

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

ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS, DEGRADADORES DE CELULOSE DOS INTESTINOS DE CUPINS

RONE EMERSON PINHEIRO JUNIOR¹, MARCOS VENICIUS DE CASTRO²,

¹ Aluna da Graduação: Ciências naturais habilitação em química, Bolsista PIBIC-EM-CNPq, IFSP, Campus São João da Boa Vista, pinheiro.rone@aluno.ifsp.edu.br

² Professor Doutor em, Campus São João da Boa Vista, marcos.castro@ifsp.edu.br
Área de conhecimento (Tabela CNPq): 1.03.03.04-9 Sistemas de Informação

RESUMO:

Os cupins são conhecidos por sua habilidade em degradar a celulose e outros polissacarídeos presentes em sua dieta de madeira, graças à simbiose com uma diversidade de micro-organismos em seus intestinos. A maioria dos estudos sobre os simbiosites de cupins se concentra em bactérias e protozoários, mas a presença e importância dos fungos e actinobactérias também têm sido cada vez mais investigados. As actinobactérias são bactérias filamentosas encontradas nos intestinos de cupins que desempenham um papel importante na degradação de material lignocelulósico. Estudos destacam a diversidade desses simbiosites. Os degradadores naturais de lignina mais bem caracterizados são os fungos da podridão branca. Várias espécies deste grupo de fungos produzem enzimas extracelulares como a lignina peroxidase (Lip), manganês peroxidase (MnP) e lacases. O isolamento de organismos com capacidade de produzir enzimas que degradam celulose e tenham potencial para degradar lignocelulose pode ser um passo importante na busca por soluções sustentáveis para o tratamento e aproveitamento de resíduos lignocelulósicos gerados por diversas atividades humanas.

PALAVRAS-CHAVE: Cupins, Intestinos, Isolamento, Simbiosites.

Isolation of cellulose-degrading microorganisms from termite intestines

ABSTRACT: Termites are known for their ability to degrade cellulose and other polysaccharides present in their wooden diet, thanks to symbiosis with a diversity of microorganisms in their intestines. Most studies on termite symbionts focus on bacteria and protozoa, but the presence and importance of fungi and actinobacteria have also been increasingly investigated. Actinobacteria are filamentous bacteria found in the intestines of termites that play an important role in the degradation of lignocellulosic material. Studies highlight the diversity of these symbionts. The best characterized natural lignin degraders are white rot fungi. Several species of this group of fungi produce extracellular enzymes such as lignin peroxidase (Lip), manganese peroxidase (MnP) and laccases (GOLD and ALIC, 1993; HIGUCHI, 2004; AHMAD et. al., 2010). The isolation of organisms with the capacity to produce enzymes that degrade cellulose and have the potential to degrade lignocellulose can be an important step in the search for sustainable solutions for the treatment and use of lignocellulosic waste generated by various human activities.

KEYWORDS: Termites, Intestines, Isolation, Symbionts.

INTRODUÇÃO

A simbiose entre cupins e micro-organismos em seus intestinos representa um modelo fascinante de cooperação biológica, essencial para a degradação de lignocelulose, um dos maiores desafios na bioconversão de biomassa vegetal (GOLD e ALIC, 1993). Os cupins, através de seus simbioses, conseguem decompor eficientemente a celulose e a lignina, componentes majoritários da madeira, o que desperta grande interesse biotecnológico. No entanto, a maioria das pesquisas concentra-se em bactérias e protozoários, deixando fungos e actinobactérias em segundo plano, apesar de sua relevância crescente na degradação da lignina e na produção de enzimas extracelulares como lignina peroxidase e manganês peroxidase (HIGUCHI, 2004).

O tratamento químico, para degradar a lignina, pode ter alguns efeitos negativos para o meio ambiente. Nesse sentido, o tratamento biológico é considerado a melhor escolha, pois utiliza microrganismos funcionais como agentes para produzir enzimas hidrolíticas (ZABED et al., 2016 e 2017; BRODA & YELLE, 2022).

O objetivo deste trabalho foi estudar linhagens de bactérias, actinomicetos e fungos isolados do trato digestório de cupins e foram capazes de degradar celulose. A justificativa reside no potencial biotecnológico desses simbioses para o desenvolvimento de novas tecnologias sustentáveis, como a produção de biocombustíveis e o tratamento de resíduos lignocelulósicos (AHMAD et al., 2010). O trabalho visou, portanto, isolar, estimar a eficiência das linhagens em degradar celulose.

