneidade da amostra; valores de referência inexatos; e mudanças na constituição química. Estudos encontrados na literatura também mostraram problemas de baixa exatidão na predição de outros compostos, contudo a varredura do processo fermentativo foi eficaz com uso de NIRS (Holm-Nielsen et al., 2008). Diferentemente das análises realizadas pelos métodos convencionais, a análise NIR é rápida, de custo relativamente baixo e permite a aquisição de dados em tempo real, portanto, fornece um monitoramento eficiente do digestor anaeróbio.

## CONCLUSÕES

O uso de NIRS junto ao método de regressão SVM possibilitou a análise de metanol em biorreatores alimentados com glicerol bruto de forma rápida, com baixo custo e sem gerar resíduos para o meio ambiente. Essas vantagens somadas à necessidade de um volume pequeno de amostra permitirão uma coleta maior de dados, resultando em um monitoramento mais eficaz do processo fermentativo. Ou seja, o método NIRS aliado a um método convencional, GC ou HPLC, fornecerá informações essenciais para melhor compreensão e aprimoramento de biorreatores para produção de H<sub>2</sub>.

## AGRADECIMENTO

À CAPES e ao Centro Multidisciplinar de Pesquisa em Combustíveis, Biocombustíveis, Petróleo e Derivados (CEMPEQC).

## REFERÊNCIAS

ASTM E1655-05, 2012. Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative

Analysis.

- GEMPERLINE, P., 2006. *Practical Guide To Chemometrics*, Second Edition. pp. 89.
- HOLM-NIELSEN, J.B., LOMBORG, C.J., OLESKOWICZ-POPIEL, P. and ESBENSEN, K.H., 2008. On-line near infrared monitoring of glycerol-boosted anaerobic digestion processes: Evaluation of process analytical technologies. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 99, no. 2, p. 302–313. DOI 10.1002/bit.21571.
- LIU, B., CHRISTIANSEN, K., PARNAS, R., XU, Z. and LI, B., 2013. Optimizing the production of hydrogen and 1,3-propanediol in anaerobic fermentation of biodiesel glycerol. *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 38, no. 8, p. 3196 –3205. DOI 10.1016/j.ijhydene.2012.12.135.
- RODRIGUES, C.V., SANTANA, K.O., NESPECA, M.G., OLIVEIRA, J.E. and MAINTINGUER, S.I., 2016. Crude glycerol by transesterification process from used cooking oils: Characterization and potentialities on hydrogen bioproduction. *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 1. DOI 10.1016/j.ijhydene.2016.06.209.
- ROSSI, D.M., COSTA, J.B., SOUZA, E.A., PERALBA, M.C.R., SAMIOS, D. and AYUB, M.A.Z., 2011. Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 36, no. 8, p. 4814–4819. DOI 10.1016/j.ijhydene.2011.01.005.
- SANTANA, K.O., RODRIGUES, C.V., NESPECA, M.G., OLIVEIRA, J.E. and MAINTINGUER, S.I., 2016. Produção biológica de gás hidrogênio a partir de glicerol bruto e esgoto sanitário. *Ciência & Tecnologia: Fatec-JB*. Vol. 8, p. 1–14. Available from: <http://www.citec.fatecjab.edu.br/index.php/files/article/viewFile/677/pdf>

## **Identificação de macrofungos encontrados no Extremo Sul da Bahia**

Michele Bonfim Santos<sup>1</sup>; Bianca Vicente Figueiredo<sup>1</sup>; Jorge Luiz Fortuna<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Discentes do curso de Ciências Biológicas. Universidade do Estado da Bahia (UNEB), Campus X. Teixeira de Freitas-BA. Bolsistas de Iniciação Científica pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), respectivamente.

<sup>2</sup> Professor Adjunto da área de Microbiologia. Laboratório de Microbiologia. Universidade do Estado da Bahia (UNEB), Campus X. Teixeira de Freitas-BA. \*jfortuna@uneb.br

---

### **RESUMO**

A identificação preliminar de macrofungos visa contribuir para o conhecimento da área estudada, fornecendo dados para futuros estudos específicos a serem realizados no mesmo local. Este trabalho teve como objetivo realizar identificação preliminar de fungos poliporoides encontrados em um fragmento de Mata Atlântica no município de Teixeira de Freitas no Extremo Sul da Bahia. As coletas foram realizadas em um fragmento florestal remanescente da Mata Atlântica, com aproximadamente 30 ha, onde se localiza o Programa Arboreum de Conservação e Restauração Florestal. Neste fragmento florestal foram delimitadas seis parcelas de 125 m<sup>2</sup> (5,0 m x 25,0 m). As coletas dos macrofungos foram realizadas a cada dois meses no ano de 2015. Todo material foi transportado para o Laboratório de Microbiologia do *Campus X* da Universidade do Estado da Bahia (UNEB). Foram identificadas as seguintes famílias de macrofungos: Polyporaceae; Hymenochaetaceae.; Sarcoscyphaceae; Agaricaceae; Ganodermataceae; Clavulinaceae.

**Palavras-chave:** Fungo; Cogumelo; Micologia; Poliporoides.

---

### **Identification of macrofungus found in the Extreme South of Bahia**

### **ABSTRACT**

The preliminary identification of macrofungus aims to contribute to the knowledge about these organisms with data for future studies in the same location. The present study describes the results of the preliminary identification of polyporous fungi in an Atlantic Forest fragment in the municipality of Teixeira de Freitas, south Bahia state, Brazil. Collections were carried out in a 30-ha Atlantic Forest fragment that is part of the Arboreum Program of Forest Conservation and Reforestation. Six quadrats (125 m<sup>2</sup>, 5.0 m x 25.0 m) were outlined in the 30-ha and collections were carried out every two months in 2015. All material was transported to Laboratory of Microbiology, Campus X, Universidade do Estado da Bahia (UNEB). The following families of the macrofungus were identified: identified: Polyporaceae; Hymenochaetaceae.; Sarcoscyphaceae; Agaricaceae; Ganodermataceae; Clavulinaceae.

**Keywords:** Fungus; Mushroom; Mycology; Polyporous Fungi.

---

## INTRODUÇÃO

Os fungos são componentes primordiais para os ecossistemas, estes organismos são encontrados em qualquer local do ambiente, sendo grande a diversidade dos fungos existentes.

Segundo Silva e Coelho (2006) os fungos são importantes para manutenção de uma floresta, já que neste meio ambiente ocorre grande deposição de material vegetal como troncos, galhos e folhas, pois possuem enzimas capazes de degradar e reciclar essa matéria orgânica disponibilizando os produtos da degradação para ação de outros microrganismos e o crescimento de outras plantas e eventualmente de animais. Sendo assim, Amazonas (2003) afirmou que, além de evitar a depleção de nutrientes, estes fungos melhoram a estrutura do solo e facilitam o reflorestamento.

Hyde e Hawksworth (1997) determinaram que o baixo conhecimento micológico está associado, principalmente, aos poucos estudos realizados nas florestas tropicais que por sua vez, abrigam a maior diversidade do planeta. Para Blackwell (2011) a falta de conhecimento de novas espécies se dá porque a maior parte das regiões tropicais do mundo não foi amplamente inventariada e acredita-se que existem inúmeras espécies ainda não conhecidas nessas áreas.

Portanto, as atividades dos fungos na natureza são tão necessárias para a continuidade da existência do planeta, quanto são aquelas desempenhadas pelos organismos produtores (Silva e Coelho, 2006).

Neste contexto, o estudo da micota para o conhecimento do fragmento de Mata Atlântica na região é de extrema importância, e a identificação preliminar de macrofungos visa contribuir para o conhecimento da área estudada, fornecendo dados para futuros estudos específicos a serem realizados no mesmo local.

Esta pesquisa teve como objetivo coletar e identificar a diversidade de espécies de macrofungos em um fragmento de Mata Atlântica localizado no Programa Arboretum em Teixeira de Freitas-BA, região do Extremo Sul da Bahia.

## MATERIAL E MÉTODOS

A área de estudo é um fragmento florestal remanescente da Mata Atlântica, com aproximadamente 30 ha, que pertence ao Programa Arboretum de Conservação e Restauração Florestal, localizado na região do Extremo Sul da Bahia no município de Teixeira de Freitas ( $17^{\circ}34'S$  e  $39^{\circ}43'W$ ). Pertence ao domínio ecológico da Mata Atlântica, com Floresta Ombrófila Densa. Neste fragmento florestal foram delimitadas

seis parcelas, sendo que cada uma com área de 125 m<sup>2</sup> (5,0 m x 25,0 m), que foram identificadas e localizadas através de GPS.

As coletas dos macrofungos foram realizadas a cada dois meses no ano de 2015. Em campo foram realizados registros fotográficos dos fungos antes e após coleta e anotações das suas principais características (tamanho, cor, substrato, odor, etc.).

Os espécimes coletados foram acondicionados individualmente em sacos de papel, para que o material não se danificasse. Todo material foi transportado para o Laboratório de Microbiologia do *Campus X* da Universidade do Estado da Bahia (UNEB).

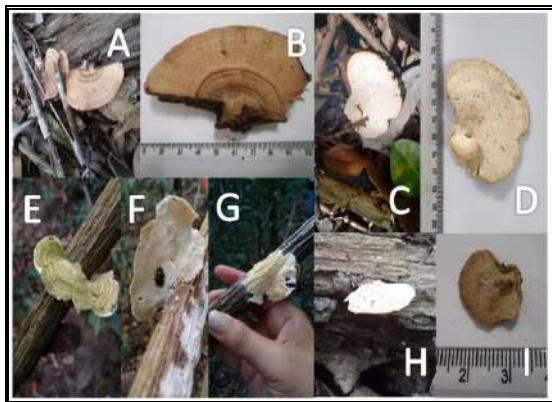
No laboratório os espécimes foram visualizados em estereoscópio (lupa) para maiores detalhes das estruturas. Também foram feitas análises das microestruturas do basidioma e novamente fotografados. Para a análise das microestruturas do basidioma, foram feitos cortes transversais à mão livre sob microscópio estereoscópico, utilizando lâminas de aço inoxidável. Foram realizados cortes dos basidiomas (contexto, tomento e tubos) à mão livre, foram fixados em lâminas e lamínulas nas soluções de KOH 2-3%, Floxina 1%, e Melzer (Teixeira, 1995) para observação microscópica.

As análises das características macroscópicas foram baseadas em caracteres diagnósticos de acordo com a literatura científica da área de macrofungos (Alves et al., 2012; Braga-Neto, 2006; Evert e Eichhorn, 2013; FPFP, 2008; Lazarotto et al., 2014; Pires et al., 2014).

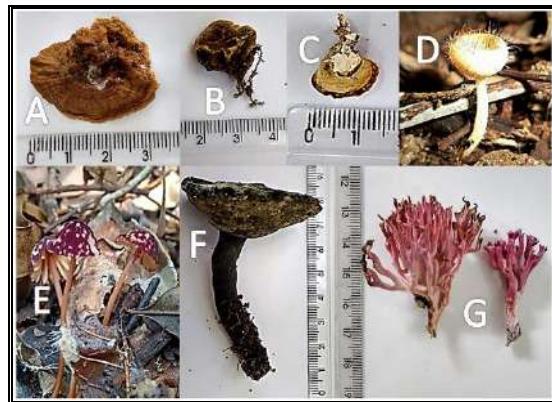
Os espécimes foram desidratados em estufa botânica a temperatura de 40°C por um período máximo de 24 horas. Os macrofungos, após a secagem, foram preservados em temperatura ambiente e de congelamento no Laboratório de Microbiologia do *Campus X* da UNEB para estudos posteriores.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao todo foram identificados 14 macrofungos, cinco em nível de espécie e nove em nível de gênero, distribuídos em seis diferentes famílias, sendo elas: (1) Polyporaceae: *Coriolopsis caperata*; *Trametes membranacea*; *Trametes cingulata*; *Fomitopsis* spp.; *Polyporus* spp.; *Tyromyces* spp.; *Daedalea* spp. (Figura 1); (2) Hymenochaetaceae: *Fuscoporia gilva*; *Phellinus piptadeniae*; *Phylloporia* spp.; (3) Sarcoscyphaceae: *Cookeina* spp.; (4) Agaricaceae: *Marasmius* spp.; (5) Ganodermataceae: *Amauroderma* spp.; (6) Clavulinaceae: *Clavulina* spp. (Figura 2).



**Figura 1.** Fungos da família Polyporaceae encontrados em um fragmento de Mata Atlântica no Extremo Sul da Bahia: (A-B) *Daedalea* spp.; (C-D) *Trametes cingulata*; (E-F-G) *Trametes membranacea*; (H-I) *Fomitopsis* spp.



**Figura 2.** Macrofungos encontrados em um fragmento de Mata Atlântica no Extremo Sul da Bahia: (A) *Fucosporia gilva*; (B) *Phellinus piptadeniae*; (C) *Phylloporia* spp.; (D) *Cookeina* spp.; (E) *Marasmius* spp.; (F) *Amauroderma* spp.; (G) *Clavulina* spp.

O fragmento de Mata Atlântica no qual foram realizadas as coletas passa por um processo de reconstituição natural da sua flora, possuindo uma vasta quantidade de serapilheira, árvores e troncos em processo de decomposição. Dos macrofungos coletados e identificados foi possível observar que a grande maioria foi recolhida sobre esses substratos, presentes em abundância no fragmento. Levando em consideração o estágio natural de recuperação desse fragmento, Maia et al (2012) consideram que os basidiomicetos atuam na decomposição da matéria orgânica, fato este que contribui para a fertilização do solo, promovendo o crescimento e a manutenção das espécies que ali vivem.

Os fungos poliporoides pertencem ao filo basidiomycota, sendo basidiomicetos macroscópicos que se caracterizam por apresentar o himenóforo tubular (Gilbertson e Ryvarden, 1986; Alexopoulos et al., 1996). Esses fungos também são conhecidos popularmente como orelhas-de-pau devido ao hábito do basidioma e possuem grande capacidade de degradar a lignina e/ou celulose e hemicelulose presentes na madeira (Newell et al., 1996; Anagnost, 1998). Outra característica desses fungos é a presença de poros na parte inferior do basidioma, diferente dos cogumelos que possuem lamelas aderidas ao píleo.

A família Polyporaceae é bastante representativa, pois indica maior número de espécies. Em outros estudos realizados anteriormente no Brasil (Vásquez, 2013; Abrahão et al., 2009) mostram o indicativo predominante dessa família de fungos.

A presença dos fungos das famílias Hymenochaetaceae e Ganodermataceae foi influenciada pela sazonalidade climática, principalmente no período de estiagem na área estudada. Nos meses de estiagem (novembro a março), aumentou a frequência das coletas destas famílias, sendo raro encontrar espécimes de outras famílias. Nos meses

chuvosos (maio a setembro), foi possível coletar com certa frequência os fungos da família Agaricaceae.

Foi observado que nas estações de seca as famílias de fungos com características mais resistentes eram favorecidas e, em contrapartida, os fungos denominados frágeis não prevaleciam. Tal fato ocorre pois os fungos da família Agaricaceae geralmente possui basidiomas frágeis, de consistência carnosa, muitas vezes putrescentes, tornando-os muito mais sensíveis às mudanças climáticas e variações de umidade.

Essas espécies descritas no estudo foram as primeiras identificadas preliminarmente neste fragmento de Mata Atlântica localizado no município de Teixeira de Freitas no Extremo Sul Baiano.

## CONCLUSÕES

O levantamento de dados obtidos a partir dessa pesquisa servirá de base para novos estudos, já que o mesmo é pioneiro na região que se localiza este fragmento de Mata Atlântica. Com a realização deste trabalho tornou-se possível a ampliação do conhecimento da micodiversidade no fragmento de Mata Atlântica do Extremo Sul Baiano. Porém, os fatores climáticos e a degradação por influência humana dificultam tanto a coleta quanto a própria identificação.

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa Arboretum de Conservação e Restauração Florestal, localizado no município de Teixeira de Freitas-BA, por permitir a realização da pesquisa em sua área.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelas bolsas de iniciação científica.

## REFERÊNCIAS

ABRAHÃO M. C. *et al.* 2009. Poliporoides (Basidiomycota) em fragmentos de mata no perímetro urbano de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. *Revista Brasil.* v. 32, n. 3, p. 427-440

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. 1996. *Introductory Mycology*. New York: John Wiley & Sons.

ALVES, G. C. *et al.* 2012. Primeiro relato de Agaricales no município de São Gabriel, RS, Brasil. *Caderno de Pesquisa. Série Biologia.* v. 24, n. 2, p. 7-20.

- AMAZONAS, M. A. L. A. *et al.* 2001. Envenenamento por *Chlorophyllum molybdites* no Paraná. In: 3º Congresso Brasileiro de Micologia. Águas de Lindóia-SP. *Anais...* São Paulo: Sociedade Brasileira de Micologia, p. 49.
- ANAGNOST, S. E. 1998. Light Microscopic Diagnosis of Wood Decay. *Iawa Journal* v. 19, n. 2, p. 141-167.
- BLACKWELL, M. 2011. The Fungi:1, 2, 3. 5.1 million species? *American Journal of Botany*. v. 98, n. 3, p. 426-438.
- BRAGA-NETO, R. 2006. *Guia de Morfoespécies de Fungos de Liteira da Reserva Ducke*. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).
- EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. 2013. *Raven. Biology of Plants*. 8. ed. New York: W. H. Freeman and Company Publishers.
- FPFP (Federação dos Produtores Florestais de Portugal). 2008. *Guia de Campo – Cogumelos Silvestres*. Lisboa: FPFP.
- GILBERTSON, R. L.; RYVARDEN, L. 1986. *North American Polypores*. v. 1. Oslo: Fungi Flora.
- HYDE, K. D.; HAWKSWORTH, D. L. 1997. Measuring and monitoring the biodiversity of microfungi. *Biodiversity of Tropical Microfungi*. p. 141-156.
- LAZAROTTO, D. C. *et al.* 2014. Comunidade de fungos Agaricomycetes em diferentes sistemas florestais no noroeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: Floresta Estacional Decídua e monocultura de eucalipto. *Hoehnea*. v. 41, n. 2, p. 269-275.
- MAIA, A. K. B.; TORRES FILHO, J.; CHAVES, J. T. L. 2012. Importância dos basidiomicetos como decompósitores da matéria orgânica para biodiversidade da Floresta Nacional do Araripe. *Anais...* IV Encontro Universitário da UFC no Cariri. Juazeiro do Norte-CE. 17 a 19 de dezembro de 2012. Universidade Federal do Ceará. p. 1-4.
- NEWELL, S. Y., PORTER, D., LINGLE, W. L. 1996. Lignocellulolysis by Ascomycetes (fungi) of a saltmarsh grass (smooth cordgrass). *Microscopy Research and Technique*. v. 33, p. 32-46.
- PIRES, E. Z. *et al.* 2014. Biodiversidade de basidiomicetos encontrados em um fragmento de Floresta Ombrófila Mista. *Ambiência*. v. 10, n. 2, p. 489-496.
- SILVA, R. R.; COELHO, G. D. 2006. *Fungos Principais Grupos e Aplicações Biotecnológicas*. São Paulo: Instituto de Botânica.
- TEIXEIRA, A. R. 1995. *Métodos para Estudos das Hifas do Basidiocarpo de Fungos Poliporáceos*. São Paulo: Instituto de Botânica.
- VÁSQUEZ, V. M. 2013. *Fungos com poros: (Hymenochaetales e Polyporales) do Parque Estadual da Cantareira (PEC), São Paulo, SP, Brasil*. 429 p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. São Paulo-SP.

## Otimização da produção de xilanases por *Aspergillus hortai* em estado sólido

Michel Ricardo Gracioli<sup>1\*</sup>; Cárol Cabral Terrone<sup>1</sup>; Juliana Montesino Freitas Nascimento<sup>1</sup>; Eleonora Cano Carmona<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP. \*e-mail: michel-rg@hotmail.com

---

### RESUMO

Neste trabalho, foram avaliados os efeitos isolados e sinérgicos da temperatura e do pH na produção de xilanases por uma linhagem de *Aspergillus hortai* cultivada em estado sólido (FES) por meio de Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) baseada em Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). A análise de regressão múltipla dos dados experimentais foi aplicada, gerando um modelo quadrático para a resposta da atividade xilanase, o qual revelou serem significativos para a produção das enzimas, apenas os efeitos lineares das variáveis. A significância estatística do modelo foi avaliada por ANOVA (teste F). A produção máxima de xilanase de 8,72 U/mL (101,15 U/g) de substrato seco foi obtida em pH 4,5 e temperatura de 30°C (pontos centrais), correspondendo a um aumento de 2,5 vezes na atividade enzimática.

**Palavras-chave:** xilanases, Delineamento Composto Central, Metodologia de Resposta de Superfície, pH, temperatura.

---

### Optimization of xylanase production by *Aspergillus hortai* in solid state

### ABSTRACT

In this work, isolated and synergistic effects of temperature and pH on the production of xylanases by an *Aspergillus hortai* strain cultivated in solid state fermentation (SSF) were evaluated by using Response Surface Methodology (RSM) based on Central Composite Design (CCD). A multiple regression analysis of the experimental data was applied generating a quadratic model for the response of xylanase activity which revealed that only the linear effects of the variables influenced significantly the xylanase production. The statistical significance of the model was evaluated by ANOVA (F test). The maximum xylanase production of 8,72 U/mL (101,15 U/g) of dry substrate was

obtained at pH 4,5 and temperature of 30°C (central points) which corresponds to an increase of 2.5-fold in enzyme activity.

**Keywords:** Xylanase, Central Composite Design, Response Surface Methodology, pH, Temperature.

---

## INTRODUÇÃO

As xilanases (E.C. 3.2.1.8) formam o principal grupo de hemicelulases capazes de atuar na hidrólise da xilana, a principal hemicelulose presente na parede celular das plantas, liberando xioloíligossacarídeos. Tais enzimas têm amplo emprego em diversos setores da indústria, incluindo a produção de cosméticos, de alimentos, de biocombustíveis, de ração animal, na clarificação de sucos e vinhos, no biobranqueamento de papel e celulose e no tratamento de resíduos, cujas áreas movimentam bilhões de dólares anualmente. Um fator limitante na obtenção de xilanases, porém, é o seu elevado custo de produção; para testes em pequena escala, a xilana purificada pode ser utilizada como substrato indutor, mas, para processos em escala industrial, o seu uso aumenta muito o custo final de produção das enzimas, podendo inviabilizar o bioprocesso. Em vista disso, o emprego de resíduos lignocelulósicos como o sabugo de milho, produzidos em grande quantidade pela agroindústria brasileira, como substrato para a fermentação microbiana, vem se mostrando bastante interessante, tendo em vista o seu alto potencial como indutor da produção de enzimas, compostos de alto valor agregado, e o baixo custo de obtenção. Neste contexto, desenvolveu-se este trabalho, que teve por objetivo a otimização da produção de xilanases por *Aspergillus hortai* cultivado em meio sólido de forma estática por meio de Metodologia de Superfície de Resposta baseada em Delineamento Composto Central Rotacional.

## MATERIAL E MÉTODOS

*Cultivo e manutenção do fungo.* A linhagem de *A. hortai* foi cultivada em meio sólido de Vogel (VOGEL, 1956), contendo farelo de trigo como fonte de carbono (1,5% m/v) e ágar (1,5% m/v) e mantida a 40°C em incubadora BOD por 7 dias. Após este período, foi transferido para geladeira a 4°C e repicado periodicamente. Para a preparação das suspensões de esporos, a linhagem foi cultivada conforme descrito acima e, após os 7 dias de crescimento, os conídios foram suspensos em água destilada

e sua concentração foi ajustada para  $5 \times 10^6$  conídios/mL sendo, esta suspensão, utilizada como inóculo.

*Obtenção das preparações enzimáticas.* Para obtenção das preparações enzimáticas, 1 mL da suspensão de conídios foi inoculada em meio contendo 5,0 g de sabugo de milho umidificado com 19 mL de solução de Vogel 2% (v/v) pH 5,0, e cultivado por 4 dias a 35 °C. Após esse período, foram adicionados 50 mL de água destilada às culturas, que foram agitadas e filtradas a vácuo em funil de Büchner obtendo-se, assim, um filtrado livre de células e micélio, que foi congelado e utilizado como fonte de proteínas e enzimas extracelulares.

*Determinação da atividade xilanase e proteínas totais.* A atividade xilanase foi determinada pela dosagem de açúcares redutores liberados, usando o reagente de ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS) e xilose como padrão. A determinação de proteínas totais extracelulares foi feita de acordo com Lowry et. al (1951), utilizando soroalbumina bovina (SAB) como padrão.

*Planejamento experimental e superfícies de resposta.* Para a análise dos efeitos do pH e da temperatura na produção de xilanases foi desenvolvido um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)  $2^2$  com três repetições no ponto central, totalizando 11 experimentos (Tabela 1). Os resultados dos ensaios de atividade enzimática e proteínas totais dos experimentos foram submetidos à análise estatística utilizando o software Estatística 7.0, no qual também foram elaboradas superfícies de resposta de interação entre as variáveis.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O DCCR foi realizado com o intuito de avaliar os efeitos individuais e conjuntos entre pH e temperatura de cultivo na produção das xilanases a fim de permitir a sua otimização. Na Tabela 1 estão descritas as condições experimentais do planejamento com os valores codificados, reais e de atividade obtidos em cada ensaio.

**Tabela 1.** Matriz do planejamento experimental. Valores codificados, reais e de atividade de cada ensaio.

Ensaios	x (pH)	y (temperatura °C)	Atividade (U/ml)
1	-1 (3,45)	-1 (26,4)	4,548
2	+1 (5,56)	-1 (26,4)	6,535
3	-1 (3,45)	+1 (33,5)	5,843
4	+1 (5,56)	+1 (33,5)	9,330
5	-1,41 (3,00)	0 (30,0)	4,645
6	+1,41 (6,00)	0 (30,0)	8,697
7	0 (4,50)	-1,41 (25,0)	4,558
8	0 (4,50)	+1,41 (35,0)	7,557
9	0 (4,50)	0 (30,0)	8,285
10	0 (4,50)	0 (30,0)	10,142
<b>11</b>	<b>0 (4,50)</b>	<b>0 (30,0)</b>	<b>9,975</b>

Com base nos dados da matriz do planejamento, observa-se que, no geral, o micro-organismo apresentou melhor atividade em meios mais ácidos, com valores de pH entre 4,5 e 5,56 (experimento 4, 10 e 11) e em temperaturas variando entre 30,0 e 33,5 °C. A partir desses dados, foram realizadas as análises de regressão múltipla, de significância, e o estudo de interação entre as variáveis.

Os coeficientes de regressão para a produção de xilanase estão descritos na Tabela 2. A análise dos *P*-valores mostrou que apenas a interação entre as duas variáveis não demonstrou efeito significativo em um intervalo de 90% de confiança, sendo o pH, a variável de maior influência na produção da enzima (*p*-valor = 0,001923).

**Tabela 2.** Análise de regressão múltipla das variáveis do planejamento.

Efeitos	Coef. Regressão	Erro Padrão	t (5)	p-valor
Média	9,46646	0,384608	24,61325	0,000002
X	1,40235	0,235877	5,94523	0,001923
X <sup>2</sup>	-1,35124	0,281463	-4,80078	0,004880
Y	1,04304	0,235877	4,42196	0,006879
Y <sup>2</sup>	-1,65984	0,281463	-5,89720	0,001994
X x Y	0,37494	0,333085	0,311424	-0,29624

Intervalo de confiança de 90%. X: pH; Y: temperatura (°C).

Com a eliminação o parâmetro não significativo para a produção, obteve-se a equação ajustada do modelo:

$$Xilanase (U/ml) = 9,46 + 1,40X - 1,35X^2 + 1,04Y - 1,65Y^2$$

**Eq. 1**

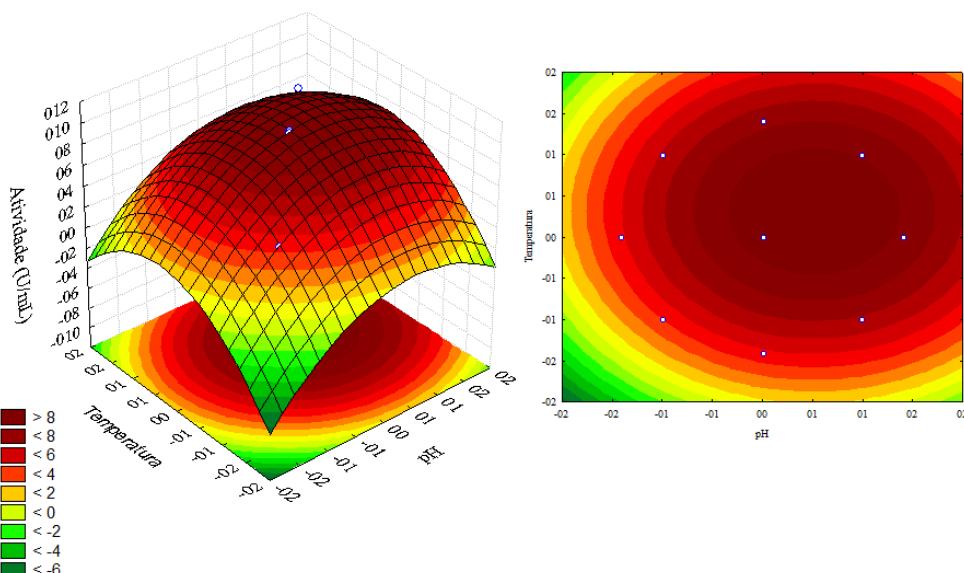
A ANOVA dos resultados (Tabela 3) permitiu afirmar que o modelo obtido foi de boa qualidade ( $F_{calc}$  superior a  $F_{tab}$ ) para um nível de confiança de 90%. Além disso, o coeficiente de correlação bastante alto ( $R^2$  de 0,94) indicou um ajuste satisfatório dos dados na resposta de produção de xilanases.

**Tabela 3.** ANOVA para a produção de xilanases por *A. hortai* cultivado em estado sólido.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F calculado
Regressão	44,4046	4	11,1011	23,95
Resíduo	2,7812	6	0,4635	
F ajuste	0,6696	4	0,1674	0,15
Erro puro	2,1115	2	1,0557	
Total	47,1858	10	4,7185	

SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; QM: quadrados médios;  $R^2$ : 0,94;  $F_{tab}$ : 3,18.

Para melhor visualização dos resultados, foi elaborada a curva de superfície de resposta e as curvas de contorno da atividade enzimática em função da temperatura e do pH de cultivo (Figura 1).



**Figura 1.** Superfície de resposta e curvas de contorno da atividade enzimática em função da temperatura e do pH de cultivo.

A análise das curvas de superfície e de contorno mostra que os maiores valores de resposta foram encontrados para os pontos centrais - pH 4,5 e temperatura de 30°C - levando a um valor predito de aproximadamente 9,46 U/ml, o qual, apresentou boa correlação com o valor real obtido de 8,72 U/ml, representando um aumento aproximado de 2,5 vezes na produção das xilanases como resultado da otimização do processo.

## CONCLUSÕES

A aplicação do delineamento experimental permitiu a identificação dos efeitos significativos e não significativos individuais e conjuntos da temperatura e do pH sobre a produção das xilanases, possibilitando a obtenção de um modelo preditivo para a atividade e a construção de superfícies de respostas que permitiram identificar as melhores condições de cultivo do micro-organismo para a produção de xilanases.

## REFERÊNCIAS

- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, pp. 265-275, 1951. <http://www.jbc.org/content/193/1/265.full.pdf>.
- VOGEL, H.J., 1956. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microbiology and Genetic Bulletin*, vol. 13, pp. 42-43.

## Ação do cloranfenicol em bactérias presente no mosto

Milca Ribeiro de Brito do Carmo<sup>1</sup>; Geisa Alves da Silva<sup>2\*</sup>; Elvio Mora Júnior<sup>2</sup>; Thais Domingues da Silva<sup>2</sup>; Maria do Socorro Mascarenhas Santos<sup>3</sup>; Margareth Batistote<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Tecnologia em Produção Sucroalcooleira.

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Ciências Biológicas. \*geisardg@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Pós-Graduação de Recursos Naturais.

<sup>4</sup>Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Docente de Química Industrial.

### RESUMO

O Brasil possui condições favoráveis e fundamentais capazes de fazer com que o bioetanol venha a se tornar um dos pilares do mercado nacional de combustíveis renováveis e o Estado de Mato Grosso do Sul, por possuir condições propícias para o desenvolvimento da cultura de cana de açúcar vem se tornando um polo agroindustrial deste segmento. Entretanto, um dos problemas deste processo é a contaminação o que acarreta problemas no rendimento da produção de etanol pelas leveduras. Neste contexto, o presente estudo visa avaliar os parâmetros químicos do mosto e realizar teste antibiograma em bactérias isoladas deste substrato durante a safra de 2015. As análises de pH foram realizadas com pHmetro e a condutividade por condutivímetro, ambos de bancada. Para o teste de antibiograma utilizou-se 1,0mL da cultura bacteriana diluída em 9,0mL de solução salina (0,85%) estéril utilizando a escala 0,5 de MacFarland e 0,1 mL destas amostras foram adicionadas em placa de Petri no meio sólido Müller Hinton e espalhadas com um swab onde foram dispostos discos impregnados com 10µL de antibiótico cloranfenicol na concentração (0,003 mg mL<sup>-1</sup>) e incubadas à 37°C durante 24 horas em estufa. Após o período de incubação, as placas foram retiradas e avaliados os halos de inibição. Os resultados de pH e condutividade entre os meses de agosto e outubro diferiram dos demais e no teste de antibiograma cerca de 70% das bactérias se mostraram ser susceptíveis ao antibiótico cloranfenicol.

**Palavras-chave:** contaminação; antibiograma; fermentação.

### Action of chloramphenicol in bacteria present in the must

### ABSTRACT

Brazil has favorable and fundamental conditions capable of making bioethanol become one of the pillars of the national market for renewable fuels and the State of Mato Grosso do Sul, as it has favorable conditions for the development of sugar cane. Becoming an agroindustrial pole of this segment. However, one of the problems of this process is the contamination, which causes problems in the yield of ethanol production by the yeasts. In this context, the present study aims to evaluate the chemical parameters of the must and to perform antibiotic tests on bacteria isolated from this substrate during the harvest of 2015. The pH analyzes were performed with pHmetro and conductivity by Condutivímetro both bench. For the antibiogram test 1.0 ml of the bacterial culture diluted in 9.0 ml of sterile saline solution (0.85%) was used using the 0.5 scale of MacFarland and 0.1 ml of these samples were added in Petri dish In the Müller Hinton solid medium and scattered with a swab where discs were impregnated with 10µL

chloramphenicol antibiotics in concentration (0.003 mg mL<sup>-1</sup>) and incubated at 37°C for 24 hours in an oven. After the incubation period, the plates were withdrawn and the inhibition halos were evaluated. The results of pH and conductivity between the months of August and October differed from the others and in the antibiotic test about 70% of the bacteria showed to be susceptible to the antibiotic chloramphenicol.

**Keywords:** contamination; antibiogram; fermentation.

---

## INTRODUÇÃO

O etanol brasileiro tem despertado a atenção de países desenvolvidos, por ser uma fonte de energia renovável e economicamente viável. O Brasil possui condições favoráveis e fundamentais capazes de fazer com que este biocombustível venha a se tornar um dos pilares do mercado nacional de combustíveis renováveis (CERQUEIRA LEITE et al., 2009) e, o Estado de Mato Grosso do Sul, por possuir condições propícias para o desenvolvimento desta cultura vem se tornando um polo agroindustrial deste segmento, o sucroenergético.

A produção deste setor está pautada no etanol, no açúcar e mais recente na cogeração de energia, na qual se mostra autossuficiente. A agroindústria do etanol apresenta-se como um celeiro de inovações, contudo, ainda possui gargalos, pois consiste em um processo que não transcorre em condições assépticas, o que leva a contaminação, que por vezes advém da própria matéria-prima podendo ser oriundas do transporte e das instalações industriais (CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009) que não são higienizadas e que causam danos ao processo, tais como: consumo de açúcar, formação de goma, flocação do fermento, inibição e queda da viabilidade das leveduras devido às toxinas e ácidos orgânicos excretados no meio por bactérias (NOBRE; HORII; ALCARDE, 2007).

Os principais contaminantes que interferem no processo fermentativo são as bactérias Gram-positivas dos gêneros *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Leuconostoc*, sendo que *Lactobacillus* e *Bacillus* estão sempre presentes na fermentação industrial e dependendo de sua concentração, comprometem o rendimento do processo fermentativo (NAVES et al., 2010). Para o controle da contaminação são utilizados antibióticos dentre eles os mais aplicados nas usinas são a monensina e a penicilina (JAY, 2012).

De acordo com Ibelli (2015) e Ribeiro (2010), o pH é um fator significativo para as fermentações industriais devido ao controle da contaminação bacteriana que é considerada como um agente estressante e pode acarretar perdas no rendimento fermentativo ao seu efeito sobre o crescimento da levedura, taxa de fermentação e

formação de subprodutos. Outro fator químico está relacionado com a condutividade, que conforme Jackson et al. (2008), é um indicativo rápido da presença de elementos no caldo de cana, em especial o potássio, sódio, cálcio e magnésio, pois quando em quantidade na solução podem interferir no processo fermentativo.

Neste contexto, este estudo visa avaliar os parâmetros químicos do mosto e realizar testes antibiograma em bactérias isoladas deste substrato durante a safra de 2015.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta das amostras e análise de pH e condutividade**

Foram coletadas amostras de mosto do processo fermentativo entre os meses de abril a outubro de 2015, e transportados em frascos estéreis à temperatura de 4°C para o Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial – LAMAI da Unidade Universitária de Glória de Dourados-MS/UEMS. Para a análise do pH, foi retirada 50mL do mosto sendo analisada com o auxílio de um pHmetro e a condutividade por um condutivímetro.

### **Isolamento de Bactérias**

Para o isolamento das bactérias foi realizada uma diluição seriada de  $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-6}$  em solução salina (0,85%) e 100 $\mu$ L de cada diluição foi inoculada em placas de Petri contendo o meio sólido Müller Hinton e espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalski. O plaqueamento foi conduzido em triplicata, incubado em estufa na temperatura de 37°C. Para este estudo foi isolada e purificada somente as colônias de bactérias que apresentaram maior frequência durante a safra 2015.

### **Teste da Atividade Antimicrobiana**

Para o teste antimicrobiano uma colônia do isolado foi crescida em meio líquido Infusão de Cérebro e Coração (BHI) e incubadas na temperatura de 37°C por 24 horas. O teste foi realizado com 1,0mL desta cultura diluída em 9,0mL de solução salina (0,85%) estéril utilizando a escala 0,5 de MacFarland e 0,1 mL da amostra foi adicionada em placa de Petri no meio sólido Müller Hinton e espalhada com uma swab, sobre as quais foram colocados discos impregnados com 10 $\mu$ L do antibiótico cloranfenicol na concentração (0,003mg mL<sup>-1</sup>) sendo incubadas em estufa à 37°C durante 24 horas. Após o período de incubação, as placas foram retiradas e avaliados em relação à formação de halos de inibição.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As amostras de mosto utilizadas neste estudo apresentaram variações quanto aos parâmetros avaliados, sendo a menor variação de pH 4,9 no mês de abril e a maior no mês de outubro, 5,8. A menor condutividade elétrica de 6,15 no mês setembro e a maior 7,50 mS/cm a 25°C, no mês de junho (Tabela 1).

A maioria dos microrganismos apresenta uma faixa estreita de pH, na qual crescimento e formação de produto ocorrem a altas velocidades e desta forma ele é controlado na maioria das fermentações. Embora haja exceções, bactérias usualmente crescem no intervalo de pH de 4,0 a 8,0; leveduras de 3,0 a 6,0; e os mofos de 3,0 a 7,0. O pH relativamente baixo do caldo, oriundo das moendas, favorece as espécies consideradas acidófilas de gêneros como *Leuconostoc* e *Lactobacillus*, por outro lado, altas temperaturas associadas ao pH favorecem o crescimento de alguns microrganismos termófilos esporulados (CHERUBIN, 2003).

A análise de condutividade é um indicativo rápido e indireto da presença de íons no caldo de cana, em especial o potássio, sódio, cálcio e magnésio, pois quando em solução alteram a condutividade elétrica do meio (JACKSON et al., 2008). A condutividade elétrica é uma propriedade que depende expressivamente da temperatura. Devido a isso, os dados de condutividade elétrica devem ser acompanhados da temperatura na qual foi medida (PINTO, 2007).

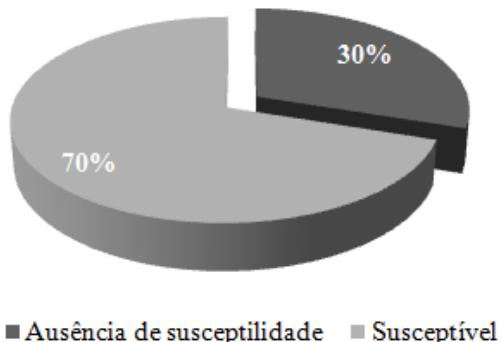
**Tabela1.** Análises físico-químicas do mosto durante os meses da safra/2015.

Mês	pH	Condutividade (mS/cm a 25°C)
Abri	4,9	7,48
Maio	5,0	7,45
Junho	5,2	7,50
Julho	5,0	7,45
Agosto	5,8	6,40
Setembro	5,4	6,15
Outubro	5,8	6,25

Fonte: Elaborado pelo autor

Na análise do teste de antibiograma 70% das bactérias isoladas se mostraram suscetível ao antibiótico cloranfenicol e 30% não apresentaram susceptibilidade ao mesmo (Figura 1). Segundo Singleton and Sainsbury (2006) para um antibiótico ser efetivo, necessita alcançar seu alvo, matando o microrganismo ou impedindo seu crescimento e multiplicação, o cloranfenicol, pode inibir a síntese de proteínas

consequentemente inibindo a realização das funções básicas do microrganismo causando sua morte (GUILFOILE and ALCAMO, 2007).



**Figura 1.** Teste da atividade antimicrobiana causada pelo antibiótico cloranfenicol meses da safra/2015.

## CONCLUSÕES

Nos meses de agosto, setembro e outubro os valores do pH e de condutividade diferiram dos demais meses.

Em relação ao antibiótico cloranfenicol as bactérias mostraram ser 70% susceptível a sua ação.

## REFERÊNCIAS

- CEBALLOS-SCHIAVONE, C. H. M., 2009. *Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando a redução de contaminantes bacterianos - Lactobacillus - na produção de etanol e eficiência de tratamento do fermento por etanol*. Piracicaba: Escola Superior de agricultura Luiz de Queiroz. 117 p. Dissertação de Mestrado em Ciências.
- CERQUEIRA LEITE, R. C.; LEAL, M. R. L. V.; CORTEZ, L. A. B.; GRIFFIN, W.M.; SCANDIFFIO, M. I. G., 2009. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol. *Energy*, vol. 34, pp. 655-661. <http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2008.11.001>
- CHERUBIN, R. A., 2003. *Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica*. Piracicaba: Escola Superior Luiz de Queiroz. 137 p. Tese de Doutorado em Agronomia.

GUILFOILE, P. G. and ALCAMO, E. I., 2007. *Antibiotic-Resistant Bacteria*. New York: Infobase Publishing. 128 p.

IBELLI, F. D., 2015. *Avaliação fenotípica e genotípica de segregantes de uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae**. Araraquara: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”. 107 p. Tese de Doutorado em Alimentos e Nutrição.

JACKSON, P. A.; SCHROEDER, B. L.; RATTEY, A. R.; WOOD, A., 2008. Management of ash/impurity ratio in sugarcane: relative effects of genotypes, and N and K fertilizer rates. *Journal of Agricultural Research*, vol. 59, no. 9, pp. 795-801. <http://dx.doi.org/10.1071/AR07387>

JAY, J.M., 2012. *Modern Food Microbiology*. Gaithersburg: AspenPublishers. 633 p.

NAVES, R. F.; FERNANDES, F. S.; PINTO, O. G.; NAVES, P. L. F., 2010. Contaminação microbiana nas etapas do processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usinas alcooleiras. *Encyclopédia Biosfera*, vol. 6, no. 11, pp.16.

NOBRE, T. P.; HORII, J.; ALCARDE, A. R., 2007. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, vol. 27, no. 1, pp. 20-25. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612007000100004>

PINTO, M. C. F., 2007. Manual Medição *in loco*: Temperatura, pH, Condutividade Elétrica e Oxigênio Dissolvido. *CPRM- Serviço geológico do Brasil*, vol. 30, no. 6, pp. 2010.

RIBEIRO. F. A. M., 2010. *Fermentação Alcoólica*. Apostila Modulo II, Processamento na indústria sucroalcooleira. Uberaba- MG.

SINGLETON, P. and SAINSBURY, D., 2006. *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons. 908 p.

## **Bioestimulação de lodo de esgoto por meio de bagaço de cana-de-açúcar e borra de café**

Milene N. Souza<sup>1</sup>; Flávio A. Oliveira<sup>2</sup>; Carlos E. Levy<sup>2</sup>; Maria A. Marin-Morales<sup>1</sup>; Mary Rosa R. Marchi<sup>3</sup>; Dânia E. C. Mazzeo<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro. \*e-mail: daniamazzeo@gmail.com

<sup>2</sup>Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP.

<sup>3</sup>Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, UNESP, Araraquara.

---

### **RESUMO**

Frente à crescente produção de lodo de esgoto (LE) e sua composição rica em matéria orgânica e nutrientes, tem sido proposta a sua utilização como aditivo agrícola, possibilitando a redução de custos para sua disposição, a possibilidade de substituição de fertilizantes sintéticos, além da reciclagem de nutrientes. No entanto, o LE pode conter substâncias tóxicas, que inviabilizariam o seu uso. Portanto, esse trabalho propôs o tratamento do LE aeróbio, de origem sanitária, por meio do processo de biorremediação, utilizando bagaço de cana-de-açúcar e borra de café como agentes bioestimulantes. A efetividade do processo foi avaliada por meio de bioensaios com *Allium cepa*, caracterizando o potencial ecotoxicogenético do LE, nos períodos de 0 e 2 meses de bioestimulação. A identificação dos microrganismos envolvidos no processo revelou uma variação na composição microbiana entre as amostras, ao longo dos períodos testados, com predominância de bactérias. Após dois meses, notou-se que a adição de solo ou solo com bagaço foi eficiente na detoxificação do LE, eliminando resultados significativos para todos os efeitos encontrados no período inicial. No entanto, não foi possível observar resultados satisfatórios para a borra, pois mesmo após dois meses de bioestimulação, os efeitos tóxicos ainda estiveram presentes.

**Palavras-chave:** Biorremediação; *Allium cepa*; toxicidade; composição microbiana.

---

### **Biostimulation of sewage sludge by means of sugarcane bagasse and coffee grounds**

### **ABSTRACT**

Due to the increasing production of sewage sludge (SS) and its composition rich in organic matter and nutrients, its use as agricultural additive has been proposed, allowing the reduction of costs for its disposal, the possibility of replacing synthetic fertilizers, besides nutrients recycling. However, the SS may contain toxic substances, which would make it unfeasible. Therefore, this work proposed the treatment of aerobic SS, of sanitary origin, by means of bioremediation process, using sugarcane bagasse and coffee grounds as bio-stimulating agents. The effectiveness of the process was evaluated by means of bioassays with *A. cepa*, characterizing the ecotoxicogenetic potential of the SS, in periods of 0 and 2 months of biostimulation. The microbiological identification involved in the process revealed a variation in the microbial composition of the samples, during the periods tested, with a predominance of bacteria. After two months,

the addition of soil or soil with bagasse proved to be efficient in the detoxification of the SS, eliminating significant results for all the effects found in the initial period. However, it was not possible to observe satisfactory results for the coffee grounds, since even after two months of biostimulation, toxic effects were still present.

**Keywords:** Bioremediation; *Allium cepa*; Toxicity; Microbial composition.

---

## INTRODUÇÃO

O lodo de esgoto (LE) é um resíduo resultante do processo de tratamento de efluentes, o qual, por sua produção crescente e possível constituição tóxica, apresenta um potencial altamente danoso ao ambiente (PATHAK et al. 2009). Contudo, devido sua alta concentração de matéria orgânica e nutrientes, seu aproveitamento como fertilizante agrícola é bastante promissor (ÇIFCI et al., 2013).

A biorremediação, por ser uma tecnologia de baixo custo e eficiente na degradação de substâncias tóxicas, vem sendo proposta para promover a detoxificação do LE, possibilitando uma aplicação segura deste resíduo em solos agrícolas (MAZZEO et al., 2015). O aproveitamento de resíduos agroindustriais e domésticos como agentes estimulantes é bastante interessante, pois possibilita a melhoria da biorremediação sem acarretar em um aumento nos custos do processo (SELLAMI et al., 2008).

A espécie *A. cepa* é um dos vegetais mais utilizados para avaliar danos ecotoxicogenéticos induzidos por contaminantes, além de ser um excelente organismo testepara avaliação de processos de biorremediação (MIRANDA et al., 2013).

Desse modo, esse trabalho buscou avaliar a efetividade do processo de biorremediação na redução da toxicidade do LE aeróbio, por meio do bioensaio com *A. cepa*. Adicionalmente, pretende-se comparar a eficiência do bagaço de cana-de-açúcar e da borra de café como agentes bioestimulantes do processo de detoxificação do LE.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção do lodo de esgoto, agentes bioestimulantes e preparo das amostras

As amostras de LE foram fornecidas pela ETE Praia Azul, responsável pelo tratamento de esgoto sanitário do bairro Praia Azul, da cidade de Americana – SP. Esta ETE realiza o processo de tratamento convencional, por lodo ativado, produzindo cerca de 115m<sup>3</sup> de LE aeróbio por mês, com um teor de sólidos em torno de 25%.

Os agentes bioestimulantes empregados neste estudo como descompactantes e estimulantes do processo de detoxificação do LE foram: a) bagaço de cana-de-açúcar

(BAG), adquirido em indústrias sucroalcooleiras, após moagem da cana, seco e triturado grosseiramente; e b) borra de café (BO), obtida em cafeterias, após preparo da bebida.

A diluição das amostras foi feita com solo (S) coletado no Jardim Experimental da UNESP - Rio Claro, de textura argilosa e condutividade elétrica de 146,7  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

As amostras estudadas foram preparadas em proporções volumétricas, como segue: LE + S (3:3 – v/v); LE + S + BAG (3:3:1 – v/v/v); LE + S + BO (3:3:1 – v/v/v).

### **Ensaio de detoxificação das amostras de LE**

O estudo foi desenvolvido em escala piloto, acondicionando as amostras, individualmente, em caixas de aço inox, mantidas no Jardim Experimental, em local coberto, sob temperatura ambiente. O experimento foi realizado em triplicata. Os períodos escolhidos para avaliação da biorremediação foram de 0 (T0) e 2 meses (T1). Após cada período, uma parte das amostras foi coletada para a identificação dos microrganismos e verificação do seu potencial tóxico, por meio do ensaio de *A. cepa*.

### **Caracterização dos microrganismos degradadores**

O isolamento dos microrganismos foi realizado seguindo o protocolo descrito por Mazzeo et al. (2015). A quantificação se deu pela contagem de UFC (Unidade Formadora de Colônia), referente a 1 g do material original. Os microrganismos foram identificados por meio do equipamento de automação BD PhoenixTM – Biosciences.

### **Bioensaio com *A. cepa***

O ensaio foi realizado em triplicata, com 50 sementes de *A. cepa* (variedade Baia Periforme; 2n=16) submetidas à germinação em placas de Petri individuais contendo as amostras especificadas anteriormente. As placas foram incubadas a 22°C, com fotoperíodo de 12h, por 7 dias. Após germinação, as sementes germinadas foram contabilizadas e coletadas. As raízes previamente fixadas foram lavadas com água destilada, hidrolisadas e submetidas à metodologia de Feulgen, para a confecção de lâminas com o meristema radicular. Os controles negativo e positivo foram realizados em água ultra pura e em metilmetano sulfonato a 10 mg/L, respectivamente. No T0, também foi realizado tratamento controle com o solo puro utilizado para a diluição das misturas testadas, além do LE puro, para comprovar sua toxicidade inicial.

Para a avaliação da eficiência do processo de biorremediação, foram considerados os parâmetros: a) índice de germinação; b) citotoxicidade, caracterizada pelo índice mitótico; c) índice de aberrações cromossômicas (perdas, quebras, pontes, atrasos e aderências cromossômicas nas diferentes fases da divisão celular) e anormalidades nucleares (broto nuclear, núcleo lobulado, célula polinucleada); d)

presença de MN (micronúcleo). Foram analisadas cerca de 500 células por lâmina, sendo 15 lâminas para cada tratamento (5 por triplicata), em cada um dos períodos. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA (índice de germinação) e Mann-Whitney a 0,05 de nível de significância, utilizando o programa BioEstat 5.3.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à caracterização microbiológica, o LE estudado apresentou apenas 2 espécies fúngicas. Dentre as bactérias encontradas, foi possível identificar 3 espécies pertencentes ao grupo das enterobactérias (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumonia*), 4 bacilos não fermentadores (*Acinetobacter baumannii*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas* sp) e 2 bactérias gram-positivas não identificadas. A incorporação de agentes estimulantes ao LE promoveu um decréscimo do número de espécies de bactérias para o T0. No entanto, esta diversidade foi reestabelecida após 2 meses. Um efeito contrário foi observado para os fungos, onde houve um aumento da diversidade para o T0 e uma posterior predominância de uma única espécie de zigomiceto para o T1. Esses resultados indicam que os materiais testados podem contribuir para aumento da diversidade microbiana do LE, possivelmente, por promover uma melhor aeração, além de acréscimo da umidade e nutrientes nas misturas (PANDEY et al., 2000; KASONGO et al., 2011).

Quanto aos ensaios ecotoxicogenéticos, ao avaliar o índice de germinação, foi possível observar que, no T0, houve diminuição significativa da germinação para as amostras de LE e LE+S+BO (Tabela 1). Além disso, a amostra L+S+BO promoveu inibição do crescimento das radículas, impossibilitando a confecção de lâminas para análise da citotoxicidade, aberrações cromossômicas e nucleares e MN. No entanto, esses parâmetros foram normalizados após dois meses (T1). Estudos realizados por Martins et al. (2016) também indicaram uma inibição da germinação de sementes de *A. cepa* causada por LE. Esses resultados indicam que o LE pode exercer um efeito prejudicial, demonstrando que seu uso como fertilizante agrícola não é viável sem que este receba tratamento de detoxificação prévio.

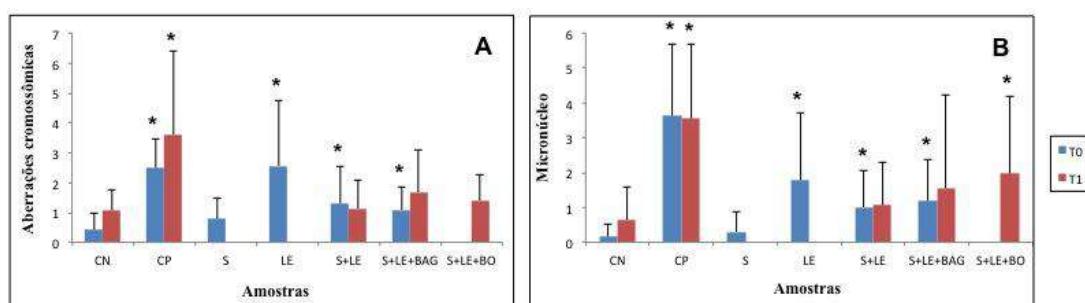
Nenhum efeito citotóxico significativo foi observado para as amostras, em ambos os períodos testados. Contudo, todas as amostras analisadas induziram resultados significativos para aberrações cromossômicas, anormalidades nucleares e MN no T0, indicando alto potencial de danos celulares à espécie *A. cepa* (Figura 1). Porém, no T1, valores significativos foram encontrados apenas para presença de MN para L+S+BO.

Tais resultados indicam que, para os períodos testados, o BAG mostrou-se um material mais promissor para ser empregado no processo de detoxificação do LE. ANACLETO et al. (2017) também descreveram o BAG como sendo um agente bioestimulante eficiente para ser empregado em ensaios de detoxificação de resíduos sólidos.

**Tabela 1.** Índice de germinação (%) de sementes de *A. cepa* expostas às diferentes misturas de LE.

Amostra	CN	CP	SOLO	LE	LE+S+BA	LE+S+BO	LE+S
T0	82,6 ± 3,05	80,6 ± 3,78	91,3 ± 2,30	34,0 ± 9,84	90,0 ± 0,57	36,0 ± 7,21*	86,6 ± 3,05
T1	74,6 ± 2,12	71,3 ± 2,12	N.A.	N.A.	66,0 ± 14,84	83,3 ± 2,12	92,0 ± 0,70

\* estatisticamente significativo ( $p<0,05$ ); N.A.: amostra não avaliada para o período; CN: controle negativo; CP: controle positivo; LE: lodo de esgoto; S: Solo; BA: bagaço de cana-de-açúcar; BO: borra de café.



**Figura 1.** Frequência de alterações genotóxicas em *A. cepa*, induzidas por diferentes misturas de LE, antes (T0) e após (T1) bioestimulação. **A.** Presença de alterações cromossómicas; **B.** Presença de micronúcleo. \* estatisticamente significativo ( $p<0,05$ ).

## CONCLUSÕES

Neste estudo, as bactérias pareceram atuar como os principais agentes degradadores. Embora ambos os agentes bioestimulantes tenham contribuído para o aumento da população microbiana das amostras, em termos toxicológicos, o bagaço de cana foi mais efetivo por reduzir significativamente a toxicidade do LE.

## AGRADECIMENTOS

FAPESP - Processos n° 2016/19604-1; 2014/14123-0.

## REFERÊNCIAS

ANACLETO, L. R., ROBERTO, M. M. and MARIN-MORALES, M. A., 2017. Toxicological effects of the waste of the sugarcane industry, used as agricultural fertilizer, on the test system *Allium cepa*. *Chemosphere*, vol. 173 p. 31-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.033>.

ÇIFCI, D.İ., INACI, C. and ARIKAN, O.A., 2013. Occurrence of phthalates in sewage sludge from three waste water treatment plants in Istanbul, Turkey. *Clean Soil Air Water*, vol.41, p. 851-855.doi:10.1002/clean.201200212.

KASONGO, R.K., VERDOODT, A., KANYANKAGOTE, P., BAERT, G. and VAN RANST, E., 2011. Coffee waste as an alternative fertilizer with soil improving properties for sandy soils in humid tropical environments. *Soil Use Management*, vol. 27, p.94-102.doi:10.1111/j.1475-2743.2010.00315.x.

MIRANDA, R.C.M., GOMES, E.B., PEREIRA JR, N., MARIN-MORALES, M.A., MACHADO, K.M.G. and GUSMAO, N.B., 2013. Biotreatment of textile effluent in static bioreactor by *Curvularia lunata* URM 6179 and *Phanerochaete chrysosporium* URM 6181. *Bioresource Technology*, vol.142, p.361–367. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.066>.

MARTINS, M.N.C., SOUZA, V.V. and SOUZA, T.S., 2016. Cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of sewage sludge on *Allium cepa*. *Chemosphere*, vol. 148 p. 481-486. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.071>.

MAZZEO, D.E.C., FERNANDES, T.C.C., LEVY, C.E., FONTANETTI, C.S. and MARIN-MORALES, M.A., 2015. Monitoring the natural attenuation of a sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. *Ecological Indicators*, vol.56, p. 60–69.<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.03.026>.

PANDEY, A., SOCOOL, C.A., NIGAM, P. and SOCOOL, V.T., 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues.I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technol*, vol.74, p.69-80.[http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00142-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00142-X).

PATHAK, A., ASTIDAR, M.G. and SREEKRISHNAN, T.R., 2009. Bioleaching of heavy metals from sewage sludge: A review. *Journal of Environmental Management*, v.90, p.2343-2353.<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2008.11.005>.

SELLAMI, F., JARBOUI, R., HACHICHA, S., MEDHIOUB, K. and AMMAR, E., 2008. Co-composting of oil exhausted olive-cake, poultry manure and industrial residues of agro-food activity for soil amendment. *Bioresource Technology*, vol. 99, p. 1177-1188.<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.02.018>.

SINGH, R.P. and AGRAWAL, M., 2008. Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. *Waste Management*, vol. 28, p. 347-358. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2006.12.010>.

## **Densidades de *Enterococcus* sp em praia do Litoral Norte Paulista**

Mirella Massonetto<sup>1</sup>; Vanessa da Costa Andrade<sup>2</sup>; Wagner Ferreira Vilano<sup>1</sup>; Ana Júlia Fernandes Cardoso de Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus do Litoral Paulista

\*mirella.massonetto@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Rio Claro

---

### **RESUMO**

A ocupação desordenada nas áreas litorâneas atrelada a precariedade no tratamento de esgoto local, resulta em um importante impacto ambiental e em um problema de saúde pública. Devido a isso, as praias recreacionais passaram a ser monitoradas pela CETESB e qualificadas segundo a densidade de bactérias fecais em suas águas. O gênero *Enterococcus* sp é indicador de contaminação fecal por colonizarem o trato gastrointestinal de mamíferos e ideal no caso de águas salinas e salobras, justamente por sobreviverem em alta salinidade. O objetivo desse estudo foi monitorar e comparar a densidade de *Enterococcus* sp na água e também no sedimento, a fim de se estabelecer uma comparação entre esses parâmetros. As amostras foram submetidas a Técnica de Membrana Filtrante, utilizou-se meio seletivo para o gênero em questão e as colônias foram confirmadas por meio de Enterococcosel caldo. Os resultados revelaram que assim como a água, o sedimento também encontra-se contaminado, porém com índices muitos superiores ao aquático na maioria dos meses de coleta e testes estatísticos demonstraram que essa diferença é significativa. O sedimento oferece nutrientes, permite a fixação desses microrganismos e retém calor, aumentando suas chances de sobrevivência; outra questão é o contato dos banhistas com esse sedimento, uma vez que é na areia seu maior tempo de permanência. Esse contato prolongado pode desencadear desde dermatites até gastroenterites severas, principalmente no verão, por isso é tão imprescindível a criação de uma legislação específica para estabelecimento de padrão qualidade da balneabilidade de uma forma mais completa.

