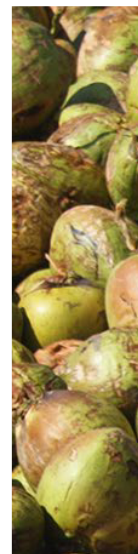
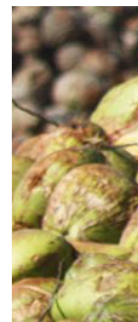


Caracterização e cultivo de microrganismos celulolíticos isolados de resíduos da indústria de processamento de coco (*Cocos nucifera* L.), e o desenvolvimento de um acelerador biológico para biodegradação



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
109**

Caracterização e cultivo de microrganismos
celulolíticos isolados de resíduos da
indústria de processamento de coco
(*Cocos nucifera* L.), e o desenvolvimento de
um acelerador biológico para biodegradação

*Alessandro Riffel
Maria Urbana Corrêa Nunes
Ayhessa Cristina Santos de Lima
Natália Neutzling Camacho
Fernanda dos Santos Dourado
Luis Henrique de Barros Soares*

Embrapa Agrobiologia
Seropédica, RJ
2022

Unidade Responsável pelo conteúdo:
Embrapa Agrobiologia
Rodovia BR 465, km 7
CEP 23891-000, Seropédica, RJ
Caixa Postal 74.505
Fone: (21) 3441-1500
Fax: (21) 2682-1230
www.embrapa.br/agrobiologia
www.embrapa.br/sac

**Comitê Local de Publicações
da Embrapa Agrobiologia**

Presidente
Bruno José Rodrigues Alves

Secretária-Executiva
Carmelita do Espírito Santo

Membros
*Claudia Pozzi Jantalia, Janaina Ribeiro Costa
Rouws, Luc Felicianus Marie Rouws, Luis
Cláudio Marques de Oliveira, Luiz Fernando
Duarte de Moraes, Marcia Reed Rodrigues
Coelho, Marta dos Santos Freire Ricci de
Azevedo, Nátia Élen Auras*

Unidade Responsável pela edição:
Embrapa Agrobiologia

Normalização bibliográfica
Carmelita do Espírito Santo CRB 7/5043

Tratamento das ilustrações
Maria Christine Saraiva Barbosa

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Maria Christine Saraiva Barbosa

Foto da capa
Fernando Cintra

1ª edição
Publicação digital – PDF (2022)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agrobiologia

C258

CHARACTERIZAÇÃO e cultivo de microrganismos celulolíticos isolados de resíduos da indústria de processamento de coco (*Cocos nucifera* L.), e o desenvolvimento de um acelerador biológico para biodegradação. / Alessandro Riffel *et al.* – Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2022.

Livro Digital. (PDF): (Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 109).

ISSN: 1676-6709.

1. Bactérias; hidrolíticos. 2. enzimas. 3. fibra de coco. I. Riffel, Alessandro. II. Nunes, Maria Urbana Corrêa. III. Lima, Ayhessa Cristina Santos de. IV. Camacho, Natália Neutzling. V. Dourado, Fernanda dos Santos. VI. Soares, Luis Henrique de Barros. VII. Embrapa Agrobiologia. VIII. Série.

634.61 - CDD (23. ed.).

Sumário

Resumo	7
Abstract	9
Introdução	10
Material e Métodos	11
Resultados e Discussão	18
Conclusões	27
Referências Bibliográficas	27

Caracterização e cultivo de microrganismos celulolíticos isolados de resíduos da indústria de processamento de coco (*Cocos nucifera* L.), e o desenvolvimento de um acelerador biológico para biodegradação

Alessandro Riffel^{1†}

Maria Urbana Corrêa Nunes²

Ayhessa Cristina Santos de Lima³

Natália Neutzling Camacho⁴

Fernanda dos Santos Dourado⁴

Luis Henrique de Barros Soares^{4*}

Resumo – Neste trabalho, buscou-se inicialmente a caracterização funcional de um grupo de 11 isolados microbianos obtidos em uma área de descarte de resíduos da agroindústria de processamento de cocos (*Cocos nucifera* L.) e seus derivados. A partir do sequenciamento do 16S rRNA identificou-se os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Pantoea* e *Ochrobactrum*. As estirpes BR 14004 de *Pseudomonas* sp. e BR 14009 de *Bacillus* sp. produziram os índices mais altos de hidrólise de celulose e hemicelulose, medidos em um teste preliminar em placas. Em cultivos submersos, foram testados o crescimento celular e a produção de enzimas em quatro meios de cultura tradicionais, além de desenvolver um meio básico específico, enriquecido com celulose e hemiceluloses. Neste último, a atividade hidrolítica também foi quantificada em dois níveis de temperatura. A estirpe BR 14004 confirmou a produção maior de atividade de endo e exo-celulases. Porém, BR 14009 apresentou maior atividade hemicelulolítica. Para o desenvolvimento de um acelerador de compostagem, produziu-se um protótipo contendo estes dois isolados e testou-se o desempenho hidrolítico comparativamente contra um formulado padrão contendo o fungo *Trichoderma aureoveridae*. O produto acelerador produziu, em 90 dias, uma quantidade de proteína solúvel quase 192% maior

^{1†} Embrapa Tabuleiros Costeiros, UEP Rio Claro, Maceió, AL (*in memoriam*).

² Embrapa Tabuleiros Costeiros, Av. Gov. Paulo Barreto de Menezes, nº 3250, Jardins, Aracaju, SE, CEP 49025-040.

³ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia BR-465, km 07, Seropédica, RJ, CEP 23891-001.

⁴ Embrapa Agrobiologia, Rodovia BR-465, km 07, Seropédica, RJ, CEP 23891-000. *Autor para correspondência: e-mail luis.soares@embrapa.br.

do que o padrão, 46% a mais de hidrólise de açúcares redutores totais, e solubilizou quase 5,6 vezes mais compostos fenólicos, demonstrando a capacidade de redução no tempo de biodegradação. A viabilidade do produto formulado, ao longo do tempo de prateleira, manteve-se estável até o terceiro mês, demonstrando bom potencial para aplicações em condições de agroindústria e produção em escala comercial.

Termos para indexação: bactérias; hidrolíticos; enzimas; fibra de coco.