MATERIAL E MÉTODOS

Os espécimes (operários e soldados) foram coletados em cupinzeiros localizados no IFSP-Campus São João da Boa Vista. A coleta foi realizada diretamente de ninhos, característicos de cupins de solo.

Para isolamento dos microrganismos, operários e soldados foram esterilizados superficialmente pela seguinte sequência: Imersão em etanol 70% por 1 min, solução de 0,5% de hipoclorito de sódio por 5 minutos, etanol 70% por 5 minutos. Na sequência, os espécimes foram submetidos a três banhos sucessivos em água destilada estéril (3 min/cada). Os espécimes foram dissecados para a coleta do intestino. Os intestinos obtidos de dez indivíduos de cada casta (operário e soldado) da espécie estudada, foram transferidos para tubo contendo 200 µL de solução de ringer-lactato estéril e, em seguida, macerados cuidadosamente com auxílio de um bastão de vidro. Os macerados obtidos foram utilizados para o isolamento de colônias após a realização de diluições seriadas.

Cada diluição foi agitada em vórtex e alíquotas de 50 µL foram plaqueadas nos meios de cultura com a seguinte composição (em g/L):

1) Para isolamento das bactérias: Meio Ágar Nutriente modificado: Extrato de Carne (1,0), Extrato de Levedura (2,0), Peptona (5,0), Cloreto de Sódio (5,0), KNO₃ (2,0), NaCl (2,0), KH₂PO₄ (3,0), K₂HPO₄ (6,0), MgSO₄.7H₂O (0,05), CaCO₃ (0,02), FeSO₄.7H₂O (0,01), Ágar (15), pH 7,0-7,4. Suplementado com 100 µg/mL do antifúngico Nistatina e Ciclopirox.

2) Para isolamento das actinobactérias: Meio ISP-2 (PRIDHAM et al., 1957) modificado: Extrato de carne (1,0), Extrato de Levedura (2,0), Peptona (5,0), Cloreto de Sódio (5,0), Extrato de Malte (10,0), Dextrose/Glicose (4,0), Amido (5,0), KNO₃ (2,0), NaCl (2,0), KH₂PO₄ (3,0), K₂HPO₄ (6,0), MgSO₄.7H₂O (0,05), CaCO₃ (0,02), FeSO₄.7H₂O (0,01), Ágar (15), pH 7,2. Suplementado com 100 µg/ml do antifúngico Nistatina e Ciclopirox.

3) Para Isolamento dos fungos: Meio BDA suplementado com sais: KNO₃ (2,0), NaCl (2,0), K₂HPO₄ (2,0), MgSO₄.7H₂O (0,05), CaCO₃ (0,02), FeSO₄.7H₂O (0,01), Ágar (15). Suplementado com 100 µg/ml do antibiótico terramicina e Cloranfenicol.

Os meios foram cultivados até o aparecimento das colônias, que foram pinçadas com a alça de níquel-cromo e transferidas para os meios específicos.

Para seleção das linhagens para teste de atividade de carboximetilcelulase (CMCase), as linhagens obtidas foram cultivadas em meio de sais minerais (BRECCIA et al., 1995) modificado com a seguinte composição em (g/L) NaNO₃ (1,2), KH₂PO₄ (3,0), K₂HPO₄ (6,0), MgSO₄.7H₂O (0,2), CaCl₂.2H₂O (0,05), ZnSO₄.7H₂O (0,001), MnSO₄.7H₂O (0,01), Ágar (15,0) suplementado com 1 % (p/v) de carboximetilcelulose sal sódico de baixa viscosidade ou 1 % (p/v) 1000ml de água destilada.

Para determinação da atividade de carboximetilcelulase (CMCase), apenas as linhagens que obtiverem crescimento no meio de triagem com carboximetilcelulose como única fonte de carbono foram utilizadas para o teste do Vermelho Congo. As linhagens foram cultivadas em meio de sais minerais (BRECCIA et al., 1995) modificado, conforme composição já descrita acima. A atividade de

carboximetilcelulase (CMCase) foi determinada pela utilização do método de coloração com vermelho Congo (Carder 1986). As linhagens foram inoculadas sob forma de spots, 1 por placa, com auxílio de uma alça de platina. A incubação foi conduzida a 28 °C durante 12 dias. Após este período, para a visualização da formação de zonas de hidrólise, foi adicionado à superfície das placas, solução Vermelho Congo 0,1 % (p/v), permanecendo em contato com o meio por 10 minutos. Após este período, foram realizadas lavagens sucessivas com solução NaCl 1M até a visualização de zonas de hidrólise circunscrevendo o crescimento das colônias. A medida das zonas de hidrólise e da colônia foi realizada com auxílio de uma régua, e os resultados expressos em cm.