**Palavras chave:** contaminação, areia, bactéria, praia, balneabilidade

---

***Enterococcus* sp. densities in the beach at São Paulo North Coast**

### **ABSTRACT**

The disorderly occupation of coastal regions and the absence of basic sanitation, results in serious environmental impacts, besides presenting a serious risk to the population. Contaminated recreational beaches may expose bathers to serious public health risks (e.g. pathogenic microorganisms). Due to the use of beaches in a recreational way, CETESB began to qualify them according to the densities of fecal bacteria present in the water. The genus *Enterococcus* sp is a bioindicator of fecal contamination by colonizing the gastrointestinal tract of mammals and ideal in the case of saline and brackish waters, especially because they survive in high concentrations of salt. The

present study aimed to monitor and compare the density of *Enterococcus* sp. in water and sediment samples. The Membrane Filtering Technique was used to count bacteria using mEnterococcus agar for selective growth and Enterococcosel Broth for confirmation. The results showed that both the water samples as well as the sediment samples were contaminated. The sediment samples showed higher densities and significant ( $p \leq 0.05$ ) when compared to water. Sediments provide nutrients, fixes microorganisms and retains heat, increasing your chances of survival. Another issue is the contact of the bathers with this sediment, since they stay most of the time in the sand, which exposes them to several pathogens. Based on the results obtained, it is important to note that the legislation for sediment is a public health problem.

**Keywords:** contamination, sand, bacteria, beach, bathability

---

## INTRODUÇÃO

Áreas costeiras estão altamente impactadas pela ausência de planejamento e falta de infraestruturas relacionadas ao saneamento básico. Esse grande volume de efluentes despejado no ambiente marinho torna necessária a avaliação e monitoramento das águas utilizando padrões físico-químicos e biológicos (Abessa et al., 2012; Kacar et al., 2016). No Estado de São Paulo, o monitoramento de praias recreacionais é realizado pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) que segue normas da Organização Mundial da Saúde (OMS), estabelecendo como parâmetro o índice de coliformes totais, que abrange a densidade de *Escherichia coli* e do gênero *Enterococcus*, sendo esse último o mais indicado para estudos em águas salinas, pois suportam salinidades maiores e pH 9,6. Esses organismos são considerados importantes indicadores de contaminação fecal por dois fatores: são patogênicos e são presentes no trato gastrointestinal humano (CETESB, 2012; Berg et al., 2013; CETESB, 2013).

O monitoramento das águas é importante para a saúde pública, uma vez que pode haver transmissão de doenças infecciosas pela exposição direta aos microrganismos (Solo-Gabriele et al., 2016). Sendo assim, a preocupação com a qualidade das águas também deve ser estendida aos sedimentos do supralitoral, uma vez que há maior permanência de banhistas e também possuem características favoráveis a sobrevivência das bactérias. Entretanto, a legislação no Estado de São Paulo não prevê parâmetros qualitativos para os sedimentos (Sato et al., 1998; Wheeler et al., 2003; Hortellani et al., 2008; Pinto et al., 2012 e Andrade et al., 2015).

Assim, o objetivo do presente estudo foi monitorar a densidade de bactérias do gênero *Enterococcus* sp em amostras de água e sedimento na praia da Enseada, litoral

Norte de São Paulo, a fim de comparar os resultados e verificar se há diferença significativa entre a contaminação de ambos locais, prevendo outros parâmetros de qualificação para as praias de uma maneira mais completa.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

As amostras foram coletadas em dois pontos: próximo ao costão rochoso (Ponto 1) e outro na porção central (Ponto 2), na Praia da Enseada, localizada na Baía do Flamengo(S 23° 29' 50,0"/ W 45° 04' 58,9"), no município de Ubatuba (São Paulo).Foram coletadas amostras de água do mar a 1 m de profundidade, armazenadas em frascos estéreis. Amostras de sedimento seco e úmido, foram coletadas com o auxílio de uma espátula estéril e armazenadas em sacos plásticos estéreis. As amostras foram mantidas sob refrigeração até seu processamento no Laboratório de Microbiologia Marinha (UNESP – CLP).

Em frascos estéreis com 180mL de água destilada foi adicionado 20 g de sedimento e colocados sob agitação por 5 minutos para a remoção das bactérias aderidas ao sedimento e no caso das amostras de água, houve apenas homogenização. Posteriormente, foi realizada a Técnica de Membrana Filtrante nos volumes de 10 e 50mL para ambas as amostras (APHA, 2012). Após a filtração, as membranas foram colocadas em placas Millipore, contendo ágar mEnterococcus e incubadas por 48 horas a 37°C ± 1°C. Colônias com coloração vermelho-amarronzado foram contadas e foram submetidas a teste de confirmação com Caldo Enterococcosel. As densidades foram expressas em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por 100 mL para as amostras de água e, UFC por g para sedimento. Para as análises estatísticas foi utilizado o software Past, sendo o teste de Levene para verificar a homocedasticidade dos dados, e Kruskal-Wallis ( $p \leq 0.05$ ) para análise de variância.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Segundo os resultados (figura 1) nenhum dos índices de água ficou acima do previsto pela legislação, não atingindo 1000 UFC ao longo de todo período, no dois pontos de amostragem, classificando a praia como própria para banho. Diferentemente dos índices apresentados pelos sedimentos, que estiveram superiores aos da água na maioria dos meses de coleta; assim como no estudo realizado por Heaney et al.(2014), não foi a qualidade da água que surpreendeu nos resultados, mas sim o sedimento, por abrigar uma diversidade maior de microrganismos patogênicos e em uma densidade

maior. O mesmo estudo estabeleceu uma relação entre os banhistas doentes e a balneabilidade, evidenciando um problema não apenas ambiental, mas de saúde pública e Murray (1990) descreveu que *Enterococcus* sp é o principal causador de infecções hospitalares graves por serem resistentes a antibióticos. O sedimento seco apresentou picos de densidade, corroborando com os estudos conduzidos por Wheeler et al. (2003) e de Solo-Gabriele et al. (2016) que evidenciaram o sedimento como excelente local para sobrevivência desses organismos.

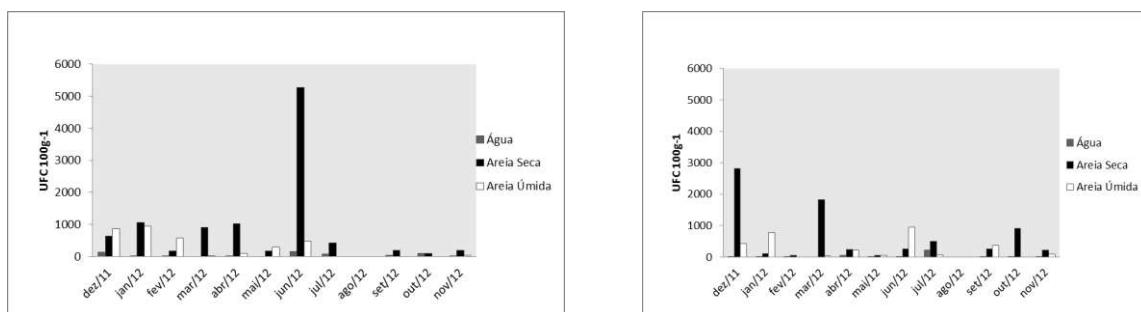


Figura 1: Densidade de *Enterococcus* sp. no ponto 1 (próximo ao costão rochoso- esquerda), e ponto 2 (região central da praia- direita) referente a água, sedimento seco e úmido

Houve uma diferença significativa nas densidades de *Enterococcus* sp. na água e, principalmente, no sedimento seco entre os dois pontos de coleta (Ponto 1-  $p=0,00572$ ; Ponto 2-  $p = 0,00486$ ).

Apesar de haver estudos que apontem os sedimentos como importante parâmetro a ser analisado para contribuir na avaliação da balneabilidade das praias, a legislação Paulista ainda não prevê índices para monitorá-las. Segundo o trabalho de Pinto & Oliveira (2012) bem como, Whitman et al. (2014), o monitoramento realizado hoje nas praias, é incompleto, uma vez que estudos que utilizaram o sedimento (seco e úmido) como parâmetro de comparação para a densidade de *Enterococcus* revelaram uma discrepância entre a quantidade desses organismos, cujas concentrações no sedimento seco eram mais elevadas do que na água do mar.

## CONCLUSÃO

A alta densidade de *Enterococcus* no sedimento e na água revela a importância de políticas públicas que visem sanar o problema, tratando de maneira adequada o esgoto doméstico, bem como estabelecer metas de curto e médio prazo, como uma legislação específica para o padrão de qualidade dos sedimentos das praias recreacionais.

## REFERÊNCIAS

- ABESSA, D., RACHID, B., MOSER, G. and OLIVEIRA, A.J.F., 2012. Efeitos ambientais da disposição oceânica de esgotos por meio de emissários submarinos: uma revisão. *O mundo da Saúde*, vol. 36, no. 4, pp.643-661. [http://www.saocamilo-sp.br/pdf/mundo\\_saude/97/14.pdf](http://www.saocamilo-sp.br/pdf/mundo_saude/97/14.pdf)
- APHA- American Public Health Association. 2012. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewaters*, vol. 22, pp. 120.
- ANDRADE, V.C., ZAMPIERI, B., BALLESTEROS, E.R., PINTO, A.B and OLIVEIRA, A.J.F., 2015. Densities and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from marine waters and beachs sands. *Environmental monitoring and assessment*, vol. 187, pp. 342.
- BERG, H., GUERCIO, M.J. and ULBRITCH, V.R., 2013. Indicadores de Balneabilidade: a situação brasileira e as recomendações da World Health Organization. International . *Journal of Knowledge Engeneering and Manengerment.*, vol. 2, no. 3, pp. 83-101.
- CETESB- Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. 2012. *Variáveis qualidade das águas*. São Paulo: Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental.
- CETESB- Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. 2013. *Relatório de qualidade das águas litorâneas do Estado de São Paulo: Balneabilidade das praias* 2012. São Paulo: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental.
- HEANEY, C., EXUM, N.G., DOFOUR, A.P., BRENNER, K.P., HAUGLAND, R.A., CHERN, E., SCHAWAB, K.J., LOVE, D.C., SERRE, M.L., NOBLE, R. and WADE, T.J., 2014. Water quality, weather and environmental factors associated with fecal indicator organism density in beach sand at two recreational marine beaches. *Science of the Total Environment*, vol. 487, pp. 440-447.
- HORTELLANI, M.A., SARKIS, J.E.S., ABESSA, D.M.S. and SOUZA, E.C.P.M., 2008. Avaliação da contaminação por elementos metálicos dos sedimentos do Estuário de Santos-São Vicente. *Química Nova*, vol. 31, no. 1, pp. 10-19.
- KACAR, A., PAZI, I.G.T and KUCUKSEZGIN, F., 2016. Marine pollution risk in a coastal city: use of an eco-genotoxic tool as a stress indicator in mussels from the Eastern Aegean Sea. *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 10, pp.1-12.

MURAY, B. E., 1990. The Life and Time about *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 3, no. 1, pp. 46-65.

PINTO, A.B., PEREIRA, C.R. and OLIVEIRA. A.J.F.C., 2012. Densidade de *Enterococcus* sp em águas e areias recreacionais do Município de São Vicente-SP, Brasil e sua relação com parâmetros abióticos. *O mundo da saúde*. 3, vol. 6, no. 4, pp. 587-593.

SATO, M. I. Z., BARI, M. D., LAMPARELLI, C. C., TRUZZI, A. C., COELHO, M. C. L. S. and HACHICH, E. M., 2005. Sanitary quality of sands from marine recreational beaches of São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 36, no. 4, pp. 321–326.

SOLO-GABRIELE, H.M., HARWOOD, J., KAY, D., FUJIOKA, R.S., SADOWISK, M.J., WHITMAN, R.L., WITHER, A., FONSECA, R.C., DUARTE, A., EDGE, T., GARGATE, M.J., GUNDE-CIMERMAN, N., HAGEN, F., MCLELLAN, S.L., DA SILVA, A.N., BABIC, M.N., PRADA, S., RODRIGUES, R., ROMÃO, D., SABINO, R., SAMSON, R., SEGAL, R., STALEY, C., TAYLOR, H.D., VERÍSSIMO, C., VIEGS, C., BARROSO, H. and BRANDÃO, J.C., 2016. Beach sand and the potential for infectious disease transmission: observations and recommendations. *Journal of Marine Biological Association of United Kingdom*, vol. 961, no. 1, pp. 101-120.

WHEELER, E., BURKE, J. and SPAIN, A., 2003. Fecal indicator bacteria are abundant in wet sand at freshwater beaches. *Water Research*, vol. 37, pp. 3978-3982.

WHITMAN, R. L., HARWOOD, V. J., EDGE, T. A., NEVERS, M. B., BYAPPANAHALLI, M., VIJAYAVEL, K., BRANDÃO, J., SADOWSKI, M. J., ALM, E.W., CROWE, A., FERGUSON, D., GE, Z., HALLIDAY, E., KINZELMAN, J., KLEINHEINZ, G., PRZYBYLA-KELLY, K., STALEY, C., STALEY, Z. and SOLO-GABRIELE, H. M. 2014. Microbes in beach sands: Integrating environment, ecology and public health. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, vol. 13, pp. 329–368.

## **Biodegradação em solo cultivado com cana-de-açúcar com tebutiurom e vinhaça**

Mirian Alves de Faria<sup>1</sup>; Alessandra Baroni Rodrigues Neves<sup>1</sup>; João Vitor França Pirola<sup>1</sup>; Paulo Renato Matos Lopes<sup>1\*</sup>; Ederio Dino Bidoia<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Dracena. Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros, km 651, CEP 17900-000, Dracena, Brasil. <sup>2</sup> Instituto de Biociências de Rio Claro, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Rio Claro.

\*plopes@dracena.unesp.br

---

### **RESUMO**

O tebutiurom é um herbicida largamente utilizado no cultivo de cana-de-açúcar no território nacional. Nestas lavouras, também há geralmente aplicação de vinhaça como fertirrigação devido ao seu alto teor de matéria orgânica e nutrientes. O objetivo deste estudo foi avaliar a biodegradação microbiana em solo de cultivo de cana-de-açúcar com aplicação de diferentes doses de vinhaça associadas ou não ao tebutiurom. Os resultados revelaram que a adição de vinhaça promoveu um aumento na produção de CO<sub>2</sub> nas amostras de solo, sugerindo aumento da atividade metabólica da biomassa microbiana. Por outro lado, a presença do herbicida tebutiurom não influenciou significativamente na taxa de CO<sub>2</sub> evoluído nos sistemas.

**Palavras-chave:** fertirrigação, herbicida, respirometria, resíduo.

---

### **Biodegradation in soil cultivated with sugarcane with tebuthiuron and vinasse**

#### **ABSTRACT**

Tebuthiuron is a herbicide widely used in Brazilian sugarcane crops. Also, there is vinasse application fertigation due to its high content of organic matter and nutrients. The objective of this study was to evaluate the microbial biodegradation in sugarcane cultivation soil with different vinasse doses associated or not with tebuthiuron. The results showed that vinasse addition promoted an increase in CO<sub>2</sub> production, which suggested a higher metabolic activity of microbial biomass. On the other hand, the herbicide tebuthiuron did not significantly influence CO<sub>2</sub> rates evolved in systems.

**Keywords:** Fertigation, herbicide, respirometry, residue.

## INTRODUÇÃO

O tebutirom (1-(5-tert-butil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1,3-dimetilureia) é um dos herbicidas mais usados no cultivo da cana-de-açúcar no Estado de São Paulo (Negrisoli et al., 2005, 2007). É um herbicida seletivo, com ação sistêmica e pertencente ao grupo químico das ureias substituídas. Sua utilização está relacionada a aplicações em pré-emergência visando o controle de 25 plantas daninhas na lavoura canavieira e também em pastagens, sendo absorvido preferencialmente pela raiz (Tomlin, 1994).

Entretanto, o tebutirom apresenta algumas características de importância ecológica, como alta persistência no solo, com meia vida de até 15 meses; toxicidade moderada a extrema (Rodrigues and Almeida, 2011); baixa capacidade sortiva no solo (Koskinen et al., 1996); e alta solubilidade em água, que apontam para o seu elevado potencial de lixiviação no solo (Oliveira et al., 2001).

Sabe-se que a vinhaça é um resíduo da produção de álcool que, por seu alto teor de matéria orgânica e sua riqueza nutricional, tem sido utilizada na fertirrigação da lavoura de cana-de-açúcar. (Canellas et al., 2003).

Alguns autores observaram que a adição da matéria orgânica tem aumentado a degradação de várias moléculas, apoiando seus resultados no aumento da atividade e biomassa microbiana (Costa, 1992; Vroumsia et al., 1996). Outros, porém, observaram a maior persistência de moléculas em solos com maiores teores de matéria orgânica, que foi explicado em função da maior adsorção (Luchini, 1987; Gaillardon, 1997). Tais dados sugerem que a associação entre o herbicida tebutirom e a vinhaça podem trazer consequências benéficas à lavoura e ao meio ambiente.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a biodegradação microbiana em solo de cultivo de cana-de-açúcar com aplicação de diferentes doses de tebutirom em associação com vinhaça.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), câmpus de Dracena.

Foram coletados solo de cultivo de cana-de-açúcar e vinhaça na usina Caeté no município de Paulicéia-SP. As amostras de solo foram coletadas até 30 cm de profundidade, sendo posteriormente peneiradas, homogeneizadas e acondicionadas em recipientes plásticos.

O herbicida tebutiurom foi adquirido em estabelecimento comercial em Dracena-SP (produto comercial Combine® 500SC - Dow AgroSciences Industrial Ltda).

O delineamento experimental foi fatorial 2x4 (Tabela 1), sendo analisados duas doses de tebutiurom (TBT – zero e 1,0x), de acordo com a recomendação do fabricante, e quatro volumes de vinhaça (VV – zero; 0,5x; 1,0x e 2,0X). O volume vinhaça (VV) referiu-se à dose geralmente utilizada para aplicação na lavoura canavieira, segundo Lourencetti et al. (2012).

**Tabela 1.** Composição dos sistemas para análise da biodegradação

Sistemas	TBT	VV
<b>S1</b>	-	-
<b>S2</b>	1,0x	-
<b>S3</b>	-	0,5x
<b>S4</b>	1,0x	0,5x
<b>S5</b>	-	1,0x
<b>S6</b>	1,0x	1,0x
<b>S7</b>	-	2,0x
<b>S8</b>	1,0x	2,0x

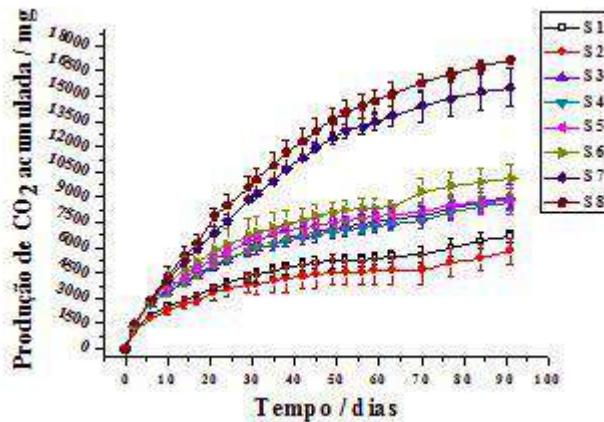
A análise de biodegradação dos tratamentos foi realizada pelo método respirométrico de Bartha e Pramer (1965), baseado na Norma Técnica L6.350 da CETESB (1990) e na NBR 14283 (ABNT, 1999). No entanto, a determinação da produção de CO<sub>2</sub> foi realizada segundo Faria et al. (2013).

Os respirômetros foram montados utilizando potes plásticos em triplicata, mantidos fechados e incubados a 28 °C. A determinação da atividade microbiana foi realizada até 91 dias.

Os dados experimentais de produção máxima de CO<sub>2</sub> acumulado no período foram analisados efetuando-se a análise de variância pelo teste de Tukey a 5,0% de probabilidade para a comparação de médias. Neste caso, foi utilizado o software Microcal Origin 8.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da produção de CO<sub>2</sub> nos sistemas e análise estatística no tempo final (91 dias) estão apresentados na Figura 1 e Tabela 1, respectivamente.



**Figura 1.** Produção acumulada de CO<sub>2</sub> em cada sistema pelo tempo de incubação.

**Tabela 2.** Análise de variância da produção de CO<sub>2</sub> acumulada em 91 dias nos diferentes sistemas.

Produção de CO <sub>2</sub> acumulado em 91 dias	
<b>S1</b>	6644,25±353,83 a
<b>S2</b>	5797,51±808,27 a
<b>S3</b>	9095,35±724,69 b
<b>S4</b>	8665,12±400,27 b
<b>S5</b>	8785,11±779,63 b
<b>S6</b>	10078,08±850,95 b
<b>S7</b>	15526,49±1136,88 c
<b>S8</b>	17159,41±133,72 c
*letras minúsculas representam diferença significativa das médias entre os tratamentos. (teste de Tukey a 0,05 de probabilidade)	

A adição de vinhaça promoveu um aumento na respiração dos micro-organismos no solo, sendo que os tratamentos com duas vezes o volume (S7 e S8) obtiveram os valores mais altos de produção acumulada de CO<sub>2</sub>. Em contrapartida, quando ausente de vinhaça (S1 e S2), os índices de CO<sub>2</sub> nos respirômetros foram os mais baixos. Esses resultados sugerem que a adição de matéria orgânica ao solo por meio de vinhaça promoveu aumento da atividade metabólica da biomassa do solo. Para confirmar se houve aumento da biomassa microbiana é necessária a realização de testes de contagem de UFC do solo (Costa, 1992; Vroumsia et al., 1996).

No entanto, deve-se ressaltar que os sistemas com 0,5x VV (S3 e S4) e com 1,0x VV (S5 e S6) não apresentaram diferença significativa após 91 dias de incubação (Tabela X).

Pela Figura 1, foi demonstrado que a adição de tebutiurom ao solo não influenciou significativamente a produção de CO<sub>2</sub> nos sistemas. Este fato foi evidenciado pela ausência de diferença significativa na comparação entre os sistemas S1-S2, S3-S4, S5-S6 e S7-S8 (Tabela 1).

## CONCLUSÕES

Portanto, foi demonstrado que a adição do herbicida tebutiurom não alterou o metabolismo microbiano no solo. Por outro lado, houve aumento da produção de CO<sub>2</sub> na presença de vinhaça, sugerindo aumento da biodegradação. No entanto, é necessária a realização de testes de ecotoxicidade nas amostras de solo para comprovar o processo eficiente de biorremediação.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPe/UNESP), às empresas Usina Caeté (Paulicéia-SP) e Planeta Verde (Lucélia-SP) pela disponibilidade na coleta das amostras de solo e vinhaça e também ao GAIA (Grupo de Ação de Impactos Ambientais) da FCAT/UNESP, câmpus de Dracena.

## REFERÊNCIAS

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. 1999: Resíduos em solos - Determinação da biodegradação pelo método respirométrico. NBR 14283, Rio de Janeiro.
- BARTHA, R.; PRAMER, D. 1965. Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. *Soil Science*, vol. 100, no. 1, pp. 68-70.
- CANELAS, L. P.; VELLOSO, A. C. X.; MARCIANO, C. R.; RAMALHO, J. F. G. P.; RUMJANEK, V. M.; REZENDE, C. E. and SANTOS, G. A., 2003. Propriedades químicas de um cambissolo cultivado com cana-de-açúcar, com preservação do palhiço e adição de vinhaça por longo tempo. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, vol. 27, no. 5, pp. 935-944.
- CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. 1990. Solos – Determinação da Biodegradação de Resíduos – Método Respirométrico de Barth. Norma Técnica L6.350, Cetesb: São Paulo.

- COSTA, M.A. 1992. Biodegradação de 14 C-ametrina em Areia Quartzosa com adição de palha de cana e solo rizosférico. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.
- FARIA, A.U.; MARIN-MORALES, E.; ANGELIS, D.F. 2013. Manual de protocolos de laboratório. Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Rio Claro: Publicação interna/UNESP - IB.
- GAILLARDON, P., 1997. Desorption of diuron and isoproturon from undispersed clay loam soil. *Journal of Pest Science*, vol. 51, pp. 185-193.
- KOSKINEN, W.C.; STONE, D.M. and HARRIS, A.R., 1996. Sorption of hexazinone, sulfometuron methyl, and tebuthiuron on acid, low base saturated sands. *Chemosphere*, vol. 32, pp. 1681-1689.
- LOURENCETTI, C.; DE MARCHI, M.R.R. and RIBEIRO, M.L., 2008. Determination of sugar cane herbicides in soil and soil treated with sugar cane vinasse by solid-phase extraction and HPLC – UV. *Talanta*, vol. 77, no. 2, pp. 701-709.
- LUCHINI, L.C. 1987. Adsorção-dessorção dos herbicidas paraquat, diuron e 2,4-D em seis solos brasileiros. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 91p.
- NEGRISOLI, E.; COSTA, E.A.D.; VELINI, E.D.; CAVENAGHI, A.L. and TOFOLI, G.R., 2005. Deposition and leaching of tebuthiuron on sugarcane straw applied with and without alkyl poyglycoside adjuvnt. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, vol. 40, no. 1, pp. 207-214.
- NEGRISOLI, E.; VELINI, E.D.; ROSSI, C.V.S.; CORREIA, T.M. and COSTA, A.G.F. Associação do herbicida tebuthiuron com a cobertura de palha no controle de plantas daninhas no sistema de cana-crua. 2007. *Planta Daninha*, vol. 25, no. 3, pp. 621-628.
- RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. 2011. Guia de herbicidas. 6a ed. Londrina-PR: IAPAR, vol. 1. 697p.
- TOMLIN, C. 1997. The pesticide manual: A world compendium. 10a ed. British Crop Protection Council and Royal Society of Chemistry, Thornton Heath, UK.
- VROUMSIA, T.; STEIMAN, R.; SEIGLE-MURANDI, F.; BENOIT-GUYOD, J.L. & KHADRANI, A. 1996. Biodegradation of three substituted phenylurea herbicides (chlortoluron, diuron and isoproturon) by soil fungi. A comparative study. *Chemosphere*, vol. 33, pp. 2045-2056.

## Metabólitos de *Schinus terebinthifolius* com potencial antimicrobiano

Mírian Lobo Sáber;<sup>1\*</sup> Jéssica Aparecida Ribeiro<sup>2</sup>; Luana das Neves Silva<sup>2</sup>; Tuany Alcebiades do Santos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Docente da Universidade do Vale do Sapucaí - Curso de Ciências Biológicas.

\*e-mail (autor para correspondência): mirianlsaber@gmail.com

<sup>2</sup>Discente da Universidade do Vale do Sapucaí – Curso de Ciências Biológicas.

---

### RESUMO

Avaliar a ação antimicrobiana dos óleos essenciais e extratos etanólicos da casca e folhas da planta *Schinus terebinthifolius* (aroeira vermelha). Foram coletadas casca e folhas frescas da planta *S. terebinthifolius*. O material vegetal coletado foi então separado para a secagem em estufa, para obtenção do óleo essencial através da destilação por arraste a vapor, e para obtenção do extrato etanólico da planta foram trituradas as estruturas da planta e após o procedimento, foram introduzidas um volume de 15 ml de álcool 70% para cada 1g de material vegetal. A técnica utilizada no estudo foi disco de difusão em ágar Muller-Hinton frente aos microrganismos: *Escherichia coli* (ATCC 13048), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Candida parapsilosis* (ATCC 20019). O estudo sobre o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais da *Schinus terebinthifolius* provou uma pequena ação antimicrobiana para *E. coli*, *S. aureus* e *C. parapsilosis*. Já os extratos etanólicos provaram alta atividade antimicrobiana para todos os microrganismos testados.

**Palavras-chave:** Ação antimicrobiana; aroeira vermelha; óleo essencial; extrato etanólico.

---

### *Schinus terebinthifolius* metabolites with antimicrobial potential

### ABSTRACT

To evaluate the antimicrobial action of the essential oils and ethanolic extracts of the bark and leaves of the plant *Schinus terebinthifolius* (red aroeira). Fresh bark and leaves were collected from the *S. terebinthifolius* plant. The collected plant material was then separated for drying in an oven, to obtain the essential oil by steam distillation, and to obtain the ethanolic extract of the plant, the plant structures were crushed and after the procedure, a volume of 15 ml of alcohol 70% for each 1g of plant material. The technique used in the study was diffusion disc in Muller-Hinton agar against the microorganisms: *Escherichia coli* (ATCC 13048), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Candida parapsilosis* (ATCC 20019). The study on the antimicrobial effect of the essential oils of *Schinus terebinthifolius* proved antimicrobial little action for *E. coli*, *S. aureus* and *C. parapsilosis*. On the other hand, the ethanolic extracts proved high antimicrobial activity for all tested microorganisms.

**Keywords:** Antimicrobial action; red aroeira; essential oil; ethanol extract.

---

## INTRODUÇÃO

A descoberta dos antimicrobianos foi um grande avanço para a medicina, reduzindo a morbidade e mortalidade de doenças infecciosas (Aschbacher, 1978). Os antimicrobianos são substâncias naturais ou sintéticas que atuam sobre microrganismos inibindo seu crescimento ou causando sua morte (Saez-Llorens, 2000). Estes devem ser prescritos de forma racional, baseado em diagnósticos concretos. O uso excessivo pode acarretar a problemas sérios a saúde. (Fiol et al., 2010).

As propriedades antimicrobianas de substâncias presentes em extratos e óleos essenciais produzidos pelas plantas são reconhecidas há séculos. (Jansen apud Scheffer and Baerheim, 1987). Os extratos de plantas como óleos essenciais ou extratos com solventes apresentam substâncias inibidoras de patógenos e além destes serem inofensivos ao meio ambiente apresentam maior eficácia à ação dos antimicrobianos sintéticos, pois não liberam resíduos e são totalmente naturais (Bonett et al., 2012).

A *Escherichia coli* habita no intestino humano, e em alguns casos, podem causar infecções, causando diarreia ou infecção urinária. Além disso, a presença desses microrganismos, em elevada concentração nos alimentos, indica uma possível contaminação fecal (FRANCO, 2002).

O *Staphylococcus aureus* é um importante patógeno devido à sua virulência, resistência aos antimicrobianos para várias doenças, incluindo doenças sistêmicas, infecções cutâneas, infecções oportunistas e intoxicação alimentar (LOWRY, 1998).

O gênero *Candida* estão cada vez mais comuns em pacientes com sistema imunológico baixo, estas infecções apresentam um grande custo para os hospitais, pois aumentam o tempo de internação do paciente, além de causarem elevada mortalidade (ALANGADEN, 2011; PATTERSON, 2005).

O objetivo deste trabalho foi comparar a ação antimicrobiana do óleo essencial com o extrato etanólico das diferentes partes da planta *Schinus terebinthifolius*: casca e folha. Essa espécie foi escolhida devido à escassez de pesquisas comprovando seu efeito sobre patógenos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Folhas e cascas da *Schinus terebinthifolius* foram coletadas e encaminhadas para o laboratório de botânica da universidade Vale do Sapucaí e seco em estufa a 50°C por cinco dias. Após a secagem do material vegetal, foram pesadas 100g de cada material vegetal, trituradas e inseridas em 1 litro de água. A extração do óleo essencial foi feita

por arraste à vapor por baixa pressão descrito por Koketsu e Gonçalves (1991). Foi extraído de 6 kg de folhas, 5 ml de óleo essencial, e de 5kg de cascas, 2ml de óleo essencial.

Para a obtenção do extrato etanólico, o material vegetal já processado foi separado em liquidificador até a obtenção de um pó granuloso de cheiro forte. Utilizando o método e Costa et al, (2014) com algumas modificações, sendo assim, para cada 1g de planta, adicionamos 15 ml de álcool 70%, sendo utilizados no total 25g da planta e 375 ml de álcool. A mistura foi feita em frasco à temperatura ambiente, em agitação durante um período de 7 dias e outro com agitação de 30 dias, para evitar o contato com a luz, todos os frascos foram tampados e vedados com papel alumínio.

Após os dias de agitação, os extratos etanólicos de *Schinus terebinthifolius* foram filtrados em bomba a vácuo e o líquido etanólico foi acondicionado em frasco de vidro. Para a evaporação do álcool foi utilizado o Rota vaporizador e após esse processo foram acondicionadas em vidro âmbar levados a estufa durante dois dias.

Os microrganismos utilizados na pesquisa foram cepas de *Escherichia coli* (ATCC 13048), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Candida parapsilosis* (ATCC 20019). Após o crescimento prévio de 12h, 100 $\mu$ l de cada cepa microbiana foram depositadas nas placas de petri e com auxílio da alça de Drigalski foi espalhado todo inoculo pelo meio de crescimento. Em seguida, na técnica do disco difusão, utilizamos discos de papel filtro Whatman n° 1, onde cada disco foi umedecido com 10 $\mu$ l de óleo essencial e extratos da *Schinus terebinthifolius*.

Para a placa controle foram inoculados 100 $\mu$ l do inoculo com discos de papel filtro umedecidos com 10 $\mu$ l de água destilada. Após o procedimento as placas foram incubadas em estufa a 35°C durante um período de 24 horas. Após a incubação foi realizada a leitura do resultado obtendo a medida dos halos somando estes na horizontal e vertical calculando à média.

Para as análises estatísticas foi utilizado o software Assistat (Statistical Assistance), versão 7.7 beta, criado pelo professor Doutor Francisco de A. S. e Silva, da Universidade Federal de Campina Grande, através do teste de Tukey.

## RESULTADOS

A pesquisa realizada com diferentes partes da *S. terebinthifolius* demonstrou que os extratos etanólicos obtiveram maior ação antimicrobiana quando comparada ao óleo essencial, como pode ser observada na Tab. 1.

Tabela 1 – Média dos halos (cm) obtidos pelos óleos essenciais e extratos etanólicos da planta *S. terebinthifolius* frente aos microrganismos *E. coli*, *S. aureus* e *C. parapsilosis*.

Microrganismos	ÓLEO ESSENCIAL		EXTRATO ETANÓLICO			
	Folha	Casca	Folha 7 dias	Folha 30 dias	Casca 7 dias	Casca 30 dias
	Média do halo (cm)					
<i>E. coli</i>	0,55	0,50	1,0	1,4	0,52	0,4
<i>S. aureus</i>	0,10	0,20	1,3	1,1	0,6	0,5
<i>C. parapsilosis</i>	0,10	0,10	1,1	1,4	0,50	0,60

Frente aos resultados apresentados na Tab. 1, pode-se verificar que houve inibição em todos os microrganismos testados com extratos etanólicos e óleo essencial de *Schinus terebinthifolius*. Destacando o extrato etanólico da folha como maior inibidor microbiano, frente aos patógenos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida parapsilosis*.

## DISCUSSÃO

Segundo Delgado-Adamez et al. (2012), extratos brutos de espécies vegetais podem muitas vezes apresentar ação antimicrobiana mais efetiva contra patógenos devido ao sinergismo entre os constituintes bioativos que são extraídos pelo solvente, uma vez que substâncias isoladas podem alterar suas propriedades na presença de outras substâncias.

A atividade antimicrobiana de óleos essenciais e extratos de plantas medicinais tem sido comprovada em muitos estudos realizados em países com flora diversificada (SILVA et al 2010; CARVALHO 2013), e segundo Degaspari et al. (2004), todas as partes da *Schinus terebinthifolius* são medicinais e várias dessas propriedades estão associadas a presença de polifenóis na planta, como apigenina, ácido elágico e naringina, associados as propriedades antioxidantes.

O presente estudo demonstrou que os microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida parapsilosis*, sofreram ação inibidora frente aos extratos testados. Estudo semelhante de Guerra et al. (2000) demonstrou que extratos de *Schinus terebinthifolius* apresentou inibição bacteriana e fúngica.

Como podemos observar no estudo realizado tanto o óleo essencial quanto o extrato inibiu o crescimento bacteriano do patógeno *Escherichia coli*, corroborando com

Greatti (2014) que demonstrou que os extratos da folha e o óleo essencial de pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius*) inibiram o crescimento da *Escherichia coli*.

Alves et al. (2009) também confirmaram as atividades bacteriostática e bactericida *in vitro* da aroeira frente a *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus sanguis* e *Lactobacillus casei*, e Gundidza et al. (2009) identificou atividade antimicrobiana frente à *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *E. coli*, antifúngica frente à *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* e atividade antioxidante do óleo essencial das folhas de aroeira em diferentes concentrações.

Analisando os resultados desta pesquisa podemos perceber que alguns dos resultados diferem dos demais autores, podendo ser justificado. Gundidza et al. (2009), cita que as diferenças na composição química de *S. terebinthifolius* desenvolvendo-se em diferentes países ou regiões podem justificar as diferenças encontradas quanto as suas atividades antibacteriana, antifúngica e antioxidante. Justificando os resultados diferentes de outros estudos.

## CONCLUSÃO

A partir deste estudo, é possível concluir que o óleo essencial da casca e folha, da *Schinus terebinthifolius* (aoeira vermelha) possui uma pequena atividade antimicrobiana contra os microrganismos *Escherichia coli* (ATCC 13048), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Candida parapsilosis* (ATCC 20019). Já o extrato etanólico obtido da planta, houve inibição em todos os microrganismos testados.

## AGRADECIMENTO

Aos técnicos dos Laboratórios de Biologia da Universidade do Vale do Sapucaí pelo apoio ao realizar este trabalho, José Donizeti Reis, Hellen Vanessa Pereira e Eliakim José de Souza Lopes.

## REFERÊNCIAS

ALANGADEN, G., 2011. Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control and prevention. *Infection Disease Clinics of North America*, vol. 30, n. 4, pp. 1023-1052.

ALVES, P.M.; QUEIROZ, L.M.G; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S.V., 2009. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais

brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 42, n.2, pp. 222-224.

ASCHBACHER, P. W. Distribution and fate of growth-promoting drugs. In: HATHCOCK, J. N. and COON, J. (Ed.), 1978. *Nutrition and drugs interrelations*, New York: Academic Press, 886 p.

BONETT, L.P.; MULLER, G.M.; WESSLING, C.R. et al., 2012. Extrato etanólico de representantes de cinco famílias de plantas e óleo essencial da família Asteraceae sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* coletados de frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.). *Revista Brasileira de Agroecologia*, Paraná; [s.v.: s.n] pp.116-125.

DEGASPARI, C.H. 2004. *Propriedades antioxidantes e antimicrobianas dos frutos da aroeira – *Schinus terebinthifolius* Raddi*. Paraná: Programa de pós-graduação em tecnologia de alimentos – Universidade Federal do Paraná, 100 p. Tese de Doutorado.

FRANCO, B.D.G.M and LANDIGRAF, M., 2002. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: editora Atheneu, 182 p.

GREATTI, V.R. et al., 2014. Avaliação da atividade antibacteriana "in vitro" da aroeira (*Schinus Terebinthifolius*) e da canela (*Cinnamomum Zeylanicum*) frente a linhagens Gram positivas e Gram negativas. *Salusvita*, v. 33, n. 3, p. 345-354.

GUERRA, M.J.M.; BARREIRO, M.L.; RODRIGUEZ, Z.M.; RUBALCABA, Y., 2000. Actividad antimicrobiana de um extracto fluido al 80% de *Schinus terebenthifolius* Raddi (copal). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, v.5, n.1, p.23-25.

GUNDIDZA, M. et al., 2009. The chemical composition and biological activities of essential oil from the fresh leaves of *Schinus terebinthifolius* from Zimbabwe. *African Journal of Biotechnology*, v. 8, n. 24, p 7164-7169.

JANSEN, A.M.; SCHEFFER, J.J.C.; BAERHEIM S.A., 1987. Antimicrobial activity of essential oils from Greek Sideritis species, *Pharmazie*, v. 45, p. 70-71.

LOWRY, F.D., 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine*, v.339, p.520-532.

PATTERSON, M.F.A., 2005. Review. Microbiology of pressure treated foods. *Journal of Applied Microbiology*, v. 98, n. 6, p. 1400-1409.

SILVA, A.B. et al., 2010. Antibacterial activity, chemical composition, and cytotoxicity of leaf's essential oil from brazilian pepper tree (*schinus terebinthifolius*, raddi). *Brazilian Journal of Microbiology*, v.41, p. 158-163.

## Identificação, por desreplicação, de ácidos orgânicos produzidos por *Fusarium oxysporum*

Natália Carolina Vieira<sup>1\*</sup>; Ian Castro-Gamboa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Química – UNESP – Campus de Araraquara \*e-mail :vieira\_naty@hotmail.com

### RESUMO

Atualmente os micro-organismos recebem grande atenção por serem fontes de produção de produtos naturais. Neste contexto, a desreplicação é uma técnica de trabalho que nos auxilia na identificação de compostos, pertencentes a extratos brutos, sem a necessidade de isolamento. Nesse trabalho tivemos como foco a técnica CG-EM para identificar metabólitos produzidos pelo fungo *Fusarium oxysporum* isolado da rizosfera de *Senna spectabilis*. O estudo por CG-EM nos trouxe a possibilidade de identificação de quatro ácidos orgânicos produzidos por ele com auxílio de bases de dados específicas. O extrato bruto do fungo foi derivatizado e analisado por CG-EM e, os metabólitos encontrados tiveram seus índices de retenção comparados com as bases de dados NIST e GMD. E também foi realizado um estudo dos perfis de fragmentação desses compostos.

**Palavras-chave:** Produtos naturais; *Senna spectabilis*; CG-EM; rizosfera;

**Identification, by dereplication, of organic acids produced by *Fusarium oxysporum***

### ABSTRACT

Currently microorganisms receive great attention because they are sources of production of natural products. In this context, dereplication is a technique that assists in the identification of compounds within a crude extract without requiring isolation. In this work we focused on GC-MS data to identify metabolites produced by *Fusarium oxysporum*, a fungus isolated from the rhizosphere of *Senna spectabilis*. The study by GC-MS brought us the possibility of identifying four organic acids produced by it with the aid of specific databases. The crude extract of the fungus was derivatized and analyzed by GC-MS, and the detected metabolites had their retention indexes compared to the NIST and GMD databases. A study of the fragmentation pathways obtained for these compounds was also carried out.

**Keywords:** Natural products; *Senna spectabilis*; GC-MS; rhizosphere;

### INTRODUÇÃO

Os fungos são inseridos dentro da química de produtos naturais como fonte de produção de metabólitos primários e secundários importantes industrialmente. Mas, atualmente apenas cerca de 1% dos micro-organismos podem ser estudados devido à dificuldade de cultivá-los por técnicas laboratoriais. Porém, existem inúmeros metabólitos biologicamente ativos e eficazes contra diversas doenças, produzidos por

micro-organismos capazes de serem cultivados (Newman and Cragg, 2013). Partindo dessa premissa e, devido à alta atividade biológica evidenciada na planta *Senna spectabilis*, principalmente relacionada aos seus alcalóides piperidínicos (Silva et al. (2010)) surgiu o interesse em estudar micro-organismos relacionados a sua rizosfera de forma a tentar descobrir alguma relação dos metabólitos produzidos por seus micro-organismos que expliquem alguma co-relação com a biossíntese desses metabólitos na planta. Dentre os micro-organismos isolados de sua rizosfera, *Fusarium oxysporum* foi um dos fungos em estudo neste trabalho. Ele encontra-se comumente no solo sendo conhecido por ser patógeno a plantações, causando prejuízos à agricultura (Gordon and Martyn, 1977). O gênero *Fusarium* é também capaz de ser patógeno ao ser humano (Antequera et al.(2015)). Mas apesar de toda sua patogenicidade, espécies de *Fusarium* são muito conhecidas por produzirem compostos com atividades biológicas promissoras (Mahapatra and Banerjee (2012)). Esse contexto torna esse gênero importante como fonte de estudos, o que nos inspirou a desenvolver e aplicar a desreplicação de seu extrato. A desreplicação é uma técnica que ajuda a diferenciar, dos extratos de alta complexidade os compostos já conhecidos daqueles possíveis compostos desconhecidos e interferentes sem a necessidade de isolamento (Lang et al., 2008). Para tanto, várias técnicas combinadas de separação e detecção são utilizadas, visando à comparação dos conjuntos de dados obtidos com bases de dados (Cordell et al., 1996).

## MATERIAIS E MÉTODOS

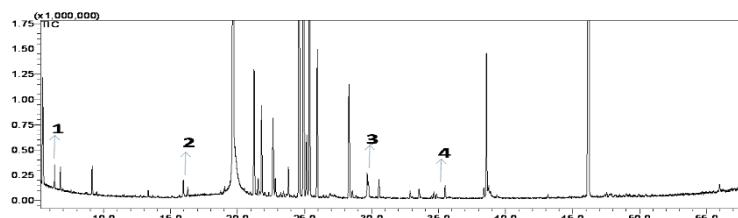
O fungo foi cultivado em meio líquido czapek (previamente autoclavado) e incubado a 25°C durante 28 dias em modo estático. Após esse período, seu micélio foi filtrado e o meio aquoso submetido a uma extração líquido-líquido com acetato de etila. O extrato foi então concentrado em rotaevaporador a pressão reduzida. O extrato bruto foi derivatizado para sua análise por CG-EM: Metoximação: 5-10mg da amostra foram solubilizados em 80 $\mu$ l de uma solução de metoxiamina em piridina (20mg/ml) adicionou-se mais 100 $\mu$ l de piridina e aqueceu-se em banho-maria a 30°C por 90min.Sililação: Na amostra metoximada adicionou-se 200 $\mu$ l de MSTFA e aqueceu-se a 37°C/30min.A amostra foi então filtrada com microfiltro de 0,22 $\mu$ m e transferida para vial com *insert*. Para as análises por CG-EM utilizou-se cromatógrafo a gás Shimadzu QP-2010 com interface com um espectrômetro de massas. A coluna utilizada foi a EN5MS (30 m x 0,25  $\mu$ m x 0,25 mm). A temperatura do forno foi: 120 °C (3 min), 3 °C/min, 320 °C (10 min) até 79.67 min. A temperatura do injetor foi 260 °C. Modo de

injeção: *splitless/split* (Grob). Gás de arraste: hélio. Condições EM: temperatura da fonte de íons e interface de 250 °C, modo de IE a 70 eV, faixa das massas de *m/z* 40-600 u. Utilizou-se o software Shimadzu *GCMS solution Ver. 2.61*, os índices de retenção foram calculados pela equação de Van den Dool e Kratz, utilizando um padrão de hidrocarbonetos analisados nas mesmas condições dos extratos, que em seguida foram comparados com as bases de dados NIST e GMD.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 mostra o cromatograma de íons totais para o extrato bruto derivatizado de *Fusarium oxysporum*. E a tabela 1 mostra as informações dos ácidos orgânicos identificados. Pode-se observar uma diferença, entre o índice de retenção calculado e os disponíveis na base de dados, muito pequena, confirmando as estruturas, bem como seus perfis de fragmentação. As figuras 2-6 ilustram as propostas de fragmentação dos metabólitos.

**Figura 1**–Cromatograma de íons totais do extrato bruto do fungo *Fusarium oxysporum*.

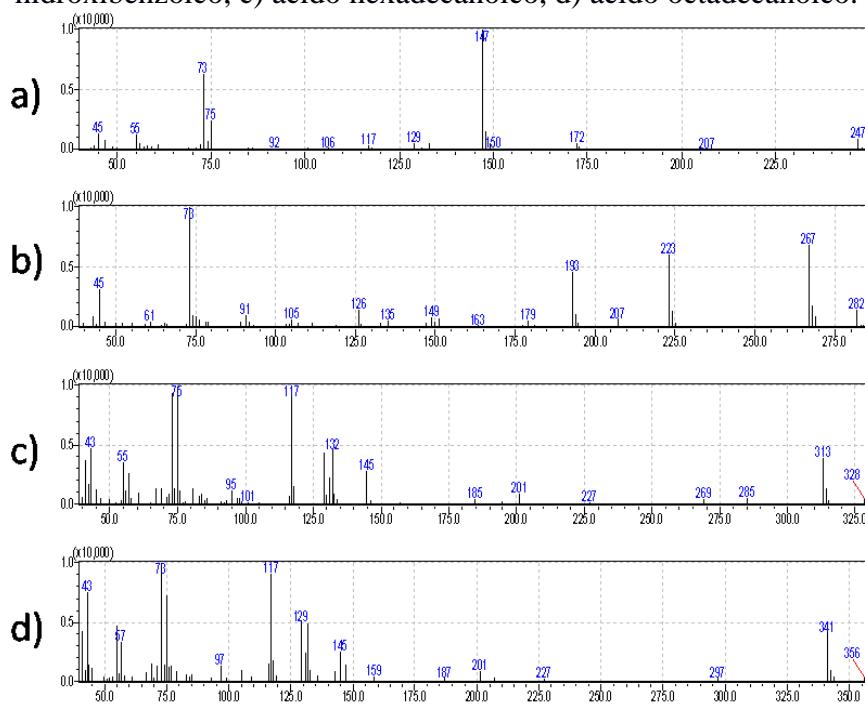


**Tabela 1** - Dados CG-EM para o fungo *Fusarium oxysporum*.

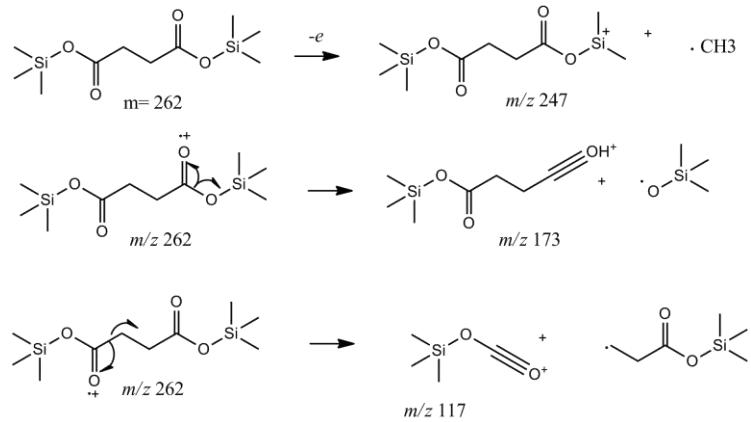
Tr	IR (Literatura)	IR (calculado)	ΔIR	Composto	Fragmentos <i>m/z</i>	Similaridade com o software (%)
<b>6.336</b>	1314	1304,533	9,466	(1) ácido butanodióico	117; 173; 247	93
<b>15.963</b>	1629	1623,887	5,113	(2) ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	193; 267	91
<b>29.682</b>	2053	2043,883	9,117	(3) ácido hexadecanóico	117; 201; 285; 313	90
<b>35.491</b>	2248	2241,708	6,292	(4) ácido octadecanóico	117; 145; 201; 341	84

IR: Índice de retenção; Tr: Tempo de retenção.

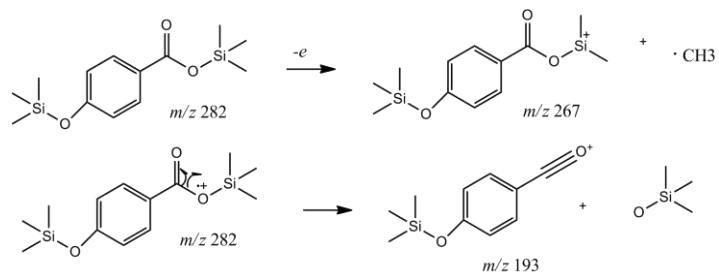
**Figura 2**–Fragmentogramas dos compostos silificados a) ácido butanodióico, b) ácido p-hidroxibenzóico, c) ácido hexadecanóico, d) ácido octadecanóico.



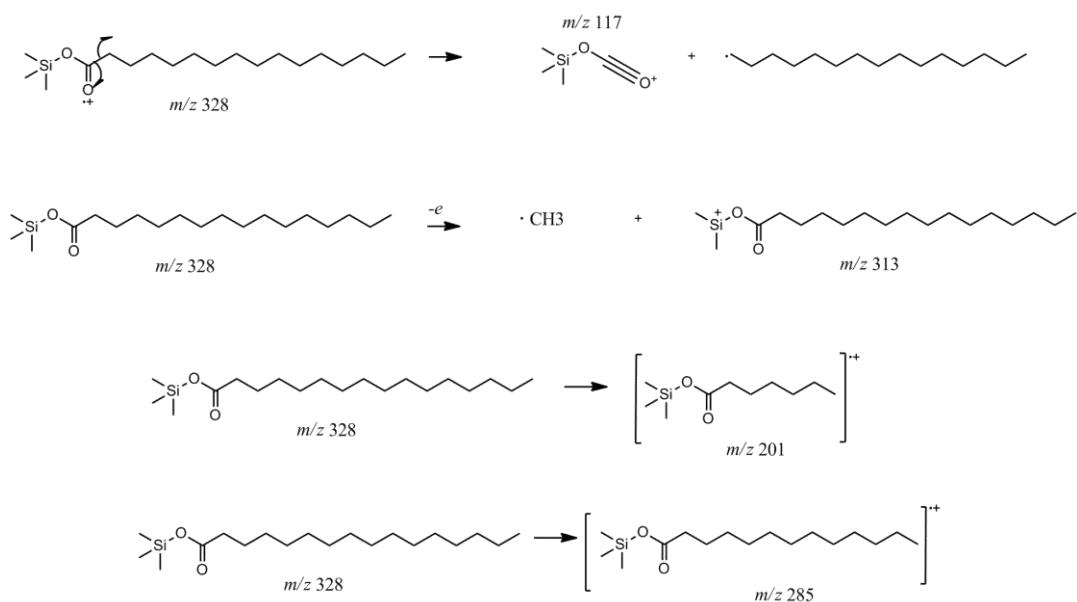
**Figura 3**- Proposta de fragmentação do ácido butanodióico siliado.



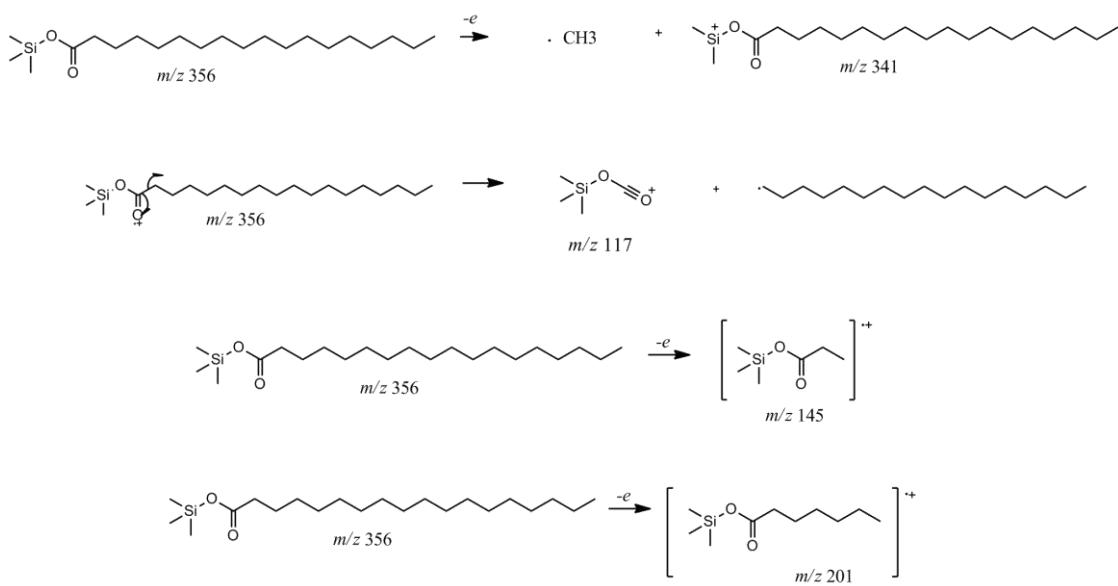
**Figura 4** - Proposta de fragmentação do ácido *p*-hidroxibenzóico siliado.



**Figura 5** - Proposta de fragmentação do ácido hexadecanóico siliado.



**Figura 6** - Proposta de fragmentação do ácido octadecanóico siliado.



## CONCLUSÕES

Técnicas acopladas como CG-EM associadas a bases de dados são capazes de nos ajudar a identificar metabólitos em uma matriz complexa sem a necessidade prévia de isolamento, como sugere a técnica de desreplicação. Porém o grande desafio do estudo por desreplicação em extrato de micro-organismos são as bases de dados que ainda não contemplam informações suficientes sobre metabólitos relacionados a essas fontes.

Essas bases acomodam, em sua grande maioria, metabólitos de plantas, sendo esse o grande desafio a vencer para o estudo de micro-organismos.

## REFERÊNCIAS

- ANTEQUERA, P.; GARCIA-CONCA, V.; MARTÍN-GONZÁLEZ, C.; ORTIZ-DELATABLA, V., 2015 Queratitis por *Fusarium* multirresistente. *Archivos de La Sociedad Española de Oftalmología*, vol. 90, no. 8, pp. 382-384. <http://dx.doi.org/10.1016/joftal.2014.04.008>
- CORDELL, G. A.; BEECHER, C. W. W.; KINGHORN, A. D.; PEZZUTO, J. M.; CONSTANT, H. L.; FANG, L.; SEO, E. K.; LONG, L.; CUI, B. L.; BARRILOS, K. S., 1996. The dereplication of plant – derived natural products. *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 19, pp. 749-79. [http://dx.doi.org/10.1016/S1572-5995\(96\)80018-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1572-5995(96)80018-4)
- GORDON, T. R. AND MARTYN, R. D., 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual review of phytopathology*, vol. 35, no. 1, pp. 111-128. <http://dx.doi.org/10.1146/ANNUREV.PHYTO.35.1.111>
- MAHAPATRA, S. and BANERJEE, D., 2012. Structural elucidation and bioactivity of a novel exopolysaccharide from endophytic *Fusarium solani* SD5. *Carbohydrate Polymers*, vol. 90, pp. 683-689. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.097>
- NEWMAN, D. J. and CRAGG, G. M., 2013. Natural products a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1830, no. 6, pp. 3670-3695. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>
- SILVA, D. H. S.; VIEGAS JUNIOR, C.; SANTOS, L. A.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. da S.; PIVATTO, M.; YOUNG, M. C. M.; CASTRO, N. G.; ROCHA, M. S.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J., 2010. Espectralina, cassina e análogos semissintéticos como potenciais candidatos a fármacos para o tratamento da doença de Alzheimer. *Revista Virtual de Química*, vol. 2, no. 1, pp. 38-46. <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20100005>

## Ação da temperatura durante o processo fermentativo

Nislene Pires dos Santos<sup>1</sup>, Margareth Batistote<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Pós-Graduação de Recursos Naturais. \*Nislene5@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Docente de Química Industrial.

---

### RESUMO

A produção do etanol no Brasil é derivada de tecnologias de primeira geração, onde a sacarose extraída da cana de açúcar é fermentada por leveduras para produção de etanol. Este estudo visou avaliar a capacidade fermentativa e a produção de bioetanol de leveduras industriais em diferentes temperaturas. Foi utilizado o meio YPD esterilizados como pré-inóculo a 30°C por 10 horas. Após o crescimento foi feito a recuperação da biomassa por centrifugação, a qual foi utilizada nos ensaios fermentativos que foram realizados em mosto e incubados nas temperaturas de 30 e 40°C, alíquotas foram retiradas para análise dos parâmetros fermentativos como viabilidade, biomassa açúcar residual, e etanol em diferentes tempos de fermentação. A levedura Red Star apresentou queda da viabilidade e biomassa, quando cultivada a 40°C. Em relação a produção de etanol a levedura Red Star obteve a maior produção de etanol na temperatura de 40°C, já a catanduva-1 mostrou ser sensível a ação da temperatura, propiciando uma perda na capacidade fermentativa.

**Palavras-chave:** fermentação; mosto; microrganismo

### Temperature action during the fermentation process

### ABSTRACT

The Brazil's ethanol is produced by means of first generation technologies that utilize sucrose extracted from sugarcane fermented by yeast in the process of production. This study aims was to analyze the fermentative capacity and bioethanol production of industrial yeasts at different temperatures. Was utilized YPD medium sterilized as pre-inoculum at 30°C for 10 hours. After the growth, biomass recovery was performed by centrifugation, which was used in the fermentation tests that were made in must and incubated at temperatures of 30 and 40°C, and aliquots of this material was used for obtaining parameters such as viability, biomass, sugar Residual, and ethanol at different fermentation times. The Red Star yeast presented viability drop and biomass when grown at 40°C. In relation to ethanol production, the Red Star yeast obtained the highest ethanol production at 40°C, and Catanduva-1 showed to be sensitive to the temperature action, leading to a loss in fermentation capacity.

**Keywords:** fermentation, must; microorganism

---

### INTRODUÇÃO

O etanol é uma fonte de energia renovável que compõe a matriz energética do Brasil, na qual é o segundo maior produtor de etanol ficando atrás apenas dos Estados Unidos sendo que acordo com Leite and Leal (2007). A indústria de produção etano e

açúcar compõe 2,3% da Produto Interno Bruto (PIB), sendo responsável por gerar 4,5 milhões de empregos no país. Ainda o etanol combustível representa quase 50% do volume total de combustível consumido por carros (Basso et al., 2011).

A produção do etanol brasileiro é derivada de tecnologias de primeira geração, onde uma simples fonte de açúcar, proveniente da extração da cana de açúcar, a sacarose, é fermentada por leveduras como produto primário o etanol (Brow et al., 2013). Entre diversos microrganismos produtores de etanol destaca *Saccharomyces cerevisiae* (Ma and Liu, 2010). No entanto para o sucesso de uma fermentação bem sucedida garantindo o bom rendimento e um produto de qualidade, faz-se necessário conhecer o perfil fermentativo das linhagens de leveduras com potencial biotecnológico para a produção de etanol.

Diante do contexto o estudo visa avaliar o perfil fermentativo de linhagens de leveduras indústrias cultivada em mosto a base de caldo de cana na concentração de 22°Brix em diferentes temperaturas, bem como avaliar a produção de biomassa, viabilidade celular, consumo de açúcar e produção de etanol.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para o preparo do pré-inoculo, foi utilizado o meio YPD 2%, contendo (1,0% (m/p<sup>-1</sup>) de extrato de levedo; 1,0% (m/p<sup>-1</sup>) de peptona; 2,0% (m/p<sup>-1</sup>) glicose), com pH ajustado para 5,0 (ácido clorídrico 1N), esterilizados em autoclave 120°C por 20 minutos. Para o inoculo utilizou 0,10g de leveduras liofilizadas, Catanduva-1 e Red Star, os frascos de erlenmeyers contendo as leveduras foram incubados em “shaker” por 10h na temperaturas de 30°C a 250 rpm. Após o crescimento as células, foram coletadas centrifugadas a (800g, 20min), ressuspensida e lavadas por três vezes consecutivas em solução salina (0,85%) estéril, a uma concentração de 10 mg/mL massa úmida.

