



DETERMINAÇÃO DA TERMOTOLERÂNCIA DE ISOLADOS BACTERIANOS DE *Azadiractha indica*

Helena Souza Nascimento Santos, Gleika Larisse Oliveira Dorasio de Souza, Lidiane Magalhães Madureira, Adelica Aparecida Xavier, Regina Cássia Ferreira Ribeiro

Introdução

As bactérias são microrganismos procariontes amplamente difundidos em todos os ambientes terrestres e aquáticos. Esta ampla distribuição é um reflexo de sua grande adaptabilidade metabólica, o que permite observarmos estes organismos em ambientes extremos, como por exemplo, habitando ambientes com temperaturas abaixo do ponto de congelamento ou temperaturas acima do ponto de ebulição, ambientes extremamente ácidos ou alcalinos, e aeróbios ou anaeróbios [1].

Segundo MADIGAN et al. [2], um dos fatores ambientais que influenciam mais fortemente as populações microbianas é a temperatura, devido ao fato de atuar de duas maneiras totalmente opostas: aumentando a eficiência metabólica e assim acelerando o crescimento ou causando danos, alguns deles irreversíveis, a algumas moléculas essenciais, podendo causar a morte do organismo.

Em condições de stress algumas bactérias podem produzir endósporos para garantir a sua sobrevivência. Essa estrutura, segundo FERNANDES et al. [3] possui formas arredondadas ou ovais, intracelular, que tem uma estrutura complexa formada por uma camada protetora, um córtex e uma membrana interna que envolve o protoplasto. Eles contêm dipicolinato de cálcio, são muito resistentes ao calor, dessecação, corantes, desinfetantes e radiação.

De acordo com a formação de endósporos, as bactérias podem ser classificadas em diversos grupos. Um dos grupos são os Termófilos, que crescem em temperaturas acima de 55°C e incluem cerca de 15 espécies de *Bacillus*, 11 de *Clostridium* e 7 de *Desulfotomaculum*, ocorrendo em solos de regiões temperadas, sendo obviamente mais encontrados em locais termais. O estudo dos microrganismos termofílicos é de grande importância para o futuro, devido a suas características metabólicas diferentes e atrativas do ponto de vista industrial e comercial, como produção de álcool, de metano, de acetato, de enzimas, etc. [4]

O Objetivo do trabalho foi avaliar a tolerância de bactérias a temperatura superior a 80° C.

Material e Métodos:

A. Isolados bacterianos utilizados no ensaio:

Para avaliação utilizou-se um isolado de bactéria epifítica e nove isolados do extrato fermentado de bacterioteca do laboratório de Fitopatologia da Unimontes – Campus Janaúba.

B. Multiplicação e calibragem dos isolados

Foram utilizados os isolados EPI 03, NIM 02, NIM 04, NIM 05, NIM 07, NIM 09, NIM 10, NIM 12, NIM 15 e NIM 16 da bacterioteca do laboratório de Fitopatologia da Unimontes – Campus Janaúba.

Os cultivos foram realizados em placa de Petri contendo meio TSA (Trypticase Soy Agar) e incubados a BOD por quatro dias. Para o preparo da solução bacteriana a ser utilizado no ensaio, foi adicionada a cada placa 3 mL de solução salina (0,85 %) previamente autoclavada, e com o auxílio de uma lâmina, as colônias foram desagregadas do meio de cultura. A seguir, as suspensões foram centrifugadas a 10000 rpm durante 15 minutos.

Após a centrifugação formou-se um pélate de células bacterianas que foi ressuspenso em solução salina com o auxílio do vortex e calibrado em espectrofotômetro para a densidade óptica de 0,5 de absorvância. Fez-se então a diluição em série até a concentração de 10^{-5} . Para cada isolado plaqueou-se em meio TSA três gotas de 10µL cada nas seguintes concentrações, 10^{-4} e 10^{-5} . Em seguida os tubos foram levados a banho maria a 85°C por dez minutos e depois de voltarem a temperatura ambiente foram novamente plaqueados nas mesmas concentrações. Durante o período de 33 h foi observado o surgimento ou não de unidade formadora de colônia (UFC). O ensaio foi montado em delineamento



inteiramente casualizado, onde cada isolado constituiu um tratamento e cada gota uma repetição. A testemunha foi constituída de plaqueamento das diluições sem o tratamento térmico.