A degradação da celulose foi avaliada através da medição do halo de degradação formado pelos fungos na placa. A área do halo foi calculada utilizando a fórmula $A = \pi \times r^2$, onde r é o raio do halo medido. A área do halo foi então dividida pela área total da placa, que é de 1963,49 mm². O percentual de degradação foi calculado multiplicando por 100, expressando isso como porcentagem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise microbiológica dos cupins revelaram uma diversidade significativa de microrganismos no trato digestivo, com predominância de actinobactérias e fungos. Inicialmente foi possível isolar 30 linhagens de bactérias, porém ao realizar os testes os resultados mostraram que algumas linhagens não tiveram atividade em meio celulose, ou seja, não houve crescimento. As linhagens que foram selecionadas no meio celulose foram: B22; B30; B28; B12 e B5. Já no teste de vermelho congo somente a linhagem B12 foi capaz de produzir carboximetilcelulase extracelular, apresentado um halo de degradação com uma extensão de 0,006% de degradação da celulose (Figura 1). Porém as demais B22; B30; B28 e B5 não criaram halo mas mostraram crescimento no meio contendo carboximetilcelulose. Esse crescimento pode sugerir que as bactérias conseguiram sobreviver utilizando a carboximetilcelulose, mas não produzem carboximetilcelulase extracelular.



FIGURA 1: Teste do vermelho congo da linhagem de bactéria (B12)

As linhagens de fungos apresentaram resultados variáveis no estudo sobre degradação de celulose. Foram isoladas 40 linhagens das quais apenas 7 foram capazes de demonstrar atividade significativa da carboximetilcelulase extracelular, demonstrada pela formação de halo de degradação no teste de vermelho congo.

Observou-se uma variação significativa entre as linhagens, com percentuais de degradação que variam de 1,44% a 57,57%, indicando diferenças na produção das enzimas ou em características específicas de cada linhagem. As linhagens F6 e F9 apresentaram as maiores eficiências, com percentuais de 39,0% e 57,57%, respectivamente (Figura 3).

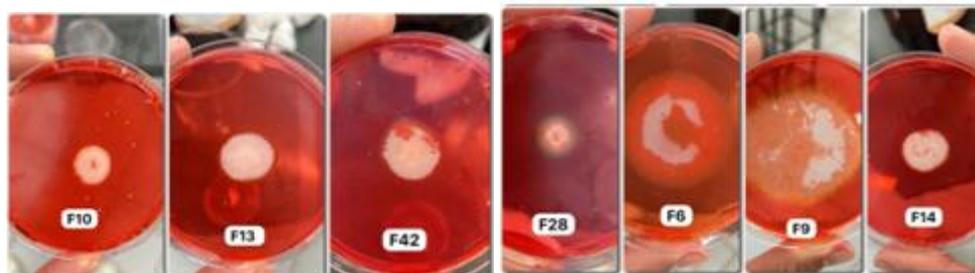


Figura 3: Teste vermelho congo nos fungos.

No gráfico 1, as 7 linhagens selecionadas estão representadas com seus respectivos percentuais de degradação de celulose onde cada barra representa o percentual de degradação da carboximetilcelulose por cada linhagem testada, conforme cálculo descrito na metodologia.

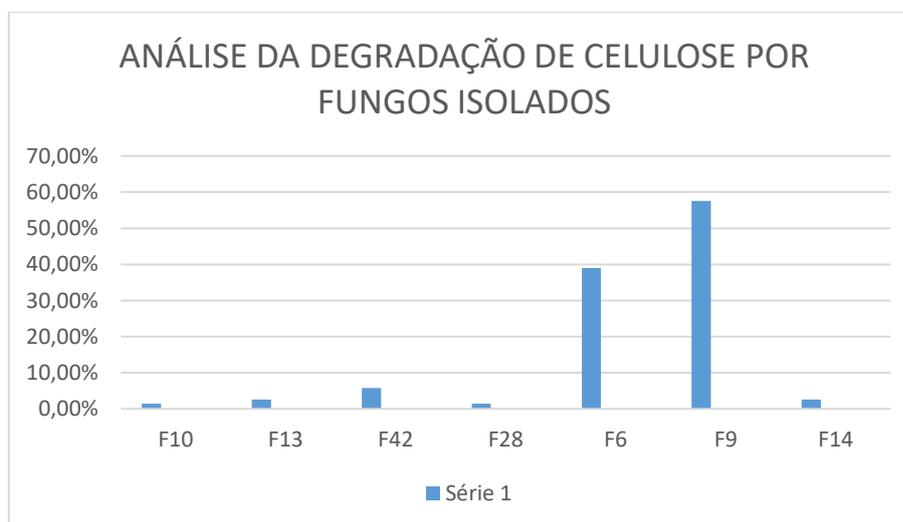


Gráfico 1 – Percentuais de degradação da carboximetilcelulose por diferentes linhagens de fungos