A fermentação foi realizada em mosto, o qual foi calibrado com o auxílio de um sacarímetro na concentração de 22°Brix sem correção do pH, em frascos de erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL do substrato estéril. A biomassa obtida foi reinoculada no meio fermentativo e incubada em “Shaker” a 250 rpm nas temperaturas de 30°C e 40°C, em diferentes tempos de fermentação, alíquotas foram retiradas para análise dos parâmetros fermentativos. As análises do crescimento celular foram realizadas através de medidas espectrofotométricas a 570nm, correlacionada com curva de calibração. A determinação da viabilidade celular foi acompanhada através do método de coloração com azul de metileno (Lee et al., 1981). O Consumo dos açúcares redutores totais (ATR)

foi determinado através do método do ácido 3,5 – dinitrosalicílico – DNS (Miller, 1959).

A concentração do etanol foi determinada no cromatógrafo a gás CG 3900 com detector de ionização de chama (Varian), utilizando uma coluna capilar de sílica fundida de 30m de comprimento (ZB-5). A condição cromatográfica empregada foi: volume de injeção 1 $\mu$ L, razão de split 1:20 e temperatura do forno de 90°C. As temperaturas do injetor do detector foram de 240°C. As amostras foram filtradas em ultrafiltra de 0,22 $\mu$ m.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

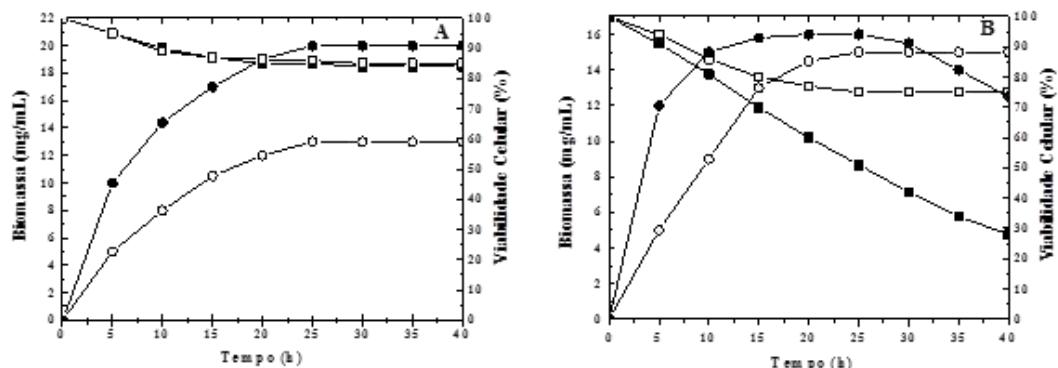
Na análise dos parâmetros fermentativos os dados mostraram-se semelhante na avaliação da viabilidade celular, na qual as leveduras Catanduva-1 e Red Star apresentaram uma taxa de viabilidade em torno de 85%, para a avaliação da biomassa a levedura Red Star obteve a maior crescimento de 20 mg/mL no transcorrer do tempo de 25 horas de fermentação, enquanto a Catanduva-1 a apresentou a menor produção de 13 mg/mL no mesmo tempo de fermentação, na temperatura de 30°C (Figura A).

No entanto na temperatura de 40°C as leveduras apresentaram uma cinética de crescimento diferente. Na qual a Catanduva-1 obteve a maior taxa de viabilidade celular de 75%, e a linhagem Red Star apresentou uma queda na viabilidade ficando em torno de 28%. Quanto a produção de biomassa, a levedura Catanduva-1 obteve uma produção de 15 mg/mL no tempo de 25 horas de fermentação enquanto, entretanto a levedura Red Star apresentou a maior produção de 16 mg/mL no tempo de 20 horas de fermentação, porém apresentando uma queda de 12 mg/mL no tempo de 60 horas de fermentação (Figura B). Os dados mostraram que na temperatura de 30°C as linhagem estudadas apresentaram uma performance fermentativa eficiente, no entanto na temperatura de 40°C, as leveduras apresentaram queda nos parâmetros fermentativos analisados em destaque para a linhagem Red Star, mostrando ser sensível a alta temperatura.

Estudos realizados por Ramos et al. (2013), utilizando sessenta e seis cepas de *Sacchormyces cerevisiae* isoladas de destilaria e de frutas, avaliaram a influência das temperaturas sobre as leveduras (30°, 37° e 42°C). Os resultados apresentaram dois grupos de leveduras, um grupo composto por vinte e uma cepas as quais se mostraram mais resistentes as condições submetidas, e quarenta e cinco cepas de leveduras se mostraram mais sensível a temperatura mais elevada (42°C). Segundo Batistote et al. (2010), as temperatura ideais para a fermentação industrial ocorrem entre a faixa de 30°

e 40°C. No entanto as temperaturas elevadas pode acarretar em perda da viabilidade celular e biomassa, podendo comprometer o rendimento fermentativo.

**Figura 1:** Avaliação dos parâmetros fermentativos da levedura Catanduva-1, sendo representados pelos símbolos, abertos (□) viabilidade celular e (○) biomassa e Red Star fechado (■) viabilidade celular e (●) biomassa, nas temperaturas de 30°C (A) e 40°C (B), em diferentes tempos de fermentação.



A avaliação da produção de etanol e o consumo de açúcar em diferentes temperaturas e tempo de fermentação estão apresentados na (tabela 1). Os dados mostram que a linhagem Red Star cultivada na temperatura de 40°C apresentou a maior produção de etanol de 5,0% (v/v) e o menor consumo de açúcar em 40 horas de fermentação. A Catanduva-1 apresentou uma pequena perda na produção de etanol de 1,0 (v/v) em relação a temperatura de 40°C mostrando ser mais sensível a ação do estresse celular nas condições analisadas.

Em resultados apresentados por Moreira et al. (2015), leveduras industriais cultivadas em mosto a base de caldo de cana nas concentrações de Brix (12°, 15°, 24° e 30°) na temperatura de 30°C, obtiveram maior produção de etanol na concentração de 15° Brix (8,5% (v/v)). Em nossos estudos, possivelmente o tempo prolongado de fermentação tenha afetado o rendimento fermentativo das leveduras, levando a uma queda da produção de etanol.

**Tabela 1:** Valores médios para produção de etanol e consumo de açúcar em mosto a base de caldo de cana na concentração de 22° Brix em diferentes temperaturas.

Linhagens	Tempo de Fermentação (h)	Etanol (%)	Açúcar Residual (%)
Temperatura de 30°C			
Catanduva-1	20	3,2	33
	40	4,5	10
Red Star	20	3,0	40
	40	5,0	10
Temperatura de 40°C			
Catanduva-1	20	2,8	35
	40	3,5	10
Red Star	20	3,0	35
	40	5,0	10

## CONCLUSÕES

Na avaliação dos parâmetros fermentativos analisados as leveduras apresentaram semelhança quando cultivada na temperatura de 30°C, no entanto a levedura Red Star mostrou-se mais sensível quando exposta à temperatura de 40°C, acarretando em perda de viabilidade, apesar perda dos parâmetros analisados na temperatura de 40°C. A levedura Red Star obteve da maior produção de etanol nesta temperatura, consumindo praticamente todo o substrato do meio. A levedura catanduva-1 mostrou ser sensível a ação da temperatura, propiciando uma perda na capacidade fermentativa, apesar de apresentar maior resistência à temperatura mais elevada.

## REFERÊNCIAS

- BASSO, T.O.; KOK, S.; DARIO, M.; ESPÍRITO-SANTO, J.C.A.; MULHER, G.; SCHLONG, P.S.; SILVA, C. P.; TONSO, A.; DARAN, J.; GOMBERT, A.K, MARIS, A.J.A.V, PRONK, J.T. and STAMBUK, B.U., 2011. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. *Metabolic Engineering*, vol. 13, no. 6, pp. 694–703. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2011.09.005>.
- BATISTOTE, M.; CARDOSO, A. C.; ERNANDES. J. R. and DOFFINGER, R. D., 2010. Desempenho de leveduras obtidas em indústrias do Mato Grosso do Sul na produção de etanol em mosto à base de caldo de cana. *Revista Ciência e Natura*, vol. 32, no. 2, pp. 83-95. <http://dx.doi.org/10.5902/2179460X9487>.
- BROWN, N.A.; CASTRO, P.A.; FIGUEIREDO, B.C.P.; SAVOLDI, M.; BUCKERIDGE, M.S.; LOPES. M.L.; PAULLILO, S.C.L.; BORGES, E.P.; AMORIM, H.V.; GOLDMAN, M.H.S.; BONATTO, D.; MALAVAZI, I. and GOLDMAN, G.H., 2013. Transcriptional profiling of Brazilian *Saccharomyces cerevisiae* strains

selected for semi-continuous fermentation of sugarcane must. *FEMS Yeast Research*. vol. 13, no. 3, pp. 277-290. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12031>.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M. and WANG, H. Y., 1981. Rapid determination of yeast viability. *Biotechnology Bioengineering Symposium*, vol. 11, no.11, pp. 641-649.

LEITE, R. C. C. and LEAL, M. R., 2007. O biocombustível no Brasil. *Novos estudos-CEBRAP*, no. 78, pp. 15-21. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-33002007000200003>.

MILLER, G. L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, vol. 31, no. 3, pp. 426-428. <http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030>.

MA, M. and LIU, Z.L., 2010. Mechanisms of ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 87, no .3, pp.829-845. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2594-3>.

MOREIRA, S. C.; SANTOS. M. S. M.; BARROS, N.S.; CARDOSO, A. C. and BATISTOTE, M., 2015. Análise dos parâmetros morfofisiológicos de linhagens de leveduras industriais com potencial biotecnológico para a produção de etanol. *Ciência e Natura*, vol. 37, no. 4, pp. 55-63. <http://dx.doi.org/105902/2179460X18107>.

RAMOS, C. L.; DUARTE, W.F.; FREIRE, A.L.; DIAS, R.D.; ELEUTHERIO, E.C.A. and SCHWAM, R.F., 2013. Evaluation of stress tolerance and fermentative behavior of indigenous *Saccharomyces cerevisiae*, *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 44, no. 3, pp. 935-944. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-8382201300500005>.

## **Atividade antibacteriana de filmes de gelatina e zeólita clinoptilolita-Ag**

Patricia Hubner<sup>1\*</sup>; Nicoly Donati<sup>1</sup>; Luci Kelin de Menezes Quines<sup>1</sup>; Isabel Cristina Tessaro<sup>2</sup>; Nilson Romeu Marcialio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Processamento de Resíduos (LPR), Departamento de Engenharia Química (DEQUI), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

<sup>2</sup>Laboratório de Separação por Membranas (LASEM), Departamento de Engenharia Química (DEQUI), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

\*e-mail (autor para correspondência): phubner@enq.ufrgs.br

### **RESUMO**

Curativos utilizados no tratamento de feridas crônicas e queimaduras devem apresentar características antimicrobianas. Compostos de prata são utilizados há muito tempo como antissépticos, mas apresentam alguns problemas relacionados à sua forma de liberação. A fim de controlar essa liberação, os íons Ag<sup>+</sup> podem ser imobilizados em suportes, como por exemplo, zeólitas naturais, que por sua vez devem estar dispersas em um filme polimérico. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a propriedade antibacteriana de filmes produzidos à base de gelatina, adicionados de zeólitas impregnadas com íons prata. Os filmes foram produzidos por técnica de *casting*, com 10 % (m/v) de gelatina, 25 % (v/v) de glicerol e diferentes concentrações de zeólitas. Então, foi realizado um ensaio antibacteriano de difusão em placas de Petri com a bactéria *Staphylococcus aureus* e uma amostra de filme disposta sobre a bactéria espalhada em ágar PCA, de forma a verificar a atividade antibacteriana dos filmes produzidos. Os resultados demonstraram que a ação antibacteriana é devida aos íons prata e que os filmes que contêm concentrações iguais ou superiores a 0,5 % de clinoptilolita-Ag apresentam atividade antibacteriana. Dessa forma, conclui-se que os filmes têm potencial para serem utilizados como curativos.

**Palavras-chave:** filmes, gelatina, glicerol, clinoptilolita, prata.

### **Antibacterial activity of gelatin and clinoptilolite-Ag zeolite films**

### **ABSTRACT**

Dressings used for wound and burn treatment may present antimicrobial characteristics. Silver compounds are used for many years as antisepsics, but have some problems related to its liberation form. In order to control the Ag<sup>+</sup> release, ions may be immobilized into supports, for example, natural zeolites that may be scattered in a polymeric film. Therefore, this work aim to evaluate the antibacterial property of gelatin based films that contain zeolites impregnated with silver ions. The films were produced by casting technique with gelatin 10 % (w/v), glycerol 25 % (v/v) and different zeolite concentrations. So, it was realized an antibacterial test of Petri plates diffusion with *Staphylococcus aureus* bacteria and a film sample was disposed on the scattered bacteria on the agar PCA surface, aiming to evaluate the antibacterial activity of produced films. The results demonstrate that the antibacterial action is due to the silver ions and films containing concentrations equal or higher than clinoptilolite-Ag 0.5 %

showed antibacterial activity. Thus, concludes that the films have potential to be used as dressings.

**Keywords:** films, gelatin, glycerol, clinoptilolite, silver.

---

## INTRODUÇÃO

A utilização de compostos de prata como antissépticos é explorada há muito tempo, tanto para fins medicinais quanto para aplicação em embalagens, mas emergiu recentemente como um composto viável para o tratamento de infecções em feridas abertas, queimaduras e úlceras crônicas (Marx, Barillo 2014; Santos 2014). No entanto, são encontrados alguns problemas nesses tratamentos, como a dificuldade de controlar a liberação desses íons, a ocorrência de manchas na pele e a necessidade frequente de remoção e reaplicação de medicamentos como o creme dermatológico sulfadiazina de prata, amplamente utilizado em queimaduras suscetíveis a infecções (Barbosa et al., 2016; Fajardo et al., 2013; Jeong et al., 2014). Devido a essas dificuldades, muitas pesquisas estão sendo realizadas acerca da utilização de suportes de liberação controlada da  $\text{Ag}^+$ , tais como partículas porosas e filmes. Dentre esses se destacam as zeólicas e os filmes de biopolímeros biodegradáveis que atuam como matrizes poliméricas para essas partículas (Barbosa et al., 2016; Yassue-Cordeiro et al., 2015).

As zeólicas apresentam potencial para serem utilizadas nesse tipo de aplicação, principalmente em decorrência das suas propriedades, tais como alta porosidade, estabilidade térmica e química, elevada área superficial e capacidade de troca iônica (Auerbach, Carrado, Dutta 2003; Luz 1995). A gelatina, por sua vez, é um biopolímero biodegradável de alta massa molar, obtida através da hidrólise do colágeno, que apresenta boas propriedades funcionais, baixo custo e é abundantemente disponível (Keenan 1998; Mark 2013). Por ser uma proteína, a gelatina apresenta vasta diversidade molecular em sua composição e, em virtude dessa diversidade, pode ocorrer à formação de diferentes ligações químicas (Mark 2013; Bailey, Paul 1998; Hanani 2016). Além disso, as suas propriedades, tais como capacidade de formação de gel e filmes, capacidade de absorção de água e capacidade de emulsificação, são favoráveis para sua aplicação no desenvolvimento de filmes (Fan, Yang, Yang, Peng, Hu 2016; Taylor, Djagny, Wang, Xu 2010).

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho é avaliar a atividade antimicrobiana de filmes à base de gelatina, com a adição de zeólicas impregnadas com íons prata para a liberação controlada de  $\text{Ag}^+$  diretamente no local de interesse.

## MATERIAL E MÉTODOS

A preparação dos filmes foi feita hidratando a gelatina na concentração de 10 % (m/v) em água destilada a temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, a solução foi aquecida a 45 °C e mantida sob agitação a 200 rpm em shaker por 30 minutos, adicionou-se o plastificante glicerol na concentração de 25 % (v/v) e a solução foi novamente agitada, nas mesmas condições anteriores, por mais 15 minutos para ocorrência das reações de plastificação. Por fim, foi adicionada a zeólita clinoptilolita impregnada com aproximadamente  $15,5 \text{ mg}_{\text{Ag}^+} \text{ g}_{\text{zeólita}}^{-1}$  à solução formadora de filme, nas concentrações de 0,1, 0,5, 1, 3 e 5 % (m/v) (Barbosa et al., 2016, Santos, 2014, Boschetto, 2009). Além disso, este ensaio antibacteriano foi feito, também, com um filme contendo 10 % de gelatina e 25 % de glicerol sem zeólitas, e com um filme contendo 5 % (m/v) de zeólita clinoptilolita não impregnada com íons prata.

Após a preparação, a suspensão formadora de filme foi disposta em placas de Petri (d = 9 cm) mantendo uma gramatura constante de 20 gramas (Hosseini et al., 2015, 2016) e submetida à secagem em estufa de circulação forçada de ar DeLeo A3-DL-SED (DeLeo Equipamentos Laboratoriais, BR) a 35 °C por 24 horas (Martucci et al., 2012). Após a secagem, os filmes foram armazenados em câmara de umidade controlada contendo solução saturada de nitrato de magnésio.

Para a avaliação da atividade antibacteriana dos filmes, utilizou-se a bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e foram suspensas alçadas da bactéria em solução 0,1 % (m/v) de peptona bacteriológica (BD Biosciences, US). A suspensão bacteriana foi homogeneizada em vórtex K45-2810 (Kasvi, BR) e 0,1 mL foram espalhados em placas de Petri contendo ágar PCA (Plate Count Agar, Merck Millipore, DE) previamente preparado e solidificado. Após a dispersão da solução bacteriana nas placas com ágar, uma amostra circular com 3 cm de diâmetro de cada um dos filmes preparados foi colocada no centro de cada placa de Petri e estas foram incubadas em incubadora BOD (Biochemical Oxygen Demand) Tecnal TE381 (Tecnal Equipamentos Científicos, BR) a 30 °C por 48 horas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio antibacteriano realizado para os filmes de gelatina teve como objetivo avaliar a quantidade de clinoptilolita-Ag necessária para que o filme apresentasse atividade antimicrobiana. Assim, as concentrações de zeólita a serem incorporadas aos

filmes foram selecionadas de acordo com a literatura, na qual se pode observar que, para os casos em que os autores utilizaram concentrações de zeólita-Ag em torno de 0,1 ou 0,2 % ocorreu fraca inibição bacteriana ou não ocorreu inibição e ainda, na maioria dos casos, a inibição passou a ser percebida ao se utilizar concentrações maiores do que 0,5 % de zeólita-Ag (Boschetto 2009; Fernández et al., 2010; Santos 2014).

Na Figura 1 estão apresentadas as imagens dos resultados dos testes antibacterianos.

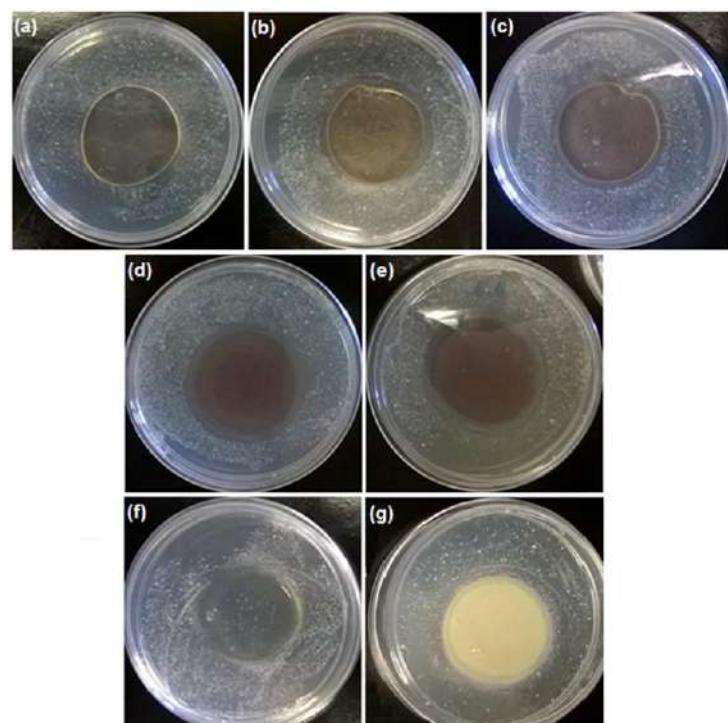


Figura 1 – Ensaios antibacterianos para os filmes com 10 % de gelatina, 25 % de glicerol e (a) 0,1 %, (b) 0,5 %, (c) 1 %, (d) 3 %, (e) 5 % de clinoptilolita-Ag, (f) sem zeólita e (g) 5 % de clinoptilolita.

Pode-se perceber que para os filmes sem zeólitas (Figura 1.f), com clinoptilolita não impregnada com íons  $\text{Ag}^+$  (Figura 1.g) ou para os filmes com 0,1 % de clinoptilolita-Ag na sua composição (Figura 1.a), não ocorre a inibição da bactéria *Staphylococcus aureus*, pois não é formado um halo de inibição bacteriana e há crescimento de colônias da bactéria inclusive sob o filme.

Em contrapartida, para as demais concentrações de clinoptilolita-Ag na formulação do filme (Figura 1.b a Figura 1.e), se percebe a formação de um halo de inibição em torno do filme, porém, não se percebe um aumento no diâmetro deste halo com o aumento da concentração de clinoptilolita-Ag na formulação do filme, pelo contrário, aparentemente os diâmetros são similares. Dessa forma, é possível concluir

que a atividade antibacteriana do filme é devida à presença de íons prata na sua composição e que estes estão sendo liberados da estrutura da zeólita e do filme, agindo como bactericida e, ainda, percebe-se que a atividade antibacteriana ocorre para concentrações iguais ou maiores do que 0,5 % de clinoptilolita-Ag na composição do filme. Entretanto, para as concentrações estudadas, não se observa uma mudança expressiva no diâmetro do halo formado em torno dos filmes, sendo necessária a realização de um ensaio antimicrobiano quantitativo para verificar as diferenças entre a inibição causada por cada uma das concentrações de clinoptilolita-Ag na composição do filme.

## CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos conclui-se que a atividade antibacteriana do filme é devida à presença de íons prata na sua composição e que estes estão sendo liberados da estrutura da zeólita e do filme, agindo como bactericida e, ainda, percebe-se que a atividade antibacteriana ocorre para concentrações iguais ou maiores do que 0,5 % de clinoptilolita-Ag na composição do filme. Os resultados deste estudo demonstram que os filmes de gelatina com clinoptilolita impregnada com íons prata têm potencial para serem aplicados como curativos, atuando como agente antibacteriano.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- AUERBACH, S. M., CARRADO, K. A. and DUTTA, P. K. (eds.), 2003. *Handbook of zeolite science and technology*. Nova York: Marcel Dekker, Inc.
- BAILEY, A. J. and PAUL, R. G., 1998. Collagen: A Not So Simple Protein. *Society of Leather Technologists and Chemists*. 1998. Vol. 82, no. 3, p. 104–110.
- BARBOSA, G. P., DEBONE, H. S., SEVERINO, P., SOUTO, E. B. and SILVA, C. F., 2016. Design and characterization of chitosan/zeolite composite films - Effect of zeolite type and zeolite dose on the film properties. *Materials Science and Engineering C*. 2016. Vol. 60, p. 246–254. DOI 10.1016/j.msec.2015.11.034.
- BOSCHETTO, D. L., 2009. *Filmes de polietileno impregnados com zeólita contendo prata para aplicação em embalagens com propriedades antimicrobianas*. Erechim: Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. 74 p. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos.

- DJAGNY, K. B., WANG, Z. and XU, S. 2010. Gelatin: A Valuable Protein for Food and Pharmaceutical Industries: Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2001. Vol. 6, no. 41, p. 37–41. DOI 10.1080/20014091091904
- FAN, L., YANG, H., YANG, J., PENG, M. and HU, J., 2016. Preparation and characterization of chitosan/gelatin/PVA hydrogel for wound dressings. *Carbohydrate Polymers*. 2016. Vol. 146, p. 427-434. DOI 10.1016/j.carbpol.2016.03.002.
- FERNÁNDEZ, A., SORIANO, E., HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. and GAVARA, R., 2010. Migration of antimicrobial silver from composites of polylactide with silver zeolites. *Journal of Food Science*. 2010. Vol. 75, no. 3. DOI 10.1111/j.1750-3841.2010.01549.x.
- HANANI, Z. A. N., 2016. Gelatin. In: B. CABALLERO, P. M. FINGLAS, F. TOLDRÁ, eds. *Encyclopedia of Food and Health*. Waltham: Academic Press. p. 4006.
- HOSSEINI, S. F., REZAEI, M., ZANDI, M. and FARAHMANDGHAVI, F., 2015. Fabrication of bio-nanocomposite films based on fish gelatin reinforced with chitosan nanoparticles. *Food Hydrocolloids*. 2015. Vol. 44, p. 172–182. DOI 10.1016/j.foodhyd.2014.09.004.
- HOSSEINI, S. F., REZAEI, M., ZANDI, M. and FARAHMANDGHAVI, F., 2016. Development of bioactive fish gelatin/chitosan nanoparticles composite films with antimicrobial properties. *Food Chemistry*. 2016. Vol. 194, p. 1266–1274. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.09.004.
- KEENAN, T. R., 1998. Gelatin. In: A. J. DOMB, J. KOST, D. WISEMAN, eds. *Handbook of Biodegradable Polymers*. Amsterdā: Harwood Academic Publishers. p. 527.
- LUZ, A. B., 1995. *Zeólitas: Propriedades e Usos Industriais*. Rio de Janeiro: CETEM/CNPq. ISBN 8572270523.
- MARK, H. F., 2013. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. 3. Nova York: John Wiley & Sons. ISBN 978-0471288244.
- MARTUCCI, J. F., ACCAREDDU, A. E M and RUSECKAITE, R. A., 2012. Preparation and characterization of plasticized gelatin films cross-linked with low concentrations of Glutaraldehyde. *Journal of Materials Science*. 2012. Vol. 47, no. 7, p. 3282–3292. DOI 10.1007/s10853-011-6167-3.
- MARX, D. E. and BARILLO, D. J., 2014. Silver in medicine: The basic science. *Burns*. 2014. Vol. 40, no. S1, p. S9–S18. DOI 10.1016/j.burns.2014.09.010.
- SANTOS, A. F., 2014. *Produção de filmes ativos a base de amido e zeólita modificada com prata*. Curitiba: Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 44 p. Trabalho de conclusão de curso de Tecnólogo de Alimentos.

## **Avaliação da atividade $\beta$ -glicosídica de fungo isolado da madeira**

Rafaela Castro<sup>1</sup>; Leidilene Andrade<sup>1</sup>; Isabela Corrêa<sup>1</sup>; Thamires Durso<sup>1</sup>; Boutros Sarrouh<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Federal University of São João del Rei, Department of Chemistry, Biotechnology and Bioprocess Engineering.

<sup>2</sup>Federal University of São João del Rei, Post-graduate Program “Technologies for Sustainable Development”

\*e-mail (autor para correspondência): faelasmc@hotmail.com

---

### **RESUMO**

A utilização de processos enzimáticos vem se ampliando no mercado industrial devido ao potencial operacional e sustentável das enzimas. Todavia é necessário a redução do custo de produção. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de produção de  $\beta$ -glicosidases por um fungo filamentoso isolado a partir da casca de madeira, bem como a caracterização desta enzima frente à variação de condições de pH e temperatura. Inicialmente, inoculou-se o fungo em meio líquido mineral enriquecido com CMC 2% (p/v). A atividade  $\beta$ -glicosídica do fungo isolado foi determinada pela técnica de p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (pNP $\beta$ G) 0,001 M em tampão fosfato-citrato 0,1 M pH 5,0. Para a caracterização da atividade enzimática, foram testados os parâmetros de pH e temperatura, os quais variaram de 4 a 8 e de 30 a 70 °C, respectivamente. Após 4 dias de cultivo, obteve-se como resultado atividades enzimáticas máximas de 10,1259 ± 0,3797 U/mL e 51,8370 ± 0,8904 U/mL em pH ótimo de 5,0 e temperatura de 60 °C, respectivamente. Conclui-se que o fungo em estudo apresentou um potencial promissor para a produção da enzima  $\beta$ -glicosidases, a qual possui uma importante aplicação na produção biotecnológica de etanol 2G.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -glicosidase, atividade enzimática, fungo de podridão branca, etanol 2G

---

**Evaluation of the  $\beta$ -glycosidic activity of fungus isolated from wood.**

### **ABSTRACT**

The use of enzymatic processes has been increasing in the industrial market due to the operational and sustainable potential. However, it is necessary to reduce its cost of production. The objective of this work was to evaluate the production capacity of  $\beta$ -glycosidases by a filamentous fungus isolated from the wood bark, as well as the characterization of this enzyme against the variation of pH and temperature conditions. Initially, the isolated fungus was inoculated in a mineral liquid medium enriched with 2% (w/v) CMC. The  $\beta$ -glycosidic activity of the isolated fungus was determined by the 0,001 M p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (pNP $\beta$ G) technique in 0,1 M phosphate-citrate buffer pH 5,0. For the characterization of the enzymatic activity, the parameters of pH and temperature were tested, which varied from 4 to 8 and from 30 to 70 ° C, respectively. After 4 days of cultivation, maximum enzymatic activities of 10,1259 ±

0.3797 U / mL and  $51.8370 \pm 0.8904$  U / mL were obtained at optimum pH of 5.0 and temperature of 60 ° C, respectively. It is concluded that the fungus in study presented a promising potential for the production of the enzyme  $\beta$ -glycosidases, which has an important application in the biotechnological production of 2G ethanol.

**Keywords:**  $\beta$ -glucosidase, enzymatic activity, white rot fungi, ethanol 2G.

---

## INTRODUÇÃO

As celulases desempenham papel essencial na hidrólise da ligação  $\beta$ -1,4-glicosídica da celulose, componente da parede celular das plantas (HENRISSAT, 1991). Elas são classificadas em três grandes grupos de acordo com seu local de atuação: endoglucanases; exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases (LYND et al., 2002). As  $\beta$ -glicosidases, cujo nome sistemático é  $\beta$ -glicosídeo gluco-hidrolase (EC 3.2.1.21), hidrolisam celobiose e oligossacarídeos solúveis com grau de polimerização menor que sete unidades em glicose (LYND et al., 2002).

Os fungos possuem diversas aplicações biotecnológicas devido a atividade metabólica dos mesmos, sendo utilizados tanto para a síntese de seus metabólitos quanto na produção de enzimas que possuem funções degradativas (BENNETT, 1998). Cepas isoladas de fungos filamentosos são capazes de produzir enzimas que possuem aplicação na maioria dos processos biotecnológicos (PUNT et al., 2002).

## MATERIAL E MÉTODOS

Para o teste em meio líquido utilizou-se erlenmeyers de 150 mL contendo 50 mL de meio líquido mineral e Carboximetilcelulose (CMC) 2% (p/v). O meio mineral foi constituído por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,7%;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,4%;  $\text{MgSO}_4$  0,02%;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1% e extrato de levedura 0,06% (SINGH et al, 2009, modificado), o qual foi autoclavado a 121°C por 15 min. Realizou-se o inóculo em duplicata, retirando-o com o auxílio de uma espátula, três discos de aproximadamente 1 cm de diâmetro de uma placa de Petri contendo colônias crescidas do fungo isolado e transferiu-os para os erlenmeyers contendo o meio mineral. Os frascos foram colocados em um *shaker* sob temperatura de 28°C e rotação de 180 rpm. Em intervalos de 24 horas durante 11 dias, com auxílio de uma micropipeta, as amostras foram coletadas e transferidas para micro tubos tipo *Eppendorf* ®. Em seguida, as mesmas foram centrifugadas sob rotação de 10.000 rpm por 20 min. à fim de obter o extrato enzimático bruto.

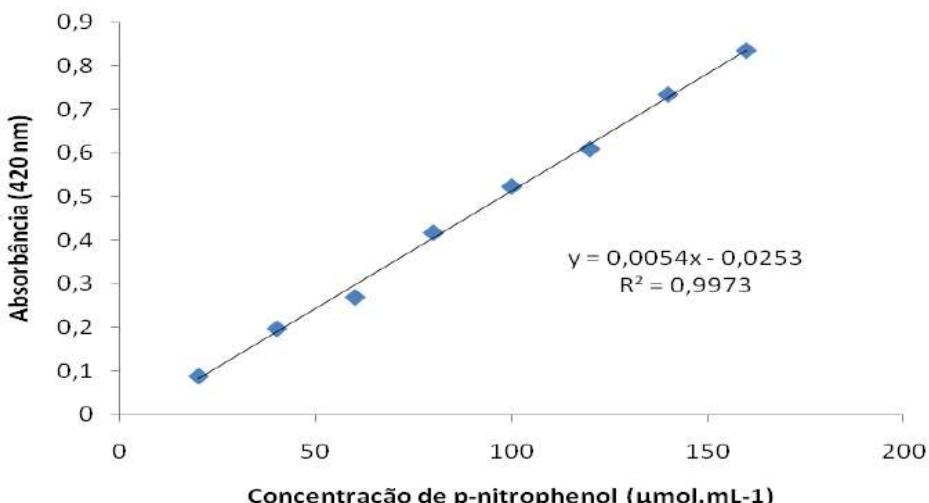
Para determinar a atividade  $\beta$ -glicolítica foi utilizada a técnica de *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (pNP $\beta$ G). Inicialmente, adicionou-se 1,2 mL de pNP $\beta$ G a 0,001M

nos tubos de ensaios em um banho-maria a 30°C por 10 min. Em seguida, acrescentou-se 0,3 mL dos extractos enzimáticos brutos em tampão fosfato-citrato 0,1 M a pH 5,0. Os tubos foram colocados em banho-maria a 30°C por 30 min. A reação foi interrompida ao acrescentar 1,5 mL da solução de bicarbonato de sódio 0,5M. Em seguida realizou-se a leitura a 420 nm em espectrofotômetro (Bioespectro SP 220).

A especificidade da enzima foi estudada frente a diferentes valores de pH entre 4,0 e 8,0, utilizando os tampões fosfato-fosfato a 0,2M. Da mesma forma, avaliou-se a atividade  $\beta$ -glicolítica nas temperaturas de 30 a 70°C para a sua caracterização. Para ambos os ensaios utilizou-se os protocolos conforme supracitado alterando apenas as condições de pH e temperatura nas quais os ensaios foram realizados.

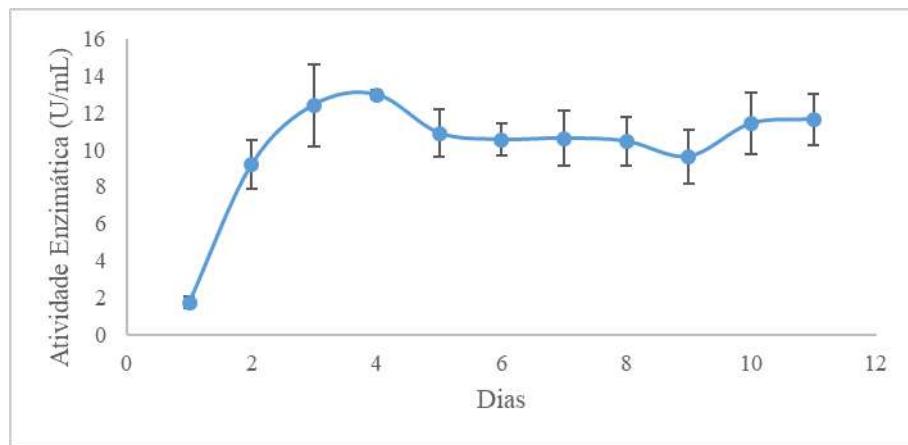
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foi construída uma curva padrão que relaciona os valores de absorbância e de concentração de açucares obtidos, representada pela concentração do p-nitrophenol liberado após a hidrólise enzimática (Figura 1), considerando que 1 Unidade Internacional (IU) equivale a 1  $\mu$ mol de p-nitrophenol produzido por minuto.



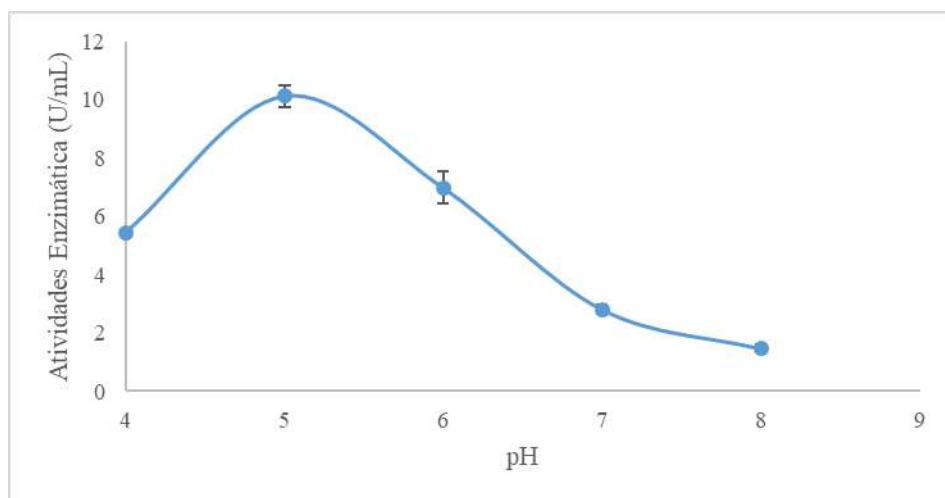
**Figura 1:** Curva Padrão de  $\beta$ -glicosidase – Absorbância em função da concentração de p-nitrofenol (g/L).

Os ensaios de atividade enzimática tiveram início pela determinação da atividade  $\beta$ -glicosídica do fungo isolado. Conforme apresentado na Figura 2, observou-se uma rápida adaptação do fungo no meio líquido enriquecido com CMC 2% (p/v). Nota-se que uma atividade  $\beta$ -glicosídica máxima de  $12,9685 \pm 0,2357$  U/mL foi alcançada após 4 dias de cultivo. A atividade mínima foi de  $1,7302 \pm 0,3055$  após 24 h de cultivo, como esperado, visto que o fungo se encontrava na fase de adaptação ao meio de crescimento.



**Figura 2:** Produção da enzima  $\beta$ -glicosidase por fungo isolado a partir da casca de madeira em função do tempo de cultivo.

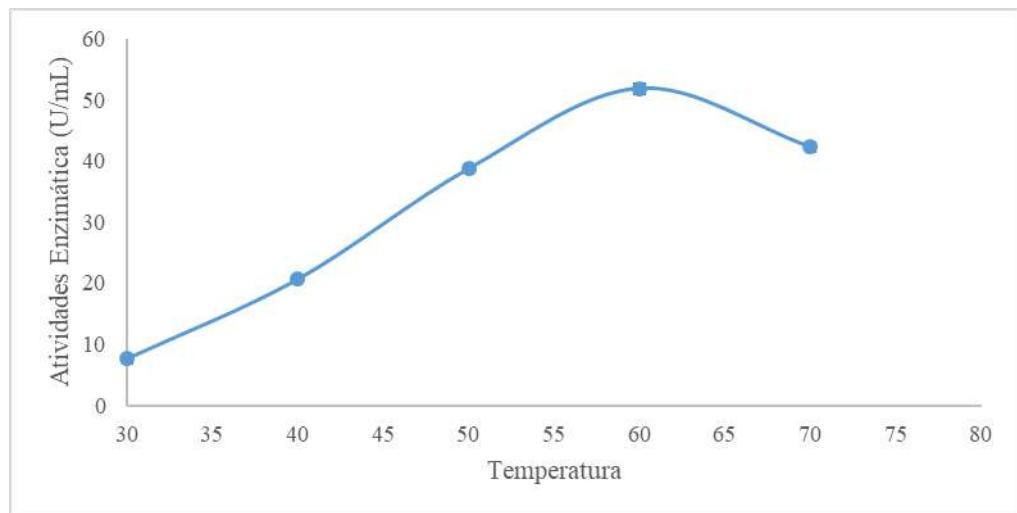
Os dados obtidos sob diferentes valores de pH nos ensaios de caracterização da atividade  $\beta$ -glicolítica estão mostrados na Figura 3.



**Figura 3:** Efeito do pH na atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase produzida no extrato bruto do fungo.

Segundo os resultados obtidos na Tabela 1 e na Figura 3, percebeu-se que a enzima  $\beta$ -glicosidase, presente no extrato enzimático, apresentou uma atividade máxima de  $10,1259 \pm 0,3797$  U/mL em pH ótimo de 5,0. Sendo assim, um decaimento significativo da atividade enzimática foi observado em valores de pH superiores a 5.

Em relação a temperatura, a Figura 4 apresenta a variação da atividade enzimática de  $\beta$ -glicosidase em sob diferentes valores de temperatura.



**Figura 4:** Efeito da temperatura na atividade  $\beta$ -glicolítica presente no extrato enzimático bruto do fungo isolado.

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 2 e na Figura 4, notou-se que a enzima  $\beta$ -glicosidase apresentou uma atividade máxima de  $51,8370 \pm 0,8904$  U/mL a uma temperatura ótima de  $60^{\circ}\text{C}$ .

Segundo Marco (2007), o fungo *Trichoderma harzianum* isolado da madeira apresentou uma atividade enzimática máxima em pH 5,0. Da mesma forma, Silva (2016) obteve uma atividade  $\beta$ -glicosídica máxima a pH 5,0 e temperatura  $65^{\circ}\text{C}$ , utilizando o fungo *Myceliophthora heterothallica*. Almeida (2009) encontrou valores de pH ótimo para esta enzima na faixa de 4,5 a 5,0 e temperatura ótima de  $60^{\circ}\text{C}$  para o fungo *Trichoderma versicolor* TRAM01.

## CONCLUSÕES

O fungo de podridão branca isolado da casca de madeira foi capaz de produzir a enzima  $\beta$ -glicosidase. Segundo os resultados obtidos, foi observada uma atividade  $\beta$ -glicolítica máxima de  $10,1259 \pm 0,3797$  U/mL e  $51,8370 \pm 0,8904$  U/mL em pH ótimo de 5,0 e temperatura ótima de  $60^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, após 4 dias de cultivo. Portanto, através desse estudo pôde-se perceber um promissor potencial na utilização do fungo isolado em processos biotecnológicos, especialmente na produção de etanol 2G.

## REFERÊNCIAS

- BENNETT, J.W., 1998. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *Journal of biotechnology*, Amsterdam, vol. 66, no. 2-3, pp. 101-107.

- HERISSAT, B. A., 1991. *Biochemical Journal*, vol. 280, pp. 309.
- LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN ZYL, W.H. and PRETORIUS, I.S., 2002. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 66, pp. 506-577.
- MUSSATTO, S.I.; FERNANDES, M. and MILAGRES, A.M.F., 2007. Enzimas - Poderosa ferramenta na indústria. *Revista Ciência Hoje*. vol. 41, no. 242, pp. 28-33.
- PAPAGIANNI, M., 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, Oxford, vol. 22, pp. 189-259.
- PUNT, P.J.; BIEZEN, N.V.; CONESA, A. ALBERTS, A.; MANGNUS, J. and HONDEL, C., 2002. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production, *Trends in Biotechnology*, Amsterdam, vol. 20, no.5. pp. 200-206.
- SINGH, R.; VARMA, A. J.; LAXMAN R.S. and RAO, M., 2009. Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium* cellulases: Comparison with commercial cellulose. *Bioresource Technology*. no.100, pp.6679–6681.

## **Produção de xilanase por *Fusarium oxysporum* utilizando resíduos agroindustriais**

Ryhára Dias Batista<sup>1\*</sup>; Isabella de Moraes Guimarães<sup>2</sup>; Tallyta Santos Teixeira<sup>2</sup>; Claudia Cristina Auler do Amaral Santos<sup>2</sup>; Alex Fernando de Almeida<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Tocantins, Palmas-TO, \*ryharabatista@uft.edu.br (autor para correspondência)

<sup>2</sup> Habite – Incubadora de Empresas de Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi-TO, Rua Badejós, chácaras 69/72, Zona Rural, CEP 77.402-970.

---

### **RESUMO**

As enzimas xilanolíticas são muito utilizadas comercialmente, porém o elevado custo da produção dificulta a sua aplicação devido o substrato xilano purificado ser extremamente caro. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um meio de cultivo utilizando resíduos agroindustriais para a produção de xilanase em condições submersas. A seleção da melhor fonte de carbono a partir de resíduos agrícolas foi realizada utilizando tegumento de soja, casca de mandioca, coroa de abacaxi, palha de milho, casca de arroz, bacaba, bagaço de cevada e sabugo de milho. Os cultivos foram realizados por 132 h, 30°C e 180 rpm. A palha de milho apresentou a melhor condição para a produção de xilanase (12,57 U.mL<sup>-1</sup>). O delineamento Plackett e Burman foi utilizado para rastrear as fontes de nutrientes importantes do meio para produção de xilanase. Desta forma, a ureia e o sulfato de magnésio foram selecionadas e utilizadas em um Delineamento Composto Central Rotacional, alcançando a produção de 26,57 U.mL<sup>-1</sup>. Assim, a produção de xilanase por *Fusarium oxysporum* pode ser otimizada utilizando palha de milho como fonte de carbono, sendo um resíduo de baixo custo e encontrado em grandes quantidades.

**Palavras-chave:** Xilanase. Resíduos agroindustriais. Atividade enzimática. Plackett & Burman. DCCR.

---

### **Xylanase production by *Fusarium oxysporum* using agricultural wastes**

### **ABSTRACT**

Xylanolytic enzymes are widely used commercially, but the high cost of production makes your application difficult because the purified xylan substrate is extremely expensive. In this way, the objective of this study was develop culture medium using agricultural waste for the production of xylanase under submerged conditions. The selection of the best carbon source from agricultural waste was carried out using soybean husk, cassava peel, pineapple crown, corn straw, rice husk, bacaba, barley bagasse and corncob. The cultures were carried out during 132 h, 30°C and 180 rpm.

Corn straw presented the best conditions for xylanase production (12.6 U.mL<sup>-1</sup>). Plackett and Burman design was used to screen the important nutrients sources for the production of xylanase. Thus, urea and magnesium sulphate were selected and used in a Design Central Composite Rotational, reaching the production of 26.57 U.mL<sup>-1</sup>. So, the xylanase production by *Fusarium oxysporum* can be optimize using corn straw, a low cost waste found in large quantities.

**Keywords:** Xylanase. Agricultural waste. Enzymatic activity. Plackett & Burman. CCRD.

---

## INTRODUÇÃO

A hemicelulose é o segundo maior componente da parede vegetal depois da celulose. Ela compreende um grupo de polissacarídeos heterogêneos, representando 20-35% do peso seco total da biomassa. A hidrólise enzimática deste material por enzimas hemicelulolíticas é a abordagem mais promissora para obter altos rendimentos de produtos vitais para o sucesso econômico. As enzimas xilanolíticas são capazes de hidrolisar a hemicelulose e podem ser obtidas por uma grande variedade de microrganismos, entre os quais os fungos filamentosos se destacam. Um exemplo de fungo filamentoso muito utilizado é o *Fusarium oxysporum* (Uday et al., 2015; Prema, 2010).

As xilanases são muito utilizadas comercialmente em processos de bioconversão de material lignocelulósico ou resíduos agro-industriais, bio-branqueamento na indústria do papel, melhoria da textura e volume de pão, clarificação de suco e vinho, melhoria do valor nutricional de estoque de alimentos para animais, extração de óleo vegetal, café e amido. A sua produção é normalmente realizada por fermentação submersa, devido à facilidade de controle durante o processo de fermentação aeróbia. Porém, o elevado custo de produção destas enzimas dificulta a sua aplicação devido o substrato xilano purificado ser extremamente caro. Uma alternativa para a redução do custo da produção é possível pela utilização de resíduos agrícolas de baixo custo (Irfan et al., 2015; Uday et al., 2015). Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de xilanase por *F. oxysporum* em diferentes biomassas agroindustriais e estimar a quantidade de enzimas produzidas a partir da melhor composição química do meio de cultivo em condições submersas.

## MATERIAL E MÉTODOS

A linhagem de *F. oxysporum* foi isolada a partir de frutos de pequi no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos e Purificação de Bioproductos, da

Incubadora de Empresas de Base Biotecnológica do Campus Universitário de Gurupi, Universidade Federal do Tocantins/TO, e é mantida em meio ágar sais de Vogel, contendo farelo de trigo (Vogel, 1956). Os repiques foram realizados periodicamente, em tubos inclinados e placas de Petri, mantidos a 30 °C durante 7 dias e posteriormente utilizados ou armazenados a 4°C.

Os cultivos submersos foram realizados em Erlenmeyers de 125 mL contendo 20 mL de meio suplementar basal proposto por Mandel e Weber (1969) e 1% de biomassa vegetal como fonte de carbono, tais como: tegumento de soja, casca de mandioca, coroa de abacaxi, palha de milho, casca de arroz, bacaba, bagaço de cevada e sabugo de milho. Estas foram previamente moídas em moinhos de facas e peneiradas com granulação máxima de 1 mm. Após o período de incubação, o caldo fermentado foi separado da biomassa por filtração em papel de filtro (diâmetro de 12,5 cm) com auxílio de funil de Buchner, kitassato e bomba de vácuo e posteriormente o caldo fermentado foi utilizado para análise da atividade xilanolítica.

Foi utilizado o delineamento experimental Plackett & Burman (1946) e as variáveis independentes testadas foram: concentração de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; Ureia;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CaCl}_2$ ; peptona de carne; Extrato de levedura e Tween-80. Posteriormente utilizou-se o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), onde as variáveis utilizadas foram Ureia e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Os resultados foram analisados utilizando software STATISTICA versão 10, cujos valores foram submetidos a análise variância (ANOVA). Os resultados foram expressos em médias de 3 experimentos independentes seguidas de desvio padrão e para as médias foram aplicado teste de Scott-Knott, com nível de 5% de significância através do sistema computacional ASSISTAT. Os resultados foram apresentados em forma de gráficos e tabelas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Seleção da melhor fonte de carbono para produção da xilanase

A maior produção de xilanase ( $p<0,05$ ) foi obtida no meio contendo palha de milho ( $12,57 \text{ U.mL}^{-1}$ ), com rendimento igual a  $1306,94 \text{ U.g}^{-1}$  e produtividade igual a  $2,0 \text{ U.g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (Tabela 1).

**Tabela 1** - Produção de xilanase utilizando diferentes resíduos agroindustriais como fonte de carbono.

<b>Fonte de carbono</b>	<b>Atividade de xilanase</b>		
	<b>U.ml<sup>-1</sup></b>	<b>Y<sub>p</sub>/s</b>	<b>P<sub>p</sub></b>
Tegumento de Soja	0,96 <sup>d</sup>	64,02 <sup>d</sup>	0,10 <sup>d</sup>
Casca de arroz	0,05 <sup>d</sup>	31,50 <sup>d</sup>	0,05 <sup>d</sup>
Bacaba	0,40 <sup>d</sup>	43,27 <sup>d</sup>	0,07 <sup>d</sup>
Casca de mandioca	0,18 <sup>d</sup>	17,96 <sup>d</sup>	0,03 <sup>d</sup>
Sabugo de milho	1,53 <sup>c</sup>	150,90 <sup>c</sup>	0,23 <sup>c</sup>
Bagaço de cevada	2,73 <sup>c</sup>	231,96 <sup>c</sup>	0,35 <sup>c</sup>
Coroa de abacaxi	5,80 <sup>b</sup>	583,63 <sup>b</sup>	0,90 <sup>b</sup>
Palha de milho	12,57 <sup>a</sup>	1306,94 <sup>a</sup>	2,00 <sup>a</sup>

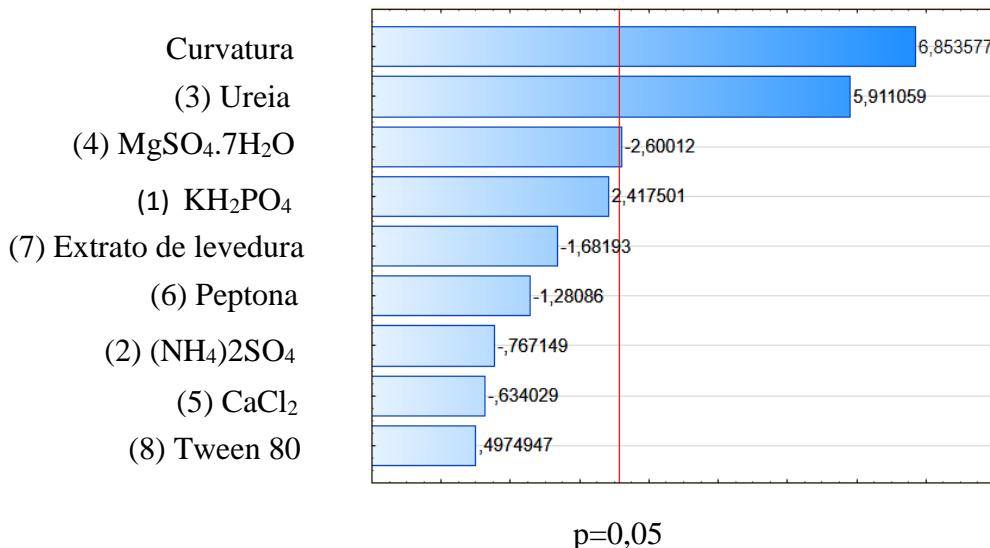
Incubado por um período de 132 horas, 30 °C e 180 rpm

Letras iguais não se diferenciam pelo teste de Scott-Knott a 5%.

U total: U.ml<sup>-1</sup> × volume da extração

### Plackett & Burman

As variáveis significativas foram a Ureia e MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, onde a primeira teve um efeito positivo, ou seja, o aumento na quantidade dessa fonte de nitrogênio pode aumentar a produtividade da enzima. Por outro lado, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O um efeito negativo, ou seja, quanto menor for à quantidade do sal usado no meio, melhor será para atividade enzimática (Figura 1). Desta forma, essas variáveis foram selecionadas para serem avaliadas em DCCR, e as outras variáveis que não foram significativas no processo foram mantidas de acordo com o meio basal (Mandel e Weber, 1969).

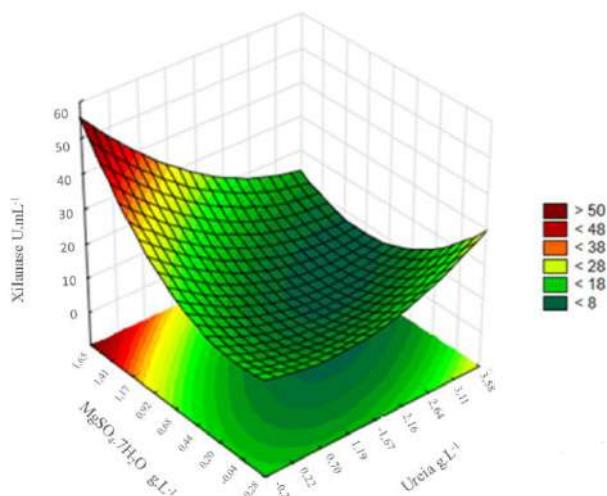


$$p=0,05$$

**Figura 1**- Gráfico de pareto dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta atividade enzimática xilanase.

#### DCCR

Na Figura 2, percebe-se que a variável ureia teve efeito negativo, enquanto a variável  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  teve efeito positivo, ou seja, nas menores concentrações de ureia e maiores concentrações de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , apresentou um ponto ótimo para maiores produção da enzima xilanase. Tais efeitos foram significativos, ao nível de 5%, na indução da produção da enzima, sob condições submersas, 30°C a 180 rpm.



## CONCLUSÕES

No presente trabalho, a palha de milho apresentou-se como um resíduo ideal para a produção de xilanase utilizando o fungo *F. oxysporum*, em condições submersas. A palha de milho é uma fonte de baixo custo, sustentável e encontrada em grandes quantidades após a colheita do milho. A otimização dos nutrientes do meio de cultivo pode aumentar a produção de xilanase em 111,4%.

## AGRADECIMENTO

Os autores agradecem a Embrapa Agroenergia, Brasília/DF pela identificação do fungo *Fusarium oxysporum* utilizada neste estudo.

## REFERÊNCIAS

- IRFAN, M., et al. Optimization of process parameters for xylanase production by *Bacillus* sp. in submerged fermentation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, p.1-9, 2015.
- MANDEL, M.; WEBER, J. *The production of cellulases*. Advances in Chemistry Series. v. 95, p. 391- 414, 1969.
- PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. *The design of optimum multifactorial experiments*. *Biometrika*, 33, p. 305-325, 1946.
- PREMA, P. Xylanases. In: Pandey, A. et al. *Enzyme Technology*. New York: Springer, p. 333-337, 2010.
- UDAY, U. S. P., et al. Classification, mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth. *International Journal of Biological Macromolecules*, p. 1-14, 2015.
- VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). *Microbiology Genetic Bulletin*, v. 13, p. 42–43, 1956.

## **Detoxificação de lodo de esgoto por meio de bioestimulação**

Samantha S. Silveira<sup>1</sup>; Flávio A. Oliveira<sup>2</sup>; Carlos E. Levy<sup>2</sup>; Maria A. Marin-Morales<sup>1</sup>; Mary Rosa R. Marchi<sup>3</sup>; Dânia E. C. Mazzeo<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP/Rio Claro. \*daniamazzeo@gmail.com

<sup>2</sup>Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP.

<sup>3</sup>Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, UNESP/Araraquara.

---

### **RESUMO**

O lodo de esgoto (LE) é o resíduo final do tratamento de efluentes realizado nas estações de tratamento de esgoto (ETE). O LE, por conter uma grande quantidade de matéria orgânica e nutrientes, apresenta um alto potencial agronômico. No entanto, a ocorrência de substâncias tóxicas pode impedir o seu uso agrícola. Assim, o presente trabalho teve como objetivo propor uma tecnologia eficiente e de baixo custo para detoxificar o LE, a fim de reutilizá-lo como fertilizante agrícola. O LE anaeróbio estudado foi proveniente da ETE Carioba (Americana – SP), a qual trata esgoto doméstico e industrial por meio de filtro biológico. Como agentes bioestimulante e descompactante, foram utilizados borra de café e bagaço de cana-de-açúcar. Misturas contendo solo e LE; solo, LE e borra; solo, LE e bagaço foram biorremediadas por períodos de 0 e 2 meses. A caracterização dos microrganismos envolvidos no processo indicaram uma predominância bacteriana e revelaram que os materiais empregados como bioestimulantes atuaram no aumento da diversidade microbiana. A eficiência do processo na detoxificação do LE, avaliada por meio de ensaio com *Allium cepa*, mostrou que a borra de café foi o único material estudado capaz de reduzir, significativamente, todos os parâmetros ecotoxicogenéticos avaliados (citotoxicidade e danos ao DNA). Desse modo, a tecnologia aqui empregada parece ser bastante satisfatória para a transformação de um resíduo potencialmente tóxico, como o LE, em aditivo agrícola.

**Palavras-chave:** Biorremediação, resíduo sólido, *Allium cepa*, toxicidade, *Bacillus* sp.

---

### **Detoxification of sewage sludge by means of biostimulation**

### **ABSTRACT**

Sewage sludge (SS) is the final residue of effluent treatment carried out at wastewater treatment plants (WWTP). As SS contains a great amount of organic matter and nutrients, it presents a high agronomic potential. However, the occurrence of toxic substances may prevent its agricultural use. Thus, the present work aimed to propose an efficient and low cost technology to detoxify the SS in order to reuse it as agricultural fertilizer. The studied SS came from the WWTP Carioba (Americana - SP), which treats domestic and industrial sewage by means of biological filter. Coffee grounds and sugarcane bagasse were used as biostimulating and decomposing agents. Mixtures

containing soil and SS; Soil, SS and bagasse; Soil, SS and coffee grounds were bioremediated for periods of 0 and 2 months. The characterization of the microorganisms involved in the process indicated a bacterial predominance and showed that the materials used as biostimulants acted increasing the microbial diversity. The efficiency of the SS detoxification process, evaluated by means of *Allium cepa* assay, showed that coffee grounds were the only studied material capable of significantly reducing all the ecotoxicogenetic parameters evaluated (cytotoxicity and DNA damage). Thus, the technology employed here appears to be quite satisfactory for the transformation of a potentially toxic residue, such as SS, in an agricultural additive.

**Keywords:** Bioremediation, solid waste, *Allium cepa*, toxicity, *Bacillus* sp.

---

## INTRODUÇÃO

O lodo de esgoto (LE) é o resíduo sólido final gerado a partir do tratamento das águas residuárias nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs). Devido à grande parte de sua composição ser constituída por matéria orgânica e nutrientes, vem sendo sugerida a sua utilização como fertilizante e recondicionante de solos. No entanto, a possível presença de contaminantes tóxicos pode impossibilitar seu uso agrícola, frente aos riscos de contaminação ambiental, da saúde humana e da biota associada (ROIG et al., 2012).

Uma opção para detoxificação do LE é a biorremediação, tecnologia de baixo custo que consiste em utilizar microrganismos para degradar compostos tóxicos transformando-os em não tóxicos (BAMFORTH and SINGLETON, 2005). A incorporação de agentes bioestimulantes ao processo de biorremediação tende a estimular o crescimento da microbiota e, assim, reduzir a carga tóxica em um menor período de tempo (MAZZEO et al., 2014).

Para avaliar o potencial tóxico do LE, bem como verificar a eficiência do processo de biorremediação, vem sendo proposto o uso de bioensaios, sendo a espécie *A. cepa* muito indicada para essa finalidade (MAZZEO et al., 2015).

Assim, este trabalho propôs o desenvolvimento de uma metodologia eficiente e de baixo custo, com o emprego de microrganismos, para a detoxificação de LE, por meio da associação com resíduos agroindustriais (bagaço de cana-de-açúcar) e doméstico (borra de café). Adicionalmente, a segurança toxicológica do produto final obtido (aditivo agrícola) foi avaliado por meio do ensaio com o organismo teste *Allium cepa*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta e preparo das amostras**

O LE anaeróbio utilizado nesse estudo foi coletado na ETE Carioba, localizada na cidade de Americana – SP. Esta ETE recebe esgoto sanitário e industrial, tratando-o por meio de filtros biológicos. O lodo gerado corresponde a cerca de 420 ton/mês, com teor de sólidos entre 36- 38%.

Como agentes descompactantes e estimulantes do processo de biorremediação do LE foram utilizados o bagaço de cana-de-açúcar (BAG) e a borra de café (BO). Para diluição das amostras foi utilizado solo (S) de textura argilosa coletado no Jardim Experimental da UNESP, Campus Rio Claro.

Inicialmente, o projeto foi desenvolvido em escala piloto, acondicionando as amostras em caixas de aço inox (24 cm de largura X 20cm de altura X 30 cm de comprimento), mantidas no Jardim Experimental da UNESP de Rio Claro, em local coberto e sob temperatura ambiente. O experimento foi desenvolvido em triplicata.

