



APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE MATRIZES INORGÂNICAS PREPARADAS PELO PROCESSO SOL-GEL PARA IMOBILIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS *KLEBSIELLA OXYTOCA* E *BACILLUS FIRMUS*

¹Leonardo Yugo Abe Tanaka; ²José Eduardo Gonçalves.

Resumo: Os microrganismos apresentam uma grande diversidade genética e desempenham funções como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos assim ajudam as plantas no seu crescimento, adaptação e desenvolvimento. As bactérias isoladas identificadas como *Klebsiella oxytoca*, foram submetidas a ensaios visando quantificar a produção de ácido indolacético em meio de cultura NFb-malato suplementado com triptofano. No Brasil, há um forte incentivo para a produção de CDs a baixo custo, devido a grande disponibilidade e facilidade de obtenção do substrato amido, sendo que o seu emprego na produção das CDs agregará valor a esta matéria-prima. Os extratos dos sobrenadantes das culturas, incubados por diversos períodos de tempo, foram submetidos à análise espectrofotométrica para quantificação do AIA. As cepas de *Klebsiella oxytoca* e *Bacillus firmus* produziram AIA e β -CD, respectivamente quando imobilizadas com matrizes produzidas no processo sol-gel.

Palavras-chave: *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus firmus*, processo sol-gel, AIA, β -ciclodextrinas.

INTRODUÇÃO

Na parte da química, o processo sol-gel oferece uma versatilidade na formação dos compostos, principalmente por possibilitar a síntese de sistemas multicomponentes em que a estequiometria, tamanho de partículas, poros, microestrutura e homogeneidade podem ser muito bem controladas. Dentre os compostos de constituição simples, utilizados para a preparação de novos materiais via processo sol-gel, destacam-se os alcóxidos, sendo mais particularmente conhecidos os dos elementos silício, alumínio, zircônio e titânio, largamente empregados (AIROLD, FARIAS, 2004; DUTOIT *et al.*, 1997).

A imobilização de enzimas e células microbianas é um setor com ampla aplicação industrial devido a maior facilidade de armazenamento e vida útil do biocatalisador. As reações realizadas com enzimas e microrganismos suportados apresentam vantagens sobre as condições tradicionais (não suportadas), pois são mais facilmente processadas, permitem processos contínuos e diminuem o número de operações unitárias necessárias nas indústrias (QUINTANA *et al.*, 1999).

1 Acadêmico do Curso Farmácia. Departamento de Farmácia - Centro Universitário de Maringá – CESUMAR,

Maringá – PR. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do PROBIC/FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA-Cesumar (PROBIC-Cesumar). h4ziel@hotmail.com

2 Docente do CESUMAR. Departamento de Farmácia do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – PR. jegoncal@cesumar.br

Sabe-se que o gênero *Klebsiella* e outros grupos de bactérias RPCP produzem e liberam um largo espectro de substâncias reguladoras de crescimento de plantas, como auxinas, diversas giberelinas e citocininas. Entre as auxinas, o ácido indolacético (AIA) é o mais comum, as quais são conhecidas por estimular uma resposta rápida levando ao aumento do alongamento celular e outra de longa duração estimulando a divisão e diferenciação celular nas plantas (EL-KHAWAS *et al.*, 1999; BEYELER *et al.*, 1997; TEIXEIRA *et al.*, 2007).

As CDs são produzidas, usualmente, a partir do amido pela reação de ciclização das cadeias lineares de glucopirranose pela enzima ciclodextrina flicosiltransferase (CGTase). No Brasil, há um forte incentivo para a produção de CDs a baixo custo, devido a grande disponibilidade e facilidade de obtenção do substrato amido, sendo que o seu emprego na produção das CDs agregará valor a esta matéria-prima (MATIOLI, 2000).

Os sistemas com células imobilizadas têm sido amplamente revisado e aplicados em diversos processos biotecnológicos. Sua aplicação oferece vantagens, tais como a habilidade em separar a massa celular no final do processo para posterior reutilização, facilitando as operações descontínuas. Também melhoram as características dos processos contínuos, quando da necessidade de operação por um período prolongado, aumentando a produtividade do reator (ABDEL-NABY *et al.*, 2000).

MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Crescimento da *Klebsiella oxytoca* e *Bacillus firmus*

A inoculação da *Klebsiella oxytoca* em estudo será realizada pela transferência de um inoculo com alça de platina para o meio líquido NFb malato livre de nitrogênio mineral e mantido em agitador rotatório (120 rpm) à 28° C por 168 horas. As células bacterianas serão centrifugadas (5000 rpm) e lavadas duas vezes com 25 mL de solução tampão (NaHPO₄.7 H₂O / KH₂PO₄, 0,1 mol L⁻¹ pH 7) estéril.

A cepa de *Bacillus firmus* isolada e mantida em solo será suspensa em água estéril e semeada em placas contendo meio de cultura sólido, cuja composição (p/v) será: 1,0% de amido; 0,5% de polipeptona; 0,5% de extrato de levedura; 0,1% de K₂PO₄; 0,02% de MgSO₄.2 H₂O; 1,0% de Na₂CO₃; 0,01% de corante vermelho do congo e 1,5% de Agar. As placas serão incubadas a 37°C por 48 horas. Após está etapa, será preparado um pré-inóculo, em meio de cultivo com composição idêntica à do meio sólido, exceto no Agar e corante, que neste caso não serão adicionados. Também a concentração do meio de amido passará a ser de 2,0% (p/v). O cultivo deverá ser feito a 37°C por 48 horas e agitação constante de 150 rpm. Após o crescimento do pré-inóculo, serão repassados 50mL para meios líquidos de 1.000 mL, que serão novamente incubados a 37°C por 5 dias sob agitação (150 rpm) (MATIOLI, 1997).

2.1.4 Imobilização dos microrganismos nas matrizes inorgânicas

A imobilização das bactérias serão realizadas em enlenmeyer (250 mL) contendo água destilada estéril (50 mL), células integras do microrganismo previamente lavadas (ca. 1,2g, peso úmido) e as matrizes inorgânicas (0,6g) esterilizada. A suspensão resultante será agitada a 120 rpm, mantendo-se a temperatura em 28°C. Após 12 horas o sólido será filtrado.

Uma parte do material imobilizado será estocado em recipientes estéreis sob refrigeração para testar sua estabilidade e verificar a manutenção da sua atividade biocatalítica após períodos de estocagem (MARSAIOLI *et al.*, 2001).

2.1.5 Preparo das amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após a adsorção das bactérias nas matrizes inorgânicas, os materiais serão colocados em presença de uma solução tampão (NaHPO₄.7 H₂O / KH₂PO₄, 0,1 mol L⁻¹ pH 7) contendo 2,5% de glutaraldeído por 24 horas. Após este período as soluções sobrenadantes serão descartadas e os materiais lavados três vezes com soluções

etanólicas de 30%, 50%, 70%, 90% e 100% consecutivamente. O mesmo procedimento será realizado com as células bacterianas não imobilizadas.

O material permanecerá em etanol absoluto até a realização do ponto crítico, utilizando CO₂ líquido à alta pressão.

2.1.6 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras para micrografia serão colocadas sobre a superfície de uma fita dupla face aderida aos portas amostra de alumínio. Para as micrografias das matrizes inorgânicas, das células bacterianas livres e imobilizadas será depositado uma camada fina de ouro, através de um metalizador Shimadzu.

As micrografias serão obtidas em um microscópio eletrônico de varredura "Shimadzu". A tensão de aceleração utilizada para as amostras biológicas será de 15 KeV e para a matriz inorgânica de 20 KeV.

2.1.7 Quantificação do ácido indolacético em *Klebsiella oxytoca* imobilizada nas matrizes inorgânicas

Amostras isoladas e imobilizadas de *Klebsiella oxytoca* serão cultivadas em meio líquido NFb malato livre de nitrogênio mineral, ao qual foi adicionado o triptofano (100µg.mL⁻¹), os isolados serão cultivados a 28°C com agitação por um período de tempo variando de 24 à 168 horas. Após cada um destes períodos os meios de cultura serão centrifugados, a seguir a 1 mL dos sobrenadantes serão adicionados 2 mL do reativo de Salkowski e depois de 25 minutos será realizado a leitura em um espectrofotômetro Varian a 530 nm. O AIA será utilizado como padrão na concentração de 10 - 100100µg.mL⁻¹.

