

15º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP - 2024

BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS DO SOLO RIZOSFÉRICO E FOLHAS DE FRUTÍFERAS BRASILEIRAS

SABRINA DE B. DA SILVA¹, VANIA BATTESTIN WIENDL²

¹ Graduanda em Licenciatura em Química, Bolsista PIBIFSP, IFSP, Campus São José dos Campos, e-mail: sabrina.brito@aluno.ifsp.edu.br

² Engenheira de alimentos, Profa Dra. IFSP, Campus São José dos Campos, vbattestin@ifsp.edu.br

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 2.12.02.02-8 Microbiologia Industrial e de Fermentação

RESUMO: O uso de microrganismos através de isolamento e seleção de linhagens, é uma ferramenta utilizada para a produção de metabólitos importantes, nos quais podemos incluir compostos bioativos como as enzimas. O trabalho tem como objetivo isolar fungos do solo e folhas de plantas frutíferas brasileiras para, posteriormente utilizá-los em bioprocessos para a produção de enzimas. Este estudo busca criar um banco de culturas de microrganismos de interesse para o meio acadêmico local, uma vez que a obtenção de linhagens através de bancos de culturas puras é difícil, com custo bastante oneroso. Coletaram-se amostras de diferentes tipos de solo de plantas frutíferas de limão, manga, banana, amora, acerola e seriguela. Além de amostras de solo, foram também realizadas coletas de folhas das árvores de abacate, acerola, amora, goiaba, limão, manga, ponkan e seriguela. As amostras foram preparadas em laboratório e repicadas em meio PDA (Potato dextrose Agar), incubadas em estufa 30°C durante 48h para o crescimento dos microrganismos. Das 14 amostras, foram isoladas 3 linhagens, representando aproximadamente 21%, sendo essas amostras provenientes das folhas de seriguela, ponkan e goiaba. As linhagens isoladas foram mantidas sob refrigeração e posteriormente serão utilizadas em processo de fermentação sólida para a produção de enzimas de interesse industrial.

PALAVRAS-CHAVE: isolamento; fungos; bioprocessos.

BIOPROSPECTION OF MICROORGANISMS FROM RHIZOSPHERIC SOIL AND BRAZILIAN FRUIT LEAVES

ABSTRACT: The use of microorganisms through isolation and selection of strains is a tool used for the production of important metabolites, in which we can include bioactive compounds such as enzymes. The aim of the work is to isolate fungus from the soil and leaves of Brazilian fruit plants to later use them in bioprocesses for the production of enzymes. This study seeks to create a bank of cultures of microorganisms of interest to the local academic community, since obtaining strains through banks of pure cultures is difficult, with a very expensive cost. Samples were collected from different types of soil from lemon, mango, banana, blackberry, acerola and seriguela fruit plants. In addition to soil samples, leaves were also collected from avocado, acerola, blackberry, guava, lemon, mango, ponkan and seriguela trees. The samples were prepared in the laboratory and sub cultured in PDA medium (Potato dextrose Agar), incubated in an oven at 30°C for 48h for the growth of microorganisms. Of the 14 samples, 3 strains were isolated, representing approximately 21%, these samples coming from seriguela, ponkan and guava leaves. The isolated strains were kept under refrigeration and will later be used in a solid fermentation process to produce enzymes of industrial interest.

KEYWORDS: isolation; fungi; bioprocesses.

INTRODUÇÃO

No âmbito da biodiversidade, o Brasil se destaca como um país detentor da mais vasta diversidade biológica global. Este cenário abrange extensas áreas territoriais com uma flora rica, porém, em grande parte pouco explorada. A bioprospecção se caracteriza como a busca por recursos na natureza a fim de contribuir com a pesquisa e o futuro desenvolvimento de um produto (Silva e Fernandes, 2023; Alves et al., 2022).

A biotecnologia é a atividade que beneficia o conhecimento, visando a adesão de vias tecnológicas relacionadas a seres vivos ou proveniente deles para dar origem a produtos e/ou processos com o intuito de solucionar possíveis problemas (Amaral et al., 2020). Na área de bioprocessos, a bioprospecção de microrganismos é muito importante pois, através da descoberta e isolamento de microrganismos de fontes naturais, é possível utilizá-los em processos biotecnológicos para a produção de produtos de interesse industrial e comercial.