As amostras estudadas foram preparadas utilizando proporções volumétricas dos diferentes materiais, como segue: LE+S (3:3 – v/v); LE+S+BAG (3:3:1 – v/v/v); LE +S+BO (3:3:1 – v/v/v). Essas amostras foram dispostas, individualmente e em triplicata, em cubas de inox, mantidas em local coberto à temperatura ambiente, por períodos de 0 e 2 meses. Após cada período, uma parte das amostras foi coletada para caracterização microbiológica e verificação do seu potencial tóxico pelo teste de *A. cepa*.

### **Avaliação da toxicidade do LE por meio do organismo teste *A. cepa***

Para a realização dos bioensaios, cerca de 50 sementes de *A. cepa* foram submetidas à germinação em placas de Petri, contendo cada uma das amostras, por um período de 5 dias a 22°C. Após coleta e fixação, as raízes foram submetidas à reação de Feulgen, para coloração e posterior preparo das lâminas com a região meristemática das raízes. Os controles negativo e positivo foram feitos com água ultrapura e metilmetano sulfonato a 10 mg/L, respectivamente.

Foram analisadas, em microscópio de luz, 5 lâminas de cada amostra, para cada triplicata, contabilizando 500 células aleatórias por lâmina, totalizando 7500 células por tratamento (15 lâminas/tratamento). Para avaliação do efeito citotóxico foi contabilizado a quantidade de células em divisão (índice mitótico). A avaliação de danos no DNA foi quantificado por meio de dois marcadores: presença de anormalidades cromossômicas e nucleares (como perdas, quebras, pontes e aderências cromossômicas, broto e ponte nuclear); e micronúcleo (MN).

A análise estatística foi realizada por meio do teste não-paramétrico de Mann Whitney a 0,05 de nível de significância.

### **Quantificação e identificação dos microrganismos degradadores**

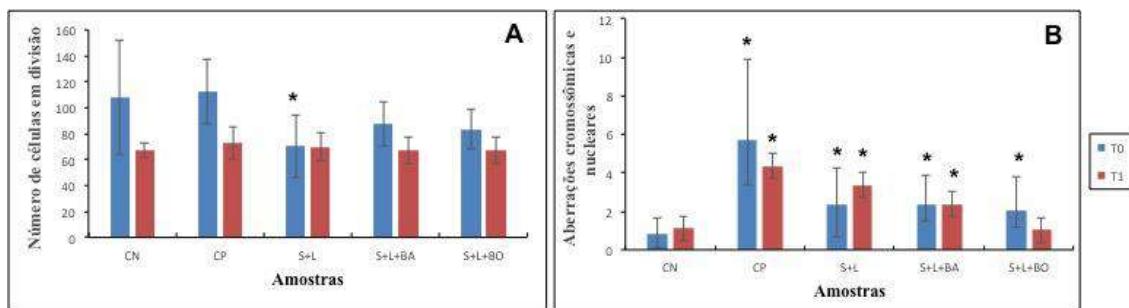
A caracterização microbiológica das amostras foi realizada seguindo o protocolo proposto por Mazzeo et al. (2015). Após isolamento e quantificação das UFC (Unidades Formadoras de Colônia), os microrganismos foram identificados pelo equipamento de automação BD PhoenixTM – Biosciences.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O LE puro inibiu completamente a germinação das sementes, impedindo a confecção das lâminas para essa amostra e, consequentemente, a avaliação dos parâmetros ecotoxicogenéticos. Martins et al. (2016) também observaram resultados semelhantes em relação à ação inibitória da amostra bruta de LE sobre a germinação de sementes de *A. cepa*. No entanto, as misturas testadas não induziram efeitos significativos na germinação das sementes de *A. cepa*, indicando que a diluição com solo ou agentes estimulantes já foi suficiente para eliminar o efeito tóxico do LE.

Em relação ao efeito citotóxico (Figura 1 A), observou-se que a amostra de S+LE foi a única que induziu efeitos significativos, antes do início do processo de bioestimulação (T0), o qual foi normalizado no T1.

Quanto à avaliação da indução de danos ao DNA, não foram obtidos resultados significativos para a presença de micronúcleos em nenhum dos tratamentos e períodos testados. Contudo, pela análise de aberrações cromossômicas e anormalidades nucleares (Figura 1 B), foi possível observar que todas as amostras estudadas induziram alterações em quantidades significativas para o tempo inicial (T0). Após 2 meses de bioestimulação, resultados significativos continuaram a ser observados para esse mesmo parâmetro, com exceção da amostra LE+S+BO. Tal fato indica que para o período estudado de bioestimulação, a borra de café parece ser um agente mais efetivo no processo de detoxificação do LE do que o bagaço de cana. Estudos realizados por Christofoletti et al. (2013) também revelaram o potencial do LE não tratado na indução de aberrações cromossômicas em *A. cepa* e uma diminuição desse efeito após 30 dias de biorremediação. Assim, nota-se que embora, inicialmente, o LE caracteriza-se em um resíduo potencialmente perigoso, após receber tratamento adequado, este pode vir a constituir um material bastante promissor para fins agrícola.



**Figura 1.** Efeito citotóxico (A) e presença de aberrações cromossômicas e anormalidades nucleares (B) em células meristemáticas de *A. cepa*, induzidos por LE, antes (T0) e após bioestimulação (T1). \*Estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

A análise microbiológica do LE anaeróbio estudado mostrou a presença de 8 espécies de bactérias, pertencentes aos grupos das enterobactérias (*Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*), dos bacilos gram-negativos não fermentadores (*Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas putida*, *Shewanella putrefaciens*) e dos bacilos gram-negativos fermentadores, não pertencente à família Enterobacteriaceae (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*). Apenas 1 espécie de fungo foi encontrada para essa amostra, classificado por seu aspecto leveduriforme.

A adição de bagaço de cana-de-açúcar e borra de café ao LE favoreceu um aumento do crescimento de espécies fúngicas após 2 meses de bioestimulação. Adicionalmente, esses agentes também contribuíram para o aparecimento de bactérias gram-positivas (*Bacillus* sp), as quais vem sendo reconhecidas como eficientes degradadoras de poluentes ambientais (YU et al., 2013; MAZZEO et al., 2015).

## CONCLUSÕES

Com a integralização deste trabalho, pode-se observar que o processo de bioestimulação, com incorporação da borra de café, pode trazer resultados positivos, até mesmo a curto prazo, em relação à descontaminação do LE, tornando-o um promissor aditivo agrícola. Embora o bagaço de cana-de-açúcar não tenha apresentado eficiência na detoxificação do lodo, tanto ele quanto a borra de café favorecem o aumento da diversidade microbiana das amostras.

## REFERÊNCIAS

- ROIG, N., SIERRA, J., NADAL, M., MARTÍ, E., NAVALÓN-MADRIGAL, P., SCHUMACHER, M. and DOMINGO, J.L., 2012. Relationship between pollutant

content and ecotoxicity of sewage sludges from Spanish wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, vol. 425, pp. 99-109. 10.1016/j.scitotenv.2012.03.018.

BAMFORTH, S. M. and SINGLETON, I., 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 80, p. 723–736. 10.1002/jctb.1276.

MAZZEO, D.E.C., VENTURA-CAMARGO, B.C., SOMMAGGIO, L.R.D. and MARIN-MORALES, M.A., 2014. Endpoints and bioassays to assess bioremediation efficiency of contaminated soils. In: J.B. VELÁZQUEZ-FERNANDEZ, orgs. *Bioremediation: Processes, Challenges and Future Prospects*. New York: Nova Science Publishers, pp. 243- 268.

MAZZEO D.E.C., FERNANDES T.C.C., LEVY C.E., FONTANETT C.S. and MARIN-MORALES M.A., 2015. Monitoring the natural attenuation of a sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. *Ecological Indicators*, vol. 56 pp. 60–69. 10.1016/j.ecolind.2015.03.026.

MARTINS, M.N.C., SOUZA, V.V. and SOUZA, T.S., 2016. Cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of sewage sludge on *Allium cepa*. *Chemosphere*, vol. 148, pp. 481-486. 10.1016/j.chemosphere.2016.01.071.

CHRISTOFOLETTI, C.A., PEDRO-ESCHER, J. and FONTANETTI, C.S., 2013. Assessment of the genotoxicity of two agricultural residues after processing by diplopods using the *Allium cepa* assay. *Water Air Soil Pollut.* vol. 224, pp. 224:1523. 10.1007/s11270-013-1523-3.

YU, C.-P., DEEB, R.A. and CHU, K.-H., 2013. Microbial degradation of steroid estrogens. *Chemosphere*, vol. 91, pp. 1225-1235. 10.1016/j.chemosphere.2013.01.112

## **Isolamento de microrganismos do sistema digestivo do peixe Curimbatá**

Samille H. Pereira<sup>1\*</sup>; Neusiane Renata Silva<sup>1</sup>; Luiz Gustavo M. Silva<sup>2</sup>; Boutros Sarrouh<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Federal University of São João del Rei, Department of Chemistry, Biotechnology and Bioprocess Engineering. \*email: samillehenriques@gmail.com

<sup>2</sup>Federal University of São João del Rei, Post-graduate Program “Technologies for Sustainable Development”.

---

### **RESUMO**

O estudo de microrganismos para obtenção de enzimas de interesse biotecnológico se torna uma alternativa promissora devido à utilização de diversas fontes energéticas, apresentando uma grande variedade de vias metabólicas e a capacidade em produzir e degradar vários compostos orgânicos e inorgânicos. Este trabalho teve por objetivo isolar microrganismos do sistema digestivo de peixe Curimbatá (*Prochilodus lineatus*) e avaliar qualitativamente a expressão das enzimas tanase, celulase e fenoloxidase pelos mesmos. Foram isoladas 5 cepas de microrganismos, sendo 4 bactérias e uma levedura. As colônias apresentaram índices enzimáticos (IE) promissores para a produção das enzimas estudadas. No teste da atividade tanásica a bactéria BE2 mostrou um IE máximo de 1,6. Por outro lado, a levedura LE1 apresentou um IE máximo de 8,5, mostrando dessa forma o seu potencial de aplicação em diversos processos biotecnológicos como, por exemplo, degradação de materiais lignocelulósicos para a produção de biocombustíveis.

**Palavras-chave:** enzimas industriais, *Prochilodus lineatus*, isolamento de microrganismos, atividade enzimática.

---

### **Isolation of microorganisms from the digestive system of Curimbatá fish**

### **ABSTRACT**

The study of microorganisms to obtain enzymes of biotechnological interest is considered to be a promising alternative due to the use of several energetic sources, presenting a great variety of metabolic pathways and the capacity to produce and to degrade several organic and inorganic compounds. The present work aimed to isolate microorganisms from the Curimbatá fish (*Prochilodus lineatus*) digestive system and qualitatively evaluate the expression of the enzymes tanase, cellulase and phenoloxidase by the same. Five strains of microorganisms were isolated, 4 bacteria and one yeast. The colonies presented promising enzymatic indexes (IE) for the production of the enzymes in study. In the test of the tanase activity the bacterium BE2 showed a maximum IE of 1.6. On the other hand, LE1 yeast reached a maximum IE of 8.5, thus showing its potential for application in several biotechnological processes, such as degradation of lignocellulosic materials for the production of biofuels.

**Keywords:** Industrial enzymes, *Prochilodus lineatus*, isolation of microorganisms, enzymatic activity

---

## INTRODUÇÃO

O Brasil possui um potencial significativo para a piscicultura, devido a sua grande extensão territorial e a grande quantidade de águas doces (SOUZA et al., 2013).

Os microrganismos isolados de ambientes aquáticos apresentam um alto potencial biotecnológico, a utilização de enzimas digestivas como catalisadores de processos industriais é de fundamental importância para a obtenção de produtos de alta qualidade e de maior valor agregado através da utilização de tecnologias limpas, e em sintonia com as necessidades tecnológicas, de mercado e de preservação ambiental que norteiam os processos produtivos internacionais. Os peixes Curimbatás são abundantes e correspondem a maior parte da biomassa ictiológica de grandes massas de água (BULLER, 2004; CASTRO, VARI, 2011).

As enzimas apresentam características que se destacam quando comparadas aos catalizadores químicos devido a sua especificidade pelo substrato ou por uma reação bioquímica (MONTEIRO, SILVA, 2009).

Este trabalho teve como objetivo o isolamento de microrganismos do sistema digestivo de peixe *Prochilodus lineatus* além de avaliar a expressão das enzimas tanase, celulase e fenoloxidase pelos mesmos.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trato digestivo do peixe Curimbatá foi conservado em solução salina 0,85%. A partir desta solução, foram realizadas diluições seriadas decimais. De cada diluição, retirou-se 100µl e transferiu-se para placas de Petri contendo meio Ágar Nutriente. Em seguida foi realizado o teste de coloração de Gram para a diferenciação dos microrganismos isolados.

Para avaliar a atividade enzimática, foi realizado um teste em meio enriquecido com ácido tânico visando a quantificação da atividade tanasica. Para a avaliação da atividade celulolítica, os microrganismos isolados foram crescidos em meio enriquecido com carboximetilcelulose (CMC) 1% (p/v). Da mesma forma, foi avaliada a produção da enzima fenoloxidase pelos microrganismos isolados. Os mesmos foram incubados em meio ágar malte acrescido de ácido gálico. Após 5 dias de cultivo, mediu-se o diâmetro dos halos formados em volta das colônias, comprovando dessa forma a ação

hidrolíticas das enzimas expressadas. Os índices enzimáticos foram determinados pela razão entre o diâmetro dos halos formados e o diâmetro das colônias cultivadas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a etapa de cultivo e isolamento dos microrganismos, foram obtidas colônias puras de cinco cepas diferentes. Estas foram denominadas com os seguintes códigos: BI1 (bactéria 1 isolada do intestino), BI2 (bactéria 2 isolada do intestino), BI3 (bactéria 3 isolada do intestino), LE1 (levedura 1 isolada do estômago) e BE2 (bactéria 2 isolada do estômago), conforme observado na Figura 1.

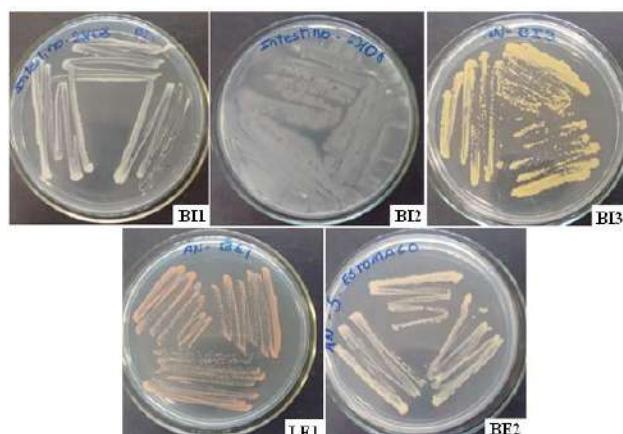


Figura 1. Cepas de microrganismos isolados do intestino e estômago do peixe Curimbatá

Por meio da coloração de Gram (Figura 2), foi possível dividir as colônias encontradas em dois grandes grupos, as Gram-positivas e as Gram-negativas. Observou-se uma heterogeneidade entre as bactérias, visto que duas pertencem às Gram-positivas (BI1 e BE2) e duas às Gram-negativas (BI2 e BI3). Ao realizar esse teste também foi possível observar que a colônia de LE1 apresentou-se ser uma levedura, devido à estrutura morfológica e o tamanho das suas células.

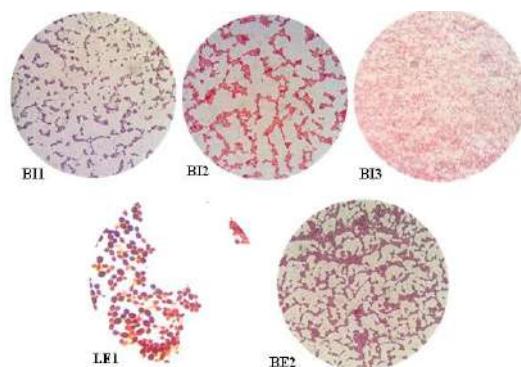


Figura 2. Visualização microscópica da coloração de Gram dos microrganismos isolados.

Após a incubação das cepas isoladas no meio sintético enriquecido com ácido tânico foi possível observar a formação de halos de coloração castanha nas colônias BI1, BI3 e LE1, comprovando a atividade enzimática tanásica (Figura 3.a). Após a incubação das cepas isoladas no meio sintético enriquecido com 1% (p/v) de CMC, foi possível observar a formação de halos de descoloração da solução vermelho congo 0,1% (p/v) pelas colônias de BI1, BI2, BI3, LE1 e BE2, mostrando dessa forma a expressão da enzima celulase (Figura 3.b). No teste da enzima fenoloxidase, houve formação de halos de coloração âmbar apenas na cepa LE1 (Figura 3.c).

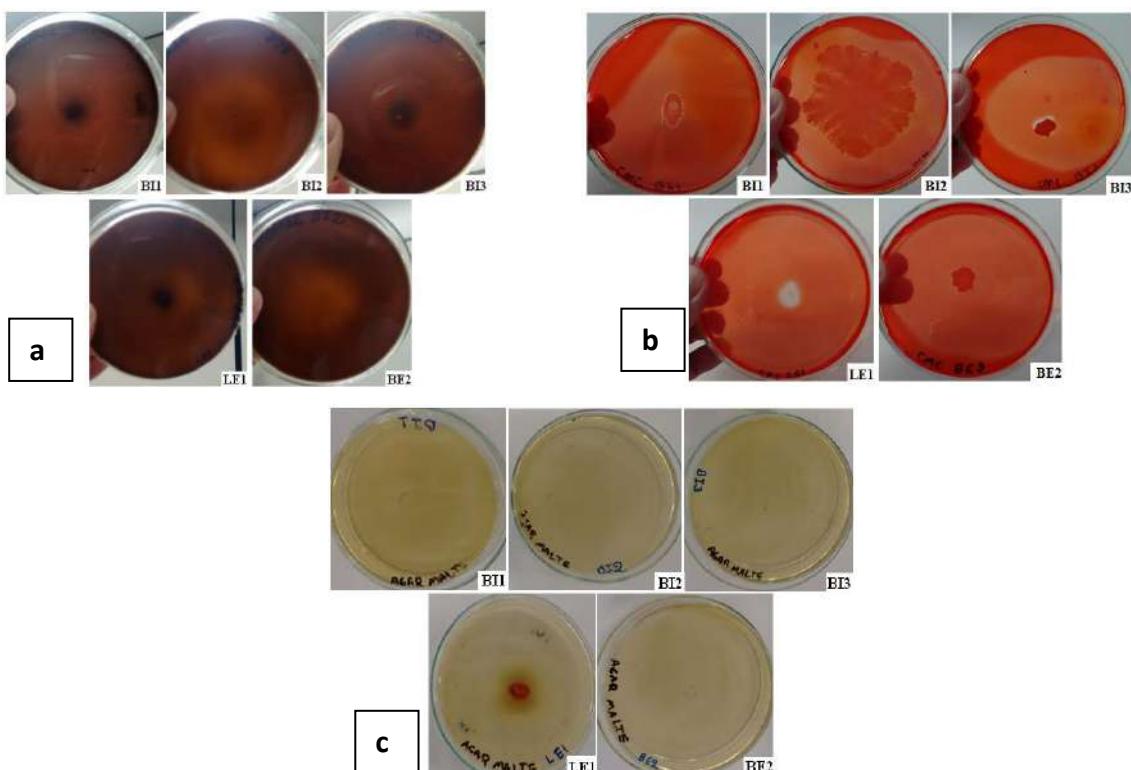


Figura 3. Linhagens dos microrganismos isolados do intestino e estômago do peixe Curimbatá após 5 dias de incubação, onde (a) meio sintético enriquecido contendo ácido tânico, (b) meio sintético enriquecido contendo CMC e (c) meio sintético contendo ácido gálico.

Os índices enzimáticos calculados nos testes enzimáticos encontram-se apresentados na Tabela 1. Segundo Lealem e Gashe (1994) para considerar um microrganismo bom produtor de enzimas extracelulares o seu índice enzimático (IE) deve ser maior ou igual a 2. No teste da atividade tanásica nenhuma das cepas apresentou este índice, porém conforme apresentado na Figura 3, a cepa que mostrou maior IE foi a bactéria BE2 (Tabela 1), apresentando um potencial para produção desta enzima.

Tabela 1. Índices enzimáticos calculados para os microrganismos isoladas do intestino e estômago do peixe Curimbatá

Colônias	Atividade tanásica	Atividade celulísica	Atividade fenoloxidase
BI1	1,5	3,72	-
BI2	-	1,5	-
BI3	1,25	6,25	-
LE1	-	8,5	-
BE2	1,6	6,25	2,8

De acordo os indices enzimáticos (IE) apresentados na Tabela 1, observou-se que todas as cepas isoladas apresentaram um bom rendimento para produção da enzima celulase, com destaque para os microrganismos BI3, LE1 e BE2, que foram capazes de produzir um IE maior que 2,0 (Lealem e Gashe, 1994). A levedura LE1 apresentou um máximo IE de 8,5, mostrando dessa forma o seu alto potencial para produção dessa enzima.

## CONCLUSÕES

O isolamento de microrganismos a partir de resíduos provenientes da indústria pesqueira mostrou-se ser uma alternativa sustentável para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. As enzimas estudadas neste trabalho possuem aplicações em diversos processos biotecnológicos como, por exemplo, degradação de materiais lignocelulósicos para a produção de biocombustíveis, tratamentos de efluentes, indústria alimentícia e síntese de compostos químicos de interesse industrial.

## REFERÊNCIAS

- CASTRO, M. A. and PEREIRA, J. N, 2010. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, vol. 33, pp. 181-188. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000100031>.

BULLER, N. B, 2004. *Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual.* CABI Publishing, 1<sup>a</sup> ed.  
<http://dx.doi.org/10.1079/9780851997384.0000>.

SOUZA, A. L. T., FONSECA, D. G., LIBÓRIO, R. A. and TANAKA, M. O, 2013. Influence of riparian vegetation and forest structure on the water quality of rural low-order streams in SE Brazil. *Forest Ecology and Management*, vol. 298, pp. 12-18.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foreco.2013.02.022>.

LEALEM, F. and GASHE, B. A, 1994 Amylase production by a Gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*eragrostis tef*). *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 77, no.1, pp. 348-352.

## Presença de *Candida sp* e *R. mucilaginosa* na Baía Araçá

Sonia Assami Doi<sup>1\*</sup>; Maria Carolina Canali<sup>1</sup>; Daiane Raquel Polezel<sup>1</sup>; Ana Julia Fernandes Cardoso de Oliveira<sup>2</sup>

<sup>1</sup> - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada, Instituto de Biociência da UNESP de Rio Claro, Rio Claro-SP, Brasil. \* E-mail: soniasdoi@gmail.com

<sup>2</sup> - Programa de pós-graduação em Biodiversidade Aquática, Universidade Estadual Paulista (UNESP São Vicente).

---

### RESUMO

Este estudo teve como objetivo quantificar quatro espécies de *Candida* (*Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*) e *Rhodotorula mucilaginosa* em água e sedimentos da Baía do Araça e correlacionar suas densidades com os fatores ambientais. As densidades microbianas nas amostras foram obtidas pela técnica da Membrana Filtrante. As densidades das leveduras foram mais elevadas no sedimento comparativamente as obtidas para água. Verificou-se elevada densidade de *C. tropicalis* seguido de *R. mucilaginosa* e *C. albicans*. Dentre os parâmetros ambientais, a temperatura apresentou correlação negativa com *C. tropicalis* e *C. krusei* diferindo da *R. mucilaginosa* que resultou ter correlação positiva. As altas densidades obtidas para estas leveduras no ambiente podem estar relacionados com descargas de materiais contaminados e poluídos na região.

**Palavra-Chave:** levedura, mangue, microrganismo, contaminação.

---

### Presence of *Candida sp* and *R. mucilaginosa* in Araçá Bay

### ABSTRACT

This study aimed to quantify the four *Candida* species (*Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. krusei*) and *Rhodotorula mucilaginosa* in water and sediment of the Araça Bay and to correlate your density with environmental factors. The microbial density of the samples were obtained by the of Filter Membrane Technique. The yeast densities were higher in the sediment compared to those obtained for water. It was detected a high density of *C. tropicalis* followed by *R. mucilaginosa* and *C. albicans*. Among the environmental parameters, *C. tropicalis* and *C. krusei* presented negative correlation with a temperature, contrary of *R. mucilaginosa* that resulted in a positive correlation. High values of these yeasts without environment may be related to contaminated and polluted materials in the region.

**KEYWORD:** yeast, mangrove, microrganism, contamination.

---

### INTRODUÇÃO

A Baía do Araçá mantém um dos últimos remanescentes de manguezal do litoral de São Sebastião, abriga alta diversidade biológica e está exposta a diferentes tipos de ação antrópica como ocupações irregulares, efluentes domésticos, instalação de uma

dragagem para o emissário submarino e pela proximidade do Porto de São Sebastião (Amaral et al., 2010).

As leveduras são microrganismos encontrados tanto em ambientes aquáticos como terrestres, sendo em sua maioria saprófitas e algumas parasitas oportunistas (Brandão et al., 2010). A diversidade e sobrevivência das espécies dependem dos fatores bióticos e abióticos do ambiente (Hagler, 2006).

Espécies de *Candida* foram observadas em ambientes que recebiam grande quantidade de esgoto doméstico, provavelmente entraram nos corpos d'água carreados pela chuva (Brandão et al., 2010). Estas espécies fazem parte da flora normal do trato alimentar e membranas mucocutâneas de seres humanos, mas também pode causar doenças como micose superficial ou invasiva (Odds, 1988). *C. albicans* é a mais freqüentemente isolada e a principal causa de infecção (Cheng et al., 2012). Espécies como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guillermondii* e *C. glabrata* isoladas de ambientes aquáticos têm sido descritos como patógenos oportunistas e agentes etiológicos de candidíase (Brandão et al., 2010).

As espécies de *Rhodotorula* são de natureza generalizada e pode ser isolada a partir de uma variedade de fontes, como a água do mar superficial e profundos (Kutty and Philip, 2008), sedimento (Loureiro et al., 2011) entre outros. *R. mucilaginosa* foi descrito como sendo uma espécie comum envolvida em infecções humanas (Arendrup et al., 2014) e é muito resistente à ambientes extremos (Starmer and Lachance, 2011).

Devido à importância em relação à contaminação ambiental e patogenicidade da levedura, este trabalho teve como objetivo determinar as densidades de *Candida* sp e *Rhodotorula mucilaginosa* na água e no sedimento da Baía do Araçá, correlacionando-as com os parâmetros físico-químicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se análise da presença de quatro espécies de levedura *Candida* e da *Rhodotorula mucilaginosa* da água e sedimento na região entremarés da Baía do Araçá, em maré alta. Foram realizados 8 coletas em 10 pontos de monitoramento. Dados físico-químicos temperatura (T°C), salinidade, pH e oxigênio dissolvido (OD) foram mensurados no local. As águas e os sedimentos superficiais foram coletados e processados no laboratório de Microbiologia Marinha (MICROMAR) localizado na UNESP – São Vicente, SP. Amostragem do sedimento foi realizada de acordo com protocolo de Oliveira and Pinhata (2008).

A determinação da densidade foi utilizada a Técnica de Membrana Filtrante (APHA, 2005) e incubados em meio de cultura cromogênico HiChrome a  $35\pm2^{\circ}\text{C}$  por 40-48h. O uso de um meio seletivo e diferencial permitiu a diferenciação em nível de espécies através da coloração e da morfologia das colônias: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei*, segundo protocolo do fabricante.

Dentre as colônias analisadas, as de coloração laranja avermelhadas foram isoladas em meio PDA (Potato Dextrose Agar). As colônias que mantiveram a coloração foram realizadas confirmação da espécie através da identificação molecular no Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais na UNESP/Rio Claro.

Os resultados das densidades foram expressos como Unidades Formadoras de Colônias da água em 100 ml ( $\text{UFC.100 ml}^{-1}$ ) e do sedimento 100 g ( $\text{UFC.100 g}^{-1}$ ).

Utilizou-se o programa Past para análise estatística. Foi aplicado o teste não paramétrico Kruskall-Wallis ( $p<0,05$ ), Correlação de Spearman entre os parâmetros ambientais com a densidade das leveduras.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação aos parâmetros ambientais, a temperatura média foi de  $25,76^{\circ}\text{C}$ , o nível de pH mantiveram-se com pouca variação mensurando de 7,26 a 8,53, igualmente para a salinidade, apresentando média de 26,07. Os valores do OD ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) variaram de 4,01 a 6,92 e a salinidade manteve inferior a 30 em todas as amostragens. Estes fatores físico-químicos corroboram com a sobrevivência, adaptabilidade e estabelecimento dos microrganismos. Mueller et al. (2007) citaram que a salinidade é um parâmetro que está diretamente relacionado com a distribuição das espécies de mangue.

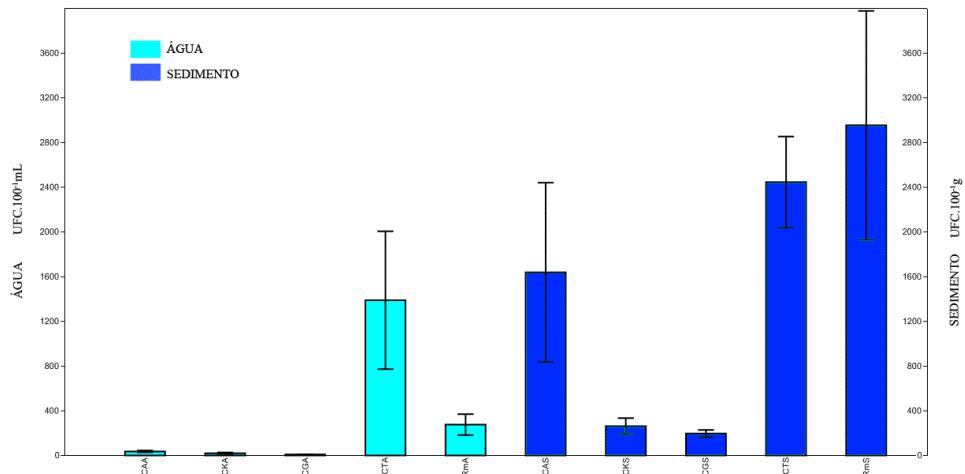
A densidade de microrganismos no sedimento foi maior para todas as espécies analisadas comparado com as encontradas na água. Alta densidade de leveduras é encontrada em sedimento aquático com a maior parte da população na camada superficial (Meyers and Ahearn, 1974) do que os presentes na água (Pagnocca et al., 1989) provavelmente por ocorrer a movimentação ocasionado pela maré e chuva.

Verificou-se que a *Candida albicans* foi detectado em todas as amostragens, tanto na água como no sedimento. Apesar da *C. krusei* não ter sido frequente nas amostragens, apresentou um pico elevado de contaminação no sedimento em alguns pontos analisados. A *C. glabrata* foi a levedura que menos se observou em todo o trabalho, apresentando a menor densidade entre as leveduras analisadas. Apesar da *C.*

*tropicalis* não ter sido observada em todas as amostragens, foi a levedura que apresentou elevada quantidade, tanto na água como no sedimento ( $1,40 \times 10^3$  UFC  $100^{-1}$  mL e  $2,46 \times 10^3$  UFC. $100^{-1}$ g, respectivamente) (Figura 1).

As colônias isoladas em meio PDA e que mantiveram a coloração laranja avermelhadas foram identificadas molecularmente como da espécie *Rhodotorula mucilaginosa* (KT945095.1).

Figura 1: Valores médios das leveduras analisados na água (UFC  $100\text{mL}^{-1}$ ) e no sedimento (UFC  $100\text{g}^{-1}$ ), e os seus erros padrões. Na água: CAA - *Candida albicans*; CKA - *C. krusei*; CGA - *C. glabrata*; CTA - *C. tropicalis*; RmA - *Rhodotorula mucilaginosa*. No sedimento: CAS - *C. albicans*; CKS - *C. krusei*; CGS - *C. glabrata*; CTA - *C. tropicalis*; RmS - *R. mucilaginosa*.



Semelhantes resultados foram descritos por Loureiro et al. (2011) que isolou elevadas quantidades das espécies de *C. krusei*, *C. glabrata* além de *Rhodotorula sp.* no sedimento do mangue de Barra das Jangadas (PE). Estudos ambientais documentaram a presença de *Rhodotorula sp.*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida krusei* na água e sedimento de lagos e rios da Bacia do Rio Doce no Sudeste do Brasil (Medeiros et al., 2012).

Hagler et al (1986) referem as leveduras *Candida* encontradas nos sedimentos de um estuário do Rio de Janeiro são prevalentes de águas poluídas e esgotos domésticos. Em outros estudos, *C. tropicalis* e *C. krusei* foram as espécies que mais se destacaram nas comunidades em águas limpas, independente de ser marinho ou dulcícola (Kutty and Philip, 2008).

Pelo teste de correlação Spearman, *C. tropicalis* apresentou correlação negativa para os parâmetros ambientais estudados, sendo que a temperatura foi o que mais influenciou na densidade ( $r = -0,47$ ), ao contrário de *R. mucilaginosa* que foi positiva ( $r = 0,47$ ), demonstrando que a temperatura foi o fator que influenciou no resultado deste trabalho.

Houve diferença significativa ( $p<0,001$ ) pelo teste Kruskal-Wallis entre as densidades dos microrganismos estudados e material amostrado. Este trabalho resultou em altas densidades de *Candida tropicalis* na água e *R. mucilaginosa* no sedimento que podem estar relacionados com a contaminação fecal por fontes humanas e animais homeotérmicos.

## CONCLUSÕES

Apesar da espécie *C. albicans* ter sido observado em todas as amostragens, *C. tropicalis* foi o que apresentou maior densidade em ambos os materiais analisados. Verificaram-se elevadas densidades de leveduras no sedimento em relação ao encontrado na água. Existência de altas densidades de levedura da espécie *Candida sp* e *Rhodotorula mucilaginosa* na água e sedimento na região representa um resultado preocupante pois estas leveduras apresentam patogenicidade e riscos à saúde humana como para os organismos locais. Necessidade de programa de monitoramento e legislações ambientais em relação às leveduras.

## AGRADECIMENTO

Bolsa: CNPq. Apoio Institucional: MICROMAR/UNESP SV e UNESP RC.

## REFERÊNCIAS

- AMARAL, A.C.Z.; MIGOTTO, A.E.; TURRA, A.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y. 2010. Araçá: biodiversidade, impactos e ameaças. *Biota Neotrop.* 10(1): 219-264.
- APHA, American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 2005. APHA, AWWA, WEF. 21<sup>th</sup> Edition.
- ARENDRUP, M.C.; BOEKHOUT, T.; AKOVA, M.; MEIS, J.F.; CORNELY, O.A.; LORTHOLARY, O. 2014. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clin Microbiol Infect.* 20:76-98.

- BRANDÃO, L.R.; MEDEIROS, A.O.; DUARTE, M.C.; BARBOSA, A.C.; ROSA, C.A. 2010. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts isolated by multiple-tube fermentation from 3 freshwater lakes in Brazil. *J. Water & Health*, v.2, n.8, 279-289 p.
- CHENG, S.C.; JOOSTEN, L.A.; KULLBERG, B.J.; NETEA, M.G. 2012. Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense. *Infect. Immun.* 4, 1304–1131.
- HAGLER, A.N.; MENDONÇA-HAGLER, L.; SANTOS, E.; FARAGE, S.; SILVA FILHO, J.B.; SCHRANK, A.; DE OLIVEIRA, R.B. 1986. Microbial pollution indicators in Brazilian tropical and subtropical marine surfaces waters. *Sci. total Environ.*, v.12, n.58, p. 151-160.
- HAGLER A.N. 2006. Yeasts as indicator of environmental quality. In: Rosa C.A, Gábor P (Eds.), *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Berlin: Springer, p. 515-532.
- KUTTY, S.N. and PHILIP, R. 2008. Marine yeasts-a review. *Yeast*. 25:465-483.
- LOUREIRO, S.T.A.; CAVALCANTI, M.A.Q.; NEVES, R.P.; PASSAVANTE, J.Z.O. 2011. Leveduras isoladas de sedimento do manguezal de Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil. *Tropical Oceanography*, v. 39, n. 1, p. 60-68.
- MEDEIROS, A.O.; MISSAGIA, B.S.; BRANDÃO, L.R.; CALLISTO, M.; BARBOSA, F.A.R.; ROSA, C.A. 2012. Water quality and diversity of yeast from tropical lakes and rivers from the Rio Doce Basin in Southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 1582-1594
- MEYERS, S.P. and AHEARN, D.G. 1974. Implication of Yeasts and Yeast- like Fungi in Marine Process. *Veroff. Inst. Meeresforsch. Bremen. Suppl.*, 5: 321-338.
- MUELLER, G.M. and SCHMIT J. P. 2007. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodiversity and Conservation*, n. 16, 1–5 p.
- ODDS, F. C. 1988. Candida and candidoses. *Ecology of Candida and epidemiology of candidoses*. 2° ed. London: Ballière Tindall, 468p.
- OLIVEIRA, A.J.F.C. and PINHATA, J.M.W. 2008. Antimicrobial resistance and species composition of Enterococcus spp. isolated from waters and sands of marine recreational beaches in Southeastern Brazil. *Water Research*, 42(8-9):2242-50.
- PAGNOCCA, F.G; MENDONÇA-HAGLER, L.C; HAGLER, A.N. 1989. Yeasts associated with the white shrimp *Penaeus schmitti*, sediment, and water of Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brasil. *Yeast*, v. 5, p. 479–483
- STARMER, W.T. and LACHANCE, M. 2011. Yeast Ecology. The Yeasts, a Taxonomic Study. *Importance of Yeasts*. PART II. Elsevier. p.65-83.

## **Microbiolização de sementes com bactérias diazotróficas isoladas de milho**

Stevan Ricardo Bordignon<sup>1</sup>; Camila Kiritani<sup>1</sup>; Valdionei Giassi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Pesquisa Mokiti Okada, filial da Fundação Mokiti Okada, Ipeúna/SP, CEP 13537-000, Brasil.  
\*e-mail (autor para correspondência): valdionei.giassi@cpmo.org.br

---

### **RESUMO**

O trabalho prospectou cepas de bactérias diazotróficas nativas da cultura do milho e avaliou o potencial de cada uma como rizobactéria promotora do crescimento de plantas (RPCP). Foram isoladas sete cepas e caracterizadas pela produção de ácido indolacético (AIA) e fixação biológica de nitrogênio (BNF). Dentre as cepas, AZM05 foi o maior produtor de AIA ( $86,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e AZM04 o maior fixador de Nitrogênio ( $41,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Após, foi realizada a microbiolização de sementes de milho com a associação da cepa AZM04 com as outras seis. As associações AZM04+AZM06, AZM04+AZM07 e AZ-Comercial apresentaram os melhores resultados na promoção do crescimento vegetal.

**Palavras-chave:** *Zea mays*, fixação biológica de nitrogênio, AIA, RPCP.

---

### **Seeds microbiolization with diazotroph bacteria isolated from maize**

### **ABSTRACT**

It prospected strains of corn crop natives diazotroph bacteria and evaluate its potential as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). Seven strains were isolated and characterized by IAA production and biological nitrogen fixation (BNF). Among the strains, AZM05 was the greatest IAA producer ( $86.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) and AZM04 the higher nitrogen fixer ( $41.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). After, was performed the maize seeds microbiolization with the association of AZM04 strain with the other six. The AZM04+AZM06, AZM04+AZM07 associations and AZ-Comercial exhibited the best plant growth promotion results.

**Keywords:** *Zea mays*, biological nitrogen fixation, IAA, PGPR.

---

### **INTRODUÇÃO**

O milho (*Zea mays*) é uma gramínea cultivada e comercializada no mundo todo e alvo de massivos programas de melhoramento produtivo. Todavia, poucos desses focam em estratégias para a eficiência na absorção de nutrientes, o que beneficiaria tanto regiões de solos pobres, quanto na redução do uso de fertilizantes (Gilbert, 2016).

Se por um lado, o processo de domesticação e melhoramento proporcionou frutos e sementes maiores, por outro, negligenciou mecanismos que proporcionam a interação planta-rizobactérias promotoras do crescimento vegetal. Além disso, a transição para um sistema agrícola provocou a homogeneização microbiológica do solo, impactando drasticamente em interações benéficas neste ambiente (Pérez-Jaramillo et al., 2016).

Bactérias diazotróficas, como o gênero *Azospirillum*, são de vida livre e comuns na rizosfera de cereais e gramíneas, capazes de metabolizar nitrogênio de diversas fontes, executam sua fixação biológica, além de produzir auxina, influenciando na nutrição e crescimento vegetal (Steenhoudt e Vanderleyden, 2000).

Competem novas pesquisas para entender melhor e aplicar a associação planta-rizobactéria. Este trabalho se propôs a prospectar cepas de bactérias diazotróficas nativas da cultura do milho, caracterizar sua capacidade direta de influenciar o crescimento das plantas e, via microbiolização, selecionar os melhores isolados para potenciais usos na agricultura.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Parâmetros *in vitro*

**Prospecção de bactérias diazotróficas.** Para a obtenção das cepas bacterianas, primeiramente, foi coletada a mucilagem de raízes adventícias de milho experimental ZMG-01 em cultivo orgânico nove semanas após o plantio no Centro de Pesquisa Mokiti Okada (CPMO), Ipeúna-SP. As bactérias diazotróficas presentes na amostra foram isolados em meio NFB e purificados a partir de plaqueamentos sucessivos (Döbereiner et al., 1995).

**Produção de AIA.** Inicialmente, as cepas foram cultivadas em 50 mL de meio de cultura Kasvi® Tryptic Soy Broth acrescido de 1 g.L<sup>-1</sup> de triptofano. Cada frasco recebeu 100 µL de suspensão bacteriana (1,0 x 10<sup>7</sup> células.mL<sup>-1</sup>) e, mantidas sob agitação a 150 rpm por 48 h à 28°C. Uma alíquota de 2 mL da cultura foi centrifugada a 4000 rpm por 15 min. Posteriormente, em 1,5 mL do sobrenadante adicionou-se 1,5 mL de reagente de Salkowski (Patten e Glick, 2002). Após 20 minutos, ocorreu a leitura em espectrofotômetro a 530 nm para a quantificação do fitormônio (Asghar et al., 2002). Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por cepa.

**Fixação Biológica de Nitrogênio.** As cepas isoladas foram cultivadas em tubos de ensaio 20x 70 mm, com 10 mL de meio de cultura NFB (Döbereiner et al., 1995). Cada tubo foi inoculado com 100  $\mu$ L de suspensão ( $1,0 \times 10^8$  células.mL $^{-1}$ ). Como controle, foi utilizado o meio de cultura sem micro-organismos. As culturas foram incubadas à 28°C por 7 dias (Kuss et al., 2007). A quantificação de nitrogênio procedeu pelo método semi-micro Kjeldahl (Malavolta et al., 1997). Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por cepa.

### Parâmetros *in vivo*

**Microbiolização de sementes.** Este experimento foi conduzido conforme metodologia adaptada de Amorim e Melo (2002). Sementes de milho Biomatrix® BM3061 foram desinfestadas em solução 0,7 % de hipoclorito de sódio durante 5 min e lavadas em água deionizada estéril. Após 2 horas à 25°C, as sementes foram imersas em suspensões de  $1,0 \times 10^8$  células.mL $^{-1}$  por 15 min, compostas pela cepa isolada (AZM04) e associações, compondo os tratamentos. Após 2 horas, foi semeada uma semente por tubete (150 cm $^3$ ) contendo substrato composto de solo e areia (1:1). A testemunha consistiu de sementes desinfestadas e imersas em água deionizada estéril. O controle positivo (AZ-Comercial) consistiu do uso de produto comercializado à base de *Azospirillum* ( $1,0 \times 10^8$  células.mL $^{-1}$ ). Vinte dias após o plantio, o diâmetro do caule foi mensurado com paquímetro digital e as plantas foram secas a 105°C por 24h para avaliar a massa seca da raiz e da parte aérea. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, com 13 repetições por tratamento.

Todos os dados obtidos foram submetidos à análise da variância ANOVA, sendo as médias comparadas entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade através do software estatístico SISVAR (Ferreira, 2000).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas sete cepas de bactérias diazotróficas. Dos parâmetros avaliados *in vitro*, a produção de Ácido Indol-acético apresentou resultados entre 48 e 86  $\mu$ g.mL $^{-1}$  sendo o isolado AZM05 o maior produtor (Tabela 1). As concentrações são maiores que as apresentadas por Kuss et al. (2007). A fixação biológica de Nitrogênio ocorreu em todas as cepas e as que mostraram melhor desempenho foram AZM04 e AZM03 com 41,06 e 37,80  $\mu$ g.mL $^{-1}$ , respectivamente. Valores semelhantes foram expostos por Kuss

et al. (2007). Os resultados demonstram a capacidade dos isolados em promover o crescimento vegetal, pois essas características influenciam diretamente na nutrição e fisiologia da planta (Glick, 2012).

**Tabela 1** – Caracterização das cepas pela produção de AIA e fixação biológica de Nitrogênio (N).

Linhagem	AIA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	N ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
AZM05	86,08 a <sup>1</sup>	13,06 b <sup>1,2</sup>
AZM04	74,28 b	41,06 a
AZM01	74,24 b	29,86 a
AZM02	59,45 c	25,66 a
AZM06	58,12 c	17,26 b
AZM03	53,81 c	37,80 a
AZM07	48,03 c	17,73 b
Controle	0,17 d	9,80 b
CV (%)	9,63	18,85

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. <sup>2</sup>Dados transformados ( $X^{0,5}$ ).

A fim de avaliar a promoção do crescimento vegetal *in vivo*, foi realizada a microbiolização das sementes de milho combinando a cepa AZM04 com as outras seis cepas isoladas, no intuito de encontrar associação benéfica que pudesse favorecer o crescimento da cultura do milho. Selecionou-se a linhagem AZM04 por apresentar os melhores resultados *in vitro* na biofixação de nitrogênio e relativamente boa produção de AIA. Com os resultados obtidos (Tabela 2), verificou-se que as combinações AZM04+AZM06, AZM04+AZM07 e AZ-Comercial proporcionaram aumento significativo nos três parâmetros avaliados *in vivo*, quando comparadas ao controle. Os resultados condizem com a literatura, onde a associação com bactérias diazotróficas beneficia o crescimento vegetal (Steenhoudt e Vanderleyden, 2000).

As demais combinações proporcionaram maior crescimento vegetal que o controle, embora não significativo. O fato da baixa promoção de crescimento pode ser devido a três fatores: por diferentes modos de ação das bactérias envolvidas, por competição entre as cepas, ou pela combinação entre cepas não ter sido adequada. Se existisse sinergismo entre as cepas, os resultados possivelmente teriam se mostrado mais favoráveis ao crescimento da planta, conforme cita Giassi et al. (2016).

**Tabela 2** – Massa seca da parte aérea, massa seca da raiz e diâmetro do caule de sementes de milho BM3061 microbiolizadas com combinações de cepas de bactérias diazotróficas.

Tratamentos	Massa Seca Parte Aérea (g)	Massa Seca Raiz (g)	Diâmetro do Caule (cm)
AZM04 + AZM06	0,2391 a <sup>1</sup>	0,3121 a	4,84 a
AZ-Comercial	0,2196 a	0,2658 a	4,58 a
AZM04 + AZM05	0,2063 a	0,2677 a	4,43 b
AZM04 + AZM07	0,1984 a	0,2855 a	4,66 a
AZM04 + AZM02	0,1858 b	0,2894 a	4,42 b
AZM04 + AZM01	0,1775 b	0,2971 a	4,26 b
AZM04 + AZM03	0,1769 b	0,2806 a	4,23 b
AZM04	0,1699 b	0,2573 a	4,29 b
Controle	0,1633 b	0,2776 a	4,25 b
CV (%)	26,49	16,40	10,00

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%.

## CONCLUSÕES

A cepa AZM05 foi a maior produtora de AIA ( $86,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e AZM04 a maior fixadora de nitrogênio ( $41,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). As melhores combinações de cepas na promoção do crescimento de plantas de milho foram AZM04+Azm06, AZM04+Azm07 e AZ-Comercial. Trabalhos a campo são necessários para comprovar a eficiência dos mesmos.

## AGRADECIMENTO

Ao Centro de Pesquisa Mokiti Okada filial da Fundação Mokiti Okada, pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- AMORIM, E.P.R. and MELO, I.S. 2002. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. *Revista Brasileira de Fruticultura*, vol. 24, pp. 565-568.
- ASGHAR, H., ZAHIR, Z., ARSHAD, M. and KHALIQ, A. 2002. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biology and Fertility of Soils*, vol. 35, no. 4, pp. 231-237.
- DÖBEREINER, J., BALDANI, V.L.D., BALDANI, J.I. 1995. *Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas*. Brasília: EMBRAPA-SPI/Itaguaí: EMBRAPA-CNPAB. 60p.

- FERREIRA, D.F. 2000. *Manual do Sistema SISVAR para análises estatísticas*. Lavras: Universidade Federal de Lavras. 66 p.
- GIASSI, V., KIRITANI, C., KUPPER, K.C. 2016. Bacteria as growth-promoting agents for citrus rootstocks. *Microbiological Research*, v. 190, pp. 46-54.
- GILBERT, N. 2016. The race to create super-crops. *Nature*, vol. 533, no. 7603, pp. 308-310.
- GLICK, B.R. 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, v. 2012.
- KUSS, A.V., KUSS, V.V., LOVATO, T. and FLÔRES, M.L. 2007. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 42, pp. 1459-1465.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C. and DE OLIVEIRA, S.A, 1997. *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. Piracicaba: Potafos. 319 p.
- PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, no. 8, pp. 3795-3801.
- PÉREZ-JARAMILLO, J.E.; MENDES, R. and RAAIJMAKERS, J.M. 2016. Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. *Plant Molecular Biology*, vol. 90, no. 6, pp. 635-644.
- STEENHOUT, O. and VANDERLEYDEN, J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 24, no. 4, p. 487-506.

## **Seleção de fungos filamentosos produtores de celulases e otimização da produção enzimática**

Tarcisio Michael Ferreira Soares de Oliveira<sup>1\*</sup>; Barbhara Mota Marinho<sup>1</sup>; Vivian Machado Benassi<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – Campus Janaúba, Instituto de Engenharia, Ciência e Tecnologia, Janaúba, Minas Gerais, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – Campus Diamantina, Instituto de Ciência e Tecnologia, Diamantina, Minas Gerais, Brasil.

\*e-mail: tarcisio.michael@yahoo.com.br

---

### **RESUMO**

A biomassa lignocelulósica é constituída principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. A conversão da celulose em açúcares suscetíveis de fermentação é realizada por enzimas celulolíticas, como: CMCase, Avicelase e FPase. O presente trabalho teve como objetivo analisar a produção das CMCase, Avicelase e FPase e a ação enzimática sob a biomassa lignocelulósica, além de definir parâmetros físico-químicos para uma melhor produção de celulases. Os fungos filamentosos isolados da palha da cana-de-açúcar proveniente da Usina São Judas Tadeu – Sada Bio-Energia (Jaíba-MG) foram cultivados em meio Khanna modificado, em pH 5, por 4 dias, à 30 °C, de forma estacionária, sendo os ensaios enzimáticos realizados para FPase e para a CMCase e Avicelase. Foram isolados um total de seis fungos: *Mucor* (3.2TA), *Neurospora* (3.3TA), *Aspergillus* (3.5TA), *Mucor* (3.4TA), *Aspergillus* 3.7TA e *Mucor* (3.8TA) , destes apenas três mostraram-se como potenciais produtores das celulases, sendo esses: *Aspergillus* (3.7TA), *Aspergillus* (3.5TA) e *Neurospora* (3.3TA)., Observou-se que o *Aspergillus* (3.7TA) apresentou melhor produção celulolítica no meio CP associado com sais Welson, empregando o extrato de levedura e o farelo de trigo como fonte de nitrogênio e de carbono, respectivamente, durante sete dias, à 30°C.

**Palavras-chave:** Enzimas, *Aspergillus*, CMCase, FPase, Avicelase.

---

**Selection of filamentous fungi producer of cellulases and optimization of the enzymatic production**

### **ABSTRACT**

The lignocellulosic biomass consists mainly of cellulose, hemicellulose and lignin. The conversion of cellulose into sugars susceptible to fermentation is performed by cellulolytic enzymes, such as: CMCase, Avicelase and FPase. The present work aimed to analyze the production of CMCase, Avicelase and FPase and the enzymatic action under the lignocellulosic biomass, in addition to defining physicochemical parameters for a better production of cellulases. The filamentous fungi isolated from sugarcane straw from the São Judas Tadeu-Sada Bio-Energia (Jaíba-MG) plant were grown in modified Khanna medium at pH 5 for 4 days at 30°C in a stationary manner , And

enzymatic assays were performed for FPase and for CMCase and Avicelase. A total of six fungi were isolated: *Mucor* (3.2TA), *Neurospora* (3.3TA), *Aspergillus* (3.5TA), *Mucor* (3.4TA), *Aspergillus* 3.7TA and *Mucor* (3.8TA), of these only three were potential Producers of cellulases, such as: *Aspergillus* (3.7TA), *Aspergillus* (3.5TA) and *Neurospora* (3.3TA). It was observed that *Aspergillus* (3.7TA) presented better cellulolytic production in the CP medium associated with Welson salts, using the yeast extract and wheat bran as nitrogen and carbon source, respectively, for seven days at 30°C.

**Keywords:** Enzymes, *Aspergillus*, CMCase, FPase, Avicelase.

---

## INTRODUÇÃO

No Brasil a agricultura é a principal atividade econômica, dessa forma observa-se uma grande quantidade de resíduos e subprodutos agrícolas que porventura não possuem nenhuma ou pouca aplicação (Pirota *et al.*, 2015). Essa biomassa lignocelulósica é considerada material de partida para muitos processos industriais, a qual é constituída por microfibras de celulose incorporada na matriz de hemicelulose reticulada e lignina (Baramee *et al.*, 2015).

A celulose caracteriza-se por ser um homopolímero de glicose; enquanto que a hemicelulose é uma cadeia altamente ramificada de xilose e arabinose, que contém também glicose, manose e galactose; e a lignina, um polímero amorfo de fenil e unidades de propanoide (Basso *et al.*, 2010).

Devido à complexidade da biomassa lignocelulolítica, faz-se necessário a ação de sistemas enzimáticos para degradação desses compostos, tais como as celulases que consiste em endoglucanases, celobiohidrolases (exoglucanase) e  $\beta$ -glucosidase, que atuam sinergicamente na conversão da celulose em glicose (Delabona *et al.*, 2016).

Esse trabalho objetivou analisar a produção celulolítica de fungos filamentosos previamente isolados da palha da cana-de-açúcar proveniente da Usina São Judas Tadeu – Sada Bio-Energia (Jaíba-MG). Bem como, após a padronização do micro-organismo para estudo, otimizar as condições de cultivo do mesmo para uma maior produção enzimática.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Determinação dos parâmetros físico-químicos do cultivo do *Aspergillus sp. 3.7TA*

Analisou-se a produção celulolítica cultivando os fungos filamentosos previamente isolados da palha da cana-de-açúcar na usina de álcool e açúcar São Judas Tadeu – SADA Bio-Energia e Agricultura LTDA (Jaíba-MG), em meio de cultura CP

(Peixoto *et al.*, 2003), e após a determinação do fungo para desenvolvimento do trabalho, o mesmo foi cultivado no meio CP com diferentes soluções de sais do meio: (1) os próprios sais do meio CP (0,03% (m/v) de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 0,05% (m/v) de  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ); (2) meio CP sem sais com solução de sais do meio SR modificado (0,3% (m/v)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 0,24% (m/v)  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ); (3) meio CP sem sais com 0,05% (m/v) de sais Wesson; e (4) sais do meio CP acrescidos de sais Wesson. Os meios foram mantidos durante quatro dias em estufa bacteriológica, de forma estacionaria, à 30 °C.

Para analisar a influência do tempo de cultivo e da fonte de nitrogênio inoculou-se *Aspergillus sp.* TA3.7 em meio submerso CP sem sais, acrescido de 0,05% (m/v) de sais Wesson, tendo o farelo de trigo como fonte de carbono, utilizando-se (1) 0,8% (m/v) de extrato de levedura ou (2) 0,8% (m/v) de peptona. Os meios foram mantidos em estufa bacteriológica, sob condição estática, à 30°C, durante dez dias, sendo retirados os meios a cada 24 horas.

Para avaliar a influência de diferentes fontes de carbono, o fungo *Aspergillus sp.* 3.7TA foi cultivado em meio submerso CP sem sais, acrescido de sais Welson, contendo extrato de levedura como fonte de nitrogênio, sendo mantidos por seis dias em estufa bacteriológica, à 30°C. As fontes de carbono (0,375g), avaliadas foram: Farinha de Chia Fito Alimentos®, Farinha de Linhaça Fito Alimentos®, Farelo de Trigo Fito Alimentos®, Farelo de Aveia Fito Alimentos®, Farinha de Trigo Integral Fito Alimentos®, Farinha de Aveia Quaker®, Fubá Sinhá®, Bagaço de cana-de-açúcar, Farinha de Trigo Vilma®, Farinha de Rosca, Palha da Bananeira, Fibra do Coco e Extrato de Soja Viver Bem®; para controle utilizou-se o meio de cultura que não continha fonte de carbono.

### **Determinação das atividades enzimáticas**

A atividade da CMCase foi realizada utilizando-se o substrato CM-celulose SIGMA® 2% em tampão citrato de sódio 100 mM, pH 4,8, enquanto que a atividade da Avicelase foi determinada utilizando o Avicel Fluka® 1% em tampão citrato de sódio 100 mM, pH 4,8, segundo Miller (1959), à 55°C. Em relação à atividade da *Filter Paperase* (FPase) utilizou-se Papel Filtro Whatman Nº 1 (1,0 x 6,0 cm) como substrato de acordo com a metodologia de Ghose (1987). O método foi previamente padronizado por uma curva padrão de glicose (0,1 a 1,0 mg/mL), sendo a unidade de atividade (U) definida como a quantidade de enzima que hidrolisa um  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto, nas condições de ensaio. A atividade total (U total) =  $\mu\text{mol}/\text{mL} \times$  volume do filtrado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que a partir do material coletado foram isolados seis distintos micro-organismos, dos quais o fungo *Aspergillus* sp. 3.7TA apresentou melhor produção enzimática em relação aos outros, com atividade de CMCase de 9,2 U totais, Avicelase 3,0 U totais e FPase 3,7 U totais, seguido do micro-organismo *Aspergillus* sp. 3.5TA com uma atividade CMCase de 9,20 U totais, e FPase de 3,70 U totais..

Avaliando a influência dos sais no meio de cultura, pode-se visualizar que a maior atividade celulolítica foi obtida cultivando o micro-organismo em meio CP sem sais acrescido de 0,05% (m/v) de sais Welson, com 15,22 U totais de atividade CMCase; 2,882 U totais de Avicelase e atividade da FPase foi de 5,95 U total.

Em relação à fonte de nitrogênio do meio de cultura, o extrato de levedura mostrou-se uma melhor fonte indutora da produção enzimática pelo *Aspergillus* sp.3.7TA em comparação à peptona. A atividade CMCase no sétimo dia de cultivo do fungo foi de 23,15 U totais, FPase foi de 4,73 U totais, e Avicelase 1,71 U totais, com extrato de levedura, enquanto que, utilizando-se peptona as atividades foram de CMCase 21,25 U totais, FPase 3,81 e Avicelase 0,74 U totais.

Dessa forma, pode-se determinar que entre o sétimo dia de crescimento do fungo com o extrato de levedura como fonte de nitrogênio, a CMCase, FPase e Avicelase apresentaram atividades significativas quando comparadas aos demais dias de fermentação. Esses resultados corroboram com os obtidos por Sales e colaboradores (2010), os quais avaliaram as melhores condições para produção das celulases pelo fungo *Aspergillus aculeatus* utilizando-se o bagaço de cana-de-açúcar residual como fonte de carbono.

Por fim, analisaram-se diferentes fontes de carbono indutoras da produção de celulases pelo fungo *Aspergillus* sp. 3.7TA, dentre as quais pode-se observar que tanto para a atividade da FPase quanto para a atividade da CMCase, o farelo de trigo foi a melhor fonte de carbono, obtendo uma atividade de 5,519 U totais e 23,327 U totais, respectivamente, entretanto, a atividade da Avicelase foi maior quando utilizado a fonte de carbono farelo de aveia como indutora do crescimento do micro-organismo, obtendo 4,370 U totais, o farelo de trigo apresentou a quarta melhor atividade com 1,474 U totais. Pode-se inferir que ambas as atividades das celulases obtidas foram expressivamente superiores às encontradas nas outras fontes de carbono.

Esses resultados corroboram com os observados por Rodríguez-Zúñigae colaboradores (2011) que concluiu que a produção celulolítica por *Aspergillus niger* na

fermentação em estado sólido de farelo de trigo foi superior, quando comparada com o bagaço de cana-de-açúcar e farelo de soja. Albano (2016) afirma que o uso do farelo de trigo é a fonte de carbono ideal para a alta produtividade de celulases e xilanases obtidas a partir da fermentação, uma vez que além de utilizada como fonte de carbono é vista como uma excelente fonte de nitrogênio, sendo de fácil acesso e baixo custo.

## CONCLUSÃO

A linhagem *Aspergillus* (3.7TA) mostrou-se promissora com uma potencial produtora de celulases, sendo ideal para uma futura aplicação tecnológica, na área de biocombustíveis e indústria de papel.

## REFERÊNCIAS

- ALBANO, M. 2012. Comparação da Produção de Celulases e Xilanases por Fungos Filamentosos em Fermentação Submersa e Estado Sólido. São José do Rio Preto: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho 82 p. Dissertação de Mestrado em Microbiologia.
- BARAMEE, S.; PHITSUWAN, P.; WAEONUKUL, R.; PASON, P.; TACHAAPAIKOON, C.; KOSUGI, A.; RATANAKHANOKCHAI, K. 2015. Alkaline xylanolytic-cellulolytic multienzyme complex from the novel anaerobic alkalithermophilic bacterium *Cellulosibacter alkalithermophilus* and its hydrolysis of insoluble polysaccharides under neutral and alkaline conditions. *Process Biochemistry*, vol. 50, pp. 643-650.
- BASSO, P. B.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. 2010. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 45, no 11, pp. 1282-1289.
- DELABONA, P. S.; LIMA, D. J.; ROBL, D.; RABELO, S. C.; FARINAS, C. S.; PRADELLA, J. G. C. 2016. Enhanced cellulase production by *Trichoderma harzianum*

by cultivation on glycerol followed by induction on cellulosic substrates. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* , vol. 43, pp.617-626.