Characterization and cultivation of cellulolytic microorganisms isolated from residues of the coconut processing industry (*Cocos nucifera* L.), and the development of a biodegradation accelerator

Abstract – The aim of this work was to perform functional characterization of a group of 11 microbial isolates obtained in a waste disposal area of the coconut (*Cocos nucifera* L.) processing agroindustry. The sequencing of 16S rRNA, allowed the identification of *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Ochrobactrum* genera. *Pseudomonas* sp. strain BR 14004 and *Bacillus* sp. BR 14009 produced highest rates of cellulose and hemicellulose hydrolysis, measured in a screening plate test. Cell growth and enzyme production in submerged cultures were tested in four traditional culture media, in addition to the development of a specific basic medium, enriched with cellulose and hemicelluloses. In this culture medium, the hydrolytic activity was also quantified at two temperature levels. Strain BR 14004 confirmed the highest production of endo and exo-cellulases activity. However, BR 14009 showed higher hemicellulolytic activity. For the development of a compost accelerator, a prototype was produced containing these two isolates and the hydrolytic performance was compared against a standard formulation containing the fungus *Trichoderma aureoveridae*. The biodegradation accelerator Prototype produced, in 90 days, an amount of soluble protein almost 192% greater than the standard formulation, 46% more hydrolysis of reducing sugars, and it solubilized almost 5.6 times more phenolic compounds, thus demonstrating the ability to reduce time of biodegradation. The stability of the formulated product, measured by its shelf life, remained constant until the third month of storage, demonstrating good potential for applications in agro-industry conditions and production on a commercial scaler.

Index terms: bacteria; hydrolytics; coconut fibres.

Introdução

O Brasil é o quinto maior produtor de coco (*Cocos nucifera* L.) do mundo, colhendo anualmente ao redor de 1,6 bilhões de frutos em uma área cultivada de 187,5 mil ha. Isto corresponde a apenas 3,7% da produção mundial, visto que os três principais produtores, Indonésia, Filipinas e Índia, respondem por mais de 74% da produção mundial, que gira ao redor de quase 63 milhões de toneladas (Faostat, 2021).

Entre os dez principais produtores globais, o Brasil se destaca pela maior produtividade, com mais de 13 ton/ha, e rendimento anual crescente na última década. A região Nordeste concentra mais de 80% da área colhida, e 73,5% da produção. Brainer (2021) ressalta que apesar da desaceleração econômica global causada pela crise sanitária de Covid-19, o consumo nacional de coco cresce acima de 4% ao ano, e o valor da produção nacional de coco ultrapassa um bilhão de reais. Além do coco *in natura*, água de coco e coco ralado são os principais produtos derivados, comercializados no mercado interno do Brasil. Para exportação, o óleo de coco, coco *in natura* e coco dessecado dominam a participação. Importante destacar que o país importa mais do que exporta em coco e derivados, o que gera um déficit comercial acima de US\$10 milhões anuais.

O coco é um fruto simples, classificado como drupa, com uma única semente. A casca do coco quando verde é relativamente fina e lisa, e chama-se epicarpo. Por debaixo dela, encontra-se uma espessa camada fibrosa, o mesocarpo, que envolve uma camada muito mais dura, o endocarpo, também conhecido como casca da semente. Dentro desta, existe uma parte succulenta de cor branca, o endosperma, conhecido como polpa, e que envolve o embrião. Quando está verde, o coco contém bastante água em seu interior, que é o endosperma líquido, e a polpa branca mole e pouco desenvolvida. À medida que vai amadurecendo a parte carnosa se torna mais espessa e consistente, e a quantidade de água diminui (Fontes; Ferreira, 2006).

A cultura do coco gera uma grande quantidade de resíduos fibrosos, tanto no processo de consumo *in natura* da água de coco, no estado conhecido como coco verde, quanto na produção agroindustrial do leite de coco, coco ralado, e outros produtos derivados do coco no estado de coco seco (Siqueira *et al.*, 2002; Cabral *et al.*, 2016). Em virtude de suas características

rústicas, durabilidade e resistência, as fibras do coco oriundas do mesocarpo, e que representam em torno de 30% do peso total dos frutos, podem ser usadas para uma série de aplicações, como em tapetes, cordas, materiais de cobertura, isolamentos, etc. Todavia o desenvolvimento destas aplicações não acompanha a quantidade crescente de resíduos gerados. Esmeraldo *et al.* (2010) compilaram alguns resultados sobre a composição química destes produtos, e definiram que a fibra de coco-anão é rica em lignina, entre 30-45%, o que confere elevada resistência mecânica ao material. Assim, é consenso que a fibra de coco é rica em fibras de celulose (32-43%) com hemiceluloses e lignina como materiais de ligação (Silva *et al.* 2000).

Em função da sua composição e estrutura, a biodegradação natural das fibras de coco é um processo lento e complexo, que envolve a ação de diversas enzimas produzidas por microrganismos presentes no ambiente. Diversos grupos de fungos e bactérias podem ser encontrados associados ao processo de biodecomposição deste material no ambiente. (Antheunisse, 1981; Theradimani *et al.*, 2019).

Neste trabalho, buscou-se isolar e caracterizar microrganismos relacionados ao processo de biodegradação natural de fibras de coco, com foco no grupo de bactérias ambientais com habilidade celulolítica e hemicelulolítica, oriundas de áreas acumuladoras de resíduos da agroindústria de processamento de cocos. A partir da caracterização genotípica e funcional deste grupo de isolados, desenvolveu-se estratégias para cultivo, avaliando meios de cultura e condições para o desenvolvimento de formulações mistas. Por fim, testou-se a eficiência de um protótipo de produto formulado, com a finalidade de ser usado como acelerador do processo de biodegradação.

Material e Métodos

Isolamento dos microrganismos

A coleta do resíduo industrial orgânico utilizado para o isolamento de microrganismos foi realizada em uma das maiores e tradicionais indústrias de processamento de cocos do país, localizada em Maceió (AL). Descartes de cascas de coco verde, em estágio de bio-deterioração natural, foram coletadas em diferentes depósitos de resíduos, localizados ao ar livre. As cascas foram

superficialmente higienizadas com álcool iodado e em seguida desintegradas em um triturador de cocos. Várias amostras de aproximadamente 10g correspondentes ao epicarpo, mesocarpo e endocarpo foram submetidas ao processo de extração com 90 mL de solução salina 0,85% estéril, contendo 0,05% de Tween 80, e mantidas em agitador orbital durante 15 minutos a 120 rpm. Após esta etapa, amostras de 100 μ L foram espalhadas com auxílio de alça de Drigalski em placas contendo os meios de cultivo: NYDA (composição em g.L⁻¹: glicose, 10; peptona, 5; extrato de levedura, 5; extrato de carne, 3; ágar, 8), meio NYDA diluído 100x, e meio Coco-agar (uma suspensão contendo 10% de polpa fresca de coco em água, triturada em liquidificador por 2 minutos, com adição de ágar bacteriológico 2%). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica sob três temperaturas: 30, 37 e 45°C, para verificar o caráter mesofílico ou termofílico dos microrganismos.