Várias espécies microbianas são utilizadas em processos industriais e a quantidade de rotas microbianas desenvolvidas continua a crescer, já que os microrganismos permitem a produção de moléculas com características químicas específicas, em altas concentrações e com reduzidos impactos ambientais, como é o caso da produção de enzimas microbianas (Almeida, Collares e Barbosa, 2015). O número de metabólitos industriais obtidos por via fermentativa é crescente, como exemplo, a produção de enzimas.

O mercado de enzimas industriais tem um grande impacto na economia mundial. Microrganismos (bactérias, leveduras e fungos) são a fonte principal de enzimas para aplicação em diferentes processos industriais. Diferentes biomas podem ser explorados como fonte de microrganismos visando sua exploração biotecnológica (Ticona, 2019). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi isolar fungos de diferentes matrizes como o solo e folhas de plantas frutíferas brasileiras para, posteriormente utilizá-los em bioprocessos para a produção de enzimas.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras para isolamento dos microrganismos

Coletaram-se amostras de diferentes tipos de solo de plantas frutíferas. As amostras foram coletadas próximas a raízes das plantas (solo rizosférico). Coletaram-se 50 g do solo, com profundidade de 10 cm das árvores frutíferas de limão, manga, banana, amora, acerola e seriguela. As amostras foram coletadas utilizando-se de espátula e transportadas ao laboratório para pesagem. Após a pesagem, as amostras foram armazenadas em sacos plásticos sob refrigeração a 10° C. Além de amostras de solo, foram também realizadas coletas de folhas das árvores de abacate, acerola, amora, goiaba, limão, manga, ponkan e seriguela.

Preparo do meio de isolamento dos microrganismos

A inoculação dos fungos realizou-se a partir do preparo do meio de ágar de batata dextrosado (PDA), preparado na proporção de 39g de meio para 1000 mL de água destilada. Para o preparo, após adicionar o meio em pó à água, levou-se a mistura à chapa de aquecimento a 100°C, sob movimentação da mistura, até que a solução levantasse fervura. Após fervura, a solução do meio foi distribuída em tubos de ensaio, com aproximadamente 7mL da solução; estes, por sua vez, foram devidamente tampados com tampão de algodão e papel alumínio, e levados à autoclave para esterilização sob temperatura de 121°C durante 15 min. Os tubos esterilizados foram inclinados a 45 graus sobre suporte e resfriados por aproximadamente 24 horas. Depois, os meios foram armazenados sob refrigeração até o momento da inoculação.

Isolamento e inoculação de microrganismos a partir das amostras de solo e folhas

Para o isolamento dos microrganismos potencialmente presentes nas amostras de solo e folhas coletadas, pesou-se em béqueres 5g a 10g de cada amostra adicionando-se a cada uma 20 mL de água destilada. As amostras de solo não passaram por processo de tamisação e as amostras de folhas não foram submetidas a nenhum processo de desinfecção superficial. As soluções foram submetidas a agitação magnética branda, visando a completa dissolução da parte sólida. As soluções foram então inoculadas com alça de inoculação estéril nos tubos de ensaio contendo o meio PDA. O processo foi realizado em triplicata para cada amostra. Em seguida, os tubos de ensaio foram acondicionados em estufa à temperatura de 30°C durante 48h para o crescimento dos microrganismos. Neste estudo inicial, não foi possível identificar se os fungos isolados são saprófitos, endófitos ou fitopatogênicos.

Visando a separação de cada espécie de microrganismo obtida através da inoculação, os microrganismos foram repicados várias vezes até obtenção de culturas puras através de análise macro morfológica. O repique foi realizado utilizando-se alça de inoculação esterilizada para a transferência dos esporos dos fungos obtidos na etapa anterior para um novo meio de cultura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Preparo das amostras e inoculação

O preparo das amostras e o isolamento dos microrganismos do solo e das folhas foram realizados conforme apresentados nas Figuras 1, 2 e 3.



FIGURA 1. Amostras de solo preparadas para a inoculação em meio PDA (Fonte: Autoral)



FIGURA 2. Amostras de folhas preparadas para a inoculação em meio PDA (Fonte: Autoral)

Após 48h em estufa, foi possível observar o crescimento dos microrganismos. Cada amostra apresentou diferentes resultados, como por exemplo, fungos de aspecto aveludado, algodinoso, de cores variadas com tonalidades brancas, acinzentadas, pretas e esverdeadas (Figura 3).