GHOSE, T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, vol. 59, no 2, pp. 257-268.

MILLER, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, vol. 11, pp. 426-428.

PIROTA, R. D. P. B.; TONCLOTTO, M.; DELABONA, P. S.; TREMACOLDI, C. R.; FARINA, C. S. 2015. Characterization of fungi isolated from the Amazon region for the potential of biomass-degrading enzymes production. *Ciência Rural*, Vol.45, no. 9, pp. 1606-1612.

RODRIGUEZ-ZÚÑIGA, U. F., FARINAS, C. S., BERTUCCI NETO, V., COURI, S., CRESTANA, S. 2011. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 46, no 8, pp.912-919.

SALES, M. R., MOURA. R. B., PORTO, T. S., MACEDO, G. R., PORTO, A. L. F. 2010. Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 45, no 11, pp.1290-1296.

## **Influência do meio na produção de biosurfactante pela *Rhodotorula mucilaginosa***

Thamirys G. C. Sousa<sup>1</sup>; Taís A. Pinheiro<sup>2</sup>; Hugo A. Camargo<sup>3</sup>; Elias B. Tambourgi<sup>1</sup>; Lara D. Sette<sup>4</sup>;  
Adalberto Pessoa Jr.<sup>5</sup>; Vicelma L. Cardoso<sup>2</sup>; Ubirajara Coutinho-Filho<sup>2</sup>; Edgar Silveira<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica.

<sup>4</sup>Universidade Estadual Paulista *Campus* Rio Claro, Departamento de Bioquímica e Microbiologia.

<sup>5</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

\* [silveira@ingebr.ufu.br](mailto:silveira@ingebr.ufu.br)

---

### **RESUMO**

Os surfactantes biológicos são metabolitos, produzidos por microrganismos, que apresentam baixa toxicidade, são biodegradáveis e biocompatíveis. O presente trabalho teve como objetivo analisar a influência das fontes de carbono e nitrogênio na produção do biosurfactante pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa*. Para analisar a produção do biosurfactante realizou-se índice de emulsificação em óleo mineral e teste de tensão superficial. Observou-se que para a fontes de carbono os melhores resultados obtidos para ambos os testes foi, extrato de levedura, extrato de abacaxi e de caju. Para as fontes de nitrogênio, peptona e sulfato de amônia foram selecionadas. Após a seleção das melhores fontes de carbono e nitrogênio é possível traçar planejamentos com a intenção de otimizar a produção do surfactante biológico, utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono.

**Palavras-chave:** Biosurfactante, leveduras, fermentação, abacaxi, caju.

---

**Influence of the source of carbon and nitrogen in the production of biosurfactant  
by *Rhodotorula mucilaginosa***

---

### **ABSTRACT**

Biological surfactants are metabolites, produced by microorganisms, that present low toxicity, are biodegradable and biocompatible. The present work had as objective to analyze the influence of carbon and nitrogen sources on the production of the biosurfactant by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. In order to analyze the biosurfactant production, mineral emulsification index and surface tension test were performed. It was observed that for carbon sources the best results obtained for both tests were yeast extract, pineapple extract and cashew. For the sources of nitrogen,

peptone and ammonium sulfate were selected. After the selection of the best sources of carbon and nitrogen, it is possible to draw up experimental planning with the intention of optimizing the production of biological surfactant, using agroindustrial residues as carbon source.

**Keywords:** Biosurfactant, yeast, fermentation, peniapple, cashew.

---

## INTRODUÇÃO

Surfactantes são moléculas anfipáticas. Devido esta característica apresentam propriedades, como: redução da tensão superficial e interfacial de misturas imiscíveis, da concentração crítica de micelas, entre outras particularidades que os tornam alvos de estudo e interesse de diversas modalidades industriais (Ghojavand et al. 2008, Banat et al. 2000).

Os Biosurfactantes são biomoléculas produzidas por microrganismos que apresentam, praticamente todas as características dos surfactantes sintéticos, além disso, possuem baixa ou nenhuma toxicidade, alta biodegradabilidade, biocompatibilidade e especificidade, e a maioria se mantém estável em condições ambientais extremas (Desai and Banat, 1997). Existem diversos tipos de biosurfactantes, sua classificação é baseada nas propriedades físico-químicas, (Cameotra et al., 2010).

O crescente interesse das indústrias na melhoria da produção de biosurfactantes promoveu o aumento da investigação do uso de resíduos agroindustriais, como resíduos do processamento de caju e abacaxi, para a composição dos meios de cultura. O abacaxi (*Ananas comosus*) é extensivamente cultivado no Brasil (Silveira et al., 2009), durante o processo industrial, a coroa, as folhas e o caule são removidos antes do processamento. De acordo com dados do IBGE de 2010, no Brasil a região nordeste é onde se encontra maior quantidade de indústrias de beneficiamento da castanha de caju (*Anacardium occidentale*), sendo os estados do Ceará e Piauí os maiores produtores. Anualmente são produzidas cerca de 200 mil toneladas de amêndoas e 2 milhões de toneladas de pedúnculo.

O presente trabalho teve como objetivo determinar a influência das fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção de biosurfactante pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Resíduos agroindustriais

Os resíduos agroindustriais de abacaxi (*Ananas comosus*) e caju (*Anacardium occidentale*) foram adquiridos nos mercados locais. Os resíduos de abacaxi constaram basicamente de casca e folhas do abacaxizeiro e, os resíduos de caju basicamente do pedúnculo do fruto do cajueiro.

### Obtenção dos microrganismos

A levedura da Antártica, *Rhodotorula mucilaginosa*, codificada por L69, é proveniente da coleção de culturas da Divisão de Recursos Microbianos do Centro Pluridisciplinas de Pesquisas Químicas, Biológicas Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA/Unicamp).

### Influencia da fonte de Carbono e Nitrogênio na produção de biossurfactante

O microrganismos foi inoculado em frascos Erlenmeyers de 200 mL contendo meio YPD modificado para seleção de fonte de carbono e nitrogênio. A seleção de fonte de carbono foi realizada pela substituição da glicose por fontes alternativas: acetato de sódio, citrato de sódio, glicose, sacarose, peptona, extrato de levedura, extrato de abacaxi e extrato de caju, em uma quantidade suficiente para atingir a mesma quantidade de açúcares redutores do meio YPD, ou seja, 10 g/L. A fonte de nitrogênio foi realizada substituindo o extrato de levedura e peptona, pelos seguintes compostos: citrato de amônio, nitrato de amônio, sulfato de amônio, peptona e extrato de levedura, na concentração de 2 g/L. Na composição dos meios também utilizou uma solução salina contendo: 10 g/L de NaCl, 5 g/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,2 g/L de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. A fermentação foi realizada durante 56 horas a 15 °C.

### Índice de emulsificação (E24)

O índice de emulsificação foi determinado a partir da metodologia descrita por Cai et al. (2014), a qual consiste na mistura de solução aquosa livre de células do caldo fermentativo com o óleo mineral, na proporção de 1:1. A mistura foi agitada vigorosamente num vortex durante dois minutos à temperatura ambiente e deixada em repouso por 24 horas. A taxa de emulsificação foi calculada pela divisão da altura da parte emulsificada pela altura total e a razão multiplicada por 100.

## Tensão Superficial

Para análise da tensão superficial, utilizou-se 10 ml da amostra da solução aquosa livre de células do caldo fermentativo. O método utilizado foi o do anel de du Noüy (1925), com o tensiômetro modelo K6 (Krüss GmbH, Humbergo, Alemanha), à temperatura ambiente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As figuras abaixo demonstraram os resultados de tensão superficial e índice de emulsificação em óleo mineral, com a finalidade de selecionar as melhores fontes de carbono e nitrogênio para a levedura L69.

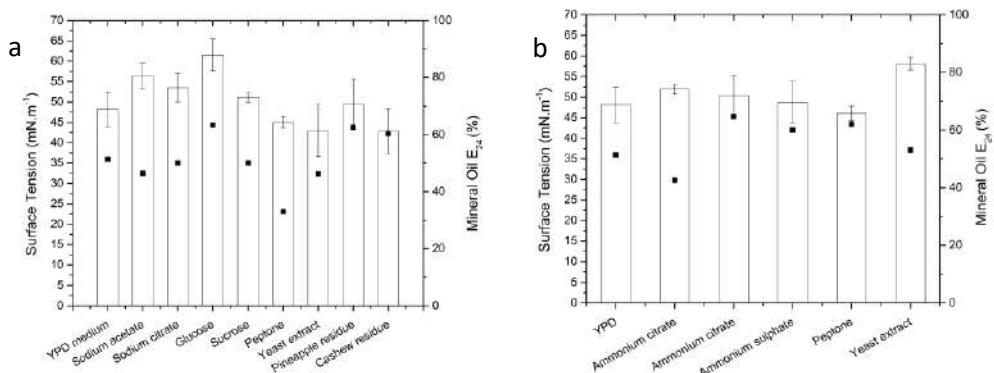


Figura 1: Tensão superficial ( $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ) e índice de emulsificação em óleo mineral (%), da levedura L69 a. em diferentes fontes de Carbono; b. Em diferentes fontes de nitrogênio. Legenda: Colunas representam os resultados da tensão superficial e os ■ representam os dados do índice de emulsificação.

Observando a figura 1a é possível determinar que os melhores resultados para índice de emulsificação foram obtidos pelos meios contendo como fontes de carbono a glicose, o extrato de abacaxi e o de caju, quando comparados ao meio padrão YPD e os demais meios testados, sendo que os três obtiveram índices acima de 60%. Em relação ao segundo teste, análise da tensão superficial, os melhores meios foram: peptona, extrato de levedura e caju, obtendo 45, 43 e 43  $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ , respectivamente.

Uma análise estatística foi realizada comparando os dados do extrato de abacaxi e de caju e comprovou-se que eles são estatisticamente iguais, portanto a utilização de qualquer um produz resultados semelhantes nos testes realizados. Com isso, os meios selecionados por apresentarem o melhor desempenho nos dois testes foram o de abacaxi e de extrato de levedura. A preferência pela utilização do meio obtido através dos resíduos de abacaxi ao produzido a partir do pedúnculo do caju, deve-se pela praticidade

de encontrar o primeiro, sendo uma fruta típica da região Sudeste, que pode ser obtida em qualquer época do ano, com uma maior facilidade quando comparada ao caju. O extrato de levedura foi selecionado por ser o que apresentou uma maior redução da tensão superficial, sendo esse um dos principais testes para produção de biosurfactante.

Na figura 1b, estão representados os dados referentes aos meios para análise das melhores fontes de Nitrogênio. Para o teste de índice de emulsificação, os melhores meios foram: nitrato de amônia, sulfato de amônia e peptona, com 65, 60 e 62 %, respectivamente. Em relação ao teste de tensão superficial, os melhores resultados, com 48,5 e 46 mN.m<sup>-1</sup>, foram dos meios sulfato de amônia e peptona, nesta ordem. Ao avaliar o desempenhos dos três melhores meios (nitrato de amônia, sulfato de amônia e peptona) nos dois ensaios considerados, optou-se por selecionar como fontes de nitrogênio mais promissoras, o sulfato de amônia e peptona, por conterem dados satisfatórios em ambos testes.

## CONCLUSÕES

A partir destes resultados, selecionou-se as melhores fontes de carbono e nitrogênio, sendo elas: extrato de abacaxi, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônia. Os próximos passos incluem a execução de um planejamento experimental 2<sup>n-1</sup>, para identificar as melhores concentrações de cada composto.

## AGRADECIMENTO

Agradeço a Fapemig/CNPq/Capes/Fapesp pelos auxílios financeiros.

## REFERÊNCIAS

BANAT, I.M., MAKKAR, R.S., CAMEOTRA, S.S., 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 53, pp. 495-508.

CAI, Q., ZHANG, B., CHEN, B., ZHU, Z., LIN, W., CAO, T., 2014. Screening of biosurfactante producers from petroleum hydrocarbon contaminated sources in cold marine environments. *Marine pollution bulletin*, vol. 86, pp. 402-410.

CAMEOTRA, S.S., MAKKAR, R.S., KAUR, J., MEHTA, S.K., 2010. Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. *Adv Exp Med Biol*, vol. 672, pp. 261–280.

DESAI, J.D. and BANAT, I.M., 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potentials. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 61, pp. 47-64.

DU NOÜY, P.L., 1925. An Interfacial Tensiometer for Universal Use. *The Journal of General Physiology*, vol. 7, pp. 625-633.

GHOJAVAND, H., VAHABZADEH, F., ROAYAEIB, E., SHAHRAKI, A. K., 2008. Production and properties of a biosurfactant obtained from a member of the *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696). *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 324, pp. 172-176.

SILVEIRA, E., MARQUES, P. P., SILVA, S. S., LIMA-FILHO, J. L., PORTO, A. L. F., TAMBOURGI, E.B., 2009. Selection of *Pseudomonas* for industrial textile dyes decolourization. *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 63, no. 2, pp. 230-235.

## Produção de enzimas lignocelulolíticas em lodo branco por diferentes *Aspergillus*

Thiago Machado Pasin<sup>1\*</sup>, Rosymar Coutinho de Lucas<sup>1,2</sup>, Ana Sílvia de Almeida Scarcella<sup>1</sup>, Yuri Heck da Silva<sup>2</sup>, Jorge Henrique Almeida Betini<sup>2</sup>, João Atílio Jorge<sup>2</sup>, Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP.

<sup>2</sup>Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP.

\*e-mail: thiagopasin@hotmail.com

---

### RESUMO

Nas indústrias de papel ocorre a geração de um efluente denominado lodo branco, cuja composição consiste em celulose, lignina e hemicelulose. A produção de enzimas lignocelulolíticas utilizando-se de resíduos industriais é uma estratégia para a hidrólise de biomassa a fim de produzir bioetanol. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de enzimas lignocelulolíticas por diferentes *Aspergillus* cultivados neste resíduo. O cultivo foi em meio mínimo, pH 6,5, com 1% de Lodo Branco "in natura" (LBIN), lavado com água (LBLA) e tratado com HCl (LBHCl). O inóculo foi feito com  $10^7$  esporos/mL, cultivado a 30°C, 120 rpm, durante 5 dias. A cada 24 horas foram coletados 2 mL das amostras. A atividade enzimática foi realizada após incubação do extrato bruto com 1% de substratos naturais e 2 mM dos sintéticos, a 50°C, 60 minutos. Os extratos de *A. brasiliensis* e *A. niveus* cultivados em LBIN durante 120 horas, apresentaram alta produção de  $\beta$ -glucosidases, além disso, *A. niveus* e *A. clavatus* apresentaram produção de xilanases, nestas mesmas condições. Quando em LBHCl, *A. brasiliensis* e *A. clavatus* apresentaram boa produção de xilanases,  $\beta$ -xilosidases e  $\beta$ -glucosidases. O extrato de *A. clavatus* cultivado em LBLA apresentou produção de xilanase e  $\beta$ -glucosidase, já o extrato de *A. niveus* apresentou produção de xiloglucanase,  $\beta$ -glucosidase e celobiohidrolase, enquanto que em LBHCl, *A. niveus* foi capaz de produzir xilanase, endoglucanase,  $\beta$ -glucosidase e celobiohidrolase. Esses dados sugerem o grande potencial da produção de enzimas lignocelulolíticas no lodo branco com potencial de aplicação biotecnológica.

**Palavras-chave:** *Aspergillus brasiliensis*; *Aspergillus clavatus*; *Aspergillus niveus*; Aplicação biotecnológica; Bioetanol.

---

### Production of lignocellulolytic enzymes in paper sludge by different *Aspergillus*

### ABSTRACT

In the paper industry occurs the generation of a specific effluent, called paper sludge. This sludge has in its composition cellulose, lignin and hemicellulose. The production of lignocellulolytic enzymes using industrial waste is a strategy for the biomass hydrolysis in order to produce bioethanol. Thus, this work aimed to evaluate the production of lignocellulolytic enzymes by different *Aspergillus* grown in the paper sludge. The culture was done in minimal medium, pH 6.5, with 1% paper sludge "in

natura" (PSIN), washed with water (PSW) and treated with HCl (PSHCl). The inoculum was performed with  $10^7$  spores/mL, cultivated at 30°C, 120 rpm, for 5 days. Every 24 hours were collected 2 mL of the sample. The enzymatic activity was performed after the incubation of the crude extract with 1% natural and 2 mM of synthetic substrates, at 50°C, for 60 minutes. The extracts of *A. brasiliensis* and *A. niveus* cultivated in PSIN for 120 hours showed high production of  $\beta$ -glucosidases, in addition, *A. niveus* and *A. clavatus* presented xylanases production under the same conditions. When cultivated in PSHCl, *A. brasiliensis* and *A. clavatus* showed good production of xylanases,  $\beta$ -xylosidases and  $\beta$ -glucosidases. The extract of *A. clavatus* cultivated in PSW showed good production of xylanase and  $\beta$ -glucosidases, the extract of *A. niveus* showed production of xyloglucanase,  $\beta$ -glucosidase and cellobiohydrolase, whereas in PSHCl, *A. niveus* was able to produce xylanase, endoglucanase,  $\beta$ -glucosidase and cellobiohydrolase. These data suggest the great potential of lignocellulolytic enzymes production in the paper sludge with potential of biotechnological application.

**Keywords:** *Aspergillus brasiliensis*; *Aspergillus clavatus*; *Aspergillus niveus*; Biotechnology application; Bioethanol.

---

## INTRODUÇÃO

Os micro-organismos são muito estudados mundialmente, dentre eles estão os fungos com sua capacidade de produzir diferentes enzimas. Eles são considerados atrativos por diversas razões, dentre elas, a rapidez com que eles se reproduzem em larga escala em métodos pré-estabelecidos de cultivo (Hatti-Kaul, 2004).

Os resíduos lignocelulósicos são considerados uma das principais fontes de matéria orgânica do planeta, apresentando como vantagem a facilidade de obtenção e grande abundância na natureza (Monte, 2009). Estes resíduos consistem, principalmente, de três diferentes tipos de polímeros: celulose, hemicelulose e lignina, que estão associados entre si. Enzimas fúngicas capazes de hidrolisar celulose e hemicelulose têm sido comumente descritas na literatura, sendo necessário um complexo enzimático que envolve a ação sinérgica das mesmas para que haja a degradação dos polímeros de maneira eficiente (Zhang and Lynd, 2004). Estas enzimas são produzidas por diversas bactérias e fungos, sendo os gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* os mais relatados (Prasetyo and Park, 2013).

O lodo branco é um resíduo lignocelulósico decorrente da produção da pasta de madeira nas fábricas de papel. Ele é constituído por restos de matérias primas e trata-se de um efluente de coloração que varia de um tom cinza claro a um branco gelo, é conhecido também pelo nome de lodo secundário. Ele representa uma promissora fonte de matéria-prima para o cultivo e produção de enzimas fúngicas, além de um grande potencial de utilização na produção do bioetanol por meio da bioconversão. Este resíduo

contém, tipicamente, em torno de 25 a 75% de carboidratos com equilíbrio de lignina, agentes de enchimento e argilas inertes. Em contraste com praticamente todos os materiais celulósicos nativos, uma fração significante do lodo branco não necessita de pré-tratamento para produção de etanol por possuir pouca lignina, obtendo um rendimento perto do teórico, que é alcançado por meio da hidrólise enzimática (Lynd et al., 2001). Observando-se a potencialidade de utilização deste resíduo lignocelulósico na obtenção de açúcares fermentescíveis para a produção do etanol de segunda geração, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus clavatus* e *Aspergillus niveus* quando cultivados no lodo branco, visando obter enzimas capazes de hidrolisarem este resíduo com a geração de grandes quantidades de açúcares redutores.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – SP – Brasil.

### **Micro-organismos utilizados**

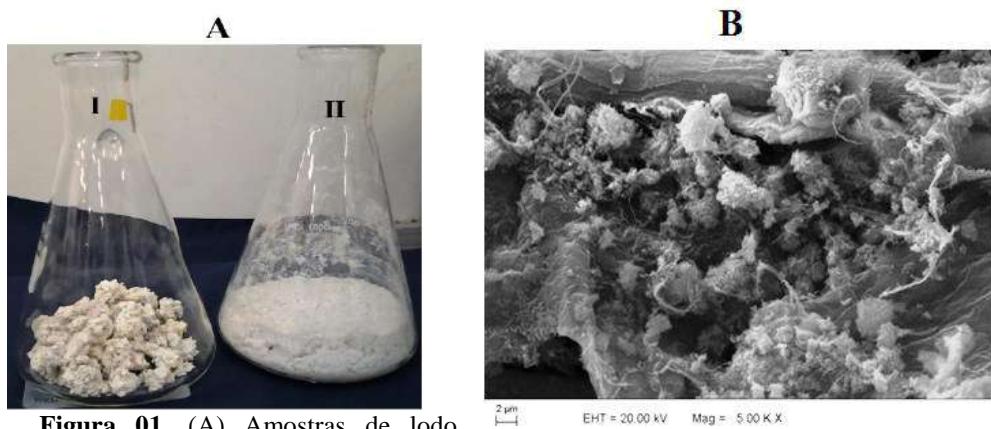
Os fungos utilizados neste trabalho (*Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus clavatus* e *Aspergillus niveus*) pertencem à micoteca do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP.

### **Manutenção dos fungos em laboratório**

A manutenção dos fungos foi realizada inoculando-se os esporos dos fungos em meio de cultura ABD (ágar batata dextrose) autoclavados a 1,5 atm, por 20 minutos. Foram realizados repiques periódicos mantendo-se *A. brasiliensis* e *A. clavatus* em estufa a 30°C e *A. niveus* a 37°C, por aproximadamente 5 dias, conservando as cepas em geladeira.

### **Pré-tratamento do lodo branco**

O lodo branco foi triturado e utilizado em três condições diferentes: “in natura” (LBIN), lavado com água (LBLA) e tratado com HCl (LBHCl). Na condição “in natura” ele foi utilizado sem pré-tratamento; já na condição LBLA o lodo foi lavado em água corrente até que seu pH chegasse a 7,0; o pré-tratamento com HCl (LBHCl) foi feito conforme descrito por Gurram et al. (2015).



**Figura 01.** (A) Amostras de lodo branco (I) “In natura” e (II) tratado com HCl. (B) Microscopia eletrônica de varredura do lodo branco “in natura”. Fotografia: J.H.A. Betini.

### Cultivo dos fungos em fermentação submersa e determinação das atividades enzimáticas

Os fungos foram cultivados em frascos Erlenmeyers de 250 mL, com 50 mL de meio mínimo (Barratt et al., 1965), pH 6,5, sendo utilizado como fonte de carbono o Lodo Branco 1% nas três diferentes condições já descritas. O inóculo foi feito com uma solução de  $10^7$  esporos/mL, incubados a 30°C para *A. brasiliensis* e *A. clavatus* e 37°C para *A. niveus*, com agitação de 120 rpm, durante 5 dias. A cada 24 horas foram coletados 2 mL das amostras.

Os ensaios enzimáticos foram realizados em micro reações utilizando-se 15  $\mu$ L do extrato bruto, 25  $\mu$ L dos substratos naturais e sintéticos. Os substratos naturais utilizados foram: 1% *linear arabinan*, *xilana beechwood*, xiloglucano, *locust bean gum* e carboximetilcelulose (CMC), acrescidos de 10  $\mu$ L de tampão acetato de sódio, 50 mM, pH 5,0. A reação foi incubada a 50°C, por 60 minutos. Os açúcares redutores resultantes foram determinados de acordo com o método de DNS (Miller, 1959). Os substratos sintéticos utilizados foram: 2 mM PNP- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo, PNP- $\beta$ -D-xilopiranosídeo, PNP- $\beta$ -D-glucopiranosídeo e PNP- $\beta$ -D-celobiosídeo, sob as mesmas condições de reação já descritas. Após a incubação com os substratos sintéticos a 50°C, por 60 minutos foram adicionados 50  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. A definição da atividade enzimática foi feita na forma de atividade relativa.

### Reprodutibilidade dos resultados

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas experimentais.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível observar uma boa produção de  $\beta$ -glucosidases pelo fungo *A. brasiliensis* após 120 horas de experimento nos cultivos com LBIN e LBHCl, além

disso, em LBHCl também foi observada a produção de xilanase e  $\beta$ -xilosidase. *A. clavatus* apresentou produção de xilanases, após 120 horas de experimento, nas três condições de cultivos, e em LBLA e LBHCl, no mesmo tempo de cultivo, foi observada a produção de  $\beta$ -glucosidases, com LBHCl houve também a produção de  $\beta$ -xilosidase. O fungo *A. niveus* demonstrou alta produção de  $\beta$ -glucosidases em LBHCl, além disso, em LBIN e LBHCl houve produção de xilanases, já quando cultivado em LBLA apresentou uma alta produção de xiloglucanase e cellobiohidrolase. Uma grande quantidade de endoglucanases e cellobiohidrolase também foi observada quando o fungo foi cultivado em LBHCl, conforme apresentado na **Tabela 01**.

**Tabela 01.** *Produção de enzimas lignocelulolíticas por A. brasiliensis, A. clavatus e A. niveus em 120 horas de experimento.*

		Atividades enzimáticas (%)								
		Abn	Abf	Xl	B-glu	B-xil	Man	Xeg	EG	CB
Fungos	Condições									
<i>A. brasiliensis</i>	LBIN	0	0	0	50,0	0	0	0	0	0
	LBLA	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	LBHCl	0	0	10,0	30,0	100	0	0	0	0
<i>A. clavatus</i>	LBIN	0	0	80,0	0	0	0	0	0	0
	LBLA	0	0	77,0	20,0	0	0	0	0	0
	LBHCl	0	0	100	37,5	30,0	0	0	0	0
<i>A. niveus</i>	LBIN	0	0	1,3	25,0	0	0	0	0	0
	LBLA	0	0	0	50,0	0	0	100	0	83,3
	LBHCl	0	0	2,6	100	0	0	0	100	100

As siglas Abn, Abf, Xl, B-glu, B-xil, Man, Xeg, EG e CB correspondem a Arabinanase, Arabinofuranosidase, Xilanase, B-glucosidase, B-xilosidase, Mananase, Xiloglucanase, Endoglucanase e Cellobiohidrolase.

Como foi observado, LBHCl foi a condição que levou a uma maior produção de diferentes enzimas lignocelulolíticas, este resultado pode ser explicado pela ação do HCl, o qual reage quimicamente com o carbonato de cálcio gerando cloreto de cálcio, gás carbônico e água como produtos desta reação. O cloreto de cálcio, por se tratar de um sal, é facilmente removido durante a etapa de lavagem com água. Estas substâncias ( $\text{CaCO}_3$  e  $\text{CaCl}_2$ ) presentes no lodo “in natura” impedem a produção de enzimas pelos fungos, assim como a hidrólise enzimática e a remoção destas substâncias através do HCl, proporciona uma área superficial aumentada para o acesso e assimilação do substrato pelos fungos (Gurram et al., 2015). Assim, a concentração e a variedade de enzimas produzidas são maiores, devido à utilização completa dos materiais lignocelulolíticos presentes, levando ao crescimento e a produção das enzimas necessárias para o desenvolvimento dos fungos.

Estes resultados se mostram inovadores já que não existem relatos na literatura da produção de enzimas de interesse biotecnológico por fungos do gênero *Aspergillus*, utilizando-se como substrato o lodo branco. A utilização do lodo branco diminui os custos do processo de tratamento deste resíduo, minimizando os impactos ambientais causados, além de gerar produtos com um alto valor agregado e com grande potencial de aplicação na produção do bioetanol, conforme já foi descrito por Gurram et al. (2015).

## CONCLUSÕES

O cultivo e a produção de enzimas lignocelulolíticas em lodo branco por *A. brasiliensis*, *A. clavatus* e *A. niveus* possui um grande potencial biotecnológico, uma vez que estes fungos demonstraram um bom crescimento em 120 dias de experimento, além de obterem uma elevada produção de enzimas com potencial de aplicação na produção do bioetanol.

## AGRADECIMENTO

CAPES, CNPq e FAEPA

## REFERÊNCIAS

- BARRATT, R.W.; JOHNSON, G.B.; OGATA W.N., 1965. Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, vol. 52, pp. 233–246.
- GURRAM, R.N.; AL-SHANNAG, M.; LECHER, N.J.; DUNCAN, S.M.; SINGSASS, E.L.; ALKASRAWI, M., 2015. Bioconversion of paper mill sludge to bioethanol in the presence of accelerants or hydrogen peroxide pretreatment. *Bioresour. Technol*, vol. 192, pp. 529-539. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.010>.
- HATTI-KAUL, R., 2004. Enzyme production. In: Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), *Biotechnology*, vol. 5, pp. 21-62. <http://www.eolss.net/>.
- LYND, L.R.; LYFORD, K.; SOUTH, C.R.; VAN WALSUM, P.; LEVENSON, K., 2001. Evaluation of paper sludge for amenability to enzymatic hydrolysis and conversion to ethanol. *Tappi J. Peer Rev. Paper*, vol. 84, pp. 1-19. <http://imisrise.tappi.org/TAPPI/Products/01/FEB/01FEB50.aspx>
- MILLER, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem*, vol. 31, no. 3, pp. 426-428.
- MONTE, J.R., 2009. *Sacarificação da polpa celulósica do bagaço de cana-de-açúcar com celulases e xilanases de Thermoascus aurantiacus*. Lorena: Universidade de São Paulo. 138 p. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Industrial.
- PRASETYO, J. and PARK, E.Y., 2013. Waste paper sludge as a potential biomass for bio-ethanol production. *Korean J. Chem. Eng*, vol. 30, no. 2, pp. 253-261. <http://dx.doi.org/10.1007/s11814-013-0003-1>.
- ZHANG, Y.H.P. and LYND, L.R., 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol. Bioeng*, vol. 88, pp. 797-824. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.20282>.

## **Atividade antimicrobiana de frações de Cambará sobre microbiota de morango**

Victoria de Moraes Gonçalves<sup>1</sup>; Júlia Borin Fioravante<sup>1</sup>; Camila Rios Piecha<sup>2</sup>; Patrícia Diaz de Oliveira<sup>2</sup>; Claire Tondo Vendruscolo<sup>2</sup>, Angelita da Silveira Moreira<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA-UFPel).

<sup>2</sup>Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia (CDTec-UFPel).

<sup>3</sup>Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA-UFPel).

\*e-mail: angelitadasilveiramoreira@gmail.com

---

### **RESUMO**

O Brasil se destaca com elevadas perdas de frutas e hortaliças na fase pós-colheita. Com a finalidade de minimizar essas perdas, principalmente em culturas suscetíveis a doenças de campo, como o morango, o desenvolvimento de novas tecnologias é necessário. Revestimentos e filmes comestíveis e biodegradáveis à base de polissacarídeos, além de reduzir a perda de massa e a atividade respiratória dos frutos, podem ainda serem adicionados de antimicrobianos e antioxidantes naturais com a finalidade de reduzir a degradação dos frutos pelo ataque de microrganismos patogênicos e inibir o escurecimento enzimático de frutos *in natura* e minimamente processados. O cambará (*Moquiniastrum polymorphum*) possui resultados promissores já descritos na literatura para importantes atividades biológicas, como antimicrobiana, anti-inflamatória, anticâncer, entre outras. O objetivo desse trabalho foi testar a atividade antimicrobiana das frações diclorometano, acetato de etila, butanol e a fração aquosa, nas concentrações de 50 e 25 mg/mL, obtidas a partir do extrato etanólico das partes aéreas de *M. polymorphum* frente à microbiota total de morangos em processo de decomposição, pelo teste de difusão em disco. Somente a fração aquosa apresentou halos de inibição com tamanhos médios de 8 mm, enquanto o controle da fração não apresentou halo de inibição; as demais frações não apresentaram potencial antimicrobiano, enquanto que os solventes inibiram a microbiota total. Os resultados obtidos são satisfatórios para o viés de aplicação na indústria de alimentos, já que a fração aquosa possibilita uma fácil solubilização na matriz dos revestimentos e filmes sem a presença de resíduos tóxicos nos produtos pretendidos.

**Palavras-chave:** Perdas pós-colheita; Halo de inibição; Extratos; Fração aquosa.

---

**Antimicrobial activity of Cambará fractions on strawberry microbiota**

### **ABSTRACT**

Brazil stands out with high losses of fruits and vegetables in the post-harvest phase. In order to minimize these losses, especially in crops susceptible to field diseases, such as strawberries, the development of new technologies is necessary. Edible and biodegradable coatings and films based on polysaccharides, besides reducing the mass

loss and respiratory activity of the fruits, can also be added with antimicrobials and natural antioxidants in order to reduce the degradation of the fruits by the attack of pathogenic microorganisms and to inhibit the enzymatic darkening of fruits *in natura* and minimally processed. The Cambará (*Moquiniastrum polymorphum*) has promising results already described in the literature for important biological activities, such as antimicrobial, anti-inflammatory, anticancer, among others. The objective of this work was to test the antimicrobial activity of the dichloromethane, ethyl acetate, butanol and aqueous fractions at concentrations of 50 and 25 mg / mL, obtained from the ethanolic extract of the aerial parts of *M. polymorphum* against total microbiota of strawberries in process of decomposition, by the disc diffusion test. Only the aqueous fraction showed inhibition halos, with mean sizes of 8 mm, while the fraction control did not present inhibition halo; the other fractions showed no antimicrobial potential, but the solvents inhibited the total microbiota. The results obtained are satisfactory for the purpose of application in the food industry, since the aqueous fraction allows an easy solubilization in the matrix of coatings and films without the presence of toxic residues in the desired products.

**Keywords:** Post-harvest losses; Inhibition halo; Extracts; Aqueous fraction.

---

## INTRODUÇÃO

As maiores taxas de perdas de frutas e hortaliças pós-colheita são representadas pelo Brasil, em torno de 35-40%, enquanto os Estados Unidos estimam perdas de apenas 16% (Assis et al., 2012). Para a redução das perdas pós-colheita, o desenvolvimento de novas tecnologias são necessárias (Borges et al., 2013). Usualmente, os procedimentos de conservação aplicados à frutas e hortaliças estão relacionados a condições de frio e boas práticas de armazenamento. Contudo, a biotecnologia vem ganhando destaque no desenvolvimento de revestimento comestíveis e filmes biodegradáveis que elevam o tempo de conservação, favorecendo o comércio (Assis et al., 2009; Borges et al., 2013).

Os biofilmes à base de polissacarídeos naturais têm se destacado como uma nova categoria com grande potencial de aplicação como revestimentos comestíveis e protetores para frutas e legumes pós-colheita, *in natura* ou minimamente processadas, com a finalidade de conservação e prolongamento da vida útil dos alimentos (Borges et al., 2008). A finalidade desses revestimentos é reduzir a perda de massa, a atividade respiratória dos frutos e o contato com o meio externo, preservando e prolongando suas características fisiológicas originais (Vega et al., 2013). Os revestimentos ainda podem atuar inibindo o escurecimento enzimático, que costuma afetar os frutos minimamente processados, e podem apresentar potencial bactericida e fungicida (Moraes et al., 2007).

O morango é suscetível a doenças de campo e pós-colheita, resultando em perdas significativas para o mercado, superiores a 50%. O uso de embalagens bioativas na forma de revestimentos comestíveis é promissor para minimizar as perdas pós-colheita e aumentar a vida útil desses alimentos (Vargas et al., 2008; Vega et al., 2013).

Uma alternativa para o mercado de embalagens funcionais é o uso de antimicrobianos naturais, visando a tendência atual de busca por alimentos mais saudáveis (Moraes et al., 2007). Vários compostos têm tido seu potencial antimicrobiano analisado dentro desse conceito. O Cambará (*Moquiniastrum polymorphum*), uma árvore da família *Asteraceae*, amplamente distribuída no Brasil, possui resultados promissores em relação aos potenciais antioxidante e antimicrobiano (Moreira et al., 2000; Piornedo et al., 2011) e apresenta níveis seguros de toxicidade (David et al., 2014). Porém, a literatura é escassa quanto a sua aplicação na indústria alimentícia.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Material vegetal** - As partes aéreas de *Moquiniastrum polymorphum* (Cambará) foram coletadas em março de 2015, em propriedades rurais distantes de atividades industriais e da circulação de automóveis. Propriedade localizada no 9º distrito de Pelotas, Monte Bonito – RS. As partes aéreas da planta foram previamente secas em estufa com circulação de ar forçada a 35°C e trituradas em moinho de facas. Assim, o material vegetal foi armazenado em sacos de papel pardo, para proteção contra umidade e luz, até a utilização.

**Preparo do extrato** - O extrato etanólico foi preparado por maceração a partir das partes aéreas de *Moquiniastrum polymorphum* (Cambará), numa proporção de 20% de material vegetal em relação ao solvente. A extração por maceração ocorreu durante 35 dias, à temperatura ambiente, sob abrigo da luz e agitação manual ocasional. Com a finalidade de promover o esgotamento dos compostos bioativos a serem extraídos da planta, o solvente foi trocado três vezes, sendo a primeira troca após 15 dias de extração e as demais, a casa 10 dias. Ao final dos 35 dias de maceração as alíquotas foram reunidas e concentradas em evaporador rotativo. O extrato concentrado obtido, chamado de extrato bruto (F0), foi ressuspensos em água destilada e em seguida, fracionou-se a mistura por partição com solventes de polaridades crescentes. As frações diclorometano (F1), acetato de etila (F2) e n-butanol (F3) foram reconcentradas no evaporador rotativo

e ressuspensas/rediluídas em seus próprios solventes, na concentração de 50 mg/mL e 25 mg/mL. A fração aquosa (F4) não passou por liofilização prévia ao uso.

**Preparo do inóculo** - Os morangos foram adquiridos no comércio local de Pelotas – RS, e armazenados no Laboratório de Biopolímeros da Universidade Federal de Pelotas em condições ambiente não controladas, como temperatura e umidade, durante aproximadamente 5 dias. Em seguida do surgimento de contaminação microbiológica na superfície dos frutos procedeu-se com o preparo do inóculo a partir de 25 g de frutos dispersos em 225 mL de água peptonada 0,1%. Homogeneizou-se a mistura, e preparou-se diluições seriadas até a  $10^4$ , para avaliar a microbiota total dos frutos.

**Difusão em disco** - Para avaliação do potencial antimicrobiano do extrato bruto e das frações de *M. polymorphum*, preparou-se discos estéreis de papel, impregnados com 5  $\mu$ L de amostra. Os discos foram dispostos sobre placas de Petri contendo uma alíquota de 100  $\mu$ L do inóculo preparado anteriormente, espalhado sobre Ágar Batata Dextrose (BDA) acidificado com ácido tartárico 10%.

Os solventes usados para fracionamento do extrato, assim como o DMSO (dimetilsulfóxido) usado para auxiliar na solubilização das amostras, foram usados como controle negativo frente a microbiota total de morangos. As placas foram incubadas a 25 °C durante 5 dias, e os resultados expressos em função da medida em milímetros dos halos de inibição formados ao redor dos discos de papel.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração do inóculo preparado a partir dos frutos contaminados foi de  $1,6 \times 10^6$  UFC/mL. Apenas a fração aquosa apresentou halos de inibição, com tamanhos médios de 8 mm, nas concentrações testadas. Quanto aos solventes usados como controle negativo, butanol foi o que apresentou maior toxicidade frente a microbiota total dos frutos, com formação de halo total apresentando 11 mm como tamanho médio, já o DMSO, o acetato de etila, o diclorometano e o etanol apresentaram pequenos halos de inibição com tamanhos médios de 6,7 mm, 7 mm, 7,5 mm e 8,5 mm respectivamente, enquanto a água não apresentou halo de inibição.

Uma vez que a água, usada como controle, não apresentou a formação de halos de inibição frente a microbiota total dos frutos e a fração aquosa do extrato de *M. polymprphum* foi a única fração que apresentou potencial atividade antimicrobiana com a formação de halos de inibição, os resultados mostram que a atividade está relacionada

aos compostos bioativos extraídos na fração aquosa, não tendo o solvente interferido no resultado. Moreira et al. (2000) identificou o aminoácido não proteico 4-N-metil-hidroxiprolina como o principal componente da fração aquosa e do extrato bruto desse vegetal anteriormente denominado *Gochnatia polymorpha*.

O potencial antimicrobiano de extratos de *M. polymorphum* também foi estudado por Stefanello (2006), os resultados mostram que na concentração de 5 mg/mL os extratos das folhas (hexano, diclorometano e etanol) apresentaram fraca atividade antimicrobiana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, com halos de inibição em torno de 6 a 7 mm. Já o extrato dos ramos com diclorometano e o extrato etanólico das cascas se mostraram ativos frente as *Micrococcus luteus*, *S. aureus* e *S. epidermidis*, com halos de inibição variando de 7 a 12 mm. Quando testados os extratos frente a bactérias Gram-, nenhum deles apresentou potencial inibição (Stefanello, 2006).

## CONCLUSÕES

A fração aquosa de *M. polymorphum* teve potencial atividade antimicrobiana. Como seu solvente é a água, isto a torna um candidato potencial à aplicação e filmes e coberturas para alimentos, pois não ocorrerão problemas de solubilização em matrizes poliméricas hidrossolúveis, nem permanência de resíduos tóxicos.

## REFERÊNCIAS

- ASSIS, L. M. de; ZAVAREZE, E. da R; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C; SOUZA-SOARES, L. A. 2012. Review: Characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods. *Brazilian Journal of Food Technology*, vol. 15, no. 2, pp. 99-109. <http://dx.doi.org/10.1590/S1981-6723201200500004>.
- ASSIS, O. B. G; BRITTO, D. de; FORATO, L. A. 2009. O uso de biopolímeros como revestimentos comestíveis protetores para conservação de frutas *in natura* e minimamente processadas. *Embrapa: Boletim de pesquisa e desenvolvimento*, vol. 1, no. 29, pp. 1-23. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/658249>.
- BORGES, C. D. and VENDRUSCOLO, C. T., 2008. Goma Xantana: características e condições operacionais de produção. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, vol. 29, no. 2, pp. 171-188. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0367.2008v29n2p171>.

- BORGES, C. D; MENDONÇA, C. R. B; ZAMBIAZI, R. C. 2013. Strawberries conservation with coatings based on xanthan gum and sage essential oil. *Bioscience Journal*, vol. 29, no. 5, pp. 1071-1083.
- DAVID, N; MAURO, M. O; GONÇALVES, C. A; PESARINI, J. R; STRAPASSON, R. L. B; KASSUYA, C. A. L; STEFANELLO, M. E. A; CUNHA-LAURA, A. L; MONREAL, A. C. D; OLIVEIRA, R. J. 2014. *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*: Bioprospecting of an anti-inflammatory phytotherapy for use during pregnancy. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 154, no. 2, pp. 370-379. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.04.005>.
- MORAES, A. R. F; GOUVEIA, L. E. R; SOARES, N. F. F; SANTOS, M. M. S; GONÇALVES, M. P. J. C. 2007. Development and evaluation of antimicrobial film on butter conservation. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol. 27, pp. 33-36. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612007000500006>.
- MOREIRA, A. S; SPITZER, V; SCHAPOVAL, E. E. S; SCHENKEL, E. P. 2000. Antiinflammatory activity of extracts and fractions from the leaves of *Gochnatia polymorpha*. *Phytotherapy Research*, vol. 14, no. 8, pp. 638-640. [http://dx.doi.org/10.1002/1099-1573\(200012\)14:8<638::AID-PTR681>3.0.CO;2-Q](http://dx.doi.org/10.1002/1099-1573(200012)14:8<638::AID-PTR681>3.0.CO;2-Q).
- PIORNEDO, R. R; SOUZA, P. DE; STEFANELLO, M. E. A; STRAPASSON, R. L. B; ZAMPRONIO, A. R; KASSUYAAL, C. A. L. 2011. Anti-inflammatory activity of extracts and 11, 13-dihydrozaluzanin C from *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa* trunk bark in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 133, no. 3, pp. 1077-1084. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.040>.
- STEFANELLO, M. E. A; SALVADOR, M. J; ITO, I. Y; MACARI, P. A. T. 2006. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha* ssp *floccosa*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 16, no. 4, pp. 525-530. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2006000400015>.
- VARGAS, M; PASTOR, C; CHIRALT, A; MCCLEMENTS, D. J; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. 2008. Recent advances in edible coatings for fresh and minimally processed fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 48, no. 6, pp. 496-511. <http://dx.doi.org/10.1080/10408390701537344>.
- VEGA, W. R. C; PIOTROWICZ, I. B. B; PRENTICE, C; BORGES, C. D. 2013. Conservation of papaya minimally processed with the use of edible coating based on xanthan gum. *Semina: Ciências Agrárias*, vol. 34, no. 4, pp. 1753-1764. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n4p1753>.

## **Metabólitos secundários de *Alternaria* sp., fungo endofítico isolado das folhas de *Serjania lethalis* A. St.Hil**

Viviane de Cassia Pereira Abdalla<sup>1\*</sup>; Ana Carolina Alves dos Santos<sup>2</sup>; Sergio Kakazu<sup>3</sup>; Paulo Cezar Vieira<sup>2</sup>; Sonia Cristina Juliano Gaultieri<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de São Carlos. Departamento de Botânica \*vivicpereira@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de São Carlos. Departamento de Química

<sup>3</sup> Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Centro de Estudos de Insetos Sociais

---

### **RESUMO**

A prospecção de metabólitos secundários de fungos endofíticos é uma importante ferramenta no estudo de substâncias bioativas provenientes de fontes naturais. Assim, este trabalho teve como objetivo isolar e identificar metabólitos produzidos por *Alternaria* sp. Para isso, cultivou-se o micro-organismo em meio Czapek enriquecido com 2% de extrato de levedura durante 21 dias. Após este período a incubação foi interrompida, o micélio foi separado da fase líquida por filtração a vácuo e foi feita uma partição líquido-líquido do filtrado (meio de cultura) com acetato de etila. Posteriormente a fase orgânica foi seca em rotaevaporador e assim foi obtido o extrato de acetato de etila. Este extrato foi fracionado em coluna de sílica de fase normal e as frações foram analisadas por meio de espectrometria de massas (CLAE-EM) e ressonância magnética nuclear (RMN). Assim foram identificados o ácido indol-3-carboxílico e as dicetopiperazinas ciclo prolina-leucina, ciclo prolina-valina e ciclo prolina isoleucina.

**Palavras-chave:** Fungos endofíticos; cromatografia; espectrometria de massas; ressonância magnética nuclear.

---

**Secondary metabolites of *Alternaria* sp. endophytic fungi isolated from *Serjania lethalis* A. St.Hil leaves**

### **ABSTRACT**

Prospection of secondary metabolites of endophytic fungi is an important tool for the study of bioactive compounds from natural sources. Thus, this work aimed to isolate and identify some metabolites produced by *Alternaria* sp. For this, the microorganism was cultivated in Czapek enriched with 2% yeast extract for 21 days. After this period

the incubation was stopped, the mycelium was separated from liquid phase by vacuum filtration and a liquid-liquid partition of the filtrate (culture medium) was performed with ethyl acetate. Afterwards the organic phase was dried in a rotary evaporator and the ethyl acetate extract of the culture medium was obtained. This extract was fractionated on a normal phase silica column and the fractions were analyzed by mass spectrometry (LC-MS) and nuclear magnetic resonance (NMR). Thus indole-3-carboxylic acid and the diketopiperazines cyclo proline-leucine, cyclo proline-valine and cyclo proline-isoleucine were identified.

**Keywords:** Endophytic fungi; Chromatography; Mass spectrometry; Nuclear Magnetic Resonance.

---

## INTRODUÇÃO

Fungos endofíticos são micro-organismos que vivem assintomaticamente dentro de tecidos de plantas sem causar prejuízos às mesmas (Kharwar et al., 2011). De uma mesma planta podem ser isoladas centenas de espécies de fungos, porém apenas uma espécie será específica ao hospedeiro (Tan & Zou, 2001). O gênero *Alternaria* é conhecido por ser patógeno, saprófito e endofítico de diversas espécies vegetais (Thomma, 2003). Até o momento algumas substâncias como altertoxinas A e C (Berestetskiy et al., 2015), tagetolona, tagetenolona, tyrosol, zinniol, ácido p-hidroxibenzóico (Ângulo et al., 2001), anhidromevalonolactona, tyrosol, (R)-(-)-mevalonolactona e cicloglicilprolina, (Varejão et al., 2013) foram reportadas como metabólitos do gênero *Alternaria*. Assim, visando dar continuidade aos estudos de prospecção de metabólitos secundários produzidos pelo fungo *Alternaria* sp. realizou-se o estudo do perfil químico deste em meio de cultura líquido (Czapek enriquecido com 2% de extrato de levedura).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolamento do fungo

O fungo *Alternaria* sp. foi isolado de folhas sadias de *Serjania lethalis*, coletadas no Cerrado da Universidade Federal de São Carlos-SP Brasil.

As folhas coletadas foram inicialmente lavadas com água corrente. Posteriormente, em câmara asséptica, foram imersas em uma solução de detergente e

água por 10 minutos, seguida de imersão em água por 3 minutos, hipoclorito 1% por 10 minutos, etanol 70% por 3 minutos, água destilada por 3 minutos, sendo que este processo foi repetido por 4 vezes. A água da última lavagem foi inoculada em placa de Petri com meio de cultura a fim de garantir a esterilização da microbiota epífita da folha (Petrini et al, 1992)

### **Extração do DNA Genômico, PCR e sequenciamento da região ITS**

Foram adicionados 600 uL de Breaking Buffer às placas de Petri contendo o fungo isolado. Em seguida, à solução contendo esporos foram adicionadas pérolas de vidro e colocadas em vortex por 30 segundos. Posteriormente foram incubadas a 70° C por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 200 uL de fenol-clorofórmio 1:1, colocados em vortex por 10 minutos e centrifugados por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro Eppendorf e a ele foram adicionados 200 uL de clorofórmio, posteriormente foram centrifugados e o sobrenadante foi retirado e adicionado a 800 uL de isopropanol. As amostras permaneceram por 30 minutos em freezer -80° C e em seguida foram centrifugadas. O pellet obtido foi lavado com etanol 70% e ressuspensionado em 50 uL de água MiliQ.

Foram amplificadas as regiões ITS1 e ITS4 (White et al., 1990). A reação de PCR foi composta por 1  $\mu$ L de DNA fúngico, 5  $\mu$ L de Tampão 5X; 2  $\mu$ L de MgCl 25 mM; 2  $\mu$ L de primer ITS1 (CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA) (2  $\mu$ M); 2  $\mu$ L de primer ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (2  $\mu$ M); 2,5  $\mu$ L de dDNTP; 0,2  $\mu$ L de Taq (5 U/mL) e 9,3  $\mu$ L de água. O volume final da reação foi de 25  $\mu$ L. O programa utilizado consistiu em uma desnaturação inicial de 94° C por 5 minutos, seguida de 94° C por 1 minuto; 55° C por 45 minutos; 72° C por 1 minuto com uma extensão final de 72°C por 10 minutos. O ciclo foi repetido por 30 vezes. A amplificação da região ITS foi confirmada pela corrida dos produtos de PCR em gel de agarose 1,5% em eletroforese com 1  $\times$  Tris-acetate EDTA e o marcador 1 kb DNA ladder (Huang et al., 2008).

### **Purificação do ITS amplicon, sequenciamento dos genes ITS e purificação da reação de sequenciamento**

Os produtos amplificados foram purificados misturando-se a cada reação 0.05  $\mu$ L da enzima Exonuclease I, 0,5  $\mu$ L de Fast AP e 2.45  $\mu$ L de água. O programa utilizado no termociclador foi 37 °C por 30 minutos para ativar a enzima e 80°C por 10

minutos para desativar a enzima. Para a reação de sequenciamento foram utilizados os reagentes Big Dye 3.1; Save Money; Primer, DNA amplificado e água MiliQ. As sequências foram obtidas através do sequenciador Sanger Method in an ABI 3500 Capillary Automated Sequence Machine. A reação de sequenciamento foi purificada utilizando-se EDTA 125mM, Acetato de Sódio 3M e Etanol 100% e ressuspensa em Hi Di Formamida (Applied Biosystems).

### **Análises das sequências**

As sequências foram alinhadas utilizando-se o programa BioEdit e analisadas no programa ITScan (Ferro et al., 2014) database utilizando-se a ferramenta BLAST.

### **Preparação dos extratos, isolamento e identificação dos metabólitos secundários**

O fungo *Alternaria* sp. foi cultivado em placas de Petri com meio de cultura BDA (Batata, Dextrose e Agar). Após o crescimento em placas de Petri por 7 dias, plugs do fungo foram transferidos para 30 Erlenmeyers de 500 mL contendo 250 mL de meio de cultura Czapek enriquecido com 2% de levedura. Os Erlenmeyers foram incubados a 25°C em modo estático e agitados a cada 3 dias. Um Erlenmeyer contendo apenas meio de cultura foi mantido como controle negativo. Após o 21º dia de incubação, filtrou-se o conteúdo dos Erlenmeyers a vácuo, separando-se o micélio do meio de cultura. O meio de cultura foi particionado com acetato de etila (3X de 100 mL) e em seguida, a fase orgânica concentrada a vácuo em rotaevaporador, gerando o extrato de acetato de etila. O mesmo procedimento foi realizado com o controle negativo. O fracionamento do extrato (2g) foi feito em coluna de sílica de fase normal. Os eluentes utilizados foram: - hexano; hexano: acetona (9:1 v/v) - hexano: acetona (8:2 v/v) hexano: acetona (7:3 v/v); hexano: acetona (1:1 v/v); hexano: acetona (3:7 v/v); acetona ; acetona: metanol (7:3 v/v); acetona: metanol (1:1 v/v); acetona: metanol (3:7 v/v); metanol. As frações obtidas foram secas e analisadas por cromatografia de camada delgada (CCD) e quando necessário foram feitas cromatografias líquidas de alta eficiência (CLAE). Os metabólitos puros foram analisados e identificados por cromatografia líquida acoplada a espectroscopia de massas (CLAE-EM) e ressonância magnética nuclear (RMN).

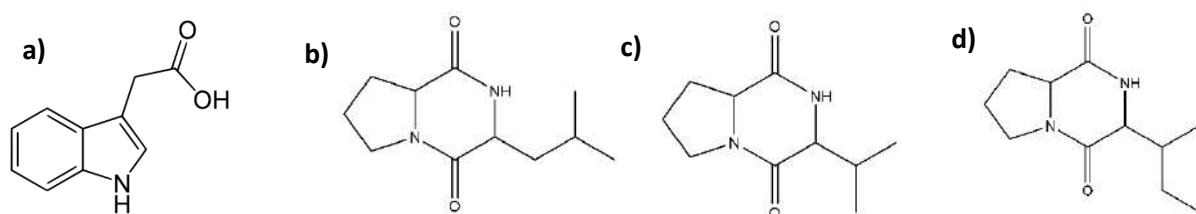
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O DNA do isolado de *Alternaria* sp. foi extraído eficientemente. Através da amplificação da região ITS (Internal Transcribed Spacer) por PCR e sequenciamento foi

obtido um fragmento de 453 pares de bases (pb). O fragmento obtido foi submetido à análise no ITScan e observou-se que o isolado mostrou uma similaridade de 100 % com os fungos do gênero *Alternaria*. Embora o tamanho do fragmento obtido tenha se mostrado insuficiente para identificar a espécie foi possível à identificação do isolado como pertencendo ao gênero *Alternaria*.

As principais classes de metabólitos secundários produzidas pelo gênero *Alternaria* consistem em substâncias nitrogenadas, esteróides, terpenóides, quinonas e fenóis (Lou et al., 2013). As substâncias isoladas neste trabalho contribuem com melhor conhecimento dos metabólitos secundários produzidos por esta espécie.

Através dos procedimentos cromatográficos utilizados foi possível isolar até o momento quatro metabólitos a partir do extrato de acetato de etila de *Alternaria* sp. Estes metabólitos foram analisados por CLAE-EM e RMN, permitindo a identificação de quatro substâncias: ácido- indole-3- carboxílico (Figura 1a) e as dicetopiperazinas ciclo prolina-leucina (Figura 1b); ciclo prolina-valina (Figura 1c) e ciclo prolina-isoleucina (Figura 1d).



**Figura 1. Metabólitos secundários produzidos pelo fungo *Alternaria* sp. a) ácido-indole-3-carboxílico (b) Ciclo prolina-leucina (c) ciclo prolina-valina (d) ciclo prolina-isoleucina**

## CONCLUSÕES

Até o momento foram isolados quatro metabólitos secundários do fungo endofítico *Alternaria* sp. sendo eles ácido- indole-3- carboxílico, ciclo prolina-leucina, ciclo prolina-valina e ciclo prolina- isoleucina, que irão contribuir com o conhecimento do perfil químico da espécie. O potencial fitotóxico destas substâncias está sendo investigado.

**AGRADECIMENTO.** Os autores agradecem às agências de fomento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior), CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa) e FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo).

## REFERÊNCIAS

- ÂNGULO, M. M. G., SOSA, K. G., GONZÁLEZ, F. A., EROSA, F. E., LAMAS, G. D., RODRÍGUEZ, L. M. P. 2001 Tagetolone and Tagetenolone: Two phytotoxic polyketides from *Alternaria tagetica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 1228-1232.
- BERESTETSKIY, A., CIMMINO, A., SOFRONOVA, J., DALINOVA, A., AVOLIO, F., EVIDENTE, M., CHISTY, L., KRIVOROTOV, D., EVIDENTE, A. 2015. Alternethanoxins C-E, Further Polycyclic Ethanones Produced by *Alternaria sonchi*, a Potential Mycoherbicide for *Sonchus arvensis* Biocontrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 63, p. 1196-1199.
- FERRO, M; ANTONIO, E.A; SOUZA, W; BACCI, M. JR. 2014. ITSscan: a web-based analysis tool for Internal Transcribed Spacer (ITS) sequences. *BioMed Central Research Notes*, v.7, p. 857-860.
- HUANG, W.Y., CAI, Y.Z., SURVESWARAN, S., HYDE, K.D., CORKE, H., SUN M. 2009. Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from three *Artemisia* species. *Fungal Diversity*, v. 36, p. 69-88.
- LOU, J., FU, L., PENG, Y., ZHOU, L. 2013. Metabolites from *Alternaria* Fungi and Their Bioactivities. *Molecules*, v.18, p.5891-5935.
- PETRINI, O., SIEBER, T.N., TOTI, L. and VIRET, O. 1992. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins*, v.1, p.185-196.
- TAN, R.X., ZOU, W.X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*, v. 18, p. 448-459.
- THOMMA, B.P.H.J. 2003. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*,v.4, p.225-236.
- VAREJÃO, E.V.V; DEMUNER, A.J; BARBOSA, L.C.A; BARRETO, R.W. 2013. Phytotoxic effects of metabolites from *Alternaria euphorbiicola* against its host plant *Euphorbia heterophylla*. *Química Nova*, v. 36, p. 1004-1007.
- KHARWAR, R.N., MISHRA, A., GOND, S.K., STIERLE, A., STIERLE, D. 2011. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. *Natural Product Reports*,v.28, p. 1208-1228.
- WHITE, T.J., BRUNS, T., Lee, S. TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide to methods and applications (eds. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White). Academic Press, New York, USA: p.315-322.

## Seleção de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* produtores de enzimas aplicadas na indústria de alimentos

Wesley de Oliveira Mendes<sup>1</sup>; Sirlei Cristina de Souza <sup>1\*</sup>; Vanessa Maria Pereira<sup>1</sup>; Lorena Dutra Silva<sup>1</sup>; Fátima Maria de Souza Moreira<sup>1</sup>; Luís Roberto Batista<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UFLA, Departamento de Ciências dos Alimentos \*sirlei.bio@hotmail.com

---

### RESUMO

As enzimas atuam em diversos setores industriais, e dentre os organismos capazes de produzir essas enzimas, destacam-se os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. O objetivo deste estudo foi realizar o screening da produção das enzimas amilases, lipases, celulases e proteases. Para os testes enzimáticos foram testados 14 fungos identificados e 21 fungos não identificados, e estes foram inoculados em meios de cultura à base de diferentes substratos. Após a incubação, foi estimado o Índice Enzimático. Dentre os fungos identificados, dois isolados produziram amilases, sete produziram celulases, 11 apresentaram produção de lipases e nenhum dos fungos identificados apresentou produção de proteases. No caso dos fungos não identificados, 1 isolado produziu amilases, 6 produziram lipases, 11 produziram celulases, nenhum dos isolados produziu enzimas proteolíticas e 7 não produziram enzimas nos testes realizados.

**Palavras-chave:** *Aspergillus*, biotecnologia, *Penicillium*.

---

**Selection of *Aspergillus* and *Penicillium* species producing enzymes applied in the food industry**

### ABSTRACT

The enzymes act in several industrial sectors, and among the organisms capable of producing these enzymes, the fungi of the genus *Aspergillus* and *Penicillium* stand out. The objective of this study was to realize the screening production of the enzymes amylases, lipases, cellulases and proteases. For the enzymatic tests, 14 identified fungi and 21 unidentified fungi were tested, and these were inoculated in culture media based on different substrates. After incubation, the Enzymatic Index was estimated. Among the fungi identified, two isolates produced amylases, seven produced cellulases, 11 presented lipases production and none of the fungi identified showed protease production. In the case of unidentified fungi, 1 isolate produced amylases, 6 produced lipases, 11 produced cellulases, none of the isolates produced proteolytic enzymes and 7 did not produce enzymes in the tests performed.

**Keywords:** *Aspergillus*, biotechnology, *Penicillium*.

---

## INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores biológicos que atuam na diminuição da energia necessária para a ativação de uma dada reação, fazendo com que a obtenção dos produtos gerados por esta ocorra em um menor tempo (Leningher, 2006). A atividade enzimática está intimamente ligada às características das proteínas que compõe a enzima, sendo responsável por suas propriedades e especificidade (Campbell, 2000). E dentre os diversos organismos capazes de sintetizar enzimas durante seus processos metabólicos, destacam-se os microrganismos, que apresentam uma série de vantagens em relação à outros organismos no que diz respeito à atividade enzimática. (Silva 2015; Cortez, 2017).