Seleção dos microrganismos mais eficientes

Para selecionar e agrupar os isolados quanto ao potencial celulolítico e hemicelulolítico, foi utilizado o teste semi-quantitativo que avalia a formação de halo em placas (Rahman *et al.*, 2019). Preparou-se placas com um meio básico contendo solução salina 0,85% e ágar 2%, adicionado de 1% de carboximetilcelulose (CMC, Merck), 1% de galactomanana (Locust bean gum, Sigma-Aldrich), ou 1% de xilana (Beechwood xylan, Sigma-Aldrich). Com uma ponteira de plástico estéril, depositou-se material retirado de uma colônia microbiana previamente crescida em 4 pontos das placas de teste. Estas placas de teste foram incubadas a 30°C por período de tempo adequado até a observação de colônias características, geralmente após 48h. Em seguida, as placas foram banhadas durante 10 minutos com aproximadamente 40 mL de uma solução de Vermelho Congo 1,0 g.L⁻¹ e 1% de etanol P.A. Após a remoção dessa solução, as placas foram descoradas com solução de NaCl 1,0 M, até o aparecimento de halos de degradação. Para determinar o raio das colônias e dos respectivos halos utilizou-se paquímetro digital, e para cada medida somou-se a sua medida ortogonal, de modo a se obter um valor médio. O índice de degradação (ID) foi calculado como a razão entre o diâmetro médio dos halos e o diâmetro médio das colônias (em milímetros). Quatro níveis foram estabelecidos: (1) ID baixo, até 2; (2) ID médio, de 2,1 a 4; (3) ID alto, 4,1 a 8,0; (4) Muito Alto, igual ou superior a 8,1.

Caracterização molecular dos isolados e classificação

Os isolados obtidos no processo anterior foram liofilizados e depositados na Coleção do Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD) na Embrapa Agrobiologia (Seropédica, RJ). Em seguida, foram cultivados em meio TY para crescimento e extração de DNA através do Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega). Após a extração, o DNA foi quantificado por espectrofotometria em equipamento NanoDrop (ThermoFisher), e 50 ng de DNA dos isolados foram submetidas à amplificação do gene 16S rRNA, com uso dos primers 27F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3') e Amp2 (5'-AAG GAG GTGATC CAR CCG CA-3') (Frank *et al.*, 2008). As reações foram realizadas em equipamento SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems) utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 29 ciclos (desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 58°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos) e temperatura de extensão final de 72°C por 5 minutos. O fragmento amplificado foi avaliado em gel de agarose na concentração de 2% e quantificado utilizando o Qubit® (Qubit® Fluorometric Quantitation). Os produtos de PCR foram purificados pelo método enzimático, utilizando a combinação de duas enzimas: Fosfatase Alcalina Termossensível (FastAP) e Exonuclease I (EXO). As reações de sequenciamento foram realizadas usando o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), conforme descrito pelo fabricante e, o sequenciamento do gene 16S rRNA foi posteriormente realizado no sequenciador ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Todo o processo foi realizado nos laboratórios da Embrapa Agrobiologia. As sequências obtidas no processo foram avaliadas e editadas no Sequencing Analysis Software 6 (Applied Biosystems™) e editadas para a obtenção da sequência consenso e correção de possíveis erros utilizando o software Bionumerics. Em seguida, as sequências consenso foram submetidas ao alinhamento e busca por similaridade com a ferramenta BLASTn (NCBI), e o resultado do sequenciamento foi posteriormente depositado na plataforma AleloMicro.

Seleção de meios e otimização das condições de cultivo

Os isolados identificados foram submetidos ao crescimento em 4 meios de cultivo diferentes: LB (Bertani, 1951), Caldo Mueller-Hinton (Mueller; Hinton, 1941), BP e BPSc (Scheidt *et al.*, 2020) (sendo glicose, amido, glicerol e

sacarose, respectivamente, as fontes de carbono). Todos os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer com capacidade de 1 L contendo 180 mL de meio líquido, e iniciados com a adição de 20 mL de inóculo. Os cultivos foram realizados a 32°C em incubadora tipo 'shaker', com agitação orbital de 120 rpm. O crescimento celular foi acompanhado através da leitura da turbidez em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 600 nm (DO_{600}). Para cada microrganismo foi feita correlação entre esta leitura e a contagem celular, em pelo menos três valores na faixa de 0 a 1 unidades de absorbância, para expressar a concentração celular em $UFC.mL^{-1}$.

Ensaio de atividade enzimática e testes bioquímicos

Para a realização dos ensaios de quantificação enzimática, alíquotas de 2,0 mL foram coletadas em microtubos e previamente centrifugadas por 4 min a 11.000 rpm, para clarificação do sobrenadante e descarte do pellet. Este material foi utilizado como amostra para quantificação das atividades e compostos listados a seguir.

Atividade celulolítica total (endo-glicanases)

A atividade de celulases foi determinada através do teste de quantificação de açúcares redutores liberados após incubação da amostra com uma solução de CMC (Merck) a 2% em tampão fosfato de sódio 0,2 M. A uma alíquota de 250 μ L de amostra enzimática em microtubos, foram adicionados 250 μ L do substrato CMC e incubado em banho-maria a 50°C por 30 minutos. Em seguida, os açúcares redutores foram quantificados pela metodologia descrita abaixo. A curva-padrão foi preparada com D-glicose (Merck). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como o volume de enzima que é capaz de liberar 1 μ mol de açúcares redutores na forma de glicose por mL.

Atividade endo-xilanases

A atividade deste grupo de enzimas foi determinada utilizando-se uma suspensão de 1% de Xilana de Bétula (Beechwood xylan, BWX, Sigma-Aldrich) como substrato, em tampão acetato 20 mM e pH 5,0. A uma alíquota de 250 μ L de amostra enzimática, em tubo de microcentrífuga, foi adicionado 250 μ L do substrato e incubado em banho-maria a 50°C por 30 minutos. Após

este período, utilizou-se a metodologia de quantificação de açúcares redutores totais, descrita abaixo. Uma unidade de xilanase foi definida como o volume de enzima necessária para liberar 1 μmol de açúcar redutor equivalente em xilose por minuto, a 50°C. Foi utilizada D-xilose para a confecção da curva-padrão (Heck *et al.*, 2005).

Atividade endo-mananases

Esta foi quantificada utilizando-se uma solução de goma Locusta a 0,5% (Locust bean gum, LBG, Sigma-Aldrich) como substrato, em tampão citrato 50 mM e pH 5,3. Uma alíquota de 0,25 mL de amostra enzimática foi misturada com 250 μL do substrato e incubado em banho-maria a 50°C por 30 minutos. Após este período, utilizou-se a mesma metodologia de quantificação de açúcares redutores totais, descrita abaixo. Uma unidade de mananase definiu-se como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de açúcar redutor equivalente em manose por minuto, a 50°C. Foi utilizada D-manose para a confecção da curva-padrão (Heck *et al.*, 2005).

Atividade β -glicosidase

Foi quantificada por meio da mistura de 100 μL de amostra enzimática com 100 μL do substrato 4-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (Sigma-Aldrich) a 10 mM, mais 200 μL de tampão citrato de sódio 0,5M, pH 4,8, e 600 μL de água ultrapura (padrão MilliQ). A mistura foi incubada em banho-maria a 50°C por 20 minutos, quando então a reação foi finalizada pela adição de 500 μL de carbonato de sódio a 1,0M. A liberação de *p*-nitrofenol foi medida em espectrofotômetro a 405nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto a 50°C (Wood; Bhat, 1988).