Esses dados sugerem que algumas linhagens têm um potencial considerável para a degradação da celulose, com possíveis aplicações industriais. A linhagem F9, com 57,57% de degradação, foi particularmente notável, indicando um potencial elevado para a decomposição da celulose.

Além dos fungos, o estudo analisou a presença e a capacidade de degradação de actinobactérias isoladas. Foi observado que as actinobactérias também demonstraram resultados positivos na degradação da celulose, com eficiência semelhante às linhagens de fungos analisadas. Esses resultados contribuem para a diversidade de microrganismos com potencial para aplicação na biodegradação de celulose. A presença de actinobactérias com capacidade significativa de degradação amplia o potencial biotecnológico desses microrganismos, sugerindo que uma abordagem multifacetada envolvendo diferentes tipos de microrganismos pode ser mais eficaz na degradação da celulose.

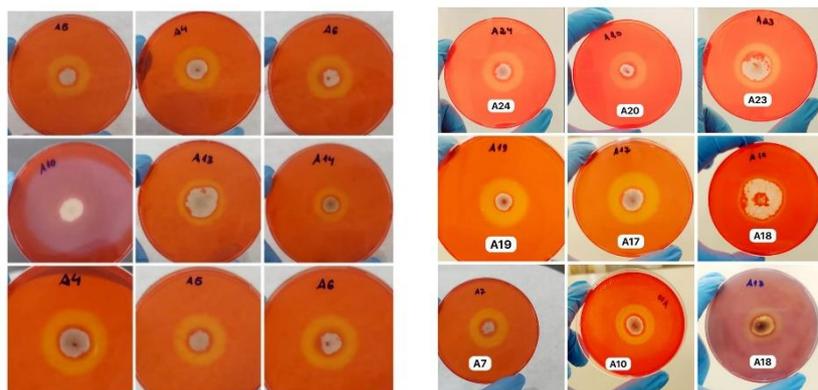
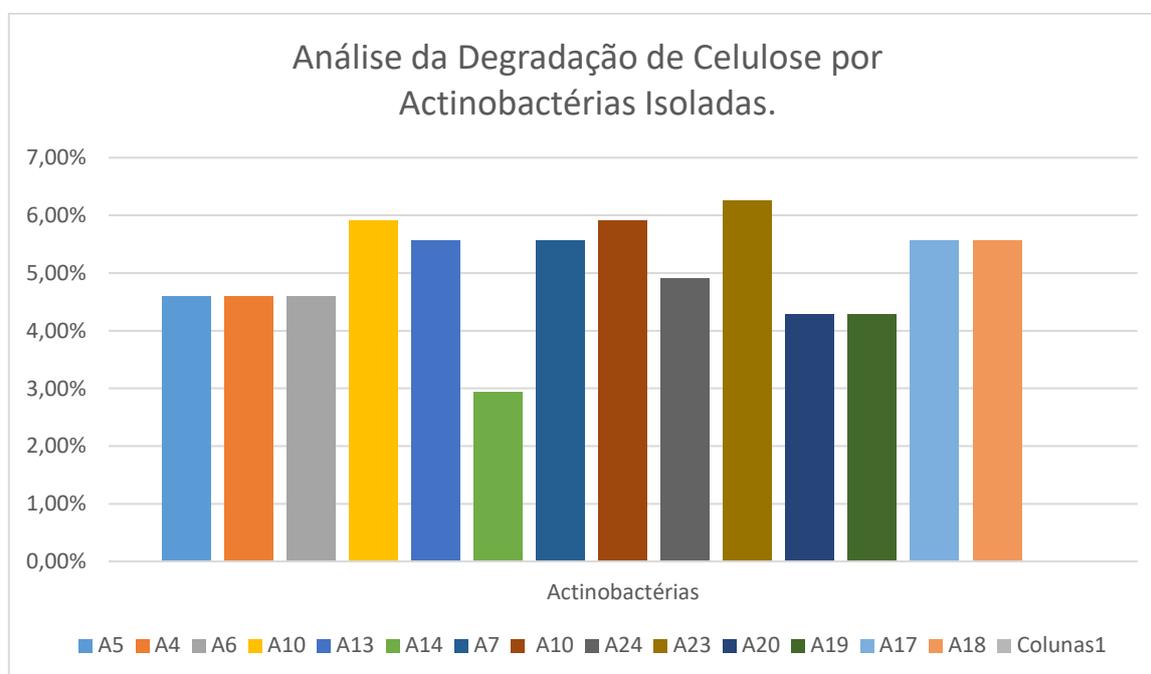


