



## Prospecção de *Bacillus sp.* produtores de proteases para aplicação na degradação de resíduos orgânicos

**Luana Carolina Alves Feitosa<sup>1</sup>, Marcia Rodrigues Sandri<sup>1</sup>, Anderson Soares Pires<sup>1</sup>, Giovani André Piva<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Purus Soluções Ambientais (luana@purus.com.br)

### Resumo

As bactérias apresentam um grande potencial em gerar enzimas que degradam a matéria orgânica. Esta degradação é de grande importância para o meio ambiente, pois a eliminação destes resíduos não causará nenhum dano para gerações futuras. Neste trabalho foram utilizados resíduos da industrialização da uva, matéria prima na produção dos fertilizantes da empresa Beifort e resíduos de indústria frigorífica, utilizados em testes de novas formulações, os quais são ricos em nutrientes. A prospecção de linhagens bacterianas formadoras de esporos que produzem proteases foi realizada a partir dos extratos iniciais da compostagem e de testes com novas formulações do fertilizante orgânico, as quais utilizaram farinha de sangue e farinha de carne em sua composição. A verificação do potencial biotecnológico para a degradação de proteínas pelos isolados foi realizada em meio sólido contendo leite desnatado, onde foram medidos os halos de degradação. Dos 52 isolados, dez apresentaram resultado positivo para a degradação de proteínas, quatro delas apresentando forte potencial. Os micro-organismos selecionados neste trabalho demonstraram rendimento promissor, abrindo a possibilidade da aplicação destes *Bacillus* na fabricação dos fertilizantes a fim de disponibilizar nutrientes provenientes de resíduos de indústrias frigoríficas, também diminuindo o impacto destes resíduos no ambiente.

Palavras chave: *Bacillus sp.*, proteases, degradação

Área temática: Tecnologias Ambientais

### Abstract

*Bacteria have great potential to generate enzymes that degrade organic matter. This degradation is very important for the environment, because the disposal of these wastes will not cause any harm to future generations. In this study we used the following wastes rich in nutrients: grape industry wastes, which is feedstock for production of fertilizers in Beifort company and the slaughterhouse wastes, used in testing new formulations. The prospection of spore-forming bacterial strains that produce proteases was carried out from extracts of compost and initial testing of new formulations of organic fertilizer, which used blood meal and meat in its composition. The evaluation of biotechnological potential for degradation of proteins by the isolates was performed on skim milk agar, where were measured degradation halos. Of the 52 isolates, ten were positive for protein degradation, four of them showing strong potential. The microorganisms selected for this study showed promising performance, opening the possibility of applying these *Bacillus* in the manufacture of fertilizers to provide nutrients from slaughterhouse waste, also reducing the impact of waste on the environment.*

Key words: *Bacillus sp.*, proteases, degradation

Theme Area: Theme 6 – Environmental Technologies



## 1 Introdução

A indústria alimentícia gera em seus processos uma grande quantidade de resíduos, onde o seu descarte é um grande problema. Destacando que estes resíduos são ricos em nutrientes uma das alternativas para a sua degradação se dá pela aplicação de bactérias proteolíticas. Segundo Uenojo e Pastore (2007), as proteases são formadas por um grupo de enzimas que degradam substâncias pécticas, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica.

Sob a designação de bactérias proteolíticas, são muitas as espécies caracterizadas. Como exemplos de espécies produtoras tem-se *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus megaterium* (SCHULZ et al., 2005). De acordo com Abate (1999), o gênero *Bacillus* é a maior fonte industrial de enzimas e *Bacillus amyloliquefaciens*, além de ser uma das espécies mais amplamente utilizadas para a produção de amilases e proteases. Micro-organismos deste gênero são pertencentes ao grupo das bactérias gram-positivas, formadoras de esporos, com baixo conteúdo de GC, assim como outros gêneros, tais como *Clostridium*, *Sporosarcina* e *Helicobacterium*. Os *Bacillus* possuem as células em forma de bastonete e são normalmente aeróbios ou anaeróbios facultativos. Geralmente crescem bem em meios definidos contendo uma dentre as várias fontes de carbono. Muitos *Bacillus* produzem enzimas hidrolíticas extracelulares que degradam polímeros complexos, como polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos, permitindo a utilização desses produtos como fonte de carbono e doadores de elétrons (MADIGAN et al., 2004).

As enzimas são extraídas de micro-organismos, plantas ou tecidos animais e fazem parte de um grupo de substâncias que podem influenciar no desenvolvimento de outros micro-organismos. As enzimas são de natureza geralmente protéica com atividade intra ou extracelular que têm funções catalisadoras de reações químicas, as quais sem a sua presença, aconteceriam a uma velocidade demasiadamente baixa. Isso é alcançado através da diminuição da energia de ativação necessária para que uma reação química se realize, resultando no aumento da velocidade da reação e possibilitando o metabolismo dos seres vivos (SGARBIERI, 1996).