Quantificação da proteína solúvel total

A concentração de proteínas solúveis totais nas amostras foi medida pelo método de Bradford, com o uso da solução de Coomassie Blue G-250 (Bradford, 1976). As curvas-padrão foram produzidas com o uso de albumina sérica bovina fração V (BSA, Sigma-Aldrich), na faixa de 0 – 0,1 g/L. Após a

incubação por 20 min à temperatura ambiente, a absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro a 595 nm.

Quantificação de compostos fenólicos solúveis totais

A concentração de compostos fenólicos solúveis totais foi medida por meio do método adaptado de Javanmardi *et al.* (2003), com o uso do reagente de Folin-Ciocalteu. Em tubos de ensaio, colocou-se as amostras de 50 µL contendo compostos fenólicos e adicionou-se 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu a 10%, e 1,0 mL de Na₂CO₃ na concentração de 7,5% (p/v). A incubação realizou-se a 45°C por 30 minutos. Uma curva-padrão foi preparada com ácido gálico (Sigma-Aldrich) na faixa de 20-150 mg.mL⁻¹ e a absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro a 765 nm. Os resultados foram expressos em mg/L de fenólicos solúveis totais.

Determinação de açúcares redutores totais

Para determinação dos açúcares redutores totais nas amostras foi utilizado o método do Reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico, Merck), previamente preparado de acordo com Miller (1959). Em cada tubo contendo a amostra, 0,5 mL do reagente DNS foi adicionado para finalizar a reação, e em seguida todos os tubos foram colocados em banho de água fervente por 5 minutos, para desenvolvimento da coloração. Após esfriar, mediu-se a absorbância de cada tubo a 540 nm em espectrofotômetro. Para a quantificação dos açúcares redutores totais utilizou-se glicose como padrão para preparar a curva de calibração.

Desenvolvimento de misturas e protótipo com atividade aceleradora

O meio de cultivo selecionado por proporcionar melhor crescimento celular foi também usado para realizar cultivos a 42°C, 37 e a 30°C, desta vez acrescidos de 2% de fibra de coco verde. Os cocos foram selecionados e desintegrados em triturador de coco elétrico (Embrapa Tabuleiros Costeiros), e encaminhados para a Embrapa Agrobiologia para utilização nos ensaios.

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 1,0 L com 200 mL de volume útil. Após o crescimento por 72h, aproximadamente 50 mL do caldo de cultura foi utilizado de cada microrganismo selecionado para preparar as misturas líquidas formuladas. Estas foram armazenadas em potes de Polietileno de alta densidade com capacidade para até 150 mL, e posteriormente utilizadas para os testes de biodegradação, controle de qualidade e para análise da vida de prateleira.

O controle de qualidade (presença ou ausência de contaminações) e a vida de prateleira (viabilidade celular) compreendeu a contagem celular diretamente em placas. Retirou-se 1,0 mL de caldo de cultura de cada frasco e misturou-se com 9,0 mL de solução salina estéril, em tubo de ensaio, perfazendo a diluição 10^{-1} . Após 20 segundos de agitação em Vórtex foram preparadas diluições seriadas até 10^{-8} . De cada uma das diluições foram retirados 100 mL de amostra e plaqueados por espalhamento, com o uso de alça de Drigalski, em duplicata. O meio LB foi utilizado nesta análise. As placas foram incubadas de forma invertida a 30°C , até aparecimento de colônias visíveis. Na contagem, desconsiderou-se colônias não características. A contagem de mesófilos totais em placas, realizada em meio LB, não distingue entre as duas estirpes adicionadas no momento da preparação em quantidades iguais. Os produtos formulados foram armazenados em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, e as contagens realizadas mensalmente ao longo de 6 meses.

Teste de biodegradação de fibra de coco

Erlenmeyers contendo uma suspensão de 20g de fibra de coco em 200 mL de água destilada, esterilizados em autoclave por 20 min., foram inoculados com 20 mL do produto protótipo, desenvolvido anteriormente com os microrganismos mais eficientes quanto à produção das enzimas destacadas. Os bioprocessos se desenvolveram sem agitação nem aeração forçada ao longo de 90 dias, com acompanhamento quinzenal. Dois controles foram estabelecidos:

- 1) cultivo realizado com a matéria-prima não esterilizada, permitindo que os microrganismos nativos da fibra de coco se desenvolvessem;
- 2) cultivo em substrato estéril realizado com inoculação de 20 mL de uma suspensão de esporos de *Trichoderma aureoviride* (IOC 3963).

Análise dos dados experimentais

Os experimentos foram realizados em duplicata, e os testes em triplicata. Os dados foram expressos como a média \pm desvio-padrão. As curvas de calibração e os coeficientes de correlação (R^2) foram calculadas por regressão linear. Todos os valores foram calculados em MS Office Excel 2003.

Resultados e Discussão

Os onze isolados microbianos foram submetidos a uma bateria inicial de testes para se obter informações básicas sobre seu comportamento frente a diferentes temperaturas de incubação, tempo de crescimento em placas, e utilização dos substratos mais importantes no que diz respeito ao material lignocelulósico presente nas fibras de coco. Na Tabela 1 pode-se observar que foram identificados três isolados do gênero *Pantoea* sp. (BR 14000, BR 14002 e BR 14003), dois *Bacillus* sp. (BR 14001 e BR 14009), quatro *Pseudomonas* sp. (BR 14004, BR 14006, BR 14007 e BR 14008) e duas *Ochrobactrum* sp. (BR 14005 e BR 14010). Os códigos citados referem-se à Coleção do CRB-JD. A inserção na plataforma Alelo Recursos Genéticos (<https://www.embrapa.br/alelo>), desenvolvida pela Embrapa para sistematizar as atividades de pesquisa em conservação e enriquecimento de recursos genéticos, gera os códigos BRM correspondentes que estão na Tabela 1. Para serem depositadas na Coleção do CRB-JD, após sequenciamento, todas as sequências de 16S rRNA foram comparadas com bancos de dados do GenBank, realizado pela ferramenta BLAST, no NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Alguns isolados mostraram Índice de Degradação (ID) muito alto para pelo menos uma das características relacionadas à celulose e hemicelulose. Este é um índice indicativo para qualificação dos isolados quanto à produção e expressão de enzimas hidrolíticas que atuam na biodegradação do complexo hemicelulolítico. A Figura 1 mostra um exemplo de um resultado do crescimento em placas com respectiva formação de halo de degradação, que permite a medição e produção do ID. O ID é um índice indicativo para qualificação dos isolados quanto à produção e expressão de enzimas hidrolíticas que atuam na biodegradação do complexo hemicelulolítico. Uma estirpe de *Pseudomonas* sp. (BR 14004) apresentou ID muito alto para degradação de celulose

Tabela 1. Características dos isolados com relação ao tempo de crescimento em placas, temperatura ótima e Índice de degradação de celulose e hemiceluloses.