FIGURA 4 : Teste do vermelho congo das actinobactérias

O gráfico 2 mostra o percentual de degradação de celulose por diferentes linhagens de actinobactérias variando de 2,94% a 6,25%. A linhagem A23 apresentou a maior degradação (6,25%), enquanto A14 foi a menos eficiente (2,94%)



Algumas linhagens, como A4, A5 e A6, apresentaram percentuais próximos, indicando que podem ser o mesmo organismo ou podem ter mecanismos semelhantes de degradação. Embora A15 e A16 tenham formado as maiores colônias, isso não se refletiu na eficiência de degradação, sugerindo que o tamanho da colônia não está diretamente relacionado à capacidade de degradar celulose.

Esses resultados destacam a importância de investigar mais a fundo as linhagens mais eficientes, como A23, para potencial uso em aplicações biotecnológicas, como a produção de biocombustíveis ou o tratamento de resíduos orgânicos.

CONCLUSÕES

Em resumo, o projeto enfrentou obstáculos consideráveis, desde a obtenção e preservação das linhagens até a execução dos testes finais. No entanto, apesar das dificuldades, a experiência adquirida ao longo do processo estabeleceu uma base sólida para futuras pesquisas.

Este estudo investigou a capacidade de degradação da celulose por fungos e actinobactérias isoladas do intestino de cupins, revelando resultados promissores e valiosos para futura aplicações.

Os resultados puderam fornecer insights valiosos sobre a ecologia microbiana dos cupins e abriu possibilidades para futuras pesquisas mais avançadas. Recomenda-se que futuros estudos se concentrem na otimização das condições de degradações e na exploração de aplicações específicas desses microrganismos para maximizar sua eficiência e utilidade em processos industriais.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

R.E.P.J atuou na execução das atividades do projeto, bem como na redação do trabalho. M.V.C - foi o orientador do projeto - procedeu com a metodologia e experimentos, além de contribuir com a curadoria e análise dos dados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Doutor Marcos Venicius de Castro, pela orientação. Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, Câmpus São João da Boa Vista, pelo fornecimento de apoio e materiais que foram fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa. Agradeço a CAPES pela bolsa de ensino PIBIC-EM - CNPq (Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica voltados aos alunos do Ensino Médio), que tornou este projeto possível.

REFERÊNCIAS

AHMAD, M et al. Development of novel assays for lignin degradation: comparative analysis of bacterial and fungal lignin degraders. **Molecular BioSystems**, v. 6, p. 815-821, 2010. DOI: 10.1039/b908966g. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/b908966g>>. Acesso em: 27 maio 2023.

BRODA, M.; YELLE, D. J.; SERWAŃSKA, K. Bioethanol production from lignocellulosic biomass—challenges and solutions. **Molecules**, v. 27, n. 24, p. 8717, 2022. DOI: 10.3390/molecules27248717. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/27/24/8717>>. Acesso em: 27 maio 2023.

GOLD, M. H.; ALIC, M. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Microbiological Reviews**, v. 57, n. 3, p. 605-622, 1993. DOI: 10.1128/MMBR.57.3.605-622. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372928/pdf/microrev00026-0107.pdf>>. Acesso em: 27 maio 2023.

HIGUCHI, T. Microbial degradation of lignin: Role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. **Proceedings of the Japan Academy, Series B, Physical and Biological Sciences**, v. 80, n. 5, p. 204-214, 2004. PMID: PMC8157907. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8157907/>>. Acesso em: 27 maio 2023.

PRIDHAM, T. G.; ANDERSON, P.; FOLEY, C. Selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*. **Antibiotics**, p. 947-953, 1957.

ZABED, H. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 751-774, 2016. DOI: 10.1016/j.rser.2016.08.038. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038>>. Acesso em: 27 maio 2023.