O processamento industrial é a transformação de matérias-primas em produtos. Como decorrências desse processamento, além do produto cuja fabricação é intencional, são gerados outros materiais de maneira não-intencional, alguns dos quais tem valor comercial e outros que são totalmente indesejáveis. Estes últimos são os resíduos industriais, aos quais é necessário dar-lhes um destino, pois não podem ser acumulados indefinidamente nos locais onde são gerados (LIMA et al., 2001).

A empresa Beifort, sediada no município de Garibaldi RS, utiliza para a produção de seus fertilizantes orgânicos matérias primas disponíveis na região, principalmente resíduos da industrialização da uva como bagaço e engaço. Da compostagem destes resíduos é gerado um extrato líquido, rico em matéria orgânica e micro-organismos, que é utilizado na formulação do produto final. Como uma nova fonte de matéria-prima na formulação destes fertilizantes poderiam ser usados resíduos da indústria frigorífica, também bastante desenvolvida na região, como farinhas de carne, sangue e penas. A aplicação de micro-organismos proteolíticos tem como foco a disponibilização de carbono e nitrogênio após a degradação destes resíduos.

Desta forma, a prospecção de linhagens bacterianas produtoras de proteases foi realizada a partir dos extratos iniciais da compostagem e de testes com novas formulações do fertilizante orgânico que utilizaram farinha de sangue e farinha de carne em sua composição. O objetivo é encontrar micro-organismos que possam ser adicionados ao processo para melhorar a eficiência na degradação de resíduos vegetais e animais, auxiliando a disponibilização de nutrientes na fabricação de fertilizantes orgânicos.



## 3º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 25 a 27 de Abril de 2012

### 2 Material e métodos

Os microrganismos utilizados neste estudo foram isolados a partir de dez amostras de fertilizantes produzidos pela empresa Beifort, suas matérias primas ou formulações experimentais. Os fertilizantes são produzidos a partir do extrato líquido do processo de compostagem de resíduos resultantes da industrialização da uva. Resíduos fornecidos por frigoríficos foram utilizados em testes de novas formulações.

Para a obtenção das bactérias do gênero *Bacillus*, cada amostra foi submetida a um choque térmico de 80°C por 10min. Após o choque térmico as amostras foram plaqueadas por espalhamento com o auxílio da alça de *Drigalsky* nas diluições 10<sup>0</sup> e 10<sup>-1</sup> em placas de petri contendo meio sólido de ágar nutritivo (Peptona 5g/L, Extrato de carne 3g/L, Ágar 15g/L.) e incubadas em BOD a 28°C durante 48 horas. A contagem das placas nos forneceu inúmeras colônias, então foi realizado o isolamento de 5-7 colônias diferentes e mais abundantes contidas nas placas.

Após o isolamento dos *Bacillus*, foi realizada a determinação qualitativa da atividade da enzima. Esta determinação foi realizada em triplicata pelo método de picada em meios de cultura sólidos, denominado ágar leite, contendo 18g/L de ágar, 2,5g/L de extrato de levedura, 1g/L de glicose, 2,5g/L de NaCl e 100mL/L do substrato indutor, o qual foi utilizado leite desnatado. Em seguida as placas de ágar leite foram incubados a 37°C por 72 horas. Após este período, foram medidos com uma régua os diâmetros das colônias e dos halos formados ao redor das colônias pela degradação do leite. A atividade enzimática foi determinada através da relação entre o diâmetro médio do halo e o diâmetro médio da colônia, expresso como Índice Enzimático.

### 3 Resultados e discussão

Todas as amostras apresentaram colônias após o choque térmico a 80°C, demonstrando desta forma a presença de bactérias formadoras de colônias (Tabela 1).

Após o choque térmico foram isoladas 5 a 7 colônias de cada placa da diluição 10<sup>-1</sup>, totalizando 52 micro-organismos.

Tabela 1. Contagem de colônias após choque térmico de 80°C em AN incubado a 28°C por 48 h

Amostra	Origem da amostra	Contagem UFC/mL
1T80	Fertilizante líquido 323	1,51 x 10 <sup>4</sup>
2T80	Fertilizante líquido 323 AHF	2,61 x 10 <sup>4</sup>
3T80	Fertilizante líquido 867	3,43 x 10 <sup>4</sup>
4T80	Extrato líquido ácido	2,35 x 10 <sup>4</sup>
5T80	Extrato líquido alcalino	4,16 x 10 <sup>3</sup>
6T80	Extrato pré-processado A	7,40 x 10 <sup>3</sup>
7T80	Extrato pré-processado B	2,35 x 10 <sup>3</sup>
8T80	Extrato primário	3,98 x 10 <sup>3</sup>
14T80	Extrato alcalino com farinha de sangue	4,70 x 10 <sup>2</sup>
25T80	Extrato alcalino com farinha de carne	2,40 x 10 <sup>2</sup>



### 3º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 25 a 27 de Abril de 2012

A determinação das bactérias produtoras de protease foi realizada através de bioensaios qualitativos, baseados na visualização em placa de petri em que o princípio é de formação de halos ao redor das colônias (Figura 1). De um total de 52 amostras, 10 apresentaram colônias e halos indicando degradação proteolítica do leite, portanto uma atividade positiva.