Estirpe na Coleção do CRB-JD	Espécie*	Código Original	Código AleloMicro	Índice de Degradação (ID) com base nas atividades enzimáticas**			Temperatura de crescimento ***		
				Celulases	Xilanases	Mananases	30°C	37°C	42°C
BR 14000	<i>Pantoea</i> sp.	FCC4A	BRM 056459	1	1	1	SIM/+++	SIM/++	NÃO
BR 14001	<i>Bacillus</i> sp.	FCC4AB	BRM 056460	2	2	2	SIM/+++	SIM/+++	SIM/++
BR 14002	<i>Pantoea</i> sp.	FCC6L	BRM 056461	1	2	2	SIM/++	SIM/++	SIM/+
BR 14003	<i>Pantoea</i> sp.	FCC6R	BRM 056462	2	2	2	SIM/+++	SIM/++	SIM/+
BR 14004	<i>Pseudomonas</i> sp.	FCC1TMin	BRM 056463	3	2	2	SIM/+++	SIM/+++	SIM/+
BR 14005	<i>Ochrobactrum</i> sp.	FCC1A	BRM 056464	2	2	1	SIM/+++	SIM/++	SIM/++
BR 14006	<i>Pseudomonas</i> sp.	FCC4FOR	BRM 056465	4	3	3	SIM/++	SIM/++	SIM/+
BR 14007	<i>Pseudomonas</i> sp.	FCC6C	BRM 056466	3	2	2	SIM/++	SIM/++	SIM/++
BR 14008	<i>Pseudomonas</i> sp.	FCC7	BRM 056467	2	2	2	SIM/++	SIM/++	SIM/++
BR 14009	<i>Bacillus</i> sp.	FCCBJ	BRM 056468	3	4	4	SIM/+++	SIM/+++	SIM/+
BR 14010	<i>Ochrobactrum</i> sp.	FCC1TMay	BRM 056469	2	2	2	SIM/++	SIM/++	NÃO

*/ Classificação após sequenciamento 16S rRNA e BLASTN.

**/ ID baixo, até 2 = (1); ID médio, de 2,1 a 4 = (2); ID alto, de 4,1 a 8 = (3); Muito alto, 8,1 para cima = (4).

*/ Crescimento em meio NYDA: SIM ou NÃO, para os três níveis de temperatura; (+++) colônias visíveis até 24h de incubação, (++) colônias visíveis entre 24 e 48h de incubação, (+) colônias visíveis após 48h de incubação.

Fotos: Luis Henrique de Barros Soares

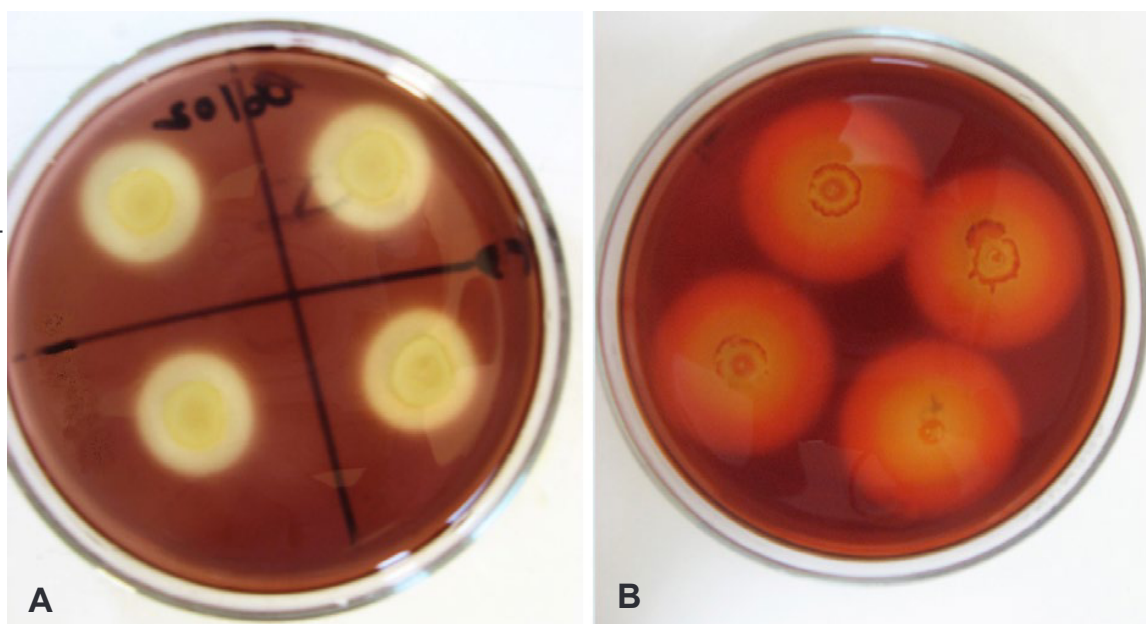


Figura 1. Imagens exemplificando testes de formação de halo de degradação de polímeros, após descoloração do Vermelho Congo. A relação entre o tamanho do halo e o tamanho da colônia representa o Índice de Degradação, que é uma medida qualitativa da eficiência do microrganismo em utilizar determinado componente da fibra de coco. **(A)** *Pseudomonas* sp. BR 14006 em meio CMC, atividade celulolítica. **(B)** *Bacillus* sp. BR 14009 em meio LBG, atividade hemicelulolítica, mananase.

em placas, e ID alto para degradação de mananas e xilanas, principais componentes da hemicelulose (Silveira *et al.*, 2013). A estirpe *Bacillus* sp. (BR 14009) demonstrou potencial para produção de enzimas hemicelulolíticas, e alto potencial para produção de celulases. A partir daí, foi proposto que a combinação destas duas estirpes poderia trazer efeitos benéficos e sinérgicos na aceleração do processo de biodegradação de materiais orgânicos oriundos da biomassa residual da agroindústria de processamento dos cocos. Além disso, os dois isolados apresentaram crescimento tanto a 30 como a 37°C, o que permite flexibilidade no desenvolvimento de bioprocessos. Assim, selecionou-se estas duas estirpes e partiu-se para a análise do crescimento individual, testando quatro meios de cultura diferentes, compostos por quatro fontes principais de carbono diferentes. Os meios LB e Mueller-Hinton são tradicionalmente utilizados em escala laboratorial para cultivos diversos. Os meios BP e BPSc são otimizados e foram desenhados para aplicação industrial (Scheidt *et al.*, 2000).