Os sobrenadantes das culturas em diferentes tempos de incubação serão alcalinizados a pH 6,8 e extraído com acetato de etila. A fração aquosa resultante será acidificada a pH 2,8 e extraída com acetato de etila. As frações orgânicas ácida e básica serão analisadas separadamente por cromatografia líquida de alta eficiência (EL-KAWA, 1999).

2.1.8 Determinação de β-CD

A concentração de β-CD é medida pela descoloração de uma solução de fenolfataleína a 550 nm, a qual ocorre depois da complexação com β-CD.

De acordo com a Teoria da Complexação (HAMON & MORAES, 1990), que leva em consideração a constante de equilíbrio (K_{β-CD}), a concentração da solução de fenolfataleína (a = 0,00005 M), a absorbância das amostras (ABS) e de uma solução isenta de β-CD (ABS_o), a equação para calcular a concentração de β-CD é a que segue:

$$C_{\beta-CD} = 6000 \times a \left(1 - \frac{ABS}{ABS_o} \right) \times \left[1 + \frac{ABS_o}{(K_{\beta-CD} \times a \times ABS)} \right]$$

A curva padrão deve ser preparada com uma solução de β-CD 1 mM e a leitura, em espectrofotômetro a 550 nm, utilizando como branco água destilada. A dosagem é feita com 0,5 mL da amostra e 2,5 mL da solução trabalho de fenolfataleína. A solução trabalho é preparada pela adição de 2,0 mL de uma solução estoque de fenolfataleína 3 mM, 20 mL de uma solução de tampão carbonato 0,6 M e pH 10,5 e completando-se o volume para 100 mL com água destilada em balão volumétrico.

A curva padrão deve ser construída com no mínimo 20 pontos e a constante de equilíbrio (K_{β-CD}) deve ser estimada, utilizando os dados de absorbância em função da concentração, pelo programa Statistica®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra a análise de microscopia eletrônica de varredura para a bactéria *Klebsiella oxytoca*. Pode-se observar que o bactéria encontra-se imobilizada em toda a

superfície da matriz de SiO_2/MnO , apresentando um boa densidade de células de microrganismos imobilizados por área superficial do suporte.

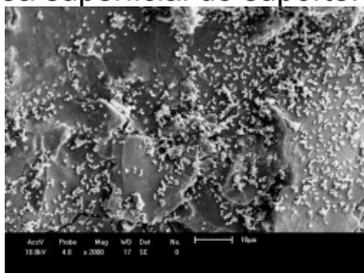


Figura 1. Micrografia da bactéria *Klebsiella oxytoca* imobilizada na matriz SiO_2/MnO .

Amostras isoladas e imobilizadas de *Klebsiella oxytoca* foram cultivadas em meio líquido NFb malato livre de nitrogênio mineral, ao qual foi adicionado o triptofano ($100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$), os isolados foram cultivadas a 28°C com agitação por um período de tempo variando de 24 às 168 h. Após cada um destes períodos os meios de cultura foram centrifugados, a seguir a 1 mL dos sobrenadantes foram adicionados 2 mL do reativo de Salkowski e depois de 25 min realizou-se a leitura em um espectrofotômetro a 530nm . O AIA foi utilizado como padrão ($10 - 100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$).

Tabela 1. Variação da concentração de AIA em função do tempo.

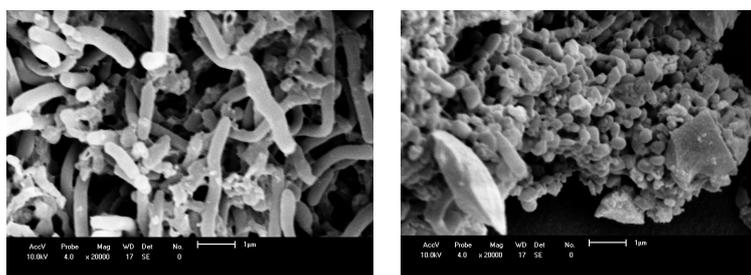
Horas	[AIA] $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ por Células livres	[AIA] $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ por Células Imobilizadas
24	50,2	7,1
48	51,5	32,7
72	43,8	40,8
168	55,6	92,1

Os resultados observados na Tabela 1 demonstram que as células livres apresentam uma taxa de conversão de triptofano em AIA $\sim 50\%$ no período de 24 a 168 h, enquanto que as células imobilizadas apresentam um aumento crescente na taxa de conversão atingindo $\sim 92\%$ no mesmo período.