FIGURA 3. Crescimento dos microrganismos das amostras isoladas (Fonte: Autoral)

Isolamento de microrganismos das amostras de solo e folhas

Para as amostras de solo, inicialmente houve crescimento de microrganismos (Figura 4). Porém, ao passo que as repicagens ocorreram, percebeu-se crescimento inadequado dos microrganismos e dificuldade de separar as culturas. As amostras de solo foram dessa forma descartadas. Muito provavelmente as condições de crescimento desses microrganismos não foram representadas no meio de cultivo utilizado no laboratório. Condições relacionadas aos nutrientes do meio, como por exemplo, excesso ou falta de algum nutriente específico, de algum cofator que determine ou auxilie seu crescimento, podem ter prejudicado seu desenvolvimento. O insucesso do isolamento desses microrganismos pode estar relacionado ao tipo de meio de cultura que foi utilizado, outros meios de cultura poderiam ter sido testados nessa parte de isolamento. Os meios de isolamento em vitro diferem muito das condições de crescimento in situ, no qual esse microrganismo se desenvolveu.



FIGURA 4. Crescimento dos microrganismos nas amostras de solo.

Para as amostras de folhas (Figura 5), observou-se que as do pé de seriguela apresentaram cor escura, com esporos mais claros; as amostras de folhas de goiaba, apresentaram cores variadas, entre esbranquiçada e esverdeada, com textura de algodão; as amostras das folhas de ponkan apresentaram nas inoculações iniciais a predominância de fungos semelhantes a bolores, de aparência esbranquiçada e aveludada. Houveram aparições pontuais de fungos de coloração escura. Dentre as os microrganismos isolados das folhas de plantas frutíferas, foi possível isolar culturas puras das amostras de seriguela, ponkan e goiaba.



FIGURA 5. Crescimento de fungos a partir de amostra das folhas de Siriguela (a). Goiaba (b), Ponkan (c) (Fonte: Autoral)

As linhagens onde foi possível um isolamento de cultura pura, foram mantidas sob refrigeração a 5°C em meios PDA e estas linhagens serão testadas em etapa futura em processo de fermentação sólida. Este estudo é o início de um trabalho maior que visa a produção de metabólitos de interesse industrial, como as enzimas.

CONCLUSÕES

Das 14 amostras coletadas, sendo 5 amostras de solo e 9 amostras de folhas de frutíferas, foi possível isolar 3 linhagens provenientes das folhas de plantas frutíferas, o que representa em torno de 21% do total de amostras. Através do método de isolamento utilizado, percebeu-se maior facilidade em isolar fungos das folhas se comparados ao solo. Apesar de existirem muitos microrganismos no solo, a metodologia utilizada não se mostrou eficiente necessitando de alterações nos protocolos de isolamento.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Sabrina de B. da Silva e Vania Battestin Wiendl contribuíram com a concepção, coleta de dados, análises e discussão dos resultados. Todos os autores contribuíram com a revisão do trabalho e aprovaram a versão submetida.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao IFSP pela concessão da bolsa de Iniciação Científica (PIBIFSP).

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. R. M., COLLARES, D. G., BARBOSA, P. F. D. Bioprospeção microbiana. **Embrapa**, 2015. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/137596/1/bioprospecao-microbiana-web.pdf> . Acesso em 11/06/2024.

ALVES, M. L. G., BRITO, N. J., ALVES, S. S. L., COSTA, P. M. S., GUIMARÃES, C. J., MANSO, M. P. P., PEREIRA, J. V. M., PESSOA, C. Ó. O impacto da bioprospeção para o descobrimento de novas moléculas terapêuticas. **Revista Fitos**. P. 293 – 314, 2022.

AMARAL, C. S. T., SOUZA, O., HILKNER, S. L., SILVA, J. G., FATORI, T. L. N. Novos caminhos da biotecnologia: As inovações da indústria 4.0 na saúde humana. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 23, n. 3, p. 203-231, 2020.

SILVA, F. D. C., FERNANDES, P. L.C. Os desafios da bioprospecção da flora brasileira na descoberta de novas moléculas para o tratamento do câncer: uma revisão integrativa (farmácia). **Real, repositório Institucional**. V. 2, n. 2, p. 1-8, 2023.

TICONA, A. R. P. Bioprospecção e caracterização de bactérias anaeróbicas como fonte de enzimas industriais. **Tese de Doutorado**. Universidade de Brasília. p. 162, 2019.