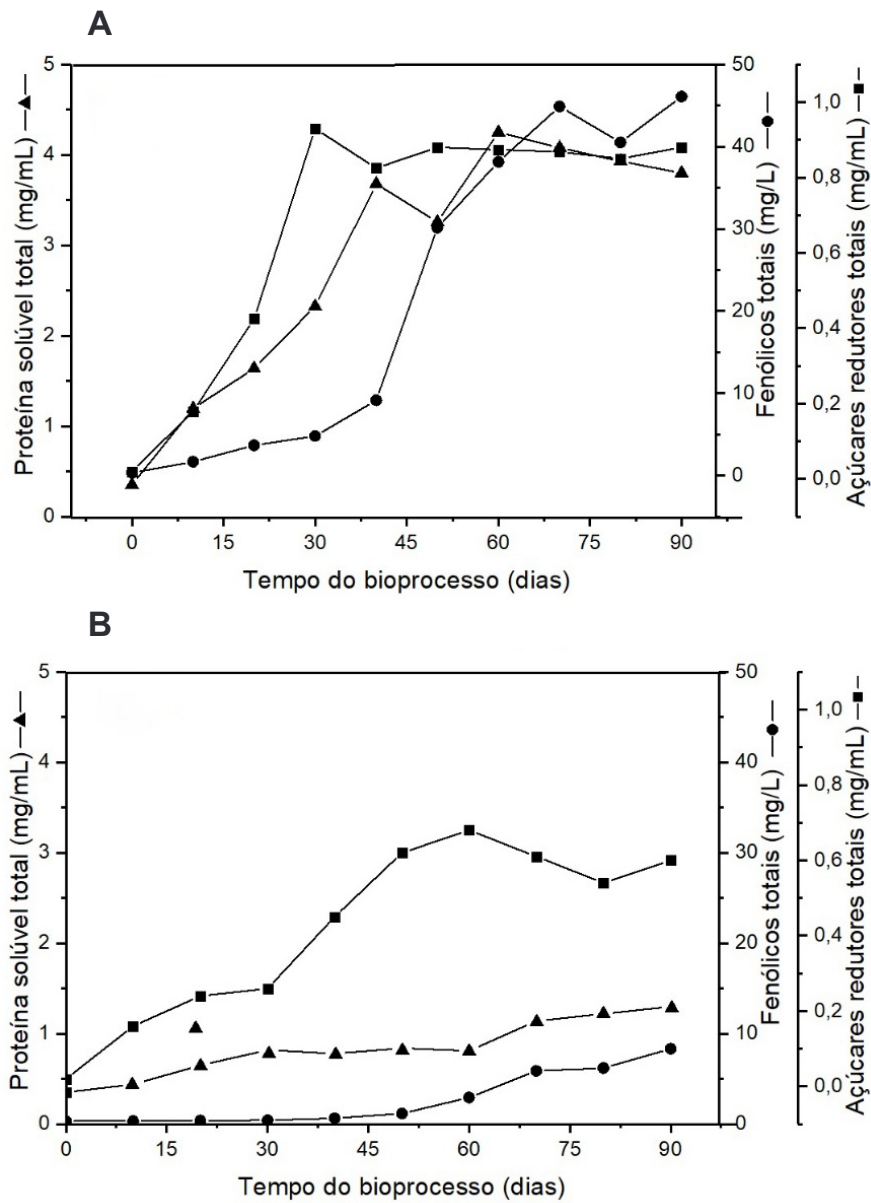


Figura 2. Curvas de crescimento para **(A)** *Bacillus* sp. BR 14009 e **(B)** *Pseudomonas* sp. BR 14006 em quatro meios de cultivo diferentes. Todos os cultivos foram realizados a 32°C, em incubadora tipo “shaker”, com agitação orbital de 120 rpm.

O desempenho na produção de biomassa para *Bacillus* sp. (BR 14009) e *Pseudomonas* sp. (BR 14004) está apresentado na Figura 2. Para ambas as estirpes, o meio BP resultou em maior produção de células, mediante contagem. Para BR 14009, a quantidade de células atingida ficou acima de 10^{10} UFC.mL⁻¹ após 36 h de crescimento. Para *Pseudomonas* sp., no

mesmo período de tempo atingiu-se $3,5 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹. Os demais meios mostraram-se satisfatórios para uso na produção de biomassa, contudo a máxima concentração de células foi atingida em um tempo maior de cultivo, para as duas estirpes. O trabalho de Scheidt *et al.* (2000) desenvolveu o meio BP e otimizou sua composição para permitir alta produção de biomassa por microrganismos promotores de crescimento vegetal. Este também tem sido usado com sucesso na produção de cultivos de microrganismos potencialmente controladores de fitopatógenos, incluindo *Bacillus* e *Pseudomonas* (Fernandes *et al.*, 2021).

Após a definição do meio de cultivo mais adequado para produção de biomassa das duas estirpes selecionadas pela sua capacidade de biodegradação de material celulolítico, realizou-se o crescimento das mesmas em duas temperaturas distintas (30 e 37°C). O potencial de crescimento a temperaturas mais elevadas pode sugerir qualidades desejáveis para os complexos enzimáticos, tais como a termotolerância (López-González *et al.*, 2015). Esta característica tem sido vista como uma tendência para os estudos de prospecção microbiana visando a identificação de novos microrganismos com aplicabilidade industrial (Cotta *et al.*, 2023). Ao meio BP escolhido previamente, foram adicionados CMC, LBG e BWX na concentração de 1% para cada um dos substratos. Assim, buscou-se estimular e avaliar a produção de enzimas ao longo do processo de cultivo, as principais responsáveis pela catalisação biológica relacionada ao processo de degradação do material orgânico. A hidrólise microbiana/enzimática dos substratos celulósicos possui inúmeras vantagens sobre os processos químicos em virtude da eficiência de sacarificação, menor consumo de energia, além de evitar poluição (Saratale *et al.*, 2012). Na Figura 3 pode-se observar que os cultivos a 37°C resultaram em menor produção celular, porém a atividade enzimática não apresentou variações entre os dois níveis de temperatura, 30 e 37°C. Deduz-se que mesmo com menor biomassa celular, a temperatura não influenciou na produção ou na atividade enzimática, nem facilitou de algum modo o processo de hidrólise.