Diante dos inúmeros microrganismos produtores de enzimas, destacam-se os fungos, principalmente os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Os fungos dos gêneros citados ganham relevância, pois são conhecidos por uma ampla produção de metabólitos, como ácidos orgânicos, antibióticos, corantes e enzimas (Bulakhov, 2017). São diversas as enzimas utilizadas na indústria alimentícia, dentre elas, destacam-se as amilases, proteases, lipases e celulases. As amilases são utilizadas em produtos de panificação e produção de xaropes, as proteases são utilizadas na produção de amaciante de carnes, as lipases são utilizadas na panificação, na obtenção de ácidos graxos essenciais e na incorporação de antioxidantes em óleos, as celulases são utilizadas na extração de componentes, e na extração e clarificação de sucos.

Diante da ampla utilização de enzimas em diversos processos de fabricação de produtos alimentícios, o objetivo deste trabalho é avaliar e selecionar fungos vindos de solo, capazes de produzir enzimas de interesse, através de *screening* enzimático. Além disso, tal avaliação tem importância por adotar metodologias rápidas e baratas de seleção qualitativa de fungos filamentosos produtores de enzimas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Local de realização do trabalho**

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Micologia e Micotoxinas de Alimentos (LAMIT), no departamento de Ciências dos Alimentos (DCA), na Universidade Federal de Lavras (UFLA-MG). As amostras de solo utilizadas foram cedidas pela empresa VALE e foram retiradas da região da cidade de Brumadinho – MG.

### **Identificação dos fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium***

Para obtenção dos microrganismos foram realizadas diluição seriada (10-1 a 10-4) seguido de plaqueamento em superfície em meios de cultura DRBC e DG18 (25°C/5-7 dias). Após o desenvolvimento das colônias, as que apresentaram macromorfologias distintas foram isoladas em MA 2%. Os meios utilizados para identificação morfológica foram MEA e CYA (25°C) e CYA (37°C). Após sete dias foram realizadas medições das colônias, observação de suas características e micrometrias em lâminas, onde os dados encontrados foram utilizados nas chaves de identificação descritas por KLICH (2002) e PITT (2002).

### ***Screening enzimático***

Após a identificação, o teste enzimático foi efetuado, com o intuito de averiguar quais enzimas seriam produzidas por cada isolado. O teste foi efetuado através da alteração do substrato presente no meio de cultura, para determinação de produção de amilases, o meio de cultura foi constituído de amido solúvel. No caso das proteases, o meio tinha como substrato a gelatina, e na determinação de produção de enzimas lipolíticas foi utilizado o Tween 20 para que este atuasse como substrato (Sierra, 1957). Por fim, a fim de determinar isolados capazes de sintetizar celulases, o meio de cultura foi preparado à base de carboximetilcelulose (CMC). Cada isolado foi inoculado nos meios de cultura citados, por cinco dias em estufa B.O.D, a 25°C. Vale ressaltar, que os isolados não identificados também foram avaliados quanto à produção enzimática.

### ***Índice enzimático (I.E)***

Após o período de incubação, nota-se a presença de halo ao entorno da colônia no caso de produção enzimática, e no caso de não produção de enzimas o halo estará ausente. Para a observação do halo pode ser necessário a utilização de reveladores, como no caso dos meios para determinação de produção de amilases e celulases, nos quais se utiliza o lugol como revelador. Há também casos em que o uso de reveladores é dispensável, como na determinação de atividade proteolítica e lipolítica, que são caracterizadas pela presença de halo visível sem a utilização de reveladores, no caso de produção destas enzimas. O Índice Enzimático é uma medida semi-quantitativa (Hankin; Anagnostakis, 1975) resultante da seguinte relação: I.E = diâmetro do halo de degradação ÷ diâmetro da colônia. Dessa forma, o maior índice enzimático representa uma maior produção enzimática.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1: Índices Enzimáticos dos isolados identificados.

xEspécie	Índice Enzimático (mm)			
	Amilases	Proteases	Lipases	Celulases
<i>A. niger</i>	1,1	ND	1,4	ND
<i>A. niger agregado</i>	ND	ND	1,5	ND
<i>A. foetidus</i>	1,05	ND	1,26	ND
<i>A. parasiticus</i>	ND	ND	ND	1,4
<i>A. tubingensis</i>	ND	ND	1,57	ND
<i>A. aculeatus</i>	ND	ND	1,57	ND
<i>P. restrictum</i>	ND	ND	ND	ND
<i>P. janthinellum</i>	ND	ND	1,36	1,93
<i>P. multicolor</i>	ND	ND	1,6	ND
<i>P. spinulosum</i>	ND	ND	1,17	1,78
<i>P. citrinum</i>	ND	ND	1,2	1,47
<i>P. simplicissimum</i>	ND	ND	1,3	1,2
<i>P. decumbens</i>	ND	ND	1,47	1,4
<i>P. brevicompactum</i>	ND	ND	ND	1,71

ND: Não detectado

Entre os fungos identificados, avaliou-se somente produção significativa de lipases e celulases com destaque para *Penicillium multicolor* que apresentou maior produção de lipases, e para a espécie *Penicillium janthinellum* que apresentou o maior índice de produção de celulases. Somente dois isolados produziram amilases, mas com baixos índices, tal fato pode estar associado aos microrganismos serem nativos do solo, onde há uma maior abundância de material celulósico e pobre em amido. No caso da produção de proteases, nenhum isolado identificado apresentou atividade proteolítica, possivelmente em decorrência de o crescimento ter sido promovido em um meio de cultura com um substrato muito restrito.

Como mencionado anteriormente, o *screening* foi também realizado com os isolados não identificados (morfotipos). Os isolados não identificados podem apresentar estruturas complexas, ou características não contempladas pela chave de identificação utilizada, dificultando o processo de identificação do fungo, entretanto, decidiu-se aplicar os testes enzimáticos uma vez que podem auxiliar em uma posterior identificação baseada em técnicas mais avançadas, além de que tais espécies poderiam apresentar potencial biotecnológico.

Tabela 2: Índices enzimáticos dos isolados não identificados

Morfotipo	Índice Enzimático (mm)			
	Amilases	Proteases	Lipases	Celulases
P. sp w01	ND	ND	1,75	ND
P. sp w1	ND	ND	2	1,42
P. sp w2	ND	ND	ND	ND
P. sp w4	ND	ND	1,88	1,39
P. sp w5	ND	ND	ND	ND
P. sp w7	ND	ND	ND	2,13
P. sp w8	ND	ND	ND	ND
P. sp w9	ND	ND	ND	1,09
P. sp w10	ND	ND	ND	1,17
P. sp w11	ND	ND	1,75	ND
P. sp w12	ND	ND	ND	1,13
P. sp w13	ND	ND	1,18	1,64
P. sp w14	ND	ND	1,29	ND
P. sp w15	ND	ND	ND	ND
P. sp w16	ND	ND	ND	ND
P. sp w17	1,13	ND	ND	2
P. sp w18	ND	ND	ND	1,87
P. sp w19	ND	ND	ND	1,6
P. sp w20	ND	ND	ND	ND
P. sp w21	ND	ND	ND	1,35
P. sp w22	ND	ND	ND	ND

ND: Não detectado

Em relação aos fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* não identificados, somente um isolado produziu amilases, possivelmente pela mesma razão citada anteriormente, nenhum dos isolados apresentou atividade proteolítica certamente pelo meio de cultivo restritivo. Obtiveram-se resultados nas análises de produção de enzimas

lipolíticas e celulósicas, que em alguns casos, apresentaram maiores índices quando comparados aos resultados dos fungos identificados.

## CONCLUSÕES

Diante do exposto, infere-se que os fungos isolados do solo apresentam potencial biotecnológico de interesse da indústria de alimentos. Os fungos identificados e não identificados apresentaram potencial enzimático significativo somente para as enzimas lipases e celulases

## AGRADECIMENTO

VALE, CAPES, FAPEMIG, CNPq

## REFERÊNCIAS

- BULAKHOV, A. G. et al., 2017. Using an Inducible Promoter of a Gene Encoding *Penicillium verruculosum* Glucoamylase for Production of Enzyme Preparations with Enhanced Cellulase Performance. *PLoS one*, vol. 12, no. 1, p. 1-13
- CAMPBELL, M. K. 2000. *Bioquímica*. Porto Alegre: Artmed. 149 p.
- CORTEZ, D. V.; CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S.S., 2017. Potential catalytic of mycelium-bound lipase of filamentous fungi in biotransformation processes. *Química Nova*, vol. 40, no. 1, pp. 85-96.
- HANKIN, L and ANAGNOSTAKIS, S. L., 1975. The use of media for detection of enzymes production by fungi. *Mycologia*, vol. 67, no. 3, pp. 597-607. <http://www.jstor.org/stable/3758395>.
- KLICH, M A. 2002. *Indentification of common Aspergillus species*. Centraalbureau voor Schimmelcultures. 116 p.
- LEHNINGER, A. L. and NELSON, K. Y., 2006. *Princípios de Bioquímica*. São Paulo: Sarvier. 256 p.
- PITT, J. I. A., 2000. *Laboratory Guide to Common Penicillium Species*. Food Science Australia. 187 p.
- SIERRA, S.A., 1957. Simple method for detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 23, no. 1, pp. 15-22.
- SILVA, J. B. A et al., 2015. Production of extracellular enzymes by fungi associated to the decomposition of plant materials in streams. *Journal of bioenergy and food science*, v. 2, n. 4, pp. 15- 20.

## **Novel culture medium SPsA (sweet potato-sucralose-agar) for optimal growth of bacteria and filamentous fungi**

Alessandro Lucas do Nascimento Santos<sup>1</sup>; Matheus Gomes Lessa Feijó<sup>1</sup>; Raysa Moreira Gama de Souza<sup>1</sup>;  
Daniel Rocha Cordeiro<sup>1</sup>, Joelma Benigna da Silva Cândido<sup>1</sup>, Iana Karla dos Santos Ribeiro<sup>1</sup>, Cícero  
Eduardo Ramalho Neto<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Molecular Genetics and Proteomics Laboratory – GEMPRO, Federal University of Alagoas  
alucassantos@gmail.com

<sup>2</sup>Researcher Pos-doc UFAL/CNPq

---

### **ABSTRACT**

Nutrients prepared for microorganism growth in laboratories are called culture medium. They are nutritional formulations that serve as natural or artificial substrates intended mainly for fungi and bacteria culture and also some types of viruses. The semi synthetic medium PDA (potato-dextrose-agar), consisting of known and unknown components, has been widely used for centuries in laboratories and clinics around the world. The development of an alternative and more efficient culture medium, less laborious/time-consuming and notably cheaper is an innovation which could lead to a revolution of microbes growing in laboratories. Basically it contains sweet potatoes, sucralose and agar (for solid media). The procedures are the same applied for PDA using, however, higher amount of starch with only 150g of sweet potatoes and 20 times less carbon source per liter. The results revealed a substantial increase in the performance and speed of growing in all tested fungi and bacteria species. We conclude that this medium is an efficient alternative protocol to grow microorganisms in laboratories. It is practical, easier to prepare and also affordable considering the availability and commercial value of the components in the market.

**Keywords:** Culture Medium, Sweet Potatoes, Microbiology, Applied Biotechnology, Sucralose.

**Support:** Ufal

## Sugarcane harvesting systems alter rhizosphere bacterial communities

Aline Giovana da França<sup>1\*</sup>; Leandro Nascimento Lemos<sup>1</sup>; Andressa Monteiro Venturini<sup>1</sup>; Fabiana de Souza Cannavan<sup>1</sup>; Caio Augusto Yoshiura<sup>1</sup>; Siu Mui Tsai<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cell and Molecular Biology Laboratory, Center for Nuclear Energy in Agriculture, University of São Paulo.\*alinegifranca@gmail.com.br

---

### ABSTRACT

The soil is considered the most diverse and important existing ecosystem. Land-use, harvesting systems, management, coverage and other factors are associated with alternations in microbial communities. This includes rhizosphere, as plants can release different compounds on the surrounding soil so that it can presents unique environments for microorganisms. However, few studies have been made using sugarcane systems models to evaluate the impact of harvesting systems on soil microbial communities. This research examined the bacterial communities present in rhizosphere and bulk soils in a mesocosm experiment established from green and burnt sugarcane fields and evaluated through terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and metagenomic sequencing. The structure of the bacterial communities exhibited a separation between the rhizosphere and bulk soils for both managements, altering their biological parameters. Bulk soils communities from green sugarcane presented higher richness and diversity than from burnt sugarcane. Nevertheless, rhizosphere communities from burnt sugarcane undergone an increase of richness and diversity. These changes include an increase in the relative abundance of *Actinobacteria* and decrease of *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* phyla. Nineteen *Actinobacteria* families responded to sugarcane harvesting systems. We hypothesize that these alterations may be associated with antibiotic production by plants in rhizosphere region. The next step of this study will be measure the antibiotic genes to validate these results.

**Keywords:** Bacteria, Agricultural systems, Metagenomic sequencing.

**Support:** FAPESP, CAPES, CNPq.

**Evaluation of the mechanisms of degradation of  
lignocellulosic biomass by the basidiomycete fungus  
*Laetiporus sulphureus***

Ana Carolina Piva de Oliveira<sup>1,2\*</sup>; Thiago Augusto Gonçalves<sup>1,2</sup>, Gabriela Felix Persinoti<sup>1</sup>, Fabio Squina<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE). \*e-mail: carol\_534@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) - Instituto de Biologia (IB).

<sup>3</sup>Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) – Faculdade de Engenharia Química (FEQ).

---

**ABSTRACT**

Genome, transcriptome and secretome data are important tools to better understand the organism biology. In this study we analyzed the differential gene expression of brown rot fungi *Laetiporus sulphureus* grown in sugar cane bagasse (RAW) and glucose (GLU) after 24 hours using the RNA-seq approach.

A total of 12.000 transcripts were identified from the fungus transcriptome and all sequences were compared to the dbCAN database to identify CAZy family members (<http://www.cazy.org>). The CAZy is a database that describes enzymes that degrade, modify, or create glycosidic bonds. The results indicated the expression of 110 CAZymes, including genes required for saccharification of lignocellulose, distributed in 51 families of Glycoside Hydrolases, 16 Glycosyl Transferases, 15 Auxiliary Activities, 9 Carbohydrate Binding Modules, 1 Polysaccharide Lyase and 1 Carbohydrate Esterase. From Auxiliary Activities family, five genes were differentially identified in RAW in relation to GLU: pyranose dehydrogenase and alcohol dehydrogenase (AA3), peroxidase (AA2) and an AA9. In general, the high expression of genes encoding AA2 and AA9 are not common features in brown rot fungi, indicating a wide diversity of wood degradation mechanisms by these fungi. The transcriptome analyzes performed has provided insights on biomass degradation capability of this fungi.

**Key words:** RNA sequencing, secretome, brown rot fungi, biomass.

**Apoio Financeiro:** Instituto de Biologia (Unicamp), Capes, CNPEM, FAPESP

## Experimental evolution with budding yeast: getting high on ethanol

Ana Paula Jacobus<sup>1</sup>; Ewerthon Rohwedder<sup>2</sup>; Jeferson Gross<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute for Research in Bioenergy, UNESP, Rio Claro

<sup>2</sup> Luiz de Queiroz College of Agriculture (ESALQ), USP, Piracicaba.

\*jeferson.gross@googlemail.com:

### ABSTRACT

Adaptive laboratory evolution protocols are valuable tools to select for industrial relevant traits in yeasts. One important trait sought in industrial yeasts is their tolerance to high ethanol titers present at the end of very high gravity fermentations, such as for the production of ethanol as biofuel. We conducted an ethanol survival adaptive experiment with *S. cerevisiae* PE-2 by submitting four haploid yeast populations to harsh ethanol treatments for two hours at 32 °C, followed by a recovery period in an ethanol-free medium (2-4 days). Cycles of shock/recovery were reinterred with increasing ethanol content. Starting from an initial shock of 19% (v/v) ethanol (during which most of the cells died), adaptation progressed through about 70 cycles of shock/recovery. At the end of the experiment, the four populations were well adapted to shocks of 28-30% (v/v) ethanol. Competition assays between the evolved populations and the ancestor show a clear pattern of antagonistic pleiotropy, in which the evolved strains have much higher fitness than the progenitor to tolerate ethanol shocks, however are largely outcompeted by the ancestor under normal growth conditions and even during propagation at 8% (v/v) ethanol. Whole genome sequencing (Illumina MiSeq platform) suggests a prominent role of trehalose accumulation and RAS/PKA phosphorelay inhibition in the mechanisms of tolerance to ethanol shocks. Molecular genetic analysis of key mutations found during whole genome sequencing are currently underway and will allow a fine understanding of the evolution process.

**Keywords:** Yeast, Trehalose, Genomics, Ethanol, Evolution.

**Support:** FAPESP 2013/15743-9.

## Sex, alcohol and Darwin: experimental evolution of ethanol tolerance with fission yeast

Ana Paula Jacobus<sup>1</sup>; Ewerthon Rohwedder<sup>2</sup>; Jeferson Gross<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute for Research in Bioenergy, UNESP, Rio Claro \*jeferson.gross@googlemail.com:

<sup>2</sup> Luiz de Queiroz College of Agriculture (ESALQ), USP, Piracicaba.

---

### ABSTRACT

Ethanol tolerance of the fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus* was challenge in our lab by two experimental evolution protocols. First, three clonal and three sexual populations were propagated (serial transfers) side-by-side for about 2600 generations under rising ethanol content in the liquid medium. Sex (sporulation) was induced every 150 generations in the sexual lineages. At the end of the experiment, sexual populations tolerated propagation on 10% (v/v) ethanol, in contrast to the paucity of growth displayed by the clonal lineages under the same condition. Second, three clonal and three sexual populations were submitted to harsh ethanol treatments for two hours at 32 °C, followed by recovery in an ethanol-free medium (2-4 days). Cycles of shock/recovery were reinterred with increasing ethanol content (17% upward). Remarkably, while one clonal populations is stuck in a low fitness maximum of 25-27% (v/v) ethanol tolerance, sexual lineages displayed a fast rise in adaptation and have scale up to a maximum of 63% (v/v). A constitutive mating/sporulation mutant phenotype underpins the extraordinary adaptation of the sexual populations; i. e., without any induction, cells undergo a full sexual cycle (mating-meiosis-sporulation) and at the end release spores that survive the ethanol challenge while vegetative cells perish. Surprisingly, two clonal populations also developed a constitutive sporulation phenotype (although mating and meiosis are clearly not present), similarly experiencing a rapid increase in fitness (currently tolerating about 34-40% v/v ethanol). Genome sequencing data from all experimental populations is helping us to understand the genetic basis of their ethanol hyper-tolerant phenotypes.

**Keywords:** Yeast, Stress, Genomics, Fermentation, Evolution.

**Support:** Projeto FAPESP 2013/15743-9.

## Screening of fungal isolates from Amazon soil

Ana Carolina Glória de Oliveira<sup>1</sup>; Larissa Aparecida Gonçalves<sup>1</sup>; Heloiza Ferreira Alves do Prado<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>UNESP, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Ilha Solteira.  
\*carolacgo91@gmail.com

---

### ABSTRACT

Amylases are enzymes that hydrolyze the reserve carbohydrate, starch. Alpha-amylase is an enzyme that hydrolyzes the  $\alpha$ -1,4 bonds of the starch molecule, releasing short oligosaccharides chain. It is an enzyme with great application in the industrial sector, mainly in the food industries. Considering the great microbial diversity in different national biomes, the present study aimed to isolate microorganisms with potential in the  $\alpha$ -amylase production from the Amazon soil. Soil samples were diluted by decimal dilution in 0.1% peptone water. Then, 100  $\mu$ L aliquots were distributed by surface plating under Petri dishes containing sabouraud dextrose agar with 0.5 g L<sup>-1</sup> chloramphenicol. The plates were incubated in an oven at 35 °C. After fungal colonies growth it were transferred to another Petri dish containing the same culture medium, to purify the culture and then stored in tubes with inclined agar. The enzymatic activity was determined by the dextrizing method. Twelve filamentous fungi were isolated and cultivated under solid-state cultivation using wheat bran as substrate. Cultivation was carried in 250 mL-Erlenmeyr flasks with 5 g of wheat bran moistened with 10 mL of nutrient solution. The flasks were inoculated with 5 disks of fungal growth for 72 hours. After the growth the crude enzymatic solution was extracted using 50 mL of deionized water and used for the enzymatic determination. The isolates AC 17.1A, AC 6.3A and AC 6.1A showed the highest amylolytic activity with 140.0 $\pm$ 6.45, 140.0 $\pm$ 17.20 and 124.0 $\pm$ 37.5 U mL<sup>-1</sup>, respectively, indicating potential in amylase production.

**Keywords:** amylase, solid state cultivation, microbial enzymes, production.

**Support:** CAPES

## **Endophytic Bacteria Associated to *Tabebuia roseo-alba*: A Promissing Source of Bioactive Metabolites**

Ana Claudia Ruela<sup>1\*</sup>; Nadja Fernanda Gonzaga Serrano<sup>1</sup>; Paulo Teixeira Lacava<sup>1</sup>; Cristina Paiva Sousa<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Federal University of São Carlos, São Carlos, SP, Brazil. \*E-mail: anaclaudiaruela@gmail.com

---

### **ABSTRACT**

The Brazilian tropical savanna is a biome characterized by plants with unique characteristics from which endophytic microorganisms can be isolated. Some authors have shown efficient production of secondary metabolites of endophytic microorganisms associated with *Tabebuia* spp. The objective of this study was to characterize the endophytic bacteria associated with *Tabebuia roseo-alba* tree, with biotechnological potential for the production of antimicrobial compounds and enzymes. A single colony of bacterial TR-1 was grown in YSP2 medium for 48 hours at 37 ° C. Subsequently, this culture was inoculated into 200 ml of YSP2 for 120 hours. Then the samples were filtered on a 0.22 µm membrane and lyophilized. The organic fractions (OF) were separated and concentrated in vacuo and used for the antimicrobial assay. The presence of antimicrobial activity was determined by the formation of zones of inhibition around disks. The assay was performed against *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Escherichia coli*. To assess the presence of extracellular enzymes, the disks were filled with 10 µl of these fractions and then plated on medium supplemented with different carbon sources. The plates were analyzed for the formation of degradation halos after 48 h (amylases, proteases, cellulases and pectinases) and 240 hours (lipase and esterase). The results showed antimicrobial activity, inhibiting the growth of *E. coli* and *C. albicans*, and enzymatic activity of lipase and esterase. The results showed that an endophytic bacterium associated with *T. alba* produced bioactive antimicrobial compounds that can be used for biotechnological applications.

**Keyword:** Endophytic Microorganisms, Secondary Metabolites, *Tabebuia* spp.

**Support:** CAPES

## Toxicity of water soluble elements evaluated by yeast metabolism

Ana Paula Maria da Silva<sup>\*1</sup>; Jessica Aparecida Ferrarezi<sup>1</sup>; Felipe Gabriel Andrino<sup>1</sup>; Marcos Yasuo

Kamogawa<sup>1</sup>; Simone Possedente de Lira<sup>1</sup>; Keila Maria Roncato Duarte<sup>2</sup>; Luiz Humberto Gomes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ESALQ/USP, Laboratory of Chemistry of Natural Products, Department of Exact Sciences. \*e-mail: silvaanapaulaa@gmail.com.

<sup>2</sup>IZ, Center for Research in Genetics and Animal Reproduction, Nova Odessa, SP, Brazil.

### ABSTRACT

Due to the great expansion of cities and their unbridled growth and industrialization, water contamination has been rapidly increasing, resulting in uncontrolled dumping in rivers and soils, posing a threat to human and environmental health. The objective of this work is to demonstrate the use of *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) as bioindicator of the presence of toxic compounds in water, by measuring metabolic activity through conversion of 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) to 1,3,5-triphenyl formazan (TPF). This yeast toxicity test (YTOX) is based on the rapidity of this microorganism defense mechanism on exposure to toxic agents, associated with TTC reagent main property, which is initially colorless and becomes red once it is reduced to TPF by dehydrogenases and reductases as result of normal metabolism of yeast. The high homology between yeast and superior eukaryotes allows us to evaluate relevant aspects related to toxic effects of the compounds evaluated in this methodology with human biology. Besides being easy to maintain in laboratory conditions and resistant to small environmental variations, *S. cerevisiae* is a good bioindicator for toxicity testing. The results of YTOX with different metals (copper, iron, zinc, cadmium and aluminum) showed greater sensitivity compared to the results presented by the germination toxicity test performed with cucumber seeds, and proving that yeast provides a more refined analysis.

**Keywords:** Yeast, Metals, TTC / TPF, Bioindicator and Toxicity.

**Support:** CAPES and FAPESP 2013/12834-3.

## Stringent response and fatty acid starvation: Importance and implications towards drug development

Andre Arashiro Pulschen<sup>1\*</sup>; Diego Emiliano Sastre.<sup>1</sup> Frederico José Gueiros-Filho.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituição. Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo  
\*e-mail: andrepulschen@usp.br

---

### ABSTRACT

Bacterial adaptation towards environmental stress, mainly starvation, relies on the stringent response, which involves production of the alormone (p)ppGpp. In cells incapable of producing (p)ppGpp (named ppGpp(0) strains), cells are unable to stop their metabolism during starvation conditions. It was decided to investigate what happens to cells that are not able to stop their metabolism when starved for fatty acids, using the gram-positive model *B. subtilis*. Fatty acid starvation was performed by using the antibiotic Cerulenin or conditional mutants for *fabF* gene. It was observed that wild-type strains block their cell growth and reduced their cell size and maintain cell viability. With the absence of (p)ppGpp (using a ppGpp(0) strain, bearing deletions in all RSH-coding genes), cells are incapable of stopping growth. As a consequence, cells cannot reduce their size, membrane potential and integrity collapses and cells die, as a consequence of continuous growth without being capable of synthetizing new membranes. Data showed that (p)ppGpp plays a key role for *B. subtilis* adaptation towards fatty acid starvation and cellular stress. Notably, the bacteriostatic drug Cerulenin was turned into a bactericidal compound upon lack of (p)ppGpp. Results highlighted the importance of ppGpp to bacterial physiology and survival in the environment as also described in metabolic dysregulation that occurs in ppGpp(0) strains. Therefore, it was demonstrated the potential of targeting ppGpp for new drug development, since the absence of this nucleotide has dire consequences to bacterial homeostasis and stress survival.

**Keywords:** ppGpp, stringent response, *B. subtilis*, membrane potential, cell death, antimicrobials

**Support:** Fapesp 2014/26528-4

## Search for the role of eIF5A in endoplasmic reticulum stress using large-scale proteomic GFP screen in budding yeast

Angélica Hollunder Klippe<sup>1\*</sup>; Natália Moreira Barbosa<sup>1</sup>; Mariana Marchi Santoni<sup>1</sup>; Cleslei Fernando Zanelli<sup>1</sup>; Sandro Roberto Valentini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"-UNESP de Araraquara \*(angelicahklippe@yahoo.com.br)

---

### ABSTRACT

The translation factor 5A (eIF5A) is highly conserved in Archaea and eukaryotes and is essential for cell viability. Although it was initially suggested a function for eIF5A in the translation initiation, it was in the elongation step that eIF5A function was better demonstrated. Recent data from our research group revealed a possible role for eIF5A in the secretory pathway and endoplasmic reticulum (ER) translocation. In addition, it has been suggested an *activation* of the *ER* stress response upon eIF5A depletion in mammalian cells. Based on that, it was tested the behavior of a yeast eIF5A mutant in the presence of dithiothreitol (DTT) and tunicamycin, both *ER* stress inducing-drugs. Interestingly, the eIF5A mutant is sensitive to DTT and resistant to tunicamycin. So, to try to understand the mechanism which leads to the difference in phenotypes, it was performed a large-scale proteomic screen with those *ER* stress inducing-drugs using the ORF-GFP collection of *Saccharomyces cerevisiae* crossed with the eIF5A mutant through the synthetic genetic array methodology. Fluorescence intensities from each individual colony were assayed using a scanning fluorimeter to reveals the differential GFP expression. In the presence of DTT, it was observed 461 differentially expressed genes, with an enrichment for those involved in regulation and progression of cell cycle. On the other hand, for the tunicamycin it was observed 298 differentially expressed genes, with an enrichment for those involved in vacuole organization, vesicle-mediated transport and microautophagy. Further analysis using an more quantitative method will be done to confirm these results.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, yeast genetics, ER stress inducing-drugs, SGA, Fluorescent protein

**Support:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

## Diversity of the genus *Penicillium* isolated from Quadrilátero Ferrífero soil

Anielli Souza Pereira<sup>1\*</sup>; Sirlei Cristina de Souza<sup>1</sup>; Lorena Dutra Silva<sup>1</sup>; Michele de Oliveira Aragão<sup>1</sup>; Suemis Maria Parenti de Souza<sup>1</sup>; Luis Roberto Batista<sup>1</sup>; Sara Maria Chalfoun de Souza<sup>2</sup>; Fátima Maria de Souza Moreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras. \*e-mail: anisouza21@hotmail.com

<sup>2</sup>EPAMIG

---

### ABSTRACT

Soil is considered a mosaic of microhabitats due to its complexity, becoming one of the main ecosystems for the development of microbial populations. However, almost nothing is known about its fungal diversity. In this context, the objective was to identify species of the genus *Penicillium* of mining area soil. Two soil samples were collected in the Quadrilátero Ferrífero region. To obtain the microorganisms, dilutions were made ( $10^{-1}$  to  $10^{-4}$ ), followed by plating on surface of media DRBC and DG18. After the development of the colonies, those that presented distinct macromorphologies were isolated in MA 2%. The media used for morphological identification were MEA and CYA at 25°C and CYA at 37°C. After seven days, the colonies were measured; their characteristics were observed and micrometric data were analyzed and compared with identification keys. It was obtained a total of 294 isolates of *Penicillium*, which were grouped into 61 different morphotypes, being able to identify 9 at species level. The unidentified morphotypes were stored for subsequent molecular identification. The predominant morphotype was sp 44 (13.26%), followed by sp 04 (9.18%), sp 01 (6.46%) and sp 26 (6.12%) and the others. Eight isolates showed the production of pigments ranging from brown (*P. aurantiogriseum*), orange (*P. multicolor*), red (*P. purpurogenum*, *Penicillium* sp 23) and yellow (*Penicillium* sp 17, 18, 19 and 20). The results that were found may help with the information of the Quadrilátero Ferrífero region's mycobiota as well as to point out potential species for biotechnological applications.

**Keywords:** microbial population, biotechnological potential, mining area, pigments production

**Support:** CNPQ, CAPES, FAPEMIG, VALE S.A.

**Production and purification of ligninolytic enzymes by *Mucor racemosus* CBMAI 847**

Bruna Soares Dionizio<sup>1\*</sup>; Dulce H. F. de Souza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal University of São Carlos, São Paulo, Brazil. Chemistry Department. \* brunasdionizio@hotmail.com

---

**ABSTRACT**

Fungi from the marine environment are potential source of ligninolytic enzymes. The degradation of lignin by fungi is performed by extracellular enzymes such as laccase (Lac), manganese peroxidase (MnP) and lignin peroxidase (LiP). The search on the biodegradation of wood and agricultural residues focuses on thermostable biocatalysts. In this context the production and partial purification of ligninolytic enzymes of marine *Mucor racemosus* was evaluated. *M. racemosus* was grown in saline malt extract medium at 28°C under stationary condition for 7 days. Then Sabouraud dextrose medium was added and the agitation was adjusted to 150 rpm. At each 24 hours the enzymatic activity in culture medium was evaluated for using ABTS 1 mM substrate, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 mM and MnSO<sub>4</sub> 20 mM in sodium acetate buffer 20 mM pH 5.0 for 15 days. The crude extract was precipitated with 70% ammonium sulfate and the pellet was resuspended in acetate buffer and subjected to anion exchange chromatography (HiTrap QFF column) in the ÄKTA (GE) system. Chromatographic eluates were monitored by ABTS activity assay and denaturant electrophoresis, SDS-PAGE. Maximum activity of oxidase was obtained between the 6th and 8th day of culture ( $\pm 13$  U/mg). Oxidase activity was observed both in void and in salt gradient eluted fractions. SDS-PAGE showed different protein profile, evidencing the presence of different isozymes. The enzymes and respective specific activity currently undergoes characterization (physico-chemical, kinetic and mass spectrometry).

**Keyword:** marine-derived fungi, ligninolytic enzymes, *Mucor racemosus*, enzymatic purification.

**Support:** Capes

## Temperature influence on lipase activity of *Trichoderma harzianum* immobilized on Celite

Bruna Akemia Kakiuchi<sup>1,2</sup>, Vitoria de Jesus Luqueti<sup>1,2</sup>, Sérgio Henrique Gonçalves Chaves<sup>1,3</sup>, Breylla de Campos<sup>1</sup>, Valéria Marta Gomes do Nascimento<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Faculdade de Ciências e Letras de Assis. Av. Dom Antonio, 2100. CEP: 19850-900 - Assis/SP, Brasil. \*E-mail: valeria@assis.unesp.br

<sup>2</sup>Escola Estadual Lourdes Pereira, Assis, SP

<sup>3</sup>Escola Estadual Carlos Alberto de Oliveira, Assis, SP

---

### ABSTRACT

Lipases are enzymes belonging to the group of hydrolases and catalyze the conversion of triacylglycerols to free fatty acids and glycerol. However, lipases are distinguished by the ability to catalyze not only hydrolysis reactions, but also synthesis in aqueous-restricted media, a property that has increased the potential for the industrial application of these enzymes. The lipase behavior at different temperatures is one of the essential parameters for the industrial application of this enzyme. The objective of this work was to study the effect of temperature on the activity of lipase produced by *Trichoderma harzianum* LBBIO-TH1 immobilized on Celite. The microorganism was cultured in shaken flasks in culture medium whose formulation was determined previously. The enzyme was immobilized on Celite and used in the enzymatic activity assays. The enzymatic activity was determined by the hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate. The influence of temperature on the enzyme will be evaluated by measuring the enzymatic activity at temperatures between 20 and 60 °C. The activity of the culture supernatant was 1.2 U / mL. For the immobilization, 48 U of enzyme and 10 g of Celite were used. The enzyme was completely adsorbed and no enzymatic activity was detected in the wash buffer. The immobilized enzyme showed activity of 7.6; 9.2; 24; 20 and 44 U / g Celite, at temperatures of 20.30, 40.50 and 60 °C, respectively. These results indicate that the immobilization provided an increase in the enzymatic activity in relation to the free enzyme, in addition to a protective effect on the temperature action, since fungal lipases generally do not withstand temperatures between 50 and 60 °C.

**Keywords:** industrial application, hydrolysis.

## **Optimization of $\beta$ -glucanase production using wastewater from the pulp industry**

**Bruna Letícia Martins<sup>1\*</sup>; Luana do Amaral Bovi<sup>2</sup>; Cynthia Barbosa Rustiguel<sup>3</sup>; Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Universidade do Sagrado Coração- Pro-Rectory of Research and Post-Graduation (PRPPG), Master's Program in Environmental Science and Technology, Bauru/SP. \*e-mail: bruna.martins1992@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade do Sagrado Coração- Pro-Rectory of Research and Post-Graduation (PRPPG), Center for Health, Biomedicine, Bauru/SP.

<sup>3</sup>Department of Biology, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP/SP.

---

### **ABSTRACT**

The pulp industry is responsible for the production of a large volume of wastewater. These wastewaters are generated after the chemical bleaching with chlorine stage, which brings concern due to its toxic nature. The use of byproducts in fermentative processes to obtain the enzymes has shown promising results, contributing significantly to production with less cost. The  $\beta$ -glucanases are enzymes that acts in the hydrolysis of the  $\beta$ -glucans, a polysaccharide constituent of the cell wall of plants and microorganisms. These enzymes have a great biotechnological potential. The aim of the study was to optimize the production of fungal  $\beta$ -glucanase using alkaline wastewater generate from the second bleaching stage of a pulp industry. The enzymatic production was realized by submerged liquid fermentation using *Aspergillus niger* (IOC / CCFF 3998) in the culture medium described in the literature with the addition of the wastewater. The optimized parameters the wastewater concentration (2 to 82%) and production period (2 to 14 days) were determined and statistically analyzed by factorial experiment ( $2^3$ ). The results were analyzed for protein concentration by Bradford method,  $\beta$ -glucanase activity was determined using laminarin as substrate and specific activity (U/mg) was determined by the ratio of protein concentration (mg/mL) and  $\beta$ -glucanase activity (U/min/mL). It was observed that the wastewater favored the production in low concentration (2 to 42%) in association with long periods of cultivation (8 to 14 days). These results are significant because they propose an alternative for the wastewater reuse, which could be toxic to the environment.

**Keywords:** enzyme, *Aspergillus niger*, agroindustrial waste, factorial experiment

## Oleyl oleate synthesis by lipase from *Burkholderia lata* LBBIO-BL02

Bruno Henrique de Oliveira<sup>1,2\*</sup>, Jérôme Lecomte<sup>2</sup>, Pierre Villeneuve<sup>2</sup>, Valéria Marta Gomes do Nascimento<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Instituto de Biociências de Rio Claro. Av. 24 A, 1515. CEP: 13506-900 - Rio Claro/SP, Brasil. \*E-mail: [bruno@assis.unesp.br](mailto:bruno@assis.unesp.br)

<sup>2</sup>Centre de Recherche Agronomique Pour le Développement (CIRAD)/SupAgro, UMR IATE F-34060, Montpellier, France.

<sup>3</sup>Universida Estadual Paulista (UNESP) - Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Dpto. de Ciências Biológicas. Av. Dom Antônio, 2100. CEP: 19806-900 – Assis/SP, Brasil.

---

### ABSTRACT

The oil from the jojoba plant (*Simmondsia chinensis*) is the main biological source of wax esters for commercial applications since the global ban on whaling. Although it has a multitude of potential applications, the use of jojoba oil is restricted; the main obstacle to its large-scale use is its high cost and regional and seasonal availability. Thus, attempts to synthesize wax esters with low cost raw material and shorter time have become very important. The oleyl oleate ( $C_{36}H_{68}O_2$ ) is known as the main component of jojoba oil and has high added value. In this study, we describe the esterification capacity of *B. lata* LBBIO-BL02 lipase for oleyl oleate synthesis. The esterification reactions of oleic acid (100 mmol/L) with oleyl alcohol catalyzed by *B. lata* lipase were performed using different alcohol/fat acids molar ratio (1:2, 1:1 and 3:1), at 55 °C using n-Hexane. Esters and free fatty acids were analyzed by gas chromatography (GC). The fatty alcohol concentration had no significantly influence to the reaction yield, even in the molar ratio 1:2 the yield was 45% due to the total alcohol consumption. At the molar ratios 3:1 and 1:1 the yield reached 84 and 87% after 30 minutes of reaction, respectively. These results demonstrate the potential of *B. lata* lipase in bioprocesses to obtain high added value esters.

**Keywords:** esterification, oleic acid, jojoba oil.

**Support:** CAPES (Proc. 6545/2015-07); FAPESP Processo 2014/25361-9

**Comparison of the fumigation-extraction and radiation-extraction methods in the evaluation of microbial biomass C in cave soil.**

Caio César Pires de Paula<sup>1\*</sup>; Mirna Helena Regali Seleghim

<sup>1</sup> Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos, SP.  
\*piresdepaula@yahoo.com.br

---

**ABSTRACT**

Soil microbial biomass carbon (MBC) is usually estimated by the fumigation-extraction (FE) method, based on carbon extraction from fumigated and non-fumigated soil samples after 24 h with chloroform. This method is not efficient for some microorganisms and the chloroform is highly toxic to humans. Microwave radiation may be an alternative to chloroform in the breakdown of the microbial cells. Our objective was to compare the MBC in cave soil using the FE and the radiation-extraction (RE) methods. Four samples (10.0 g of soil), collected in São Bernardo III cave (São Domingos, GO), were submitted to FE method (50.0 mL chloroform; 24 h) and to RE method (800 J g<sup>-1</sup> soil, 11 seconds) to estimate the MBC. The parametric t-test was used to compare means. The Fligner Killen test was used to evaluate the homogeneity of variance in the data obtained for each method. The mean amount of MBC was 217.47 mgC g<sup>-1</sup> soil (FE) and 219.61 mgC g<sup>-1</sup> soil (RE). There was not a significant difference between the values obtained in both methods ( $p = 0.91$ ). The coefficient of variance of the data was 17.27 (FE) and 0.96 (RE). Although the values of MBC were similar for the two methods, with RE the coefficient of variance in the soil samples were lower. So, we conclude that the RE method may be the most adequate to estimate the MBC, because it offers the following advantages: less variation of data; shorter time to apply the methodology and lower toxicity to researchers.

**Keywords:** microbial biomass; subterranean environment; fumigation, radiation; soil.

## Marker assisted selection for *Pseudocercospora griseola* resistance in common beans

Caléo Almeida<sup>1</sup>; Gabriel Bonfante<sup>1\*</sup>; Lucas Rossi Lazaretti Novo<sup>1</sup>; Alisson Fernando Chiorato<sup>2</sup>; Luciana Lasry Bechimol-Reis<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Agronômico, Centro de Recursos Genéticos, Campinas, SP. \*email: llasry@iac.sp.gov.br

<sup>2</sup>Instituto Agronômico, Centro de Grãos e Fibras, Campinas, SP.

---

### ABSTRACT

The angular leaf spot, caused by *Pseudocercospora griseola*, is one of the most important diseases in common beans. Molecular markers can be used as a tool for the early selection of resistant genotypes. The goal of this work was to undertake the molecular evaluation of resistance to angular leaf spot in the BC1 AND277 x IAC-Millennium (Andean x Mesoamerican). Microsatellites and SCARs were genotyped. The SSR GATS11b previously located at the core of the ALS10.1<sup>UC</sup> QTL presented andean alleles, in heterozygous state. The PvM22 also co-located with GATS11b in Pv10, presented the same allele profile of GATS11b and IAC137 markers, and probably is in the same region of the core of Pv10, being a very conserved region, with block behavior and segregation distortion. The SSR-IAC 134 marker, which flanked QTL ALS2.1<sup>UC</sup>, presented atypical profile compared to the other amplified SSRs, since it showed no heterozygotes at all, and most of the genotypes presented IAC-Millennium alleles (recurrent parent) for this locus. Three SCARs were also amplified: the SH13, associated with the *Phg-1* gene, and the SAA19, showed superiority of Andean alleles, and the SAB16 had superiority of mesoamerican alleles, the latter two being associated with the *Phg-3* gene. A new molecular selection will be performed in F3BC2 to evidence the loss or fixation of the same alleles, once most of the loci were in heterozygous state. We hope to select cultivars with superior resistance by molecular assessment correlated to the phenotypical evaluation of the disease severity.

**Keywords:** Angular leaf spot, Breeding, *Phaseolus vulgaris*

**Support:** FAPESP and CNPq/PIBIC.

## Amino acid supplementation under industrial yeast on sugarcane bagasse hydrolyzate

Camila de Souza Varize<sup>1\*</sup>; Mariane Soares Raposo<sup>1</sup>; Renata Maria Christofoleti-Furlan<sup>1</sup>; Carolina Tieppo Camarozano<sup>1</sup>; Osni Florêncio Junior<sup>1</sup>; Thalita Peixoto Basso<sup>1</sup>; Elisangela de Souza Miranda<sup>1</sup>; Ricardo Luiz Dalia<sup>1</sup>; Luiz Carlos Basso<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz | USP \*e-mail: camilasv@usp.br

---

### ABSTRACT

Inhibitors present in the hydrolyzate is one of the main factors causing deleterious effects in yeasts, its can act directly on cell functions, depreciating growth, and ethanol productivity. Studies have demonstrated the beneficial effect of some supplemental amino acids (AAs) related to tolerance and general stress response of *S. cerevisiae*. In this study, we aimed to evaluate the supplementation effect of 20 AAs on the growth of *S.cerevisiae* CAT-1 in sugarcane bagasse hydrolyzate. Growth curves were performed in a TECAN spectrophotometer (D.O. 570nm), by incubation of microplates under a 2-hour intervals readings at 30°C, till 36 hours. It was added: 10 µl of inoculum, 20 µl of amino acid (200 mg.L<sup>-1</sup> aminic N) and 90 µl of media (105.20 g.L<sup>-1</sup> Glucose, 26.05 g.L<sup>-1</sup> Xylose, 1.05 g.L<sup>-1</sup> Arabinose, 0.65 g.L<sup>-1</sup> Formic acid, 6.68 g.L<sup>-1</sup> acetic acid, 0.08 g.L<sup>-1</sup> HMF, 1.53 g.L<sup>-1</sup> Furfural, etanol 2,54%, 5.11 g.L<sup>-1</sup> YNB without (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and a.a., 321.80 mg.L<sup>-1</sup> Urea, 708.27 mg.L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 30.08 µg.L<sup>-1</sup> Biotin, 30.08 µg.L<sup>-1</sup> Folic Acid and 150.38 µg.L<sup>-1</sup>Riboflavin) to each microplate well. His, Gly, Asn, Pro and Gln promoted significantly higher growth than the control (0.646). Among them, His (0.813) and Gly (0.757) showed higher growth than all the others. The  $\mu_{max}$  data revealed that His demonstrated higher values over all. The Cys 0.025, Asp 0.022 and Glu 0.02 depreciated growth significantly. It can be concluded that the supplementation of some AAs is related to higher growth in the evaluated media.

**Keywords:** Hydrolyzate inhibitors; 2nd Generation Ethanol; Histidine; Cell yeasts; Stress in fermentation.

**Support:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

## Time-course proteomics during *Aspergillus nidulans* growth on pre-treated sugarcane bagasse and straw

César Rafael Fanchini Terrasan<sup>1</sup>; Fabiano Jares Contesini<sup>1</sup>; Jaqueline Aline Gerhardt<sup>1</sup>; Marcelo Ventura Rubio<sup>1</sup>; Mariane Paludetti Zubieta<sup>1</sup>; André Ricardo de Lima Damásio<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Instituto de Biologia – IB, Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual. Rua Monteiro Lobato, 255 – Cidade Universitária, Campinas - SP, Brazil. 13083-862. \*adamasio@unicamp.br

---

### ABSTRACT

Saprophytic filamentous fungi have extraordinary capacity for producing huge quantities of extracellular proteins, allowing them to metabolize a broad variety of polymeric substrates. Large amounts of residual sugarcane straw and bagasse constitute poorly managed by-products which could be explored for second-generation ethanol (E2G) production. The enzymatic deconstruction of plant cell walls corresponds to a main bottleneck for E2G viability, both in economic and process efficiency aspects. The objective of this work was to evaluate the order of enzyme secretion during *A. nidulans* growth, which may be playing an important role in substrate degradation. The fungus was grown in minimal medium supplemented with Avicel, glucose, steam-exploded sugarcane bagasse and straw during 24, 72 and 120 h. Extracellular proteins (secretomes) were analyzed by mass spectrometry in an Orbitrap analyzer. Among the 301 identified proteins 165, 192, 156 and 207 proteins were identified in cultivations with Avicel, bagasse, glucose and straw, respectively. About 38 proteins were commonly identified in Avicel, bagasse and straw, and 47 were commonly identified in bagasse and straw. Considering all identified proteins, 126 corresponded to Carbohydrate Active Enzymes (CAZymes: 78 Glycosyl Hydrolases, 6 Pectin Lyases, 15 Carbohydrate Esterases and 27 Auxiliary Activities). The highest protein secretion was observed with Avicel and straw. In relation to the growth period, the general trend was an increase in protein secretion with Avicel and straw, while a decrease was observed with bagasse and glucose. The results showed high potential of the fungus in producing CAZymes and gave support in targets selection for further functional studies.

**Palavras-chave:** CAZymes, extracellular proteins, mass spectrometry, plant-cell degrading enzymes

**Support:** São Paulo Research Foundation (FAPESP: 2012/20549-4 and 2016/16306-0). The authors acknowledge the Mass Spectrometry Laboratory at Brazilian Biosciences National Laboratory, CNPEM, Campinas, Brazil for their support with the mass spectrometry analysis.

## Endoglucanase activity in digestive organs content of Teredinidae

Daniela Toma de Moraes Akamine<sup>1</sup>; Daniel de Almeida Cozendey da Silva<sup>1</sup>; Gabriela de Lima Câmara<sup>1</sup>;  
Thayane Vieira Carvalho<sup>1</sup>; Michel Brienzo<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biotechnology (Labio), Metrology Applied to Life Science Division - National Institute of Metrology, Quality and Technology (Inmetro), Duque de Caxias - RJ, Brazil;

<sup>2</sup>Bioenergy Research Institute (IPBEN), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro-SP, Brazil.  
e-mail: mbrienzo@ipben.unesp.br

---

### ABSTRACT

Cellulolytic enzymes have been studied in several organisms, such as insects and molluscs, which can have enzymes endogenously produced or by symbiotic microorganisms. These enzymes are responsible for breakdown the lignocellulose material that organisms feed upon, probably with the aim of assimilating the sugars and nutrients. Moreover, organisms such as teredinids grow up inside of wood and the wood process perhaps could be related to creating growing space. Endo- $\beta$ -1,4-glucanase activity was detected in different organs of the Teredinidae bivalves, including gill and digestive organs content. The organs of digestive tract and gills were separated, with the objective to avoid the contamination and each organ had your content separated from the tissue. The extracts and macerated organs were used to measure the endoglucanase activity. All the endoglucanase extracts, from organs tissue and contents, showed maximum activity at 40°C. The maximum activity was observed at pH 5.5 for all the extracts, except for Intestine tissue that was at pH 6. Moreover, some of the extracts showed a different profile of the activity as a pH influence, suggesting different enzymes distribution over the digestive system of the teredinids. The results suggest further studies as potential to investigate endoglucanase genes from the Teredinidae and also isolate the microorganism for cellulases screening.

**Keywords:** *Neoteredo reynei*; cellulases; wood digestion; endo- $\beta$ -1,4-glucanase; optimum activity.

**Support:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ); Brazilian Council for Research and Development (CNPq) (Prometro grant number 550,105/2012-8); Program of Human Resources Formation from Petrobrás (PFRH-103).

**Evaluation of riboswitch theo/metE for gene silencing in  
*Xanthomonas citri***

Danilo Bueno<sup>1</sup>; Henrique Ferreira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Biociências/Rio Claro \*e-mail: henfer@rc.unesp.br

---

**ABSTRACT**

Genetic evaluation of any organism, especially of bacteria, requires tools to enable DNA alteration with subsequent characterization of emerging phenotypes. Among the techniques used, expression platforms based on riboswitches represent an excellent alternative that enable the modulation of gene expression without the need to remove/insert a coding DNA from/into an organism. Riboswitches can directly control gene expression at the transcription or the translational levels by just operating on the RNA coding for a characteristic, and being the switch itself part of this RNA (*cis* action): depending on a stimulus, the riboswitch will adopt a structural conformation allowing (“ON” state) or not (“OFF” state) the progress of transcription or translation. Our main goal is prove that the riboswitch theo/metE is an efficient tool genetic to control the expression gene in *Xanthomonas citri*. Here, we generated three mutants of Xac with the sequence parA-riboswitch-parB integrated in their genomes, and when grown in culture medium with theophylline, these mutants will be able to abort the transcription of the parB gene due to riboswitch theo/metE action. The success of this construction may lead to a disruption of chromosomal segregation in this microorganism, and the use of riboswitch will be important to new studies involving ORF genes in *Xanthomonas citri*, relevant for the survival of this species.

**Keywords:** Riboswitch, sintetic biology, citrus canker.

**Support:** FAPESP e CNPq.

## **Evaluation of the use of commercial biomass for the treatment of wastewater of a sugar and alcohol industry**

Danilo Augusto Polezel<sup>1\*</sup>; Júlio César Zambelle<sup>1</sup>; Marcelo Zaia Gregório<sup>1</sup>;

<sup>1</sup> Water Tech Soluções Ambientais Ltda. \*e-mail: danilo@watertech.com.br

---

### **ABSTRACT**

The production of sugar and alcohol represents an impact on the management of water resources in Brazil, due to the quantities of wastewater generated. If such effluents are not treated and be used in fertigation or dumped into water bodies, they may contaminate groundwater or affect the survival of the aquatic ecosystem. The action of microorganisms degrading the pollutants and using them as a source of nutrients is an outlet for wastewater treatment. Therefore, the aim of this study was to evaluate the efficiency of a commercial biomass composed of sugarcane molasses as substrate and microorganisms *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae*, used in the wastewater treatment of a sugar and alcohol industry in the city of Jacarezinho / PR, compound of a system of lagoons, through COD, pH, sedimented and suspended solids, aiming at reducing the organic matter load during the period from June 2016 (beginning of biomass application) to December 2016 (end of harvest). The initial and final average parameters showed high efficiency in the removal of suspended solids from 1,039.05 mg/L to 99.61 mg/L, sedimentable solids from 13.96 mL/L to 0.1 mL /L, increase in value of pH from 5.6 to 7.9 and removal of the organic load of this water, measured as COD, decreasing from 4,033.90 mg/L to 207,67 mg/L, presenting values according to the established by the legislation. The use of commercial biomass presented an economically viable and sustainable alternative to reduce the disposal of wastewater from the alcohol and sugar industry in the environment.

**Keywords:** Biodegradation. Sustainable. Microorganisms. Pollutants.

**New hydrazones: Promising compounds against  
*Mycobacterium tuberculosis***

Débora Leite Campos<sup>1\*</sup>, Caio Sander Paiva Silva<sup>1</sup>; Paula Carolina de Souza<sup>1</sup>; Pedro Ivo da Silva Maia<sup>2</sup>;  
Fernando Rogério Pavan<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Faculdade de Ciéncias Farmacéuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Araraquara, SP. Laboratório de Pesquisa em Tuberculose. \*e-mail (autor para correspondência): leite.debora26@gmail.com

<sup>2</sup> Departamento de Química, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba-MG, Brazil

---

**ABSTRACT**

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. In 2015, 6.1 million new TB cases were reported to WHO. This situation justifies the intensive research for new drugs capable to treat TB. Another reason is to find molecules capable of acting on the two metabolic states that the bacterium may assume after infection (active and latent), since in current therapy only few drugs are capable to do that. The aim of this study was to evaluate the potency of four hydrazones (14, 15, 16 and 18) against the bacillus in these different situations. REMA and LORA assays were used to verify the activity of these compounds against active and latent bacteria, respectively. It was obtained the Minimal Inhibitory Concentration (MIC<sub>90</sub>) that is the concentration capable of inhibiting 90% of the bacterial growth. In the REMA test the MIC values were 0.34, 11.89, 1.82 and 5.29 µg/mL for the compounds 14, 15, 16 and 18, respectively and in the LORA assay the MIC values were 1.77, 2.07, 2.35 and 1.78 µg/mL, respectively. These results show that the peripheral groups of the hydrazones play a role on the activity against the active bacteria, since different values were observed. However, in the case of the latent bacteria, the compounds were active by the same magnitude, indicating that the basic structure of compounds is related to their activity. These findings point out that these hydrazones are promising, because they act on the two metabolic states of the bacterium and could become a good option for TB therapy.

**Keywords:** MIC, REMA, LORA.

**Support:** CAPES, FAPESP JP 2013/14957-5.

## Preliminary test for kinetic study of fermentative processes of lactic acid producing *Metschnikovia koreensis* G18

Diego Alves Monteiro<sup>1\*</sup>; Vitória Gonçalves Navarrete<sup>1</sup>; Marcella Donofre Lousa<sup>1</sup>; Raquel Arantes Megid<sup>1</sup>; Roberto da Silva<sup>1</sup>; Eleni Gomes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biosciences, Languages and Exact Sciences Institute - (IBILCE), Júlio de Mesquita Filho University - UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil

\*diego8monteiro@hotmail.com

---

### ABSTRACT

The yeast *Metschnikovia koreensis* G18 was isolated in the Laboratory of Biochemistry and Applied Microbiology (Ibilce / Unesp). This is a promising strain for biotechnological applications due to its ability to produce high value added chemicals, such as lactic acid, from xylose as a substrate. It is fundamental to know the kinetics of product formation, substrate consumption, and biomass formation to the development of an industrial process for this microorganism. However, beforehand it is important to establish, in a simple way, a strategy that avoids excessive sampling. Therefore, the technique of 96-well plate culture with automatic optical density readings in a spectrophotometer was chosen. *M. koreensis* G18 was grown in 200µL of medium with 2% xylose, at 29°C and under pH 4.5, 6.5, and 8.5. The incubation time was 70h, and hourly readings were performed. It was possible to identify the main stages of growth (lag, exponential and stationary) in all plate cultures at different pH. In the working conditions of this study, the growth curve shows that the best points for sample collection are at 0h, 5h, 10h, 20h, 30h, 40h, 50h and 60h. These collection points guarantees a set of aliquots that allow a wide kinetic study of the fermentative processes of *M. koreensis* G18, under the conditions of pH and source of carbon and energy tested, because it contemplates all the stages of growth.

**Keywords:** yeast; biotechnology; xylose; fermentation

## The influence of edible fungi in the total and digestible protein using agro-industrial wastes as substrate

Eduardo Marin Morales<sup>1</sup>; Holger Zorn<sup>2</sup>; Dejanira de Franceschi de Angelis<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho – UNESP, campus Rio Claro. \*e-mail: emarinmorales@gmail.com (autor para correspondência):

<sup>2</sup>Justus-Liebig – Giessen Universität, Institute of Chemistry and Biotechnology of Food, Giessen - Germany.

---

### ABSTRACT

The use of agro industrial wastes represents an interesting option to increase the production food and to decrease the generation of wastes. Cassava bagasse (CB) and leaves (CL) are discarded though they contain high amounts of carbohydrates, proteins, fat and minerals. To evaluate the possibility of using wastes from cassava to obtain food with high nutritional quality, a submerged fermentation (SbF) was performed using edible fungi (*Rhizopus oligosporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* and *Agaricus blazei*) at 24°C. The total amount of protein was evaluated by Kjeldahl method and the digestibility of the protein was assessed by the growth of the bacterium *Enterococcus zymogenes*, an organism that present essential amino acids necessity similar to human diet. The results obtained to cassava leaves showed the high amount of protein and digestibility in samples fermented by *Pleurotus ostreatus* (48.2±6.2 and 38.3±4,9, respectively); followed by *Lentinula edodes* (43.5±1.6 and 31.3±1.2); *Agaricus blazei* (41.2±1.2 and 29.7±0.8); and *Rhizopus oligosporus* (41.0±1.4 and 28.7±1.0). The fermentation of cassava bagasse exhibited a different sequence comparing the fungi where the highest amount of protein and digestibility was observed in samples fermented by *L. edodes* (15.4±1.1 and 11.1±0.8); *P. ostreatus* (14.6±0.3 and 11.6±0.2); *A. blazei* (14.6±0.4 and 10.5±0.3); and *R. oligosporus* (9.6±0.4 and 6.7±0.3). The results allowed concluding that the fermentation performed by *P. ostreatus* (10 days of fermentation) and *L. edodes* (20 days of fermentation) could reach products with interesting amounts of digestible protein with important amino acids, being the *P. ostreatus* two times faster than *L. edodes*.

**Keywords:** Cassava Leaves; Cassava Bagasse; Relative Nutritional Value; Submerged Fermentation; Food.

**Support:** CAPES

## Production of extracellular biosurfactant/bioemulsifier among heavy-metal tolerant bacteria

Elane Cristina dos Santos<sup>1</sup>; Amanda Lys Silva<sup>1</sup>; Ana Maria López<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biochemistry of Parasitism and Environmental Microbiology (LBPMA), Institute of Chemistry and Biotechnology (IQB) Federal University of Alagoas (UFAL). Campus A.C. Simões, s/n. 57072-900. Maceió-AL, Brazil. \*e-mail: [amql@qui.ufal.br](mailto:amql@qui.ufal.br)

### ABSTRACT

Biosurfactants/bioemulsificants (BS/BE) are surface active agents, produced by microorganisms and largely utilized on various industrial sectors. Such molecules has been received a growing attention on last decades because of their advantages in relation to chemical surfactants. The objective of this work was to evaluate the potential of bacterial strains, isolated from effluent and sludge of Treatment Plant in a sugar-alcohol industry (Coruripe-AL) and tolerant to heavy metal, to produce extracellular biosurfactants/bioemulsificants. Eight strains tolerant to heavy metal were selected and identified by biochemical and molecular characteristics as *Pseudomonas* EFI, *Arthrobacter* EFII, *Bacillus* EFIII and EFIV, *Clostridium* EFV, *Kurthia* LOII, *Corynebacterium* LOI and LOIII. They were inoculated on minimal broth medium supplemented with 2 % glucose, during 48 h (180 rpm, 30 ± 1 °C). Then, samples were centrifuged and the supernatants free of cells used to determinate [H<sup>+</sup>], the emulsification index (on toluene and kerosene), drop collapse and total-reducing glicids. *Arthrobacter* EFII, *Bacillus* EFIII and *Corynebacterium* LOIII were positive for the drop collapse test. *Pseudomonas* EFI, *Arthrobacter* EFII and *Clostridium* EFV emulsified the toluene, and *Arthrobacter* EFII also emulsified kerosene, showing the best emulsification index (E<sub>24</sub>= 78.75 ± 0.01 % on toluene and E<sub>24</sub>= 15.62 ± 0.03 % on kerosene). *Pseudomonas* EFI and *Arthrobacter* EFII consumed more glucose than others strains under investigation during 48 h. All strains had [H<sup>+</sup>] close to neutrality, and generally, neutral pH provides favorable conditions to BS/BE production. Amongst the investigated strains, *Arthrobacter* EFII was the most promising for bioremediation experiments of effluent and sludge.

**Keywords:** Surface active agents, Microorganisms, Sugar-alcohol industry.

**Support:** Usina Coruripe and CAPES.

## Antimicrobial/antioxidant activity of spices used in shrimp preparation

Everton Martins<sup>1</sup>; Ana Maria López<sup>1\*</sup>

1 Federal University of Alagoas (UFAL), Institute of Chemistry and Biotechnology (IQB), Laboratory of Biochemistry Parasitism and Environmental Microbiology (LBPMA). *Campus A.C Simões, s/n. Cidade Universitária. Maceió-AL-Brasil.* \*amql@iqb.ufal.br

---

### ABSTRACT

Shrimps are largely used on gastronomy and once this product has a high content of lipids and proteins, it can be a target of autolytic and microbial enzymes. The objective of this work was to determine the antioxidant and antimicrobial activities of peppers used as spices in shrimp preparation: *Myracrodroon urundeuva* (Rosa), *Capsicum frutescens* (Malagueta), *Capsicum baccatum* var. *pendulum* (Dedo-de-Moça) and *Capsicum chinense* (Cheiro). The antibiogram was performed using discs impregnated with samples of the different peppers-hydroalcoholic extracts (10µL of the 20g.mL<sup>-1</sup>) or 5µg ofloxacin antibiotic (positive control), distributed on Müller Hinton Agar medium inoculated via *pour plate* with one of 5 bacterial strains isolated from fresh shrimp ( $1.5 \times 10^8$  cells.mL<sup>-1</sup> each), in Petri dishes. For the antioxidant analysis (content of phenols, total flavonoids and antioxidant activity by the use of DPPH radical) was used the spectrometry. The concentrations of the studied extracts were moderately sensitive to some of the bacteria. In the antioxidant profile, the total phenol and flavonoids contents of the peppers “Malagueta” and “Rosa” presented higher concentrations (58.3-82.6 µg.mL<sup>-1</sup> and 200-194 µg.mL<sup>-1</sup>, respectively), in comparison to the other species (“Pimenta-de-Cheiro” and “Dedo-de-Moça”). The pepper “Rosa” presented a more significant antioxidant activity (5µg.mL<sup>-1</sup>) when compared to the other peppers tested. Once it is worth mentioning that the content of phenols and flavonoids can influence the antioxidant profile, the study demonstrates that peppers analyzed can be used as natural antioxidants in food.