Resultados e discussão

Após o aquecimento a 85 °C apenas os isolados bacterianos: NIM 02, NIM 05, NIM 12, NIM 15 e NIM 16 apresentaram crescimento em meio TSA. Observa-se que houve uma redução do número de UFC destes isolados comparativamente ao número de UFC observado na testemunha sem tratamento como mostra a tabela 1. Esses dados indicam a capacidade destes isolados manter sua viabilidade em condições de estresse como temperaturas altas. Os isolados EPI 03, NIM 05, NIM 07, NIM 09, NIM 10 apresentaram sensibilidade à temperatura.

A adaptação destes microrganismos à termofilia envolve adaptação da membrana citoplasmática, das proteínas e do DNA às temperaturas altas. Essa adaptação à termofilia tem despertado grande interesse sob ponto biotecnológico já que os mecanismos de termorresistência das biomoléculas desses microrganismos podem constituir modelos interessantes para a bioengenharia ou ainda, considerando o uso direto das mesmas em bioprocessos. Inúmeros gêneros bacterianos são descritos na literatura como termófilos produtores de enzimas termoestáveis [5]. Algumas enzimas termoestáveis já têm sido usadas como ferramenta para a Biologia Molecular (Taq polimerase), como aditivo de detergentes e sabões (proteases e celulasas), no processamento industrial do amido (α -amilase, glucose isomerase) e na indústria de polpa e papel (xilanasas) e surgem como alternativas de interesse em outros bioprocessos, como o de síntese orgânica (lipases, proteases, oxidorreduções), no setor de diagnóstico, no tratamento de resíduos e na produção de ração animal [6, 7]. Os isolados testados neste trabalho foram testados *in vitro* o controle biológico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* e mostraram-se muito promissores. Desta forma será interessante que em estudos futuros estes isolados possam ser caracterizados quanto ao seu perfil enzimático para identificação do potencial de uso de tais isolados.

Agradecimentos

À Fapemig e a Unimontes pela concessão da bolsa.

Referências

- [1] WEINGARTNER, V. Identificação e atividade antimicrobiana de bactérias formadoras de endósporos isoladas de ambientes impactados pela mineração do carvão. 2005. (Curso de Ciências Biológicas – Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar), UNIVALI, Itajaí, 2005.
- [2] MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Biologia de Microrganismos. 8th ed. Prentice-Hall, Rio de Janeiro-RJ, 1997. 986p.
- [3] FERNANDES, A. M. da R.; KRAUS, H. M.; DELAZARI, Alessio. Sistema de Raciocínio Baseado em Casos para Identificação de Bactérias Aeróbicas Formadoras de Endósporo. I Workshop de Computação Aplicada à Gestão do Meio Ambiente e Recursos Naturais. 2009.
- [4] Priest, F. G.; Grigorova, R. (1990) "Methods for studying the ecology of endosporeforming bacteria". *Methods in Microbiology*, v. 22, p.565-591.
- [5] Eleni Gomes*, Marcelo Andrés Umsza Guez, Natalia Martin e Roberto da Silva. **enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial**. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 1, 136-145, 2007
- [6] HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K.; Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour. Technol.*, v. 89, 17-34. 2003
- [7] COLOMBATTO, D., MOULD, F.L., BHAT, M.K., PHIPPS, R.H., and Owen, E. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage-S Effects of ensiling temperature F Enzyme source and addition level. *Anim Feed Sci. Technol.*, v. 111, p.111-128. 2004.



FÓRUM ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

FEPEG

UNIVERSIDADE: SABERES E PRÁTICAS INOVADORAS

Trabalhos científicos • Apresentações artísticas e culturais • Debates • Minicursos e Palestras

REALIZAÇÃO:



Unimontes
Universidade Estadual de Marília - UNIMONTES

APOIO:



FAPEMIG



FADENOR

24 a 27
setembro

Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

www.fepeg.unimontes.br

Tabela 1. Médias de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) dos isolados submetidos à ausência e presença de aquecimento.

Isolado	UFC sem aquecimento x (10 ⁵)	UFC após aquecimento x (10 ⁵)
EPI 03	24,00 ± 4,36	0,00 ± 0,00
NIM 02	20,33 ± 3,51	0,33 ± 0,58
NIM 04	13,33 ± 5,13	0,00 ± 0,00
NIM 05	4,33 ± 2,00	9,00 ± 2,65
NIM 07	7,00 ± 7,00	0,00 ± 0,00
NIM 09	4,33 ± 4,16	0,00 ± 0,00
NIM 10	17,33 ± 6,11	0,00 ± 0,00
NIM 12	5,67 ± 3,51	0,33 ± 0,58
NIM15	2,00 ± 1,00	0,33 ± 0,58
NIM 16	33,3 ± 4,04	1,67 ± 0,58