O produto protótipo, formulado com a mistura das duas estirpes, foi avaliado quanto à estabilidade de prateleira. Três potes foram armazenados em temperatura ambiente, porém evitando luz direta e temperaturas acima de 20°C. Ao longo de 6 meses foram feitas contagens mensais e o resultado pode ser observado na Figura 4. Não foram identificadas contaminações

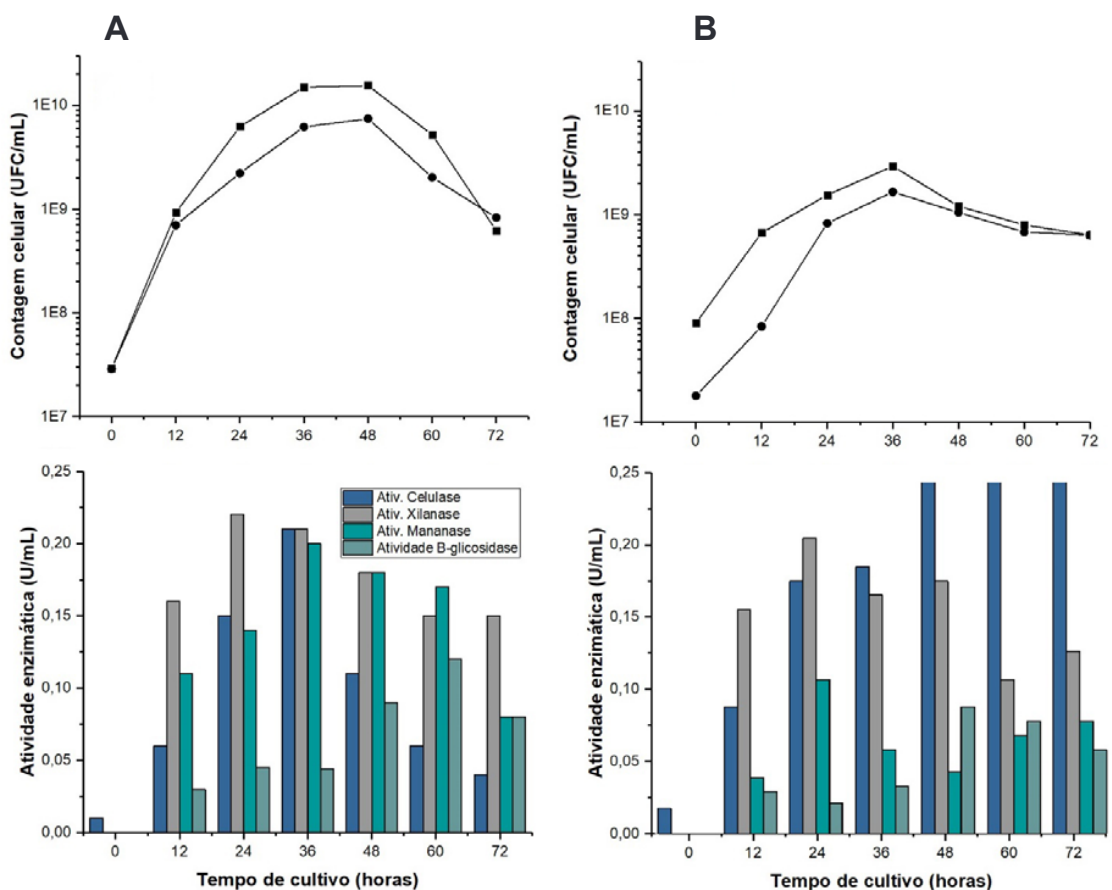


Figura 3. Em cima, as curvas de crescimento para **(A)** *Bacillus* sp. BR 14009 e **(B)** *Pseudomonas* sp. BR 14006 com o meio BP+ (adicionado de 1% de CMC, LBG e BWX), a 30°C (-●-) e 37°C (-■-). Abaixo os valores medidos de atividade enzimática para cada período correspondente.

aparentes em nenhuma das placas de contagem. Até aproximadamente três meses o produto mantém a contagem celular inicial, o que indica um período razoável para utilização, podendo ser aperfeiçoado com o desenvolvimento de formulações contendo veículos que agregam capacidade de sobrevivência.

Os testes de avaliação *in vitro* da eficiência biodegradadora da formulação protótipo desenvolvida neste trabalho estão demonstrados na Figura 5. Comparativamente ao processo realizado com o fungo *Trichoderma aureoviridae*, o produto acelerador promoveu resultados visivelmente melhores. Os fungos filamentosos do gênero *Trichoderma* sp. estão entre os organismos celulolíticos mais investigados pela sua capacidade robusta de produzir grandes quantidades de enzimas lignocelulolíticas que cooperam

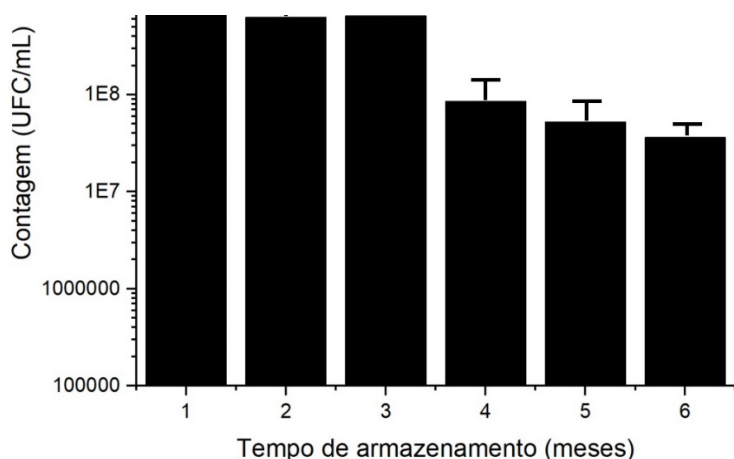


Figura 4. Avaliação da vida de prateleira do protótipo acelerador de compostagem, formulado líquido.

entre si para uma completa hidrólise da biomassa (Chery e Fidantsef, 2003; Shingania *et al.*, 2013). Ao longo dos 3 meses de execução dos experimentos de biodegradação observou-se uma elevada solubilização de compostos fenólicos pela ação dos microrganismos do Protótipo. Aos 60 dias, o processo com o protótipo formulado adicionado promoveu uma liberação de fenólicos acima de 12 vezes mais do que o padrão com o fungo. Isto pode indicar uma atuação efetiva na desestruturação da fração lignina da fibra de coco, mediante a produção de outro grupo de enzimas, do grupo das fenoloxidasas, mas que não foram quantificadas. O escurecimento do meio líquido, bem como a redução do volume, pode ser percebido na Figura 6. A atuação efetiva das enzimas hidrolíticas avaliadas, que degradam o material celulósico e as hemiceluloses, é evidente pela elevada liberação de açúcares redutores, pois os monômeros não reagem nas condições do método quando estão configurados na forma polimerizada. Além disso, o enfraquecimento da estrutura cristalina da celulose e da função agregadora da hemicelulose permite o ataque enzimático mais efetivo. Como não foi possível realizar contagem das células nem medir a DO_{600} em virtude da coloração escura, a quantificação da proteína solúvel total forneceu uma estimativa indireta do crescimento microbiano e da adaptação ao meio contendo a fibra de coco. Na comparação com o bioprocessamento mediado pelo fungo *Trichoderma* spp., percebe-se que o produto acelerador promove uma solubilização maior e mais rápida de compostos fenólicos, de proteínas solúveis e também de açúcares no meio (Figura 5).