**Keywords:** Bacteria, Pepper, Hydroalcoholic extracts.

**Support:** “CNPq” and S. A. “UsinaCoruripeAçúcar e Álcool”

## **Evaluation of bioactivity of essential oils and hydrolates in control of *Alternaria* sp, phytopathogenic fungus isolated from tomato plants**

Fabiane Facchini<sup>1</sup>; Mariana Costa Pereira<sup>1</sup>; Rosemeire Bueno<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CEUNSP - Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio (facchini\_fabi@hotmail.com).

---

### **ABSTRACT**

The tomato tree (*Lycopersicum esculentum* Mill), belonging to the family Solanaceae, has a high nutritional value and has substantial agro economic importance. Fungal diseases of tomato such as early blight, caused by *Alternaria solani*, consist on the limiting factor for tomato production due to losses in productivity and quality of products. To control or prevent most of the diseases, it is used the conventional treatment with pesticides. However, the increasing demand for plant products free of chemical residue contamination has encouraged the researching for alternative methods of control. Thus, the goal of this study was evaluate the effect of hydrolates and essential oils on phytopathogenic fungi *Alternaria* sp, previously isolated of tomato tree, to select plant extracts with antifungal potential. For these, four hydrolates, geranium (*Pelargonium* sp), lavender (*Lavandula* sp), cinnamon (*Cinnamomum zeylancum*) and clove (*Syzygium aromaticum*) and two essential oils, clove (*Syzygium aromaticum*) and eucalyptus (*Eucalyptus* sp) were tested, using Agar' Diffusion Methods (with discs and circular perforator). The microorganism test used was a phytopathogenic fungus previously isolated from a tomato tree and identified as *Alternaria* sp, after macro and microscopic analysis. For both evaluated methods, clove essential oil and hydrolate and cinnamon hydrolate was most effective in reducing 100% the micelial growth of *Alternaria* sp in 48 hours. This is indicate the efficiency of essential oils and hydrolates as fungicides, which makes them a great perspective as use for plant disease control, after new studies that establish a secure inhibitory concentration for use in the field.

**Keywords:** Essential oils, hydrolates, *Alternaria*, tomato early blight.

## Experimental validation of an *in silico* approach for prediction of new thermostable GH11 endo-xylanases

Felipe Cardoso Ramos<sup>1,2</sup>; Vinícius de Godoi Contessoto<sup>1</sup>; Letícia Maria Zanphorlin<sup>2</sup>; Vitor Barbanti Pereira Leite<sup>1</sup>; Roberto Ruller<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE)

<sup>2</sup>Centro Nacional de Ciência em Energia e Materiais (CNPEM) - Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), Campinas (SP) \*E-mail: roberto.ruller@bioetanol.org.br

---

### ABSTRACT

Processing of lignocellulosic biomasses for bioethanol production and others applications on requires thermostable enzymes able of operating under high temperatures and long incubation periods. Here, we report the preliminary validation of an *in silico* approach for engineering hydrolytic enzymes towards thermostability. Previous computational simulations of the GH11 endo-xylanase from *Bacillus subtilis* (XBS) using the electrostatic interactions optimization (EIO) methodology indicated three critical residues (K99, R122 and K154) for stability improvement through charge replacement. In this context, we analyzed the effects of K99E mutation on XBS biochemical and biophysical proprieties in order to evaluate its contribution for thermostability and thermotolerance. Both wild-type (XBS<sup>WT</sup>) and mutant (XBS<sup>K99E</sup>) enzymes were produced by heterologous expression using *Escherichia coli* BL21 cells and purified by immobilized-metal affinity chromatography (IMAC). The endo-xylanase activity was quantified through the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method employing oat spelt xylan 1 % as substrate, the enzymatic assays were performed on pH range of 4 to 10, between 20-70 °C. For secundary structures analysis, we performed circular dichroism (CD) experiments at 20 °C varying wavelength from 195 to 260 nm. The thermal denaturation temperature ( $T_m$ ) was obtained by monitoring the residual molar ellipticity at 220 nm using an increasing temperature gradient (20-90 °C). The results showed that the K99E mutation was able to increase  $T_m$  by approximately 1 °C and improve enzyme termotolerance without alter XBS optimum conditions (pH 6,0 and 50 °C), suggesting that the EIO approach can be used as starting strategy for design of new thermoactive endo-xylanases from GH11 family.

**Keywords:** GH11 endo-xylanase; thermostability; circular dichroism (CD); *in silico* design; microbial enzymology

**Support:** CAPES, FAPESP and CNPq

## Isolation of Bisphenol A degrading bacteria from an estuarine environment

Felipe Silva de Santana<sup>1\*</sup> Louise Hase Gracioso<sup>1</sup> Bruno Karolski<sup>1</sup> Maria Anita Mendes<sup>1,2</sup> Jorge Alberto Soares Tenório<sup>1,2</sup> Claudio Oller do Nascimento<sup>1,2</sup> Elen Aquino Perpetuo<sup>1,3</sup>

1 Environmental Research and Education Center, University of São Paulo, CEPEMA-POLI-USP, Conego Domenico Rangoni Rd, 270 km, Cubatão, SP, Brazil; \*felipesantana@usp.br

2 Chemical Engineering Department, University of São Paulo, POLI-USP, Lineu Prestes Ave, 580, São Paulo, SP, Brazil;

3 Department of Marine Sciences, Federal University of São Paulo, Imar-Unifesp, Alm. Saldanha da Gama Ave, 89, Santos, SP, Brazil.

---

### ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is a plasticizer substance present in many household objects made from plastic. Since this compound is present in our daily routine, exposure to BPA occurs frequently, mainly at low concentrations, caused by ingestion of food that was in contact with plastic containers or packaging. Once in the environment, plastic objects still release BPA which goes into water strengthened contact with people. Even in low concentrations ( $\text{ng.L}^{-1}$ ) BPA exposure may cause severe damage to the endocrine system binding to hormonal receptors acting as female hormone. As an important environmental contaminant coming from uncountable sources spread all over the world, mitigation studies to remove this contaminant from the environment are essential. One of the alternatives to remove this xenobiotic from the environment is bioremediation by selected bacteria isolated from a BPA impacted ambient. With this concept in mind, this study explored sediments from Santos Estuary System (SES), which represents one of the most important Brazilian examples of environmental degradation caused by the largest port in South America (Port of Santos) and a large industrial pole located in Cubatão city. Sediment analysis from SES revealed the presence of BPA confirming contamination and microorganism exposition to it. We could isolate four different aerobic bacteria strains which use BPA as carbon source. Between them, we could find a strain identified as *Shewanella halioti* which is poorly related to aromatic hydrocarbons biodegradation but was able to tolerate up to  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  of Bisphenol A and completely biotransform  $75 \text{ mg.L}^{-1}$  BPA in 6 hours.

**Keywords:** Bisphenol A; Bioremediation; Biodegradation

**Support:** CAPES

## Evaluation of Basidiomycetes secretomes in order to search for new active carbohydrate esterases

Fernanda Lopes de Figueiredo<sup>1</sup>; Marcelo Ventura Rubio<sup>1</sup>; César Rafael Fanchini Terrasan<sup>1</sup>; André Ricardo de Lima Damásio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas – UNICAMP (fernandalfigueiredo@gmail.com)

---

### ABSTRACT

The second-generation ethanol obtained from the conversion of lignocellulosic biomass to fermentable sugars has been the focus of research, in order to reduce the use of fossil fuels and increase the use of renewable energy. The objective is to make possible the use of both energy from plant biomass and by-products of raw material hydrolysis to produce different chemical blocks. Filamentous fungi stand out in the secretion of homologous and heterologous lignocellulolytic enzymes. Although *Ascomycetes* are widely studied for the secretion of carbohydrate-active enzymes (CAZymes), *Basidiomycetes* are still poor explored even they are known as excellent plant biomass degraders. The role of some CAZymes classes in plant biomass hydrolysis is still unknown, such as the carbohydrate esterases (CE). There are sixteen CE families described and only two enzymes have been characterized in the CE16 family. A proteomics study of *A. nidulans* grown in sugarcane bagasse, carried out by our research group, showed that a CE16 was the most abundant esterase in this secretome and the fifth most abundant protein in general. These results suggest the relevance of CE16 enzymes in plant biomass degradation. In order to analyze the secretion of CEs in *Basidiomycetes* and compare with *Ascomycetes* secretomes (previously reported), the strains *Trametes versicolor* (white rot), *Laetiporus sulphureus* (brown rot) and *Pycnoporus coccineus* (white rot) will be grown on microcrystalline cellulose (Avicel) and pretreated sugarcane bagasse. The main objective is to compare the secretome of these strains to explore new CE16 targets.

**Keywords:** carbohydrate esterases, *Basidiomycetes*; CE16; secretome; filamentous fungi;

**Support:** CAPES; FAPESP.

## Genome features of *Serratia marcescens* UENF 22-GI: a plant growth promoting bacterium isolated from vermicomposted material

Filipe P. Matteoli<sup>1</sup>, Pollyanna S. Lopes<sup>2</sup>, Fábio L. Olivares<sup>2</sup>, Thiago M Venancio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biociências e Biotecnologia – UENF – email: matteolifilipe@gmail.com

<sup>2</sup>Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para a Agricultura – UENF

### ABSTRACT

The ongoing increase in world's population and adoption of intensive farming results in large amounts of organic waste and environmental contamination. In order to mitigate these damages sustainable approaches are being tested worldwide, many of these focused on soil management. In this context vermicomposting is a widely known practice to biologically stabilize green wastes using earthworms to perform waste stabilization. Further, vermicompost has been demonstrated to be a rich source of microbial diversity, notably plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). These bacteria are able to promote plant growth both directly or indirectly. In this work we report the sequencing and analysis of *Serratia marcescens* (strain UENF-22GI) isolated from vermicomposted material. Paired end reads were sequenced in a Illumina HiSeq 2500 platform and assembled using Velvet, resulting in a 5,001,584 Mb assembly with 3,0 Mb N50. By annotating the genome with RAST, we found 4662 genes, 30 pseudogenes, 6 rRNAs, 84 tRNAs. We did a comparative genome analysis and phylogenetics reconstruction using other publicly available *Serratia marcescens* genomes, we also found PGPR genes like ipdC for auxin production, pqqBCDEF for pyrroloquinoline biosynthesis involved in P solubilization, bcs and pga operons which code biofilm proteins, and others genes related to soil survival and fungal competition. As a whole, our results indicate a biotechnological potential of *S. marcescens* in plant growth promoting products and shed light on a complex species formerly known only as human pathogen.

**Keywords:** Genomics, assembly, PGPR

**Support:** CAPES, FAPERJ.

**Evaluation of the anti-bacterial activity of vegetable oil esters  
against *Xanthomonas citri* subsp. *citri***

Gabriela Mendonça Paula<sup>1</sup>, Gabrielle Vieira<sup>1</sup>, Luana Galvão Morão<sup>1</sup>, Henrique Ferreira<sup>1</sup>, Salvador Claro Neto<sup>2</sup>, Daiane Cristina Sass<sup>1</sup>, Antônia Marli dos Santos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo, Brasil. \*e-mail (autor para correspondência): bi1812@hotmail.com

<sup>2</sup>Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

---

**ABSTRACT**

As bacteria of the *Xanthomonas* genus affect important crops in Brazil and the control of the diseases is carried out by practices with negative impacts on the environment and health, alternative treatments for these phytopathogens are needed. Citrus canker, one of the major concerns due to the great economic importance of citrus exports to the country, is a disease caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. The present study aimed to evaluate the inhibitory effect of a mixture of plant esters, provided by Cequil Central de Industrialização e Desenvolvimento de Polímeros, in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. The bacteria were cultivated in Nutrient (N) culture medium at 29°C and 200 rpm overnight for the bioassay. Analysis of the inhibitory action of the esters against the bacteria was performed by the Resazurin Microtiter Assay method (REMA), in concentrations ranging from 3% to 96%. For positive control, kanamycin was used and for negative control culture medium containing *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Growth inhibition was verified through resazurin fluorescence; inhibition with the ester mixture was greater than detected in positive controls, with a mean of 97.7% inhibition at ester concentrations greater than 9%, while the mean of the positive control was 96%. The esters of vegetable oil presented positive and satisfactory results in different applied concentrations.

**Keywords:** Inhibition, *Xanthomonas*, bioassay, esters, citrus.

**Support:** FAPESP

## **Ethanol fermentation of fungal extract by solid-state cultivation of *Trichoderma reesei* from sugarcane bagasse**

Gabriela Chaves da Silveira<sup>1</sup>; Beatriz Silva Campanhol<sup>1</sup>; Hiléia Camargo Ribeiro França<sup>1</sup>; Reinaldo Gaspar Bastos<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).  
\*reinaldo@cca.ufscar.br

---

### **ABSTRACT**

Solid-state cultivation (SSC) may be defined as the microbial growth on solid supports in conditions of absence of free water, i.e., mainly similar to the occurrence of fungi in nature. In this sense, many lignocellulosic materials are used as solid supports and, which when consumed by the microorganisms, lead to the release of part of the organic carbon generally as glucose which could be recovered in a final extract. *Trichoderma reesei* is a fungus with recognized capacity of hydrolytic enzyme production with glucose release, which could be used in fermentation processes. *Saccharomyces cerevisiae* PE-02 is a strain of yeast widely used ethanol fermentation from sugarcane broths in Brazil, precisely because of its stability and resistance to industrial conditions. Thus, the aim of this research was to evaluate the “second generation” ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* PE-02 of fungal extract obtained from SSC of sugarcane bagasse by *Trichoderma reesei*. Fermentative assays were performed in triplicate with 10 mL of fungal extract (culture medium) 100 rpm and 27°C. The glucose consumed was determined by the enzymatic glucose oxidase-peroxidase method, while ethanol produced was determined by gas chromatography. Results indicated 0.22 g L<sup>-1</sup> of ethanol in 48 hours with depletion of glucose, leading near the stoichiometric yield. Thus, it can be suggested that there was no inhibitory component in fungal extract, which indicates advantages of obtaining the “second generation” ethanol when compared to the methods that use acid hydrolysates.

**Keywords:** ethanol fermentation, solid state cultivation, *Trichoderma reesei*, *Saccharomyces cerevisiae*, sugarcane bagasse

**Support:** FAPESP

## Methodological adequacy to evaluate the reaction of common bean cultivars to *Pseudocercospora griseola*

Gabriel Bonfante<sup>1\*</sup>; Caléo Almeida<sup>1</sup>; Bianca Cristina de Deus<sup>2</sup>; Lucas Rossi Lazaretti Novo<sup>1</sup>; Elaine Aparecida de Souza<sup>3</sup>; Alisson Fernando Chiorato<sup>1</sup>; Luciana Lasry Bechimol-Reis<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Instituto Agronômico, Campinas, SP. \*email: gabriel\_janini@hotmail.com

<sup>2</sup> Instituto Biológico, Centro Experimental Central, Campinas, SP.

<sup>3</sup> Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, MG.

---

### ABSTRACT

The angular leaf spot, caused by *Pseudocercospora griseola*, is one of the most important diseases in common bean. This study was carried out aiming to adequate the methodology for selecting resistant genotypes. The experiment was performed in factorial design 2 (cultivars) x 2 (isolated) x 2 (concentrations), with 3 repetitions. The cultivars IAC-Milênio (susceptible) and AND 277 (resistant) were inoculated with the Psg 51 and Psg 99 isolates,  $2 \times 10^4$  and  $4 \times 10^4$  conidia/mL, on the primary leaves, at the end of V2 phenological stage. The severity of the disease was evaluated at 11, 12, 13, 14 and 15 days after inoculation using a diagrammatic scale (1 to 9) that was first used for initial V2 stage, and the area below the disease severity progress curve was calculated (AACPD). It was verified that both genotypes and AACPD was mostly differentiated at the 15<sup>th</sup> day, corroborating with literature reports at initial V2 and/or V3 stages. There was a significant interaction between isolate and cultivar factors, and the AND 277 genotype was the most immune one, while the Psg 51 isolate provided the highest severity scores at the  $4 \times 10^4$  conidia.mL<sup>-1</sup> concentration. This study allowed the adjustment of the evaluation method for angular leaf spot, in common beans, at an the initial V2 phenological phase, with plants less affected by other diseases. Due to the evident parental contrasting feature, this approach may be used with superior efficiency to phenotype the AND 277 x IAC-Milênio F3RC2 mapping population.

**Keywords:** Phytopathometry, Angular leaf spot, Breeding, *Phaseolus vulgaris*, Primary leaves.

**Support:** FAPESP and CNPq/PIBIC.

## **Construction of an ultrasensitive arsenic biosensor through synthetic biology approaches**

Gabriel Lencioni Lovate<sup>1</sup>, Letícia Magalhães Arruda<sup>2</sup>, Lummy Maria Oliveira Monteiro<sup>2</sup>, Luís Czamanski Nora<sup>2</sup>, Rafael Silva-Rocha<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

\*e-mail (for correspondence): silvarochar@gmail.com

---

### **ABSTRACT**

The environmental pollutant arsenite is present in water fountains worldwide. For this reason, cheap methods for its detection are of great interest. Due to its widely distribution, several resistance systems can be found in microorganisms, such as the *arsRBC* chromosomal operon from *Escherichia coli*. The Synthetic Biology approach has the objective to design, build and test genic synthetic circuits using the engineering's rationale for biotechnological and biomedical applications. One of its applications is the construction of whole cell-based biosensors. In this case, a cell reacts to the presence of a substance with the production of a quantifiable signal. Using this approach, the main objective of this work was the construction of an ultrasensitive arsenite biosensor implementing a genic circuit with cascade amplification and dual-reporter scheme. For this, we constructed a circuit divided in two vectors: pSEVA331-*ParsR*::*xylRΔA* and pGLR2-*Pu*. The pSEVA331-*ParsR*::*xylRΔA* (the sensor module) plasmid harbours the *Pars/arsR* system for arsenite detection and leads to the expression of *XylRΔA*, which promotes the transcription of the reporter genes (GFP and *luxCDABE*) in pGLR2-*Pu* (the reporter module). Using conventional molecular biology techniques, pGLR2-*Pu* was built by inserting the *Pu* promoter amplified from *Pseudomonas putida* mt-2 into pGLR2 plasmid. The sensor module is being built into the high-copy number vector pSEVA242, until now the *xylRΔA* regulator from *P. putida* and the *Pars* promoter from *E. coli* were cloned into pSEVA242, obtaining pSEVA242-*Pars*::*xylRΔA*. The circuit built is innovative and must be ultrasensitive, while there is no documented arsenite biosensor with its amplification architecture.

**Keywords:** Synthetic biology, arsenite, biosensor.

**Support:** FAPESP scholarship number 16/11093-8 to Gabriel Lencioni Lovate

## **Growth and stability of immobilized *Desmodesmus subspicatus* in alginate beads for cultivation in vinasse**

Geise Cristina de Jesus<sup>1</sup>; Reinaldo Gaspar Bastos<sup>2</sup>; Mariana Altenhofen da Silva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados, CCA/UFSCar, Araras/SP. Autor para correspondência: geise.crj@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócio Economia Rural

---

### **ABSTRACT**

In biotechnology, immobilized microalgae shows a growing trend, being applied in bioremediation of wastewaters, such as vinasse, aiming the incorporation of nutrients. Advantages of immobilized cells are facilitation of biomass harvesting and possibility to work in continuous systems. *Desmodesmus subspicatus* have been cultivated as free and immobilized cells in wastewater showing high cell viability, tolerance to pH and temperature fluctuations, and similar specific growth rates ( $\mu_{\max}$ ). Alginate beads (AB) have physical characteristics dependent on factors including crosslinking agent (CA) and cell type and concentration. The aim of this study was to develop AB for immobilization of *Desmodesmus subspicatus* and evaluate its growth in vinasse. Sodium alginate (5% w/v) and calcium chloride,  $\text{CaCl}_2$  (2, 5 and 10% w/v) were used as biopolymer and CA, respectively. AB and immobilized microalgae beads (MB) were made by ionotropic gelation. The stability of the beads was evaluated at 25°C for 120h by immersion in sterilized vinasse. Average diameter and force to compression were measured at pre-established intervals. Microalgae was immobilized using 5%  $\text{CaCl}_2$ . AB formed with 2%  $\text{CaCl}_2$  had higher swelling in vinasse compared to other  $\text{CaCl}_2$  concentrations. The use of 5%  $\text{CaCl}_2$  seems to be the most promising result since the beads showed higher mechanical resistance and similar average diameter compared to beads formed with 10%  $\text{CaCl}_2$ . MB showed lower mechanical resistance and average diameter than AB. Immobilized microalgae were able to growth in vinasse with a  $\mu_{\max}$  of 0.017  $\text{h}^{-1}$ , indicating good perspectives to the use of the MB in vinasse.

**Keywords:** Biopolymer, crosslinking agent, microalgae, wastewater.

**Support:** CAPES

## **Trophic and microbiological conditions of an artificial receiving system for aquaculture wastes**

Gislaine Costa de Mendonça<sup>1,2\*</sup>; Lúcia Helena Sipaúba-Tavares<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University of São Paulo State-UNESP, Limnology and Plankton Production Laboratory.

<sup>2</sup> Postgraduate Program in Aquaculture, Aquaculture Center, Postal Code 14884-900, Jaboticabal SP Brazil.

\* Corresponding author: gislaine.fcosta@hotmail.com

---

### **ABSTRACT**

The expansion of aquaculture has transformed aquaculture into an important water pollutant. The excessive accumulation of inorganic nutrients such as nitrogen and phosphorus causes eutrophication and the degradation of water ecosystems. Pathogenic microorganisms from incorporated or excreted wastes may be found in the water and sediments of fish ponds. Current analysis, conducted in a fish pond that receives 65% of effluents from an aquaculture farm, assesses the contamination of total coliforms and the trophic conditions of an artificial receiving system for aquaculture wastes. Fortnightly collections were undertaken during eight months at three different sites (entrance, center with the greatest depth and exit) of the pond. Water was collected from the surface in sterilized flasks and parameters measured on the spot. Concentration rates of inorganic solids were higher than organic ones, with high rates of conductivity and fluctuations similar at all sites. Phosphorus and total nitrogen showed a similar pattern. High densities of total coliforms were reported with a gradual decrease between sites. High rates of nutrients, conductivity and suspended solids at the pond's entrance may have been caused by high organic load, whereas decrease occurs at the center and exit, with the dilution and assimilation of the organic material. However, there were no significant differences ( $p>0.05$ ) between the evaluated sites. Indexes classify the pond as hypereutrophic with high microbiological contamination risks. The above reveals that the system's self-purification capacity is limited and water treatment should be implemented prior to reuse or dejection into the receiving streams.

**Keywords:** water quality; trophic conditions; microbiological contamination; aquaculture wastes.

**Support:** CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

## **Poison and infections food caused by microbial agents**

Igor Vaz dos Santos<sup>1</sup>; Rosana Oliveira Freguglia<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Tecnologia “Deputado Roque Trevisan” – Fatec Piracicaba. \*E-mail: ro\_freguglia@hotmail.com.

<sup>2</sup>Faculdade de Tecnologia “Deputado Roque Trevisan” – Fatec Piracicaba.

---

### **ABSTRACT**

Foods are essential sources of macromolecules responsible for innumerable metabolic functions, which play an important role in sustaining a living organism. However, food may contain undesirable physical, chemical or biological substances, which may represent a risk to public health, a biological risk, presents as the main cause of diseases, the so-called DTA's. In the last decades, the dietary habits have undergone changes and, therefore, strict standards for the control of the quality of the products are required for the agribusiness. Since microbiological safety is a determinant factor for the quality of food products and for public health, this work has the objective, through the bibliographic review, mediated by the formulation of questions of the studio, by the summarization, analysis and interpretation of articles And books, to explain the main pathogenic microorganisms associated with food, *Clostridium botulinum* and *Salmonella enteritidis*, and foods susceptible to their transmission. On the subject of toxinfections and the risk of DTAs, one can point to the severity of food contamination and its effect, either through outbreaks or in isolated cases, and it is observed the need for an awareness by public agencies and related professionals To the area of food on the importance in spreading this knowledge to the population, directly affected by this serious public health problem.

**Keywords:** Foods; Food poisoning; Contamination; *Clostridium botulinum*; *Salmonella enteritidis*.

## Oxygen transfer in heterotrophic cultivation of unicellular and filamentous cyanobacterium from vinasse

Isabely Fernanda Pizarro<sup>1</sup>; Jéssica Cristina Fonte<sup>1</sup>; Reinaldo Gaspar Bastos<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).  
\*reinaldo@cca.ufscar.br

---

### RESUMO

Researches indicate heterotrophic metabolism in some strains of cyanobacteria, allowing their application in the incorporation and consumption of organic molecules and nutrients in wastewater. Some enzymes of the Krebs Cycle are detected with extremely low activities and the metabolism in the dark is linked to the presence of oxygen, and the main route is via pentose phosphate. On the other hand, few studies in the literature evaluate the oxygen consumption by these microorganisms. Thus, the aim of this research was to evaluate of the oxygen transfer and consumption in the cultivation of unicellular cyanobacterium *Aphanocapsa holsatica* and filamentous cyanobacterium *Geitlerinema* sp. in vinasse, which the main wastewater in the sugarcane processing. Two liter volume of the vinasse with adjusted pH (7.6) and C/N ratio (5) was added to the batch bioreactor with on-line monitoring of oxygen and carbon dioxide. Experiments set up 300 mg L<sup>-1</sup> of inoculum, 25°C, aeration 1 VVM and 200 rpm. Results for *Aphanocapsa* indicated the oxygen consumption according to zero order kinetics (non-limiting), with a rate of 0.11 mg L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, as the overall gas-liquid oxygen transfer coefficient (k<sub>LA</sub>) around 0.0126 s<sup>-1</sup>. *Geitlerinema* present higher oxygen rates (1.14 mg L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>), while k<sub>LA</sub> around 0.024 s<sup>-1</sup>. Although the oxygen consumption, the bioreactor provides more oxygen than the demand both of microorganisms, indicating an optimal aeration system and low consumption by cyanobacteria, even in heterotrophic cultivation with medium rich in organic matter such as vinasse.

**Keywords:** cyanobacterium, *Aphanocapsa*, *Geitlerinema*, vinasse, oxygen transfer

**Support:** CNPq

## **Microorganism isolation for enzymatic activity verification as a form of waste industry process**

Jair Rosário do Nascimento Junior<sup>1</sup>; Isabelle Moreira<sup>1</sup>; Francine Valenga<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pontifícia Universidade Católica do Paraná. \*e-mail: junior\_jay18@hotmail.com

---

### **ABSTRACT**

Due to the importance of enzymes in industrial environment and the constant search for new biotechnological production routes, this work aims to isolate microorganisms in order to test their enzymatic potential on biofuels waste. From beet and cabbage rotting vegetables, isolations are being made through the striation method in solid medium, using Agar Nutrient, Agar Saboraud and PDA. In all three of the media it was searched for microorganisms that may produce enzymes such as lipase, protease, cellulase and xanthanase. A more specific media for the possible isolation of bacteria like *Xanthomonas campestris* are being studied. Media for observation of enzymatic activity was prepared using materials containing proper substrate in which the enzymes must act, such as vegetable oils, skimmed-milk powder, carboxymethylcellulose and xanthan gum. Certain types of colonies were isolated, however, mold with a cotton appearance isolated from the beet has been the most promisor because of its intense lipolytic activity. The phosphorescence of its medium when submitted to ultraviolet light proved the presence of lipase in these molds. Some other yeasts colonies were isolated but all of them have shown minimal or none significant enzymatic activity in the specific media that were prepared. It is concluded that it is possible to find microorganisms with commercial potential in natural sources. Besides, it is possible to attempt to use these microorganisms to verify their effectiveness in wastes processing from industry, like crude glycerol resultant from the biodiesel production, thus reducing the environmental impacts caused by the disposal of processing residues.

**Keywords:** Enzymes. Enzymatic Potential. Industry Wastes.

**Support:** Pontifícia Universidade Católica do Paraná

## Use of MALDI-TOF mass spectrometry for bacteria identification present in composting

Jamily de Almeida Nascimento Silva<sup>1\*</sup>; Jéssica Marques Coimbra<sup>1</sup>; Rafael Carvalho Amaral<sup>1</sup>; Hebe Freire<sup>1</sup>; Beatriz Ferreira Carvalho<sup>1</sup>; Leonardo de Figueiredo Vilela<sup>1</sup>; Rosane Freitas Schwan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departament of Biology, Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil. \*rschwan@dbi.ufla.br

---

### ABSTRACT

The correct disposal of solid waste is currently one of the main environmental demands on the planet. Thus, the treatment and final destination of solid waste has become an issue in social and environmental policies. Composting is a simple option for growing amounts treatment of solid waste, corresponding to a natural biological process transforming organic waste into a stable product with a low amount of organic matter, which can be recycled as fertilizer organic agriculture or as a corrective for degraded soils. During this process, several groups of microorganisms act in the transformation of organic compounds. Bacteria have the most important role in composting degradation, degrading some compounds (such as sugars and carbohydrates), being also responsible for the availability of nutrients and nitrogen fixation. Therefore, the objective of the present study was to isolate and identify the bacteria present in organic waste composting samples generated by the University Restaurant of the Federal University of Lavras/MG. Isolation, morphological and biochemical characterization and identification with matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) time-of-flight (TOF) mass spectrometry (MS) of bacteria isolated from composting were performed. From the biochemical tests, it was observed higher occurrence of microorganisms Gram positive (90.3%), catalase positive (75%), oxidase negative (85%), motility positive (90%) and sporulation positive (70%). MALDI-TOF results enable to identify 5 species, *Pseudomonas aeruginosa* ( $1.5 \times 10^4$  CFU/g), *Enterobacter asburiae* ( $6.7 \times 10^3$  CFU/g), *Staphylococcus sciuri* ( $2.3 \times 10^3$  CFU/g), *Acinetobacter pitii* ( $1.7 \times 10^3$  CFU/g) and *Stenotrophomonas maltophilia* ( $1.7 \times 10^3$  CFU/g), with the species *P. aeruginosa* corresponding to approximately 39.5% of the population analyzed in this study.

**Keywords:** solid waste, composting, bacteria, MALDI-TOF

**Support:** CAPES, CNPq, FAPEMIG

## Use of waste coffee processing for carotenoids production

Jéssica Marques Coimbra<sup>1</sup>; Mariana Dias<sup>1</sup>; Marcela Magalhães Melo<sup>1</sup>; Rosane Freitas Schwan<sup>1</sup>; Cristina Ferreira Silva<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras \* cristinafsb@dbi.ufla.br

---

### ABSTRACT

The interest in the biotechnology area to obtain non-vegetable sources of dyes has been growing in recent years, that natural pigments of microbial origin present is promising alternative to other additives. Coffee is the second largest commodity traded in the world and generates during processing and hulling large quantities of by-products such as pulp and husk, which have limited applications such as fertilizers and animal feed. In view of this, the objective of the work was to the use of extracts of pulp and coffee husk as carbon source for the production of carotenoids by *Rhodotorula mucilaginosa* CCMA 0156. The yeast strain used belong the Collection of Culture of Agricultural Microbiology (CCMA/UFLA). Initially, the yeast was reactivated in 1 ml of YEPG medium and incubated at 28°C for 48h. The inoculum, at concentration of 10% (v/v), was transferred to two different fermentation media containing the pulp extract and the coffee husk extract. Carotenoid production was performed in Erlenmeyer containing 300 ml of medium inoculated with  $10^7$  cells/ml and incubated at 28°C at 160 rpm for 5 days in the dark. The total carotenoid production by yeast in pulp extract was 16.36 mg L<sup>-1</sup> and in the husk extract was 21.35 mg L<sup>-1</sup>. Residues from coffee processing are cheap and potential substrates for the production of yeast biomass and accumulation of carotenoids. Further work will be carried out for chemical profiling of the carotenoid obtained.

**Keywords:** *Rhodotorula mucilaginosa*, Pigments, Coffee husk, Coffee pulp.

**Support:** FAPEMIG, CNPq and CAPES.

## Production of extracellular hydrolases and of bioflocculant of *Bacillus thuringiensis*-BDLJ2

Jéssica Gouveia<sup>1</sup>; Amanda Lys Silva<sup>1</sup>; Elane Cristina dos Santos<sup>1</sup>; Everton Martins<sup>1</sup>; Ana Maria López<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biochemistry of Parasitism and Environmental Microbiology (LBPMA), Institute of Chemistry and Biotechnology (IQB), Federal University of Alagoas, Campus A.C. Simões, s/n, CEP 57072-970, Maceió-AL. \*e-mail: amql@iqb.ufal.br

---

### ABSTRACT

The genus *Bacillus* possess varied characteristics, especially its high growth rate and the ability to secrete various products of industrial/commercial interest (enzymes, biosurfactants, bioplastics and bioflocculants). In this work we evaluated the production of extracellular cellulases, proteases and lipases, as well as bioflocculants, by *Bacillus thuringiensis*-BDLJ2. The strain *B. thuringiensis*-BDLJ2 was isolated from soil (Atlantic Forest, Coruripe-AL) and maintained in the bacterioteca from the LBPMA (“Laboratório de Bioquímica do Parasitismo e Microbiologia Ambiental”, UFAL). It was inoculated ( $1 \times 10^8$  cells/mL) and monitored for enzymatic activities and bioflocculant production in the following media, before being incubated (160 rpm, dark, 37 °C, 120h): 1) Cellulase (gL<sup>-1</sup>): CMC 10,0; Peptone 1,0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,0; Urea 1,0; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,5; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,4; Trace-element solution 1mL; 2) Protease (gL<sup>-1</sup>): Glucose, 5,0; Peptone 7,5; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 5,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5,0; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,1; 3) Lipase (gL<sup>-1</sup>): Glucose 10; NaCl 5; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,1; Tween 80 (1:100); 4) Bioflocculant (gL<sup>-1</sup>): Glucose 20,0; Urea, 0,5; Yeast extract 0,5; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,0; NaCl 0,1; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2. Aliquots (4 mL) were collected every 24 h to check the dry biomass, pH and tested activities. As the dry biomass increase significantly along the time, in the different media, a parallel significant production of enzymes and bioflocculant has occurred, just as the cells consume the energy reserves and adapted themselves to the environment. The initial pH 7 has changed during 120 h, remaining within the range of neutrality. The strain *B. thuringiensis* BDLJ2 has potential for the wastewater treatment or in manufactures. More studies are being provided.

**Keyword:** flocculation, hydrolytic enzymes, bacteria

**Sponsor:** “CNPq” and “S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool”

## Rosemary on polymicrobial biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*

Jonatas Rafael de Oliveira<sup>1</sup>, Leandro Wagner Figueira<sup>1\*</sup>; Luciane Dias de Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP). Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT). Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal. Av. Francisco José Longo, 777 – Jardim São Dimas. São José dos Campos/SP. \*e-mail (autor para correspondência): [jroliveira16@hotmail.com](mailto:jroliveira16@hotmail.com)

---

### ABSTRACT

Rosemary comes from Mediterranean region, however, can be found all over the globe. This plant presents several biological activities, such as antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant. The present study evaluated the action of rosemary extract on polymicrobial biofilm composed by *C. albicans* and *S. mutans*. For this end, suspensions of *C. albicans* (ATCC 18804) and *S. mutans* (35688) were prepared in saline solution (0.9% NaCl) at  $10^7$  CFU/mL (colony-forming units per milliliter). In a microtiter plate, it was added 100  $\mu$ L/well of each suspension and the biofilm was formed for 48 h under agitation (75 rpm). Posteriorly, there was exposure for 5 min to rosemary extract (200 mg/mL) or to saline (0.9% NaCl), with n = 10/group. The antibiofilm activity this extract was analyzed by colorimetric test with MTT solution (0.5 mg/mL PBS). After 1 h of incubation, the microplate was taken to the microplate spectrophotometer (570 nm) and the data were statistically analyzed by T-Test ( $P \leq 0.05$ ). The viability of polymicrobial biofilm was reduced to  $48 \pm 14\%$  after treatment. Thus, it can be concluded that the rosemary extract presented an antimicrobial effect with effective reduction of polymicrobial biofilm formed by *C. albicans* and *S. mutans*.

**Keywords:** Antibiofilm activity; Mixed biofilms; Plant extract.

## Electrolytic Treatment of a Simulated Textile Effluent and Toxicology Bioassay with *Saccharomyces cerevisiae*

José Rubens Moraes Júnior<sup>1\*</sup>; Ederio Dino Bidoia<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UNESP – São Paulo State University, Department of Biochemistry and Microbiology, IB, 24 A avenue, 1515 - Bela Vista, Rio Claro - SP, Brazil. \*jrubensmjr@yahoo.com.br

---

### ABSTRACT

The textile industry discharges large amounts of colored effluent in water bodies during its dyeing processes. Those effluents can cause environmental problems which can lead to death of the aquatic life. The electrolytic process has been presenting as an alternative to degrade color of textile effluents. The aim of this study was to degrade, by an electrolytic process, the color of a synthetic textile effluent containing Acid Red 151 dye and verify its toxicity with a *Saccharomyces cerevisiae* bioassay. The synthetic effluent was prepared using sodium chloride, sodium carbonate, and the textile dye in deionized water. The electrolytic process consisted on passing the synthetic effluent through a commercial electrolytic cell. Samples were collected at 0, 3, 5, 15, 30 and 40 minutes. Sample were submitted to a spectrophotometric analysis to verify the discoloration. Sodium thiosulfate was added to neutralize residual chlorine generated during the process. A suspension of *S. cerevisiae* cells was prepared by diluting commercial tablets in deionized water. It was added 1 ml of the suspension in 9 mL of each sample and incubated for 72 hours at  $28 \pm 0.1$  °C. Samples were then colored with erythrosine and dead cells were counted in a Neubauer chamber. The electrolytic process presented high discoloring of the textile effluent and, within 15 minutes of treatment, no initial color was detected. The bioassay with *S. cerevisiae* presented low toxicity for the entire treatment. It was concluded that this electrolytic treatment is viable in degrading color and do not increase toxicity.

**Keywords:** Advanced Oxidative Processes. Ecotoxicology. Wastewater. Textile Dye.

**Support:** The support of CAPES and CNPq is greatly acknowledged.

## Fermentative parameters in *Saccharomyces cerevisiae*

José Machado da Silva Neto<sup>1\*</sup>; Margareth Batistote<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UFSCar/CCA, 13600-000, Araras – SP. \*e-mail: netomach@outlook.com

<sup>2</sup>UEMS, 79804-970, Dourados – MS.

---

### ABSTRACT

Brazilian power plants use *Saccharomyces cerevisiae* strain as fermentation agents. During the process there are innumerable hostile conditions to which they are subjected. Sugarcane ethanol stands out as a renewable biofuel of reference and Brazil is the second largest producer. The Production involves a complex system where yeast plays an important role and sugarcane broth is used for efficient conversion of its substrates into ethanol. The objective of this study was to evaluate the fermentative performance of industrial yeasts cultivated in sugarcane broth, as well as fermentation parameters, biomass, viability and concentration and ethanol. The strain used were Pedra-2 and Catanduva-1. For cell growth, the microorganisms were inoculated, and 0.10g of lyophilized yeasts in 2% YPD medium and incubated at 30°C for 24 hours. The obtained biomass was used for the fermentation experiment based on sugarcane juice at 18° Brix concentration and incubated at 30°C, at different intervals of aliquots were withdrawn for the analysis of the biomass by spectrophotometer, cell viability by counting in chamber of Neubauer under optical microscope and ethanol by gas chromatography. The data show that the Pedra-2 strain obtained a higher biomass production of 7.3mg/mL, a viability of 75% and a higher ethanol production of 3.56(v/v) than Catanduva-1. Therefore, the Pedra-2 strain presented the best yield.

**Keywords:** yeast, fermentation, sugarcane.

**Support:** UEMS/FUNDECT

## Biological treatment with microorganisms to reduce phytotoxicity of agroindustrial wastewater

Josiane Ferreira Pires<sup>1\*</sup>; Rosane Freitas Schwan<sup>2</sup>; Cristina Ferreira Silva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Federal University of Lavras. \*josibio07@posgrad.ufla.br (autor para correspondência):

---

### ABSTRACT

Several compounds found in wastewater from coffee fruit processing (WP), such as phenolic compounds, may have a toxic effect on plants. Use of biological treatment with microorganisms, prior to disposal, reduce the concentration of these compounds and consequently decrease the phytotoxicity of the effluent. In this sense, the aim of this work was to promote the biological treatment of WP with bacteria and to evaluate the reduction of phytotoxicity of the effluent. The bacteria *Serratia marcescens*, *Corynebacterium flavescent* and *Acetobacter indonesiensis* were used in mixed inoculum for the biological treatment of two wastewaters from the Brazilian Cerrado (WPc) and Atlantic Forest (WPaf). After 6 days of incubation, the phytotoxicity of the two different WP was evaluated on *Allium cepa* (onion) seeds. Five concentrations of fresh and spent WP (12.5, 25, 50, 75 and 100%) plus distilled water (as control) were used. The relationship between WP and control was used to calculate the relative germination roots (RG), root length (RL) and germination index (GI). There was germination of the seeds in all analyzed samples and RG, RL and GI presented an inverse correlation with the WP concentration. It was observed reduction in the toxic effect of the seeds exposed to both spent WP and the highest phytotoxicity occurred in seeds exposed to fresh WPaf, where the RL showed between 31 and 82%, the RL presented values between 14 and 62% and the GI ranged from 4 to 51%. We conclude that biological treatment with mixed bacterial inoculum was able to reduce the phytotoxicity of WP.

**Keywords:** Bacteria, Mixed inoculum, Effluent, *Allium cepa*, Coffee.

**Support:** Capes, CNPq e Fapemig.

## Production and studies of blended enzymatic cocktails for sugarcane bagasse saccharification

Josiane Aniele Scarpassa<sup>1\*</sup>; Eleni Gomes<sup>2</sup>; Roberto da Silva<sup>2</sup>; Izabel Zaparoli Rosa<sup>2</sup>; Amanda Silva de Souza<sup>1</sup>; Felipe Cardoso Ramos<sup>1</sup>; Maísa Lopes Apolinário<sup>1</sup> Ricardo Rodrigues de Melo<sup>1</sup>; Claudia Maria de Souza<sup>1</sup>; Roberto Ruller<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory (CTBE), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Zip Code 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil. \*e-mail: josiane.scarpassa@bioetanol.org.br

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP/ IBILCE)

---

### ABSTRACT

The development low-cost enzymatic cocktails, with a high-performance for saccharification of lignocellulosic materials to bioethanol production have a great importance for bioeconomy. Enzymatic cocktail of fungi (*Thermoascus aurantiacus*, *Trichoderma reesei* and two *Ransamsonia* sp species) were produced through solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SMF) and then evaluated by hydrolysis of "in natura" sugarcane. We used the same substrate (wheat bran, corn straw, and sugar cane bagasse) for both SSF and SMF during ten days for enzyme productions. In the next, the total protein concentration and enzymatic activity of Xylanase,  $\beta$ -glucosidase, CMCase,  $\beta$ -xylosidase were quantified. To evaluation of blended enzymatic cocktails, the enzymatic extracts obtained were combined in different proportions for hydrolysis of lignocellulose materials (with 5% of solids content) at 60°C for 24 hours. The enzymatic activity and saccharification assays were evaluated utilizing the quantification of total reducing sugar released by the colorimetric test. The individual samples cocktails and combination of enzymatic extracts obtained by SSF shown a increased sugar release than enzymatic cocktail using SMF. The individual enzymatic cocktail of *T. aurantiacus* showed a better hydrolysis efficiency of both SSF and SMF protocols. In addition, *T. aurantiacus* enzymatic cocktail enhanced the synergic together others fungus extracts evaluated. Our preliminary results evidence a potential of enzymatic cocktail of the *T. aurantiacus* for composition of a blending of thermostable enzymes. In the next steps, we will assess the combination of the thermophilic cocktails using another pretreated biomasses challenging new applications for the improvement of saccharification bioprocesses of lignocellulosic materials.

**Keywords:** filamentous fungi, thermophilic cocktail *Thermoascus*, enzymatic extracts, hydrolysis.

**Support:** CAPES e CNPEM.

## **Cultivation of fungus *Pleurotus ostreatus* (shimeji) in term hydrolyzed sugarcane bagasse**

Júlia Taíssa M. Gandolphi<sup>1</sup>; Dejanira de F. Angelis<sup>2</sup>; Octavio Antônio Valsechi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de São Carlos [\\*juh.ta@hotmail.com](mailto:*juh.ta@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

---

### **ABSTRACT**

Bagasse is a co-product of sugarcane used for energy generation, as industrial feedstock and as forage in bovine food, rich in polysaccharides as cellulose, hemicellulose and lignin. This composition makes this presents a low digestibility, causing injuries to the digestive tract of the animal, besides being poor in proteins, vitamins and minerals. An alternative to circumvent this situation is a fungal (*Pleurotus ostreatus*) treatment, since it produces enzymes capable of degrading lignocellulosic compounds and promotes a significant increase in protein content. This study aimed to quantify crude protein in bagasse by Kjeldahl method, in several treatment stages, establishing the optimal point for this treatment. Tests were performed with term exploded sugarcane bagasse without treatment, and 1% yeast extract enriched bagasse added of 4% *Pleurotus ostreatus* inoculum. The untreated bagasse presented about 1.029% of protein, whereas the bagasse with 3 days of incubation presented 1.989%, the 5 days incubation 4.271%, 7 days 4.635% and 10 days 5.237%. Based on the obtained data, it was concluded that after 10 days of incubation the bagasse presents, on average, 5.4% of protein, which is the optimal of the treatment.

**keywords:** Co-product, lignin, crude protein.

**Determination of the Minimum Inhibitory Concentration of compounds belonging to the class N-acylidrazones and their respective Silver(I) complexes against *Mycobacterium tuberculosis*.**

Júlia Araújo Grecco<sup>1</sup>; Camila Maringolo Ribeiro<sup>1</sup>; Paulo Victor Pinto dos Santos<sup>2</sup>; Alexandre Cuin<sup>2</sup>; Fernando Rogério Pavan<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”.  
\*(fernandopavan@fcfar.unesp.br).

<sup>2</sup> Universidade Federal de Juiz de Fora - Departamento de Química.

---

**ABSTRACT**

Overall, the tuberculosis mortality rate decreased by 47% between 1990 and 2015, however, it is estimated that there were 1.4 million tuberculosis deaths in 2015. This means that even with a declining mortality rate over the years, it is still considered one of the top ten causes of death worldwide, and an important factor contributing to this position is the appearance of drug-resistant bacteria. Aiming for new compounds with potential to be used in the treatment of the disease, the objective of this work was to evaluate the in vitro activity of the salizid, o-vanizid, m-vanizid and p-vanizid ligands belonging to the class of N-acylhydrazones derived from natural aldehydes and isoniazid, and their respective Silver (I) against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294). Minimum Inhibitory Concentration (MIC<sub>90</sub>) was determined by the Rezasurin Microtiter Analysis Method (REMA), without microdilution qualification in 96-well plates and residue as a revealing of cell viability obtaining, as a final result, lower concentration of the compound capable of inhibiting 90% of growth. The experiments were performed in biological triplicate and MIC<sub>90</sub> values of the eight compounds tested showed activity at concentrations lower than 0.581 µg / mL. Considering that MIC<sub>90</sub> values below 10 µg / mL are promising, the assays were tested with excellent anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity, with drug behaviors employed in the therapy, which were used as control of the experiment. Thus this class of compounds appears to be promising as potential antituberculosis drugs.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, new antibiotics, Minimum Inhibitory Concentration.

**Support:** FAPESP (2013/14957-5)

## **Evaluation of the structure and antibiotic activity of fluorophore-labeled mastoparan Polybia-MPII**

Kenny Umino Sato<sup>1\*</sup>; Bibiana Monson de Souza<sup>1</sup>; Mario Sergio Palma<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UNESP – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. \*e-mail: kennysato@gmail.com

---

### **Abstract**

Wasp venoms have important pharmacological and immunological operations during poisonings. The venom is a complex mixture of different compounds, wherein the mastoparans comprise the most abundant components within the peptide group. Mast cell degranulation is the main biological activity of mastoparans. However, the mastoparan Polybia-MPII, isolated from the venom of the tropical wasp *Polybia paulista*, presents an important antibiotic activity. It is very interesting to development of new antibiotics. Besides, it is necessary to investigate the mode of action of this mastoparan on the bacteria cell. Thus, a cysteine residue was inserted on the C-terminal of Polybia-MPII primary sequence. This insertion permits the fluorophore (Alexa Fluor 488) couple, which permits the monitoring of labeled peptide inside the bacteria cell using fluorescent microscope technique. The structural modification altered some characteristics of this mastoparan like the increase of 58.34% of  $\alpha$ -helix content in water, 25.37% in trifluoroacetic acid (TFE) and 10.6% in sodium dodecyl sulfate (SDS). in the same way, it causes an increase in the  $\beta$ -sheet structure in 20.51% in water, 81.71% in TFE and 33.33% in SDS. However, the loop structure has a big difference in TFE of 68.75% higher in Polybia-MPII than in C-Polybia-MPII. These results can explain the drastic decrease of the antibiotic activity of the modified peptide mainly in the Gram-negative bacteria. In this moment, we are studding another mechanism to label this interesting mastoparan that does not alter drastically its original antibiotic activity.

**Keywords:** circular dichroism; *Polybia paulista*; wasp venom; mass spectrometer; HPLC; chemical synthesis of peptide.

**Support:** Cnpq - PIBIC

## Use of MALDI-TOF for wastewater fungi identification

Larissa de Souza Cardoso<sup>1</sup>; Josiane Ferreira Pires<sup>1</sup>; Cristina Ferreira Silva<sup>1</sup>;

<sup>1</sup>Federal University of Lavras. \*larissaengambienta94@gmail.com

---

### ABSTRACT

Wastewater from coffee processing (WP) has great polluting potential and should receive treatment before disposal. Therefore, the identification of filamentous fungi of the effluent, is essential for the knowledge of the microbiota and its potential use in the biological treatment. The MALDI-TOF technique can be used to identify microorganisms through protein analysis. The aim of this work was to evaluate the use of the MALDI-TOF technique for proteomic characterization and identification of filamentous fungi. For analysis in MALDI-TOF, 21 filamentous fungi were cultured on BDA agar for 3 days and a fraction of hyphae and spores were transferred to microtubes with distilled water. The preparation of samples for species identification was performed using the standardized methodology, using ethanol, 70% organic acid and 100% acetonitrile. Spectra were obtained and spectral proximity dendograms among the isolates were created by the Microflex mass spectrometer (BrukerDaltonics). The 21 analyzed filamentous fungi were grouped into 3 large groups (A, B, C), according to the genus, being possible to identify to the species 50% of the isolates. In group A composed of 11 isolates, 3 were identified as *Geotrichum silvicola* and 2 as *Geotrichum candidum*. Among the 8 isolates of group B, 7 were identified as *Fusarium oxysporum*. And in group C, only *Alternaria alternata* was identified. The MALDI-TOF technique proved to be an efficient tool for the clustering and identification of the filamentous fungi present in the WP.

**Keywords:** Fungi; Polluting; Treatment; Protein; Methodology.

**Support:** CNPq; FAPEMIG; CAPES.

**Effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract on polymicrobial biofilm of *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis***

Leandro Wagner Figueira<sup>1</sup>\*; Jonatas Rafael de Oliveira<sup>1</sup>; Luciane Dias de Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP). Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT). Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal. Av. Francisco José Longo, 777 – Jardim São Dimas. São José dos Campos/SP. \*e-mail (autor para correspondência): [leandrowf@live.com](mailto:leandrowf@live.com)

---

**ABSTRACT**

Rosemary is a medicinal plant originated from Mediterranean, which currently can be found and cultivated in all the continents. Some of its properties were considered such as antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial. The aim of this study was to evaluate the effect of rosemary extract on polymicrobial biofilm of *C. albicans* and *E. faecalis*. For this, reference strains ATCC 18804 (*C. albicans*) and ATCC 4083 (*E. faecalis*) were used. Suspensions of each microorganism were adjusted to  $10^7$  CFU/mL (colony forming units per milliliter) and were added in microtiter plate (100  $\mu$ L/well/suspension). The biofilm was formed during 48 h and exposed for 5 min to rosemary extract (200 mg/mL) or 0.9% NaCl solution, being  $n = 10$ /group. To verify the antibiofilm effect of the extract was used colorimetric test with MTT solution (0.5 mg/mL PBS) which was incubated for 1 h on the biofilm after the treatments. The data obtained in microplate spectrophotometer (570 nm) were statistically analyzed by T-Test ( $P \leq 0.05$ ). Exposure to rosemary extract provided a significant reduction of  $58 \pm 8\%$  in the polymicrobial biofilm viability. Thus, it can be concluded that the rosemary extract presented antimicrobial effect with effective reduction of polymicrobial biofilm composed by *C. albicans* and *E. faecalis*.

**Keywords:** *Rosmarinus officinalis*; rosemary; Biofilm; *Candida albicans*; *Enterococcus faecalis*.

## Xylanase production by *Rhizoctonia solani* AG-1 IA isolated from bracharya, soybean and rice crop

Letícia Louzada Ferreira<sup>1\*</sup>; Sirlene do Nascimento Senna<sup>1</sup>; Paulo Cézar Ceresini<sup>2</sup>; Heloiza Ferreira Alves do Prado<sup>2</sup>

<sup>1</sup> UNESP, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Campus de São José do Rio Preto.  
\*leticialouzadaf@gmail.com

<sup>2</sup> UNESP, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Ilha Solteira.

---

### ABSTRACT

Microorganisms produce hemicellulolytic and cellulolytic enzymes complex that are involved in cell wall degradation, including xylanases. These enzymes may be related to the mechanism of pathogenicity, and therefore have been widely studied. The fungi *Rhizoctonia solani* AG-1 IA is considered a pathogen of cultures of global importance. The objective of the present study is to evaluate the production of xylanase by *R. solani* isolated from rice, brachiaria and soybean crops. Twenty isolates of brachiaria, rice and soybean crops from different Brazilian states were evaluated, on solid-state cultivation using wheat bran as a substrate and were incubated at 25 °C for a period of 96 hours. Extracellular xylanase production was determined by DNS method, and the isolates potential to xylanolytic enzyme was evaluated. The analyses were done in triplicate and the statistical analysis was done by means of a variance analysis using the SISVAR program, through the Scott-Knott test among the means. Among the isolates evaluated, the best results for xylanase production were of the isolates RR\_A41 and RR\_A24 with values of enzymatic activity of 17,40 U g<sup>-1</sup>, MT\_S085 with 17,60 U g<sup>-1</sup> and MTAFUB03-1 with activity value of 18,47 U g<sup>-1</sup>, after ninety-six hours of solid-state cultivation. The studied strains presented effectiveness in the production of the enzyme of interest. The isolates of *R. solani* with brachiaria, rice and soybean crops demonstrated potential in xylanolytic production, being that the rice isolates presented higher enzymatic production than the isolates of the soybean and brachiaria cultures.

**Keywords:** Phytopathogenic fungus, microbial enzymes, solid state cultivation, production.

**Support:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

## **Biotic and abiotic assessment of a wetland in a frog pond effluent**

Lorena Regina da Silva Peres<sup>1</sup>\*; Lúcia Helena Sipáuba Tavares<sup>1</sup>;

<sup>1</sup>Univ. Estadual Paulista/Centro de Aquicultura, Jaboticabal, SP, 14884-900, Brazil.

\*e-mail: lorennaperess@hotmail.com

---

Growth systems of aquatic organisms require rich diets in nutrients which provide organic and inorganic compounds that may produce eutrophication. Limnological conditions, thermotolerant coliforms and removal efficiency from a wetland with *Eichhornia crassipes* are assessed. The wetland lies in the effluent of a frog pond on an aquaculture farm. Water collection was retrieved weekly during 90 days at different sampling sites: boxes with macrophytes; entrance and exit of the wetland. Mean rates of total coliforms were 479 NMP.100mL at the entrance and 92.3 NMP.100mL at the wetland exit, with highest rates during the rainy period when temperature are highest. There was a decrease in BOD/COD at the exit respectively with 63 and 59 mg/L<sup>-1</sup>. The highest rates of parameters occurred at the entrance and were related to the availability of organic solids. Mean pH rate was 7.1 at the entrance of the wetland, whilst the variables conductivity, STS and STD decreased gradually. Dissolved oxygen rates throughout the wetland were lower than 3.84 mg/L<sup>-1</sup> at the exit. The system proved to have the best conditions to remove ammonia nitrogen and phosphorus. Efficiency of the wetland with the aquatic plant *E. crassipes* was good for decreasing organic and inorganic compounds from the frog culture pond on the analyzed aquaculture farm.

**Keywords:** thermotolerant coliforms; environmental management; limnological aspects; microbiological aspects.

**Support:** Bolsa de mestrado concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

## Filamentous fungi diversity in Syrah grapes variety from Jequitinhonha Valley

Lorena Dutra Silva<sup>1\*</sup>; Elaine Andrade de Paulo<sup>1</sup>; Michelle Ferreira Terra<sup>1</sup>; Sirlei Cristina de Souza<sup>1</sup>; Nathasha de Azevedo Lira<sup>1</sup>; Michele de Oliveira Aragão<sup>1</sup>; Anielli Souza Pereira<sup>1</sup>; Cláudio Márcio Pereira de Souza<sup>2</sup>; Luís Roberto Batista<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal University of Lavras - UFLA. Department of Food Science. \*dutraslorena@gmail.com.

<sup>2</sup> Federal University of Jequitinhonha and Mucuri Valleys - UFVJM. Department of Agronomy.

In the region of the Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, winemaking has recently began with prospects for promoting wine tourism. Different fungi genera are commonly found in grapes, the main ones being *Botrytis*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* and *Penicillium*. Some filamentous fungi are a matter of concern for producing mycotoxins that are not eliminated in the process of wine production, being the genera *Aspergillus* the major producer of ocratoxin A (OTA) in grapes. Therefore, this study aimed to analyze the diversity of isolated fungi from Syrah grapes grown in Diamantina. To this purpose, samples were collected at three equidistant points from the winery, in July 2016, and were submitted to serial dilution followed by plating in DRBC and DG 18 media for fungi isolation. After 7 days, the isolates were purified and inoculated in specific media used for identification according to taxonomic keys. Also, the study evaluated the production of mycotoxins by thin layer chromatography method (TLC) in part of the isolates. The test results reported the presence of *Aspergillus niger*, *A. niger aggregate*, *A. flavus* and *A. ochraceus*, *Penicillium sclerotiorum* and *P. glabrum*, and complex formed by *Cladosporium cladosporioides*, *Alternaria* sp and *Eupenicillium* sp. So far, some of the isolates analyzed did not reveal toxicogenic potential. Despite the absence of mycotoxin production, the presence of these species in the vineyard shows the importance of good management and the adoption of good agricultural practices in grape processing, in order to reduce the risk of having mycotoxins in the final product.

**Keywords:** *Aspergillus*, mycotoxin, wine.

**Support:** CAPES, CNPq, FAPEMIG and Winemakers.

## Production of fungal $\beta$ -1,3-glucanase using vinasse

Luana do Amaral Bovi<sup>1\*</sup>; Bruna Letícia Martins<sup>2</sup>; Cynthia Barbosa Rustiguel<sup>3</sup>; Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade do Sagrado Coração - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PRPPG), Centro da Saúde, Biomedicina, Bauru/SP. \*e-mail: luana\_amaral96@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade do Sagrado Coração - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PRPPG), Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental, Bauru/SP.

<sup>3</sup>Department of Biology, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP/SP.

---

### ABSTRACT

Growing world-wide generation of agro-industrial residues brings the concern to develop techniques that make possible to reuse it, which make the application of these remainders in fermentative processes for acquirement of enzymes a huge biotechnological progress, including sustainable and low cost features, mostly, if we consider the necessary investments for enzymes production as  $\beta$ -glucanases, for example. The aim of this study was to produce  $\beta$ -1,3-glucanase using the fungus *Aspergillus niger* and vinasse. The enzyme was obtained through submerged liquid fermentation in shaker, using vinasse originating from a sugar cane industry from São Paulo, in decreasing of the culture medium; the conditions of the production are described in literature. The residue was added to the medium in the concentrations: 2%, 14%, 42%, 70% e 82% and the period of production was realized in 2, 4, 8, 12 e 14 days; the results were analyzed by factorial design. It was observed that range of variables that has induced the best enzyme activity were in concentrations of vinasse among 2% and 42% and the period of production among 8 and 14 days. After these results were valid, it was noted that the use of vinasse at 14% when the production was realized for 12 days showed the best conditions to *A. niger* for secretion of  $\beta$ -1,3-glucanase, demonstrated by specific activity equal to 6,85 U/mg. In summary, this residue was able to promote the secretion of the enzyme with considerable specific activity when used in low concentrations and in long periods of production.