Figura 1. Formação de halos ao redor da colônia indicando atividade positiva.

CT80.7.6 – Isolado da amostra 7, com atividade positiva para degradação de protease em ágar leite.

CT80.7.1 – Isolado da amostra 7, sem atividade de degradação



Stamford et al.,(1998) recomendam um valor do índice de atividade enzimática  $\geq 2,0$  para mostrar a habilidade do micro-organismo em degradar proteínas em meio sólido. Dos 10 isolados produtores de proteases encontrados neste trabalho, quatro deles apresentam o índice enzimático maior que 2, demonstrando que possuem um potencial para serem aplicados em larga escala (Tabelas 2 e 3). Estes poderão ser utilizados em ensaios de degradação de efluentes ou resíduos com grandes quantidades de proteínas. Estes micro-organismos podem ser adicionados às formulações experimentais de fertilizantes orgânicos que incluem extratos de carne e sangue para auxiliar na decomposição aeróbica das proteínas e disponibilização dos nutrientes.

Tabela 2. Micro-organismos proteolíticos isolados neste estudo.

Medidas após 72 h de incubação a 30°C em ágar leite.

Isolado	Média diâmetro da colônia (cm)	Média diâmetro do halo (cm)	Índice Enzimático
5T80.2	1,07	1,63	1,53
5T80.3	0,37	1,00	2,73
6T80.1	0,77	1,33	1,74
7T80.5	0,63	1,37	2,16
25T80.4	2,00	3,07	1,53
25T80.5	1,57	3,20	2,04
25T80.1	1,43	2,63	1,84
25T80.2	1,40	2,17	1,55
14T80.1	1,50	3,13	2,09
14T80.4	1,03	1,40	1,35



### 3º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 25 a 27 de Abril de 2012

Tabela 3- Número de isolados totais e proteolíticos provenientes de cada amostra

Amostra	Origem da amostra	Nº de isolados	Nº de isolados produtores de protease	Nº de isolados com índice enzimático ≥ 2,0
1T80	Fertilizante líquido 323	5	0	0
2T80	Fertilizante líquido 323 AHF	5	0	0
3T80	Fertilizante líquido 867	7	0	0
4T80	Extrato líquido ácido	5	0	0
5T80	Extrato líquido alcalino	5	2	1
6T80	Extrato pré-processado A	5	1	0
7T80	Extrato pré-processado B	5	1	1
8T80	Extrato primário	5	0	0
14T80	Extrato alcalino com farinha de sangue	5	2	1
25T80	Extrato alcalino com farinha de carne	5	4	1

## 4 Conclusão

Um dos grandes desafios da expansão das indústrias é a questão da preservação do meio ambiente. Portanto, este trabalho buscou propor uma alternativa para a degradação de resíduos provenientes de indústrias vinícola e frigorífica que, como decorrência do seu processo de fabricação geram resíduos de origem vegetal e animal, respectivamente. Há a possibilidade de utilização desse resíduo como fonte de nutrientes para a constituição de novos produtos. Os quatro micro-organismos selecionados neste trabalho demonstraram rendimento promissor, abrindo a possibilidade de serem aplicados em escala piloto como uma alternativa para o aproveitamento de resíduos provenientes destas indústrias, enriquecendo a composição dos fertilizantes orgânicos.

## 5 Apoio financeiro

Este trabalho foi realizado por bolsistas DTI e ITI de projeto aprovado em edital RHAE do CNPQ. Foi desenvolvido no Laboratório Beigrupo, em parceria da empresa Purus Soluções Ambientais com as empresas Beifiur e Beifort. Possui também o financiamento de projeto aprovado no edital INOVAPE RS, do Sebrae.

## Referências

ABATE, C.M. "Producion of amyloytic enzymes by *Bacillus amylquefaciens* in pure culture and in co-culture with *Zymomonas mobilis*". **Biotechnology letters**, v. 21, n. 3, 1999, pg. 249-252.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. 2 edição. Editora Edgard Blücher, São Paulo, 2001, 286 p.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de brock**. 10ª edição. Editora Pearson education, São Paulo, 2004, 608p.



### 3º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 25 a 27 de Abril de 2012

SCHULZ, D.; BONELLI, R.R.; BATISTA, C. R. V. “*Bacteriocinas e enzimas produzidas por Bacillus spp. Para a conservação e processamento de alimentos*”. **Alimentos e Nutrição – Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v.16, n. 4, out./dez. 2005, pg. 403-411.

SGARBIERI, VALDOMIRO C. **Proteínas em alimentos proteicos:** Propriedades, degradações e modificações. São Paulo, Editora Varela, 1998, 517 p.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, M.; STAMFORD, N.P.; “*Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (pachyrhizus erosus. urban)*”. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** v. 18, n. 4, 1998, pg. 382-385.

UENOJO, M.; PASTORE, G.M. “*Pectinases: Aplicações industriais e perspectivas*”. **Química Nova**, Campinas- São Paulo, v. 30, n. 2, 2007, pg. 388-394.