A diferença apresentada na conversão deve-se ao fato de que as células imobilizadas não estão se multiplicando, convertendo assim quase todo triptofano em AIA, enquanto que as células livres utilizam parte deste aminoácido para seu crescimento.

A Figura 2 mostra as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura observadas para a bactéria *Bacillus firmus* isolada e imobilizada na matriz $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$. Outro suporte inorgânico que teve uma boa adsorção da bactéria foi a matriz $\text{SiO}_2/\text{MnO}_2$. Uma adsorção satisfatória na matriz $\text{V}_2\text{O}_5/\text{TiO}_2$ e uma adsorção parcial nas matrizes $\text{V}_2\text{O}_5/\text{SiO}_2$ e celulose/ TiO_2 , foi observada.

Quando comparado a produção de β -CD com células isoladas e imobilizadas, pôde-se observar um aumento de 20% na produção de β -CD quando se passou de 1.2 para 3.0 g de biomassa para as células imobilizadas na matriz $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$. Já quando imobilizadas com $\text{SiO}_2/\text{MnO}_2$ teve uma produção de 25% maior de β -CD quando se utiliza 1.8g de biomassa.



A)

B)

Figura 2: Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para: Célula livre (A), SiO₂/TiO₂ (B), V₂O₅/TiO₂ (C), V₂O₅/SiO₂ (D), celulose/TiO₂ (E).

CONCLUSÃO

1. As matrizes inorgânicas preparadas pelo processo sol-gel mostraram se apropriadas para imobilização das bactérias *Klebsiella oxytoca* e *Bacillus firmus*;
2. A *Klebsiella oxytoca* apresentou uma ótima capacidade de fixação de nitrogênio quando comparado com células livres;
3. A bactéria *Bacillus firmus* apresentou uma boa conversão na produção de β-CD;
4. Mais estudos são necessários para implantação dos processos em sistemas contínuos, visando a aplicação no meio industrial.

REFERÊNCIAS

- AIROLDI, Cláudio; FARIAS, Robson Fernandes de. Alcóxidos como precursores na síntese de novos materiais através do processo sol-gel. Química. Nova, v. 27, n. 1, p. 84-88, 2004.
- ABDEL-NABY, M.; REYARD, R. D.; ABDEL-FATTAH, A. F. Biosynthesis of cyclodextrin glucosyltransferase by immobilized *Bacillus amyloliquefaciens* in batch and continuous cultures. Biochemical Engineering Journal, v. 5, p. 1-9, 2000.
- BEYELER, M.; MICHAUX, P.; KELL, C.; HASS, D. Effect of enhanced production of indol-3-acetic by biological control *Pseudomonas fluorescens* CHAO on plant growth. In: Proceedings of the Fourth International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. In: Ogoshi, A.; Kobayashi, K.; Homma, Y.; Kodama, F.; Kondo, M.; Akino, S. Sapporo, Japan, October 18-22, 1997, Sapporo University, p. 310-312.
- DUTOIT, D. C. M.; SCHNEIDER, M.; GÖBEL, U.; BAIKER, A. Titania-Sailica Mixed Oxides: V. Effect of Sol-Gel and Drying Conditions on Surface Properties. J. Ca., v. 164, p. 433-439, 1999.
- EL-KHAWAS, H.; ADACHI, K. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. Biol Fertil Soils, v. 28, p. 377-381, 1999.
- HAMON, V.; MORAES, F. F. de. *Étude préliminaire a l'immobilisation de la CGTase WACKER*. Laboratoire de Technologie Enzymatique. Université de Technologie de Compiègne. 1990. (Relatório de pesquisa)
- MARSAIOLI, A. J; GONÇALVES, R. A. C; GONÇALVES, J. E; GUSHUKEM, Y. Processo de imobilização de *Serratia rubidaea* CCT 5732 em óxido misto de sílica-titânia. Patente Brasil, protocolo n. 100.200-7, 2001.
- MATIOLI, G.; MORAES, F. F. de; ZANIN, F. M. Ciclodextrinas e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 2000.