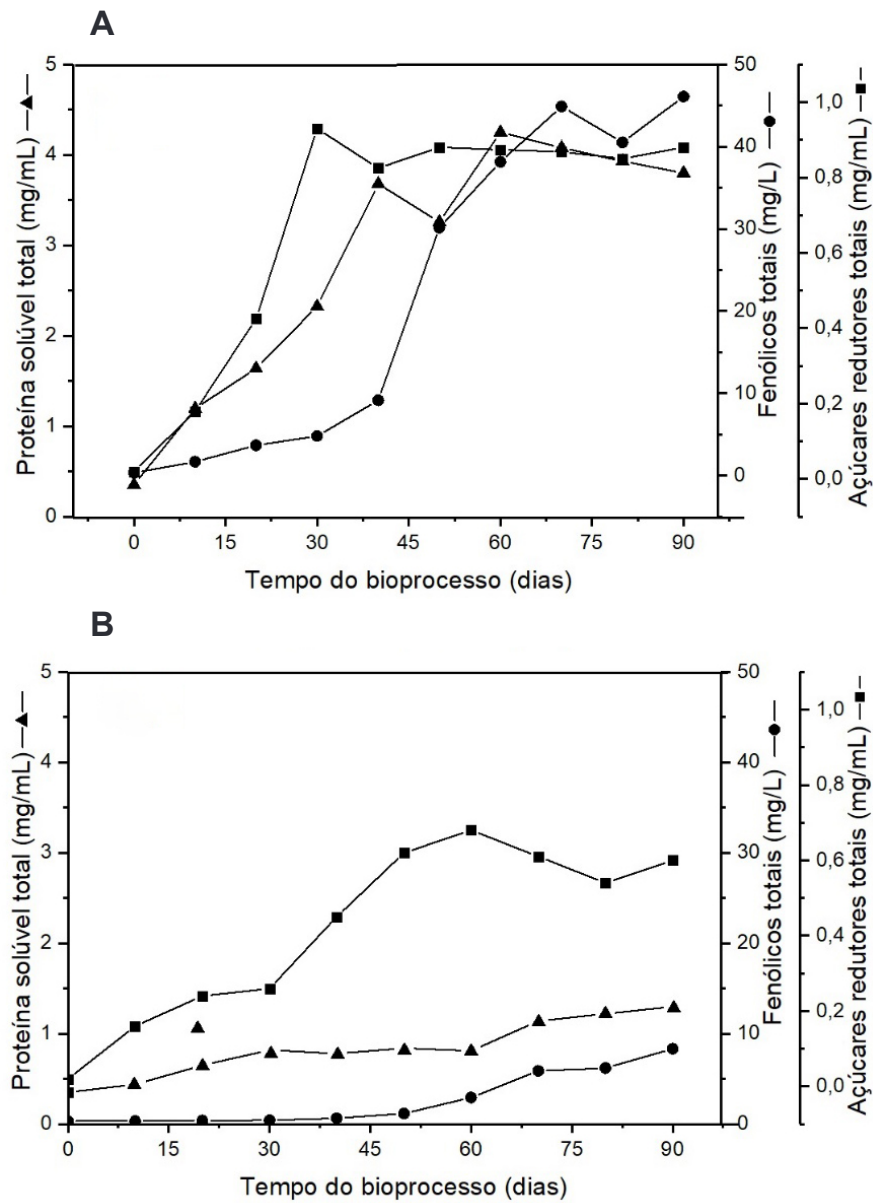


Figura 5. Bioprocessos para biodegradação da fibra de coco. **(A)** Aplicação do produto protótipo formulado, composto pela mistura das estirpes *Bacillus* sp. BR 14009 e *Pseudomonas* sp. BR 14006. **(B)** Aplicação do fungo *Trichoderma aureoviridae*.

Uma importante característica envolvida na eficiência do processo de compostagem e estabilidade dos produtos finais é a formação de ácidos húmicos (Chen *et al.*, 2020). Estes são compostos de peso molecular variável, e com grupos funcionais formados por reações químicas e biológicas (Pan *et al.*, 2021). A formação mais eficiente dos ácidos húmicos pode envolver

Fotos: Luis Henrique de Barros Soares



Figura 6. Processo em escala laboratorial com protótipo acelerador contendo microrganismos selecionados para biodegradação de fibra de coco. **(A)** Suspensão de fibra de coco seco no momento da inoculação com o protótipo acelerador. **(B)** Resultado da biodegradação estimulada, após 90 dias de processo com a mistura aceleradora.

um pré-tratamento do material lignocelulósico, que possui uma natureza recalcitrante e dificulta a acessibilidade de enzimas e microrganismos. Muito embora os pré-tratamentos químicos possam solubilizar parcialmente ou completamente a fração de hemicelulose na biomassa, bem como reduzir a cristalinidade da celulose e liberar substratos que serão utilizados por microrganismos, as desvantagens desses métodos químicos são óbvias, incluindo a produção de diversos inibidores microbianos e compostos tóxicos, o custo elevado e o potencial corrosivo que exige uma estrutura e materiais compatíveis (Owolabi *et al.*, 2017). Algumas teorias são conhecidas sobre

a importância da condensação de complexos proteína-lignina, compostos fenólicos-proteína, açúcares-aminas na formação de substâncias húmicas (Wu *et al.*, 2020). Neste trabalho, observou-se a significativa presença de alguns destes compostos importantes e que podem contribuir para a estabilização dos produtos finais. A compostagem é um método promissor e sustentável para transformar componentes lignocelulósicos em produtos húmicos de valor agregado (Chen *et al.*, 2020; Pan *et al.*, 2021).

Conclusões

Neste trabalho foi possível identificar e caracterizar um grupo de microrganismos capazes de se desenvolver utilizando a fibra de coco como substrato principal. O isolamento, realizado nas condições naturais de biodegradação, foi importante para direcionar estratégias de cultivo de modo a aproveitar o potencial de cada isolado para produzir grupos de enzimas essenciais para o processo de biodegradação de material ligno-celulolítico e compostagem. Foi possível desenvolver um protótipo com finalidade aceleradora, contendo os dois isolados que mais se destacaram na flexibilidade de aproveitamento de substratos orgânicos e na adaptação às condições de cultivo. Este protótipo apresentou efetividade na comparação com um fungo reconhecidamente eficiente, e também demonstrou boa capacidade de sobrevivência na avaliação de sua vida de prateleira.

Referências Bibliográficas

ANTHEUNISSE, J. Decay of coconut fibres by soil microorganisms. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 27, p. 435-442, 1981.

BERTANI, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 62, n. 3, p. 293-300, 1951.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-54, 1976.

BRAINER, M. S. C. P. **Coco: produção e mercado. Caderno Setorial ETENE**, Fortaleza, v. 6, n. 206, Dezembro, 2021. Disponível em: https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/1043/1/2021_CDS_206.pdf. Acesso em: 12 jun 2021.

CABRAL, M. M. S.; ABUD, A. K. S.; SILVA, C. E. F.; ALMEIDA, R. M. R. G. Bioethanol production from coconut husk fiber. **Ciência Rural**, v. 46, n. 10, p. 1872-1877, 2016.