**Keywords:** *Aspergillus niger*, industrial waste, optimization.

**Support:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

## Maintaining *Escovopsis* cultures in three preservation methods

Luciana Simão Carneiro<sup>1\*</sup>, Lorena Tigre Lacerda<sup>1</sup>, André Rodrigues<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica e Microbiologia, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP.  
\*e-mail: lu.lsc.luci@gmail.com

---

### ABSTRACT

The genus *Escovopsis* are considered specialized parasites of the symbiotic fungus cultivated by attine ants. Long-term preservation of *Escovopsis* is important for future systematic and applied studies, however, this fungus proved to be reluctant to ordinary preservation methods. Here, we evaluated the efficiency of three methods for *Escovopsis* preservation: Castellani, Cryopreservation (-80 °C) and Silica-gel. A total of 16 *Escovopsis* strains from the collection maintained at the UNESP-Microbial Resource Center were used in this study. These strains show different spore colors and most likely represent undescribed species. We analyzed the mycelial growth, spore viability and morphological characters over four months of preservation. Ten strains sustained faster growth rates (5.4 mm<sup>2</sup> day<sup>-1</sup> in average) and higher spore viabilities (18% in average) in Cryopreservation after four months in comparison to the other methods. This method was effective for brown and yellow-spored strains, which produce colonies with abundant spores compared to the pink-spored strains. In general, the Silica-gel presented better results over Castellani, since all strains preserved in the latter method sustained low spore viabilities (12% in average). However, three strains (pink and white-spored) improved their growth rates after preservation under this technique. Considering all methods, we observed that the longer the preservation time, the lower the spore germination rate. Strains with low germination rates had reduced colony growth compared to the controls. Overall, *Escovopsis* strains responded differently to the preservation methods, but cryopreservation had the best performance. Monitoring of *Escovopsis* strains will continue to check strain survival rates in long-term preservation.

**Keywords:** culture collection, long-term storage, fungi

**Support:** CNPq

## Antifungal potential of compounds produced by actinobacteria

Luís Claudio Martins<sup>1</sup>; Gislaine Vicente dos Reis<sup>1</sup>; Simone Possidente de Lira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Exact Sciences. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP). \*e-mail: luis.claudio.martins@usp.br

---

### ABSTRACT

Diseases are one of the main causes responsible for limiting the yield of agricultural crops. Anthracnose affects several cultures, including guarana, and the causative agent is the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. Thus, the present work aimed to isolate antifungal compounds produced by actinobacterias against *C. gloeosporioides*. So, *Streptomyces* sp. AM3 was grown in BD medium at 150 rpm and 28 °C for 11 days. After culturing, the metabolite medium was partitioned with ethyl acetate. The ethyl acetate fraction was subjected to column chromatography with silica gel stationary phase and mobile phase in gradient of dichloromethane, ethyl acetate and methanol. All chromatographic steps were monitored in bioassays to antifungal activity by the paper disc diffusion method. Percent inhibition was calculated using the ImageJ program. The acetate fraction (A3), which presented activity of 78.34%, was subjected to further chromatographic separation under same conditions. Among the 8 fractions obtained, the fraction A3a presented the percentage of inhibition of 50.93%. In the second separation using the same stationary phase and the same mobile phase as the previous one, nine fractions were obtained, and the fraction A3a3 inhibited in 16.90% the pathogen. The final purification was performed in HPLC, with 3 fractions obtained. The fraction A3a3b with retention time in 11.1 min showed an inhibitory percentage of 50.50%. In this study, it was presented the antifungal activity of a compound produced by *Streptomyces* sp. AM3 in the control of *C. gloeosporioides*. At present, spectroscopic techniques are being employed for structural elucidation of this compound.

**Keywords:** antagonistic activity, bioactive compounds, secondary metabolites and anthracnose.

**Support:** FAPESP Regular Project 2014/1576-3, FAPESP Thematic 2013/50228-8.

## **Obtention of Fuji apple cutin and qualitative screening for filamentous fungi cutinase producers**

**Lusiane Malafatti Picca<sup>1</sup>; Dejanira de Franceschi de Angelis<sup>1</sup>; Derlene Attili de Angelis<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Instituição. Center for Environmental Studies, UNESP - Univ Estadual Paulista, 24-A Av., 1515, 13506-900, Rio Claro-SP, Brazil.

\*e-mail (autor para correspondência): lusianepicca@gmail.com

<sup>2</sup>Instituição. Division of Microbial Resources, CPQBA – Univ Estadual de Campinas, Alexandre Cazellato Street, 999, 13148-218, Paulínia-SP, Brazil.

---

### **RESUMO**

Aerial parts of the plants are covered by protection layer called cuticle, which has an insoluble biopolyester, the cutin, a polyester composed of hydroxy and epoxy fatty acids. The fatty acids of cutin are composed by C<sub>16</sub> and C<sub>18</sub> and contain one to three hydroxyl groups. Many fungi have been reported to produce cutin-degrading enzymes, cutinases that are hydrolytic enzymes produced mainly by pathogenic plant fungi. Cutinases catalyse hydrolysis and synthetic reactions and have potential use in food, pharmaceutical and oleochemical industries. The objective of this study was to perform a qualitative screening in plate for fungi cutinase producers. For this, cutin was extracted from Fuji apples peels purchased at the local market in Soxhlet extractor with chloroform and added to the Czapek Dox culture medium, as the sole source of carbon at the concentration of 0.2%, supplemented with phenolred 0.05%. Twenty-one filamentous fungi strains were tested of the genera: *Penicillium* sp (6); *Microsphaeropsis* sp (3); *Curvularia* sp (3); *Trichoderma* sp (3); *Fusarium* sp (2); *Pycnidiphora* sp (2); *Mucor* sp and *Aspergillus* sp (one for each). For the results, the fungi that presented growth and formation of yellow halo would be cutinase producers. Six fungi were able to produce cutinase: *Penicillium* sp (2); *Microsphaeropsis* sp (2); *Fusarium* sp (1) and *Pycnidiphora* sp (1). Data reported consider some species of these genera as pathogenic (*Penicillium* and *Fusarium*) or endophytic, whose infection plant are latent or asymptomatic (*Microsphaeropsis* and *Pycnidiphora*), which justifies the results obtained.

**Keywords:** cutin, fruit, hydrolases, fungi, screening.

**Support:** Capes for the grant.

## Bioprospecting of thermophilic fungi and producing enzymes for saccharification of lignocellulosic biomass

Máisa Lopes Apolinário<sup>1\*</sup>; Josiane Scarpassa<sup>1</sup>; Roberto Ruller<sup>1</sup>

<sup>1</sup> National Laboratory of Science and Technology of Bioethanol - National Center for Research in Energy and Materials, Campinas. \*e-mail: maisa.l.a@hotmail.com

---

### ABSTRACT

Faced with the decline of oil reserves, environmental problems associated with its extensive use, and political and economic impasses related to the control of this resource, researchers around the world have been searching for alternatives that provide energy security and sustainability. Second generation bioethanol, obtained from cane bagasse biomass sugars, presents energy, economic and environmental advantages, being considered one of the most promising alternatives to fossil fuels. In view of the need to improve the enzymatic hydrolysis step to facilitate the commercialization of cellulosic ethanol, this work proposes to search in nature thermophilic fungi capable of producing enzymes effective for hydrolysis of lignocellulosic material, such as sugarcane. Thus, samples of soil and sugarcane bagasse in natura at different points of the campus were collected and subjected to selection by culture at 50 °C in media with different carbon sources (glucose, carboxymethylcellulose, celufloc and bagasse in natura). By the red congo test, the best hydrolyzed carboxymethyl cellulose (CMC) were determined, and were directed to a liquid fermentation. The enzymatic extract (thermophilic cocktail) produced by each of the isolated fungi had determined the activities of avicellase, CMCase, FPase, HMCase and xyloglucanase. Thus, of the 36 isolates, 17 were fermented and of these the 5 that presented value of enzymatic and protein activity were identified by sequencing of the ITS region. The ITS DNA sequences of the obtained isolates were analyzed in database (nBLAST), being classified as the thermophilic fungi *Thermoascus aurantiacus* var. *Levisporus* and *Rasamsonia emersonii*.

**Keywords:** Cellulosic Ethanol, *Thermoascus aurantiacus*, *Rasamsonia emersonii*, Enzymatic hydrolysis.

**Support:** CNPEM and CNPq/PIBIC.

## **Microorganisms isolated from solid residue of olive oil production**

**Marcela Magalhães Melo<sup>1\*</sup>; Jéssica Marques Coimbra<sup>1</sup>; Cristina Ferreira Silva e Batista<sup>1</sup>; Rosane Freitas Schwan<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>University Federal of Lavras - UFLA \*e-mail (marcela\_nelo0@yahoo.com.br):

---

### **ABSTRACT**

During the processing of olive oil different types of waste are produced, olive pomace, olive mill wastewater and solid residue or alperujo, which are produced in large quantities. Of these, the solid residue is generated in the proportion from 800 to 950 kg of residue for each 1000 kg of olives used in the extraction of olive oil. These residues are rich in phenolic compounds and organic compounds that when disposed directly in the environment, can cause serious environmental problems. Not much is known about the microbiota present in this solid residue. Therefore, the objective of this work was to isolate and characterize morphologically microorganisms found in the solid residue from the olive oil production of Maria da Fé (MG). From the residue was carried out a serial decimal dilution and plated on nutrient agar with nystatin (AN) for bacterial isolation, YEPG at pH 3.5 for yeast isolation, Dichloran Rose Bengal Agar (DRBC) and Agar Dextrose Potato (BDA) for fungi filamentous isolation. When necessary, enrichment technique was used for isolation. After the incubation period, the colonies were classified according to colony and cell morphological characteristics. It was obtained 122 isolates of yeasts, 63 isolates of bacteria and 13 isolates of filamentous fungi. MALDI - TOF will be performed to identify these isolates.

**Keywords:** Agroindustrial; Bacteria; Yeast; Residue of olive oil.

**Support:** FAPEMIG, Capes e CNPq.

## Influence of different N-glycans in carbohydrate active enzymes secretion, folding and functional activity

Marcelo V. Rubio<sup>1\*</sup>; Mariane P. Zubietta<sup>1</sup>; Fabiano J. Contesini<sup>1</sup>; César R. F. Terrasan<sup>1</sup>; Jaqueline A. Gerhardt<sup>1</sup>; André R. L. Damásio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, Brazil. \*e-mail (marcelov.rubio@gmail.com):

### ABSTRACT

Filamentous fungi such as *Aspergillus* sp. and *Trichoderma* sp. are frequently used to produce carbohydrate active enzymes (CAZymes) due to great enzymatic repertoire and high protein secretion. In Eukaryotes the majority of proteins synthesized in the endoplasmic reticulum are glycoproteins. Glycosylation is one of the most common posttranslational modification to occur in protein biosynthesis which glycans are attached to proteins or lipids. The attachment of glycans into nascent peptides can be *N*-linked or *O*-linked. *N*-linked glycans enhance proper folding, intracellular tracking, secretion, thermostability, reduce aggregation, promote secondary structure formation and, consequently, affect functional properties. In recent years, the structure of protein-linked carbohydrates of many fungal proteins has been elucidated, showing the prevalence of high-mannose chains, sometimes with typical fungal modifications. The different configurations of the *N*-linked glycan are not simply intermediates in a biosynthesis pathway but instead have specific functions by their own. Here, we propose to understand if the *N*-glycan pattern of glycoside hydrolases can interfere with protein secretion and function in *A. nidulans* by designing *knockout* strains to some genes related to *N*-glycan biosynthesis. The canonical *N*-glycan precursor in fungi has 14 sugars (Glc3Man9GlcNAc2) and after the *knockout* of Alg6, Alg2, Alg1, Alg11 and Alg14 genes the precursor of our strains were, theoretically, changed to Man9GlcNAc2, Man1GlcNAc2, GlcNAc2, GlcNAc1 and no sugar attachment, respectively. Moreover, we do not detected growth differences among *knockout* and control strains. The knowledge and modulation of *A. nidulans* *N*-glycosylation process is a strategy that can allow improvement in the secretion of target enzymes.

**Keywords:** Fungi, Glycoside hydrolases, Enzymes secretion, *N*-glycosylation, *N*-glycan biosynthesis.

**Support:** FAPESP and CNPq

## **Systemic infection by *Candida* spp. and its tropism to the central nervous system in a murine model**

**Marcelo D'Alessandre Sanches<sup>1\*</sup>; Thais Fernanda de Campos Fraga da Silva<sup>2</sup>; Luiza Ayumi Nishiyama Mimura<sup>2</sup>; Larissa Lumi Watanabe Ishikawa<sup>2</sup>; Sofia Fernanda Gonçalves Zorzella-Pezavento<sup>2</sup>; Alexandrina Sartori<sup>2</sup>; Cilmery Suemi Kurokawa<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, São Paulo, Brasil.

\*e-mail: mdsanches.bio@gmail.com

---

### **ABSTRACT**

The genus *Candida* comprises commensal fungi with capacity to cause systemic infection that may involves the central nervous system (CNS). It has recently been suggested that these fungi aggravate or trigger CNS pathologies. The present study was designed to establish if a systemic infection by *Candida* spp. in mice could spread to the brain. Adult female C57BL/6 mice were infected by intravenous route with  $5 \times 10^6$  viable *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. parapsilosis* yeasts. Body weight was daily recorded until the 14<sup>th</sup> day post-infection. Fungal load was assessed in brain, spleen and kidney samples, cytokine production was analyzed in spleen cell cultures and histopathological analysis was performed in brain samples on days 3 and 14 post-infection. Only *C. krusei* infection resulted in body weight loss. The three *Candida* spp. spread to the brain, spleen and kidney, being *C. glabrata* higher in the brain at the beginning of the infection. At the 3<sup>rd</sup> day post-infection *C. krusei* resulted in a higher production of TNF- $\alpha$ , *C. glabrata* in a higher production of IFN- $\gamma$  and *C. parapsilosis* in a higher production of IFN- $\gamma$  and IL-10. At the 14<sup>th</sup> day post-infection the fungal load decreased in all organs, but the *C. parapsilosis* persisted in the kidneys. Cytokine production and inflammatory infiltration were similarly lower at this time point. Even though the three *Candida* spp. presented differences related to fungal persistence and immune response, they were equally able to reach the CNS.

**Keywords:** candidiasis, systemic experimental infection, C57BL/6 mice, brain, immune response.

***Aspergillus nidulans* as a platform for recombinant production of cellulases and oxidative enzymes for biomass degradation**

Marco A. S. Kadowaki<sup>1\*</sup>; Rolf A. Prade<sup>2</sup>; Igor Polikarpov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São-carlense, 400, São Carlos, SP. Autor para correspondência: marcokadowaki@gmail.com

<sup>2</sup>Department of Microbiology and Molecular Genetics, Oklahoma State University, OK, United States.

---

## ABSTRACT

Biomass is a universally abundant, renewable resource useful for the production of biofuels and starting biochemicals that can be converted into plastics and other commercial composites. Enzymatic degradation of biomass polymers into fermentable sugars is a recalcitrant process for which a complete efficient breakdown mechanism remains to be discovered. So far current commercial enzymes that breakdown biomass polymers are of the hydrolytic type using the classic acid/base catalysis mechanism. This mechanism for the degradation of plant polysaccharides has recently been challenged by the landmark discovery of oxidoreductase systems such as fungal lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) that directly oxidize cellulose and cellobiose dehydrogenase, glyoxal- and putative GMC oxidoreductases that oxidize cellobiose, aldehydes and aromatic compounds. These enzymes reduces molecular oxygen and produce excessive amounts of hydrogen peroxide and oxygen radicals that results in non-selective Fenton like oxidation of glycosidic bonds. Filamentous fungi are able to secrete an array of oxidoreductases and to express high levels of cellulases been potential hosts to heterologous protein secretion. However, the production of high-yield and purity enzymes is a biotechnological challenge. *Aspergillus nidulans* has been used to express cellulases and can offer an alternative option to express oxidative enzymes. In this work we establish a pipeline to clone, express and purify a sort of hydrolytic as well as oxidative enzymes using *A. nidulans* as cell factory. We also show the successful expression and purification of cellulases from *Neurospora crassa* and *Chaetomium globosum* as well as active Lpmos from the thermophilic *Myceliophthora thermophila*.

**Keywords:** Heterologous expression, oxidoreductases, lytic polysaccharide monooxygenases.

**Support:** FAPESP, CAPES e CNPq.

## Influence of growth temperature on the antimicrobial activity of eugenol and thymol against *Staphylococcus aureus*

Mariana Silva Coelho<sup>1</sup>; Roberta Hilsdorf Piccoli<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Federal University of Lavras - Minas Gerais, Brazil. \*e-mail:rhpiccoli@dca.ufla.br

---

### ABSTRACT

Essential oils are gaining increasing interest in their antimicrobial properties and the major compounds are well known for their antimicrobial activity. Eugenol and thymol have been extensively studied due to their effective against pathogens and deteriorating microorganisms. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* are still an important cause of foodborne intoxications worldwide. Lack of proper hygienic measures during preparation of food is a major risk of contamination, and staphylococcal food poisoning is often associated with manually prepared food. This study evaluated the influence of growth temperature on the antimicrobial activity of eugenol and thymol on *Staphylococcus aureus*. To determine the minimum inhibitory concentration (MIC), 20; 30 and 37°C, Brain Heart Infusion (BHI) containing 0.5% (v/v) Tween 80 was used. The broth was added in polystyrene microplates with 96 wells. Different concentrations were obtained by homogenization of the antibacterial agents with culture media: 0,5; 0,9; 1,9; 3,9; 7,8; 15,6; 31,2 and 62,5 mg mL<sup>-1</sup>. The incubation temperatures studied were 20, 30 and 37 °C. The MIC of eugenol was 7,8 mg mL<sup>-1</sup> at 20 °C; 3,9 mg mL<sup>-1</sup> at 30 °C and 15,6 mg mL<sup>-1</sup> at 37 °C for thymol the MIC was 3,9 mg mL<sup>-1</sup> in all temperatures studied. This study demonstrated that growth temperatures influence MIC values of eugenol. However, for thymol the MIC values were the same. This difference can be observed because the antimicrobials studied are of different chemical classes, eugenol belongs to the phenylpropanoid group, while thymol belongs to the terpene group.

**Keywords:** MIC, major compounds, essential oil.

**Support:** FAPEMIG, CNPq, CAPES.

## ***tris-(1,10-phenanthroline) iron(II): drug repositioning in the treatment of Tuberculosis***

**Mariana Cristina Solcia<sup>1\*</sup>; Débora Leite Campos<sup>1</sup>; Patrícia Bento da Silva<sup>1</sup>; Fernando Rogério Pavan<sup>1</sup>**  
\*e-mail: mariana.solcia@gmail.com

<sup>1</sup>Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - Laboratório de Pesquisa em Tuberculose

### **ABSTRACT**

Tuberculosis (TB) is responsible for about 2 million deaths and 9 million new cases every year. One factor that contributes to these high rates is the appearance of drug resistant bacteria. Thus, the need for new forms of treatment is clear. This work aims to evaluate the activity of the metal complex, *tris-(1,10-phenanthroline)iron(II)* ( $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ ) against *Mycobacterium tuberculosis* (MTB).  $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$  acts as precursor to a series of chemical reactions. In order to evaluate their *in vitro* activity, the Minimal Inhibitory Concentration ( $\text{MIC}_{90}$ ) in *H<sub>37</sub>Rv* sensitive MTB strains was determined using the Rezasurin microtiter assay (REMA) method, and the cytotoxicity ( $\text{IC}_{50}$ ) in J774A.1 and MRC-5 cells using as a control rifampicin and doxorubicin, respectively. For the assays, microdilution was used in 96-well plates and resazurin was used as a developer of cell viability. Three independent trials were performed and the results are presented as mean and standard deviation. The  $\text{MIC}_{90}$  of the complex, capable of inhibiting 90% growth was 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$  and complex concentrations in which 50% of the cells remained viable were >500 $\mu\text{g}/\text{mL}$  for J774A.1 and MRC-5 in 24h, 48h and 72h. It was also determined the selectivity index ( $\text{SI}=\text{IC}_{50}/\text{MIC}_{90}$ ). These results were satisfactory, because the complex showed a high SI, in which the active concentration against the mycobacteria is very distant from the cytotoxic concentration, being a promising candidate for the treatment of TB. However, more studies will be carried out, such as determination of activity in resistant strains and search for the mechanism of action to ensure its efficacy and safety.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, cytotoxicity, REMA, new antibiotics.

**Financial Support:** CNPQ, 147308/2016-0 and FAPESP, JP 2013/14957-5

## **Ochratoxigenic fungi isolated from different agricultural products belonging to the EPAMIG-URESM and CCDCA-UFLA cultural collections**

Mariana Lino de Souza<sup>1\*</sup>; Sara Maria Chalfoun<sup>2</sup>; Luís Roberto Batista<sup>3</sup>, Cristina Ferreira Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia, Setor de Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, caixa postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brazil. \*e-mail: linomariana@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais- EPAMIG -Unidade Regional do Sul de Minas, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

<sup>3</sup> Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

---

### **ABSTRACT**

The development of fungi of the genera *Aspergillus* can cause undesirable effects on agricultural products, including mycotoxin contamination. Ochratoxin A (OTA) is produced by species of the *Aspergillus*, which may have detrimental effects on human health. This study aimed to evaluate the production of OTA by fungi belonging to the Collection Cultures (Epamig-URESM) and Collection of Culture of Microorganisms of the Department of Food Sciences of the Federal University of Lavras (CCDCA-UFLA). Eighteen isolates were tested: *Aspergillus carbonarius* (6), *Aspergillus niger* (4) and *Aspergillus ochraceus* (8). To evaluate the toxigenic potential we used the agar plug method on thin layer chromatography, the assessment was based on retention factor (RF) and spot fluorescence similar to the OTA standard. After obtaining pure cultures in MA (Malt Agar), the fungal isolates were inoculated in CYA (Czapek Yeast Agar) at 25 °C by 10 days. The confirmation for the production of OTA was performed in ultraviolet light with a wavelength between 264nm and 366nm using a cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). The result was that 83%, 75% and 50% of the isolates of *A. carbonarius*, *A. ochraceus* and *A. niger*, respectively had a fluorescence spot similar to the standard of OTA. It was observed that most of OTA producing species was *A. ochraceus* and *A. carbonarius*. These results indicate the need for monitoring of mycotoxins and toxigenic fungi in coffee beans, grapes and cocoa.

**Keywords:** *Aspergillus sp*, Ochratoxin A, food.

**Support:** CAPES; CNPq; FAPEMIG.

## Growth of xylose fermenters *S. cerevisiae* in sugarcane bagasse hydrolyzed

Mariane Soares Raposo<sup>1\*</sup>; Camila de Souza Varize<sup>1</sup>; Ricardo Luiz Dalia<sup>1</sup>; Carolina Tieppo Camarozano<sup>1</sup>; Renata Maria Christofoleti-Furlan<sup>1</sup>; Thalita Peixoto Basso<sup>1</sup>; Luiz Carlos Basso<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. ESALQ/USP \*e-mail ([mraposo@usp.br](mailto:mraposo@usp.br))

---

### ABSTRACT

The growth and fermentation of hydrolyzate obtained from lignocellulosic residues presents difficulties, such as: substrate with mixture of pentoses and hexoses and presence of toxic substances generated in hydrolysis process. In addition, *S. cerevisiae* has no capacity of metabolizing xylose. Three *S. cerevisiae* strains 272, 272-1A and SA-1 were modified from the integration of three genes: xylose reductase (XYL1), xylitol dehydrogenase (XYL2) and xyluloquinase (XYL3). We aimed to evaluate the growth and cell viability of these strains in a media formulated with molasses and bagasse hydrolyzate from sugarcane. Aliquots (100 µL) of the strains were resuspended in 6 mL of HM media (Sucrose 5.98 g.L<sup>-1</sup>; Glucose 5.07 g.L<sup>-1</sup>; Fructose 0.71 g.L<sup>-1</sup>; Xylose 148.83 g.L<sup>-1</sup>; Arabinose 6.61 g.L<sup>-1</sup>; Formic Acid 1.39 g.L<sup>-1</sup>; Acetic Acid 17.54 g.L<sup>-1</sup>; HMF 0.18 g.L<sup>-1</sup>; Furfural 5.04 g.L<sup>-1</sup>; Ethanol 3%; Yeast Extract 5 g.L<sup>-1</sup>; Ammonium Sulphate 2.301 g.L<sup>-1</sup>; Potassium Chloride 0.785 g.L<sup>-1</sup>; Potassium Sulphate g.L<sup>-1</sup>; Magnesium Sulphate 0.304 g.L<sup>-1</sup>; Zinc Sulfate 0.0165 g.L<sup>-1</sup>; Manganese Sulfate 0.0012 g.L<sup>-1</sup>; Copper Sulfate 0.0015 g.L<sup>-1</sup>), with 3 dilutions: 1:5 (A), 1:4 (B) and 1:3 (C) (30°C and 160 rpm). The media C allowed greater growth for all strains after 72 hours, where 2721A presented D.O. (600nm) 18.69, followed by the SA-1 18.36 and 272 17.40. The cell viability started with 100% and maintained stable until the end of the growth, in the three means tested. It was possible to conclude that the C media allowed a better growth and did not depreciate the viability of studied strains.

**Keywords:** Second generation ethanol; Hydrolyzate inhibitors; Pentose; Lignocellular.

**Support:** Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (Capes).

**Different concepts for identification of species within  
*Fusarium fujikuroi* complex associated with *Pokkah boeng*  
of sugarcane**

Marileide M. Costa<sup>1</sup>; Maruzanete P. Melo<sup>2</sup>; Claudia M. O; Veiga<sup>1</sup>; Sarah S. Costa; Ludwig H. Pfenning<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Fitopatologia, UFLA, 37200-000, Lavras MG. \*E-mail:costa.marileide@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Departamento de Fitotecnia, UFPI, 64049-550 Teresina PI

---

**ABSTRACT**

Pokkah-boeng is a disease of sugar cane (*Saccharum officinarum*) caused by species belonging to the *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC). The most typical symptoms of the disease are a morphological deformation of the plant, but also stem rot. While the occurrence of symptoms is eventually reported in plantations in Brazil, no official reports of the disease exist. The morphological, biological and phylogenetic species concept were applied for a consistent identification of species of the FFSC associated with symptoms of Pokkah boeng in sugarcane from Brazil, using molecular phylogeny, sexual compatibility and analysis of morphological markers. Twenty two monosporic isolates were obtained from states Maranhão, Minas Gerais and Paraíba. The tree inferred from EF-1- $\alpha$ , generated by Maximum parsimony analysis revealed that strains studied formed a single, strongly supported clade with reference material of *F. sacchari*. Field isolates were crossed with *F. sacchari* female fertile tester strains and produced fertile perithecia and viable ascospores. The morphological markers of the species were also observed, like conidia formed in the aerial mycelium on polyphialides only in false heads. In the Brazilian literature the pathogen is referred as "*F. moniliforme*". However, this name is invalid as it was dismembered in several phylogenetic and biological species within FFSC. This is the first report of *F. sacchari* associated with Pokkah boeng in sugarcane in Brazil. The results contribute with basic knowledge about the etiology of the disease and for the development of strategies for diagnosis and monitoring.

**Keywords:** *Saccharum officinarum*. Molecular Phylogeny. Mating Population.

**Support:** CNPq; CAPES

## **Sediment profile influences on methane cycle communities in Amazonian wetlands**

Mariley de Cássia da Fonseca<sup>1\*</sup>; Júlia Brandão Gontijo<sup>1</sup>; Aline Giovana da França<sup>1</sup>; Andressa Monteiro Venturini<sup>1</sup>; Elisa Costa Nadalini<sup>1</sup>; Fernanda Mancini Nakamura<sup>1</sup> Siu Mui Tsai<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituição: Centro de Energia nuclear na Agricultura – CENA/USP \*e-mail: mariley\_fonseca@hotmail.com

### **ABSTRACT**

Wetlands are one of the largest natural sources of methane found in the atmosphere and account for 20% of the total area of the Brazilian Amazon. River sediments are an example of a unique type of ecosystem, where methane produced in anaerobic zones by methanogenic *Archaea* is oxidized to CO<sub>2</sub> by methanotrophic *Bacteria*. Thus, the present work aimed to quantify the total microbial community through the *Archaea* and *Bacteria* 16S rRNA genes, in addition to the *mcrA* and *pmoA* functional genes, related to methanogenic *Archaea* and methanotrophic *Bacteria*, respectively, along the sediment profile. The sampling was done during October 2016 (dry season), in three wetland areas from Amazonas and Tapajós rivers from 0 to 10 and 10 to 20 cm depth in the top sediment layer, in four points of each area, used to physicochemical and molecular analysis. The abundance of 16S rRNA genes of *Archaea* and *Bacteria*, *mcrA* and *pmoA* genes was measured in triplicate by quantitative real-time PCR (qPCR) using the specific sets of primers for each gene. Data were submitted to the Kruskal-Wallis test and correlated with the Spearman test. Regardless of the depth, the abundance of *mcrA* was higher in relation to *pmoA* in all areas, evidencing the methane emission potential of wetlands. Along the sediment profile, changes occurred in the physicochemical patterns and in the abundance of the 16S rRNA genes of *Archaea* and *Bacteria*, *mcrA* and *pmoA* genes, suggesting that the microbial community involved in the CH<sub>4</sub> cycle is shaped by environmental characteristics.

**Keywords:** microbial ecology, methanogens, methanotrophs , qPCR.

**Support:** FAPESP / CAPES / CNPq

## Diversity of filamentous fungi in the south of Minas Gerais vineyards

Michele de Oliveira Aragão<sup>1\*</sup>; Natasha de Azevedo Lira<sup>1</sup>; Fábia Paulino de Deus<sup>1</sup>; Danielle Aparecida da Silva<sup>1</sup>; Luiz Gustavo Condé Lima<sup>1</sup>; Lorena Dutra Silva<sup>1</sup>; Anielli Souza Pereira<sup>1</sup>; Fabiana Reinis Franca Passamani<sup>1</sup>; Luís Roberto Batista<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal University of Lavras – UFLA. Departament of Food Science \*nathashalira@yahoo.com.br

---

### ABSTRACT

Minas Gerais recently gained prominence in wines production with new techniques of cultivation, such as invert vine cycle, enable crops in winter with better weather. Some microorganisms, for example filamentous fungi, present in the soil, air, leaves and berries of grapes influence the quality of the wines, altering desirable or the undesired the product. This study aimed to isolate and identify filamentous fungi in the air and leaves of vineyard located in Três Pontas and Três Corações. We used spontaneous sedimentation in Petri's board for isolation of air fungi and serial dilution in DRBC and DG18 medias for analysis of the leaves. Following the purification in MA media, the isolates were inoculated in specific media and identified using the identification manuals. It was identified 120 air fungi: *Alternaria* sp (12), *Aspergillus niger* (1), *Cladosporium cladosporioides* complex (70) *Epicoccus nigrum* (12), *Fusarium semitectum* (11) *F. oxysporum* (4), *Penicillium corylophilum* (1) *P. solitum* (1), *Rhyzopus* sp. (3). From the leaf samples were identified 164 fungos: *Alternaria* sp (15) *A. aculeatus* (2) *A. japonicus* (1) *A. tubingensis* (1) *C. cladosporioides* complex (106) *E. sp* (3) *F. decemcellulare* (1), *M. semitectum* (2), *F. sp* (2), *P. funiculosum* (2) *P. sp* (4), *P. crust* (1) *P. paxilli* (1), *Ulocladium* sp. (7). It was observed greater incidence of *Cladosporium cladosporioides* complex species in both samples. Those species cause bunch rot, being commonly distributed in wine regions. In Chile more than 50% of grapes present contamination with *C. herbarum* and *C. cladosporioides*, which cause dehydration of the berries.

**Keywords:** wine, *Cladosporium cladosporioides*, mycobiota terroir

**Support:** Capes, CNPq, FAPEMIG

## Archaeal, bacterial and fungal responses to vinasse and nitrogen application to the sugarcane soil

Miriam Gonçalves de Chaves<sup>1</sup>; Siu Mui Tsai<sup>1</sup>; Acacio Aparecido Navarrete<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Centro de Energia Nuclear na Agricultura CENA-USP, Piracicaba, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Centro de Ciências e Tecnologias para a Sustentabilidade (CCTS), Departamento de Ciências Ambientais, Universidade Federal de São Carlos UFSCar, Sorocaba, SP, Brasil.

\* acacionavarrete@gmail.com

---

### ABSTRACT

Studies from the late 1980s have recommended the use of nitrogen (N) fertilizer in combination with vinasse (V; a by-product of the sugar-ethanol industry) in sugarcane fields. Here we focused on the effects of combined applications of V and N fertilizer to the soil on the taxonomic groups of *Archaea*, *Bacteria* and *Fungi* in sugarcane-cultivated soils in a greenhouse mesocosm experiment monitored for chemical factors. Across 21 soil metagenomic datasets, effects of N+V fertilization were observed, in which no change in total bacterial abundance was revealed during the experiment, while that of *Archaea* and *Fungi* decreased and increased, respectively. Differences in relative abundance of metagenomic sequences were mainly revealed ( $P<0.01$ ) for archaeal phylum – *Euryarchaeota*, and bacterial phyla – *Acidobacteria*, *Chlamydiae*, *Chloroflexi*, *Delta proteobacteria*, *Firmicutes*, *Poribacteria* and *Verrucomicrobia* between 7 and 150 days after N+V application to the soil. Increase in abundance was observed for fungal phyla after 150 days of the experiment for N+V amended soil, but it was not statistically significant. Chemically, N+V fertilization increased soil pH, total carbon and sulfur concentration, whereas decreased soil organic matter. These differential response for microbial groups are being interpreted together with data obtained using a high density functional gene array contains 101,796 distinct probes belonging to microbial genes of known function. We expected provide in a near future a better understanding about the effect of combined applications of N+V fertilizer to the soil on the microbial community and mediated processes not only essential to ecosystem function but also for the sustainable management of agroecosystems.

**Keywords:** metagenome, bulk-soil, microbiome, sustainable agriculture.

**Support:** Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

**Comparative analysis of the action of the adsorbents  
hydrotalcite, *Moringa oleifera* and activated carbon in the  
treatment of landfill leachate**

Nair Conde de Almeida<sup>1\*</sup>, Valdenilson José Alves de Oliveira<sup>2</sup>, Dejanira Franceschi de Angelis<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup>Department of Biochemistry and Microbiology - Institute of Biosciences - São Paulo State University, UNESP. \*ncondealmeida@yahoo.com

---

**ABSTRACT**

Landfill leachate is formed by organic and inorganic toxic compounds, it has high salt concentration and pathogenic organisms that can cause environmental damages. Hydrotalcites, activated carbon and *M. oleifera* seeds have been used for adsorption and water purification. The landfill leachate was submitted to physicochemical and microbiological analyzes before and after treatments with these adsorbents. The leachate characterization found small number of heterotrophic bacteria and fungi, indicating unfavorable conditions for microbiological growth. Total coliforms and *E. coli* reached mean values of 17900 and 890 NMP/100mL respectively. The leachate physicochemical analyzes indicated high values for conductivity, color, turbidity, COD, BOD<sub>5</sub>, ammonia, boron, sodium and chlorides. The treatment with hydrotalcite produced the best results for the removal of the mentioned parameters, but pH increased. 4% activated carbon obtained better results for color and COD removal but didn't remove boron and ammonia efficiently. *M. oleifera* seed obtained unsatisfactory results. All adsorbents decreased by about 10 times the heterotrophic bacteria amount. Total coliforms and *E. coli* didn't resist the treatments. None of the adsorbents removed sodium, chloride or leachate toxicity for *Daphnia similis*.

**Keywords:** Landfill leachate, boron adsorption, hydrotalcite, *Moringa oleifera*, activated carbon

**Support:** Capes

## Extraction of a yeast lipase from Antarctic environment using Aqueous Two-Phase System

Natalia Melani<sup>1</sup>; Lara Sette<sup>2</sup>; Elias Tambourgi<sup>1</sup>; Edgar Silveira<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. \*e-mail (autor para correspondência): natalia.b.melani@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica.

<sup>3</sup> Universidade Estadual Paulista *Campus* Rio Claro, Departamento de Bioquímica e Microbiologia.

---

### ABSTRACT

Lipases are enzymes that catalyse the hydrolysis of the ester bonds in the molecules of triglycerides, liberating free fatty acids (FFAs) and glycerol under natural conditions and have the potential to intermediary different biochemical reactions such as hydrolysis, transesterification, interesterification, esterification, alcoholysis and acidolysis. These properties confers to lipases a huge range of industrial applications, with emphasis on food processing, pharmaceutical, cosmetic and fine chemicals industries. They can be produced by animals, plants, bacteria and fungi, alought microbial enzymes are desirable since they present high stability and selectivity. Efficient downstream processing techniques are essential for commercial production of enzymes, and Aqueous Two-Phase System (ATPS) shows great promise specially due to advantages such as high biocompatibility, continuous mode of operations, potential for scaling up, and low toxicity of phase-forming chemicals. The main purpose of this work was analyze by Full Factorial Design  $2^5$  the influence of five factors on enzyme partitioning of a yeast lipase derived from Antarctic environment using ATPS composed by Polyethylene glycol (PEG)/phosphate. The five factors studied were: molecular mass of PEG, PEG concentration, Salt concentration, pH and sample volume. The main studies indicated lipase has tendency to partition in PEG-rich phase. The sample volume and salt concentration had significant effect ( $p < 0.05$ ) on enzyme and protein partitions. These results demonstrate lipase can be extracted using PEG/phosphate ATPS, alought, it still is necessary design new experiments to optmize the system and find the best conditions to extraction.

**Keywords:** Downstream processing, Polyethylene glycol, Liquid-liquid extraction

**Support:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

## Sensory analysis of fermented beverages from different yeasts

Paulo Renato Matos Lopes<sup>1\*</sup>; Alessandra Baroni Rodrigues Neves<sup>1</sup>; João Vitor França Pirola<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Dracena. Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros, km 651, CEP 17900-000, Dracena, Brasil.

\*plopes@dracena.unesp.br

---

### ABSTRACT

The purpose of this work was to sensorially evaluate alcoholic beverages fermented from two fruits by different yeasts. Six types of alcoholic beverages were prepared from grape and jabuticaba by three yeast strains: W) wild, present in fruit itself; B) bakery, acquired as baker's yeast; and AB) of alcoholic beverages, specific for mead production. Initially, 1.0 kg of fruit was manually macerated and the wort produced was chaptified and it was added 0.15 g.L<sup>-1</sup> of sodium metabisulfite. Then, yeasts were reactivated by hydration and inoculated in plastic containers with airlock system, i.e., without air entering. Two transfuges were performed during 70 days of fermentation process. In order to indirectly determine sugars concentration in wort, °Brix measurements were conducted by refractometer at each process step. After the preparation period, the six beverages were evaluated by FCAT/UNESP academic community by sensory analysis cards. Four parameters were rated from 1 to 5 in ascending order: appearance, aroma, flavor and final evaluation. Furthermore, it was identified the preference among beverages made from the same fruit and fermented by different yeasts. Results revealed a higher preference for beverages from wild yeast both for grape (45.7%) and jabuticaba (64.7%). Regarding sensory parameters, it was observed that: Appearance had 77.2% of 4 and 5 rating; Flavor demonstrated a rejection for beverages produced with jabuticaba; Aroma had an excellent evaluation in grape beverages. Lastly, the averages in final evaluation for the fermented beverages from jaboticaba and grape were 2.74 and 3.09, respectively.

**Keywords:** aroma; flavor; grape; jabuticaba; yeast strain.

## Prospecting of yeast of biotechnological interest from residual activated sludge

Rafaela Cabestré<sup>1\*</sup>; Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Universidade do Sagrado Coração- Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PRPPG), Centro da Saúde, Biomedicina, Bauru/SP. \*e-mail: rafa.beeh@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade do Sagrado Coração- Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PRPPG), Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental, Bauru/SP.

---

### ABSTRACT

Biotechnological advances has contributed to the development of knowledge on biodiversity and the prospect of new micro-organisms allowing economic development and scientific enrichment. Activated sludge systems are used in the treatment of waste industrial, representing a source of micro-organisms that may has capacity to produce enzymes of biotechnological interest as proteases, which are used in different industries and in diagnostic kits. This study aimed to prospect yeast producer of enzymes in residual activated sludge, donated by a cellulose industry from state of São Paulo. This material was collected after the treatment process of waste generated in the cellulose bleaching steps. Isolation of fungi was performed using the culture medium Sabouraud's agar with chloramphenicol; after isolation, the maintenance of these fungi was realized in sterile distilled water according methodology described in scientific literature. The presumptive identification of fungi was carried out through optical microscopy direct and micro-cultivation. Correlating the macroscopic, microscopic, growing conditions characteristics and comparing with atlas mycological were identified five yeast colonies corresponding to *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Geotrichum* sp. and *Rhodotorula* sp.

**Keywords:** Biodiversity. Bioprospecting. Enzymes. Yeast fungi.

## **Biodegradation of perfluorinated compounds and their impact in soil microbiota compared to plant toxicity datasets**

Renato Nallin Montagnolli<sup>1,\*</sup>; Jaqueline Matos Cruz<sup>1</sup>; José Rubens de Moraes Júnior<sup>1</sup>; Elis Marina Turini Claro<sup>1</sup>; Gabriela Mercuri Quitério<sup>1</sup>; Ederio Dino Bidoia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Departamento de Bioquímica e Microbiologia. Avenida 24-A, 1515, Bela Vista, 13506-900. Rio Claro, SP, Brasil. \*renatonm3@gmail.com

---

### **RESUMO**

The use of fluoride based foams increases the effectiveness of fire-fighting operations, but they are also accompanied by major drawbacks regarding environmental safety of perfluorinated compounds (PFCs). There is a significant knowledge gap on PFC toxicity, even though such data could be useful towards bioremediation procedures. It is consensus that a realistic assessment of fire-fighting foam toxicity should cover as many test organisms as possible, however, few studies combine the performance of ecotoxicological tests with a detailed study of microbial communities in soil contaminated with firefighting foams. Our research evaluated the effects of natural attenuation of PFCs on the development of lettuce seeds and in soil microbiota using the 2,6 dichlorophenol-indophenol redox dye as microbial metabolism indicator. We aimed to determine whether aqueous film forming foams toxicity increased or decreased over time in a simulated contamination scenario. The phyto-toxicity of PFCs to lettuce was high, increasing as a function of the concentration and decreasing as a function of exposure time to the environment. However, very specific concentrations throughout biodegradation result in the formation of non-inhibiting intermediates. Therefore, variable biodegradation-dependent germination rates may be misleading on non-time-based monitoring approaches. We also proposed that the colorimetric data modelling could also establish a novel toxicity parameter to evaluate the release impacts to soil and biota. The combined assays allowed the monitoring of PFCs during long term exposition to plants as well as their immediate effects on the same soil microbiota.

**Palavras-chave:** AFFF, perfluorinated compounds, germination, response surface analysis, soil toxicity

Apoio Financeiro: ANP-PRH-05/Petrobrás, CNPq, CAPES, UNESP.

## Novel Biotechnological Spray Formulation for Fungi and Bacteria control

Roberta Cavalcante Tenorio Almeida<sup>1</sup>; Adriana Todaro<sup>2</sup>; Cícero Eduardo Ramalho Neto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Molecular Genetics and Proteomics Laboratory – GEMPRO, Federal University of Alagoas.

\*robertacta1@gmail.com

<sup>2</sup>Federal University of Alagoas.

### ABSTRACT

Bacterial and fungal infections are commonly reported in tropical countries and represent an important public health problem. Plant diseases are also considered one of the main factors responsible for the reduction of food production around the world. In the last three decades the incidence of infections caused by bacteria and fungi has increased considerably. This is one of the reasons why there is a strong worldwide biotechnological interest to search for new substances and biocompounds with antimicrobial activities. This work intended to present a spray formulation containing a biocompound (Monella1) produced by endophytic filamentous fungus A1a. The formulation has shown to be effective against different genus of bacteria and fungi. The biocompound was obtained from culture filtrates of A1a. Antagonism tests revealed inhibitory halo formation against human pathogenic bacteria like *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Shigella* sp., *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 and *Streptococcus pyogenes* by using mini-gel-blocks from A1a. We also carried out tests of antagonism by using the dual culture method against important phytopathogens like *Fusarium oxyporum*, *F. solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Magnaporthe oryzae*, *Colletotrichum gossypi* and *Sclerotium rolfsii*. We have developed a spray solution containing 5% of biocompound in ethanol 54° GL.

**Keywords:** Antiseptical Spray, Applied Biotechnology, Bacteria and Fungi infections.

**Support:** Universidade Federal de Alagoas

## Fungal strains identification for gold nanoparticles biosynthesis

Rodrigo Ken Kawasaki<sup>1,2</sup>; Leilane Hesporte Iwamoto<sup>1</sup>; Sérgio Fernandes<sup>1</sup>; Cristiane Angélica Ottoni<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia Industrial - Instituto de Pesquisas Tecnológicas (LBI-IPT).

<sup>2</sup>Instituto de Química - Universidade de São Paulo (IQ-USP).

<sup>3</sup>Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (IBCLP-UNESP).

\* crisottoni@clp.unesp.br.

---

### ABSTRACT

Metallic nanoparticles present unique properties that are different from the bulk material. Hence, their application has been explored in various fields, such as biomedicine, electrochemistry and environment. The biological synthesis of these nanoparticles is interesting, since it avoids the use of toxic chemicals and high energy demand. The aim of this study was to identify isolated fungal strains for gold nanoparticles (AuNPs) biosynthesis. Extracellular fungal extract was used to reduce HAuCl<sub>4</sub> to AuNPs in 48 h at 30 °C. Four out of seven screened fungal strains carried on the biosynthesis in such conditions. The nanoparticles biosynthesized by IPT1011, IPT1013, IBCLP11 and IBCLP15 strains were characterized by UV-vis and Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopies and dynamic light scattering. The UV-vis analysis presented absorption peaks ranging from 533 to 566 nm and near 280 nm, which were attributed to the surface plasmon resonance band of the AuNPs and the electronic excitation of aromatic amino acid residues in proteins, respectively. The AuNPs average sizes and zeta potential ranged from 51 to 211 nm and -38,33 to -6,33 mV, respectively. The FT-IR analysis indicated the presence of proteins as capping agents. The synthesis process using IBCLP11 strain will be optimized in order to obtain particles smaller than 100 nm for further application. IPT1013 strain yielded AuNPs of desired profile with 95 nm size and -38,33 mV zeta potential, which indicated stable nanoparticles. Whole AuNPs characterization is underway. This work identified four fungal strains for promising eco-friendly and cost-effective method for AuNPs biosynthesis.

**Keywords:** metallic nanoparticle, mycosynthesis, fungal extract, nanoparticle characterization.

**Support:** Fipt.

## Production and Evaluation of the Activity of Chitinase by *Trichoderma reesei* and *Penicillium simplicissimum*

Rodrigo Sorrechia<sup>1\*</sup>; Vanessa Raquel Greatti<sup>1</sup>; Rafaela Regina Fantatto<sup>1</sup>; Lucas Barbosa Cristovão<sup>1</sup>; Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Drugs and Medicines. School of Pharmaceutical Sciences – UNESP, Araraquara, SP, Brazil . \*E-mail: sorrechia@fcfar.unesp.br

---

### ABSTRACT

Chitinases are endoglycosyl hydrolases that break glycosidic bonds in chitin a component of the cell walls of fungi and exoskeletal of some animals including worms and arthropods. Chitinases can be applied in biocontrol as a protective agent against phytopathogenic fungi and in production of oligosaccharides as biologically active substances. The aim of this study was the production and evaluation of the enzyme chitinase of two fungi *Trichoderma reesei* (RUT C30) and *Penicillium simplicissimum* (FAT 7686). Submerged fermentation was carried out in erlenmeyers with spore inoculum ( $10^7$ ) for seven days at 28°C with 120 rpm agitation using the liquid culture media (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6,9g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4,2g/L, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,3g/L, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,002g/L, ZnSO<sub>4</sub> 0,0014g/L, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,005g/L, Tween80 0,02mL/L, Colloidal Chitin (enzymatic inductor) 10g/L). To separate the supernatants from the mycelium the culture was vacuum filtrated through filter paper. The Bradford Assay was used to determinate the total protein concentration and the chitinase activity assay was performed using colloidal chitin where the reducing sugar formed was detected at 540 nm by the DNS method according to Miller (1959). The total protein concentration produced by *T. reesei* was 0,14 mg/mL and the chitinase activity was 0,15 U/min/mL that provided a specific activity of 1,07 mg/mL. The *P. simplicissimum* didn't produce the enzyme in these experimental conditions. The genus *Trichoderma* and *Penicillium* are good producers of enzymes but in this study we observed that *P. simplicissimum* was not able to produce the enzyme chitinase. To improve *T. reesei* production, new fermentation parameters can be evaluated.

**Keywords:** enzyme, fermentation, chitinase, *Trichoderma reesei*, *Penicillium simplicissimum*

**Support:** UNESP

## Diversity and ligninolytic activity of fungi from regions with different states of conservation of the Iguazu National Park

Samantha Beatriz Esparza Naranjo<sup>1</sup>; William Bartolomeu de Medeiros<sup>1</sup>; Michel Rodrigo Zambrano Passarini<sup>1</sup>; Rafaella Costa Bonugli-Santos<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal da Integração Latino-Americana. \*rafaella.santos@unila.edu.br

### ABSTRACT

The fungal diversity has a main role in vegetal compounds degradation and despite the importance of fungal diversity, the microbiota of the soil in the Iguazu National Park (INP) – Paraná is virtually unknown. Furthermore, the assessment of the genetic and functional diversity, like ligninolytic enzymes, of fungi from this environment is important for ecological understanding and environmental recovery activity. Therefore, the present study has the main goal to assess the soil fungal diversity and its potential expression of ligninolytic enzymes in two points of the INP: 1. area in environmental recovery to more than 10 years; 2. area currently impacted. All isolating process was made by two treatments: with 4mM of guaiacol reactive (selection of ligninolytic fungi) and without it. So far, 21 fungi were isolated, 10 in MA2 (malt extract) and 11 using PDA (potato dextrose agar). The isolated genera are common groups of soil fungi, stands out the presence of the genus *Penicillium* identified only from the local in environmental recovery and *Aspergillus* and *Fusarium* from the impacted area. In both places, fungi were identified with reproductive structures of the chlamydosconidium type. Only fungi from the region under environmental recovery showed ligninolytic activity. The results obtained show a possible correlation between the conservation status of this area and diversity (relatively low) and ligninolytic activity, important for the current works of management and recovery of INP and for understanding the cycling of vegetal organic matter.

**Keywords:** soil fungal diversity, ligninolytic fungi.

**Support:** UNILA

## **Selection of fungi for xylanase production**

**Sirlene do Nascimento Senna<sup>1</sup>; Letícia Ferreira Louzada<sup>1</sup>; Vanina Lilián Castroagudin<sup>2</sup>; Heloíza Ferreira Alves Prado<sup>2\*</sup>**

<sup>1</sup> Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho “Câmpus de São José do Rio Preto” \*e-mail: sirlenensenna@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho “Câmpus de Ilha Solteira”.

---

### **ABSTRACT**

The enzymatic depolymerization of hemicellulose in monomeric sugars requires the synergistic action of multiple enzymes. Xylanases exercise a vital function in the depolymerization of xylan, the main component of hemicellulose. The aim of this study was the isolation of filamentous fungi from a Cerrado area in the city of Inocência-MS. About eleven strains with growth at 30 °C were analyzed for potential xylanase production. The best activities were obtained by isolates IPS 9.1, IPS 8.2 and IPS 14.3. Later, for this species, was realized the study of the effect of the carbon source using different substrates, such as: wheat bran, passion fruit peel, corn straw, box card, brachiaria, corn cob with different grain sizes, sawdust and sugarcane bagasse under solid fermentation. The isolate IPS 8.2 was identified by amplification of the rDNA using ITS1 and ITS4 primers. The comparative analysis of the sequence obtained and those available in GenBank showed that the IPS8.2 isolated is closely related to the *Gongronella butleri* specie. The xylanases production profile was analyzed along the cultivation time using the best substrate *Gongronella butleri* presented the highest production of xylanases (49.35 U/ml) when grown on wheat bran under solid fermentation. Analyzing the production profile was observed a decline in the xylanases production over 72 h. The *Gongronella butleri* has shown great potential for the production of xylanases under solid fermentation, at 72 h. The others isolates showed that the Cerrado area under study favored the isolation of different fungal strains with potential for xylanases production.

**Keywords:** Xylanase, Cerrado biome, agro-industrial waste, solid fermentation, fungal

**Support:** Capes

## **Isolation and identification of yeasts in homemade frescal minas cheese**

Suemis Maria Parenti de Souza<sup>\*1</sup>; Daelen Rezende de Oliveira<sup>2</sup>; Mauro Guilherme Barros Cardoso<sup>1</sup>;  
Lisiane Furtado Fonseca<sup>1</sup>; Thiago Oliveira Condé<sup>1</sup>; Anielli Souza Pereira<sup>1</sup>; Beatriz Carvalho<sup>1</sup>, Rosane  
Freitas Schwan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituição. University Federal of Lavras - UFLA \*e-mail: su\_nutripa@yahoo.com.br

### **ABSTRACT**

The yeasts present high physiological diversity and can be found in different environments. Yeasts metabolism enable them to participate in several fermented foods, for production of beer, vine, cheese, breads among others. In cheese production, yeasts have an important role because their ability to ferment or assimilate lactose, galactose, production of alkaline metabolites, and aromatics compounds, growth in low temperature and high salinity tolerance. The yeasts counting and isolation from cheese were done utilizing the spread plate technique in YEPG agar medium (Yeast extract 1%, glucose 2%, peptone 2% and agar 1,5%) added chloranphenicol and pH modified for 3,5, the experiment can be realized in duplicate and incubates for 48h and 30°C. The Frescal cheese were purchased at local market and presented yeast population of 1.4 x 10<sup>3</sup> UFC/g. The different morphotypes found were purified for biochemical tests with carbohydrate fermentation, osmolarity, temperature, sporulation, urea hydrolysis, DBB and starch hydrolysis. The identification was done by use of virtual identification key CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre and confirmed by MALDI TOF technique. The results of biochemical tests allowed the identification of genus *Candida*, *Aureobasidium*, *Malassezia*, *Endomyces* and *Rhodotorula*. Using MALDI TOF technique, it was possible to identify at the species level the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*, that presented 2,171 of confiability score. Therefore, the present work presented that yeasts found in cheese, can be originating of milk, or the manufacture process, which earn attention of producers, because some species found can be pathogenic.

**Keywords:** MALDI-TOF, Fermentation, biochemical tests .

**Support:** FAPEMIG, Capes and CNPQ.

## **Taxonomic assessment and antimicrobial screening of isolated bacteria from marine and terrestrial Antarctic samples**

Tiago R. Silva<sup>1,2</sup>, Alysson W. F. Duarte<sup>3</sup>, Michel R. Z. Passarini<sup>4</sup>, Ana Lucia T. G. Ruiz<sup>5</sup>, Caio Haddad Franco<sup>7</sup>, Carolina Borsoi Moraes<sup>7</sup>, Fabiana Fantinatti-Garbogini<sup>1,2</sup>, Itamar Soares Melo<sup>8</sup>, Rodney A. Rodrigues<sup>6</sup> and Valéria M. de Oliveira

<sup>1</sup> Instituto de Biologia, Universidade de Campinas s – UNICAMP 13083-970, Campinas, SP, Brasil.  
[tiago04@gmail.com](mailto:tiago04@gmail.com)

<sup>2</sup>Divisão de Recursos Microbianos, CPQBA UNICAMP, Campinas, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Alagoas UFAL, Alagoas, Brasil

<sup>4</sup>Universidade da Integração Latino-Americana, UNILA, Foz do Iguaçu, Brasil

<sup>5</sup>Divisão de Farmacologia e Toxicologia, CPQBA UNICAMP, Campinas, Brasil.

<sup>6</sup>Divisão de Química de Produtos Naturais, CPQBA UNICAMP, Campinas, Brasil.

<sup>7</sup>Laboratório Nacional de Biociências, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, Brasil

<sup>8</sup>Laboratório de Microbiologia Ambiental EMBRAPA Jaguariúna, Brasil.

---

### **ABSTRACT**

Microorganisms dominate most of Antarctic ecosystem and play a crucial role in its functioning. They are called extremophilic microorganisms with unique and versatile metabolic properties with possible biotechnological applications in several areas. The aim of the present study was to taxonomically characterize psychrophilic microorganisms from Antarctic continent samples and to screen them for antimicrobial effects. Phylogenetic analysis revealed that most isolates shared 98–100 % sequence similarity to recognized species, including those recovered previously from the Antarctica environment, which belong to the major phyla Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria and Proteobacteria (classes Alpha and Gammaproteobacteria). A total of 361 bacteria strains, distributed in 38 different genera, were recovered and identified based on sequencing of the 16S rRNA gene. The main representative genera were *Arthrobacter* (29%), *Psychrobacter* (19%), *Pseudoalteromonas* (10%) and *Rhodococcus* (4%). Antimicrobial screening of 600 bacteria revealed sixteen strains capable of inhibiting growth of at least one of the strains: *E.coli*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Candida albicans*. One psychrotolerant bacterium, *Pseudomonas mandelii* strain 99, showed a broad antimicrobial range and was selected for further antiproliferative and antiparasitic tests due to low values in Minimal Inhibitory Concentration assay. Results demonstrated that the extremophiles from Antarctica represent an untapped source of diverse microorganisms capable of antimicrobial metabolite production.

**Keywords:** Antimicrobial activity, Antarctica, Bacterial taxonomy, Antiproliferative effect, 16S rRNA genes.

**Support:** FAPESP process number 2014/17936-1

## Comparison between culture media submitted with different microorganisms by the ecometric test

Valéria França de Souza<sup>1\*</sup>; Laura de Queiroz Bomdespacho<sup>2</sup>; José Luís Ramirez Ascheri<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ. \*e-mail (vssouzafrana@gmail.com)

<sup>2</sup>Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, SP

<sup>3</sup>Pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, RJ.

---

### ABSTRACT

Quality Control aims to ensure reliable results. The objective was to use the ecometric test and to evaluate the quality of the different types of culture medium. The culture media were tested by the ecometric method. The research was performed in four culture media: Hektoen, crystal violet bile Agar (VRB), *Bacillus cereus*, PCA and six microorganisms were used: *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, yeast, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. The results obtained for the microorganisms (*Bacillus*, yeast and *Pseudomonas*) in media and temperature at 30 ° C. In the selected microorganism "*Bacillus*" for the media VRB and Hektoen the results not showing growth. The PCA medium obtained the best result, followed by the selective medium for *Bacillus cereus*. For the "yeast" the analyzed media (Hecktoen, PCA and *Bacillus cereus*) not satisfactory results. For "*Pseudomonas*" presented satisfactory growth in the media (VRB, Hecktoen, PCA and *Bacillus cereus*) with differentiated aspects of the colony. The microorganisms (*S. aureus*, *E. coli* and *Salmonella* in media and temperature at 36°C showed the results: for the *S. aureus* in the media VRB and Hecktoen did not present satisfactory results because the VRB presented the highest growth index (A and B), which showed no satisfactory growth index in the other media (PCA and *B. cereus*). It was concluded that the ecometric test can be useful in the monitoring of culture media, and that the growth of *Salmonella* can be useful in the monitoring of culture media (VRB, PCA, *Bacillus cereus*).

**Keywords:** Microbiological control. Isolation methodology. Legislation.

**Support:** CAPES, UFRRJ.

## Microbiological evaluation of leafy vegetables produced by organic and conventional farming systems

Vanessa Merlini<sup>1</sup>; Giselle Pereira<sup>1</sup>; Larissa da Silva<sup>1</sup>; Franciele da Silva<sup>2</sup>, Rafaela Rossi<sup>3</sup>, Fabíola Pena<sup>1</sup>; Adriane Antunes<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Ciências Aplicadas FCA/UNICAMP\* e-mail (adriane.antunes@fca.unicamp.br)

<sup>2</sup> Faculdades Integradas Einstein de Limeira/ FIEL

<sup>3</sup>Faculdade Herminio Ometto/ FHO

---

### ABSTRACT

Alternative production systems have been increasing food supply, following a healthy trend as the guiding criterion of food choices. However, during the fertilization of vegetables, both organic and conventional, animal manures are used, presenting a potential source of microbiological contamination. In view of the above, the objective of this work was to evaluate the microbiological contamination of leafy vegetables produced by organic and conventional farming systems. In this work, seven types of leafy vegetables produced by organic and conventional farming systems were evaluated, and five units of each vegetable were analyzed, totaling 70 samples. Mesophilic aerobes, molds and yeasts, coliforms 30 and 45°C counts were made; the presence of *Salmonella* sp. evaluated and biochemical identification of Enterobacteria, were performed using miniaturized biochemical kits. Greater microbiological contamination was observed in the vegetables produced by conventional cultivation when compared to organic vegetables. Enterobacteria were found in 4 types of organic vegetables, as well as in 4 conventional cultivation. The presence of *Salmonella* sp. was not observed in any of the vegetable of both crops systems. Lettuce cressa Vanda and Americana varieties of the conventional cultivation presented counts for coliforms 45°C higher than those established by RDC N° 12 (10<sup>2</sup> NMP/g), being inadequate according to the legislation. All organic vegetables analyzed complied with Brazilian legislation, possibly due to composting of the manure used and good agricultural practices during cultivation. Contrary to expectations, microbial counts were statistically higher for conventional plants compared to those produced by organic cultivation.

**Keywords:** Healthiness, vegetables, contamination, enterobacteria, fo

## Liquid agroindustrial waste in production of cellulase

Vanessa Fernanda Stati<sup>\*1</sup>, Bruna Letícia Martins<sup>1</sup>, Cynthia Rustiguel<sup>2</sup>, Geisiandy Maria Queiroz-Fernandes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade do Sagrado Coração- Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PRPPG), Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental, Bauru/SP. \*e-mail (autor para correspondência): vanessa.stati@gmail.com.

<sup>2</sup>Department of Biology, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP/SP.

---

### ABSTRACT

An alternative to reduce environmental damage related to the increase of industrial waste generation is to find possibilities of your reuse, a common example is the combustion of organic waste for the production of heat and energy. In the process of obtaining cellulose, high quantity of chemical products is used, causing contaminations and generating concerns to its proper disposal. Therefore, considering the high cost of production of cellulase on a large scale, this research aimed to produce the enzyme through submerged liquid fermentation using *Aspergillus niger* inoculated in culture medium with two residues from the pulp industry, one acid and the other alkaline, separately, to verify the cellulase induction capacity in the production. The production conditions are described in the literature. The proportions the residues added to the culture medium varied at concentrations of 0, 50 and 100% and the carbon source at concentrations of 0.5g and 1.0g searching to reduce the cost of production. After the production and recovery of the enzymatic extract, protein was quantified by Bradford method and cellulase activity was quantified using carboxymethylcellulose as substrate. The results indicated better production when used 0.5g of carbon source, 14% of acid residue and 50% of alkaline residue. These results showed the ability of residues to induce fungus to produce cellulase, allowing the steps following of optimization.

**Keywords:** *Aspergillus niger*, submerged liquid fermentation, enzymes.