

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

# ESTUDO DA BIODEGRADAÇÃO DE PENAS POR COMUNIDADES MICROBIANAS

Danielle Campiol Arruda

Orientador: Dr. Alexandre José Macedo

Co-orientador: Dr. Carlos Termignoni

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Celular e  
Molecular da UFRGS como um dos requisitos  
para a obtenção do grau de Mestre

Porto Alegre, 30 de agosto de 2010.

BANCA EXAMINADORA

---

Dr. Charley Staats

Centro de Biotecnologia – UFRGS

---

Dra. Fatima Menezes Bento

Departamento de Microbiologia – UFRGS

---

Dra. Siu Mui Tsai

Universidade de São Paulo

---

Dra. Adriana Seixas (suplente)

Centro de Biotecnologia - UFRGS

Porto Alegre, 30 de agosto de 2010.

*“DAS UTOPIAS  
Se as coisas são inatingíveis... ora!  
Não é motivo para não querê-las...  
Que tristes os caminhos, se não fora  
A presença distante das estrelas!”*

Mário Quintana

## AGRADECIMENTOS

Eu dedico este trabalho as seguintes pessoas:

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Alexandre José Macedo;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Carlos Termignoni, pela acolhida em seu laboratório e pelas considerações e contribuições neste trabalho;

Às minhas amigas de pós-graduação Danielle da Silva Trentin, Karine Rigon Zimmer, Marina Scopel, por compartilhar diariamente alegrias e angústias dentro e fora do laboratório;

Amigos do Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana, em especial a Élen Klein, por todo empenho e ajuda nesta etapa final do trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Peptídeos e Enzimas Proteolíticas, em especial a Dra. Adriana Seixas e Andréia Bergamo Estrela, por todo apoio que dedicaram desde que iniciei este trabalho;

Aos laboratórios de Bioquímica Farmacológica, Proteínas Tóxicas e Laboratório de Biologia de Fungos de importância médica e biotecnológica, pelas contribuições no dia-a-dia durante o esses dois anos;

Aos professores e funcionários do PPGBCM e do Centro de Biotecnologia, em especial a Sílvia Centeno, Luciano Saucedo e Graziela Barbosa, sempre dispostos a ajudar;

Aos membros da minha comissão de acompanhamento, Profa. Dra. Célia Carlini e Prof. Dr. Jeverson Frasson, por todas as sugestões e questionamentos;

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub pela revisão do meu primeiro manuscrito (capítulo 3) e à Profa. Dra. Simone Flores pela colaboração e discussão dos resultados relacionados aos planejamentos estatísticos realizados;

Aos meus amigos, Paola, Luna, Fred, Carina e Rita, por fazerem parte da minha vida;

Ao meu pai, por todo amor e confiança;

A minha mãe e irmã, pela compreensão diária e carinho nos momentos mais difíceis.

## SUMÁRIO

Abreviaturas.....	07
Resumo.....	08
Abstract.....	09
1. Introdução	
1.1 Produção de aves e resíduo: mundo, Brasil e Rio Grande do Sul.....	10
1.2 Características do resíduo: composição e aplicações.....	12
1.3 Degradação de resíduos por microrganismos isolados e comunidades microbianas.....	16
1.4 Planejamento experimental e montagens de comunidades microbianas	
1.4.1 Planejamento Plackett-Burman (PB).....	19
1.4.2 Fatorial Completo.....	21
2. Objetivos.....	25
3. Capítulo 1: Degradação de penas de aves inteiras.....	26
3.1 Materiais e Métodos	
3.1.1 Identificação dos isolados.....	26
3.1.2 Caracterização do consumo de diferentes fontes de carbono.....	26
3.1.3 Planejamento Experimental Plackett-Burman.....	28
3.1.4 Estudo do efeito da presença/ausência de bactérias no meio de cultivo.....	30
3.1.5 Estudo da variação de pH e concentração de penas.....	30
3.1.6 Cálculo da porcentagem de degradação.....	31
3.1.7 Avaliação da atividade queratinolítica.....	31
3.1.8 Formação de biofilme e microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	32
3.2 Resultados e Discussão	
3.2.1 Rastreamento de microrganismos e estudo de comunidades microbianas utilizando planejamento experimental Plackett-Burman.....	33
3.2.2 Caracterização do consumo de fontes de carbono.....	36
3.2.3 Planejamento Plackett-Burman com 4 bactérias.....	37
3.2.4 Formação de biofilme sobre penas e visualização por microscopia eletrônica de varredura.....	42
3.2.5 Avaliação da biodegradação de penas visando aplicação industrial: presença e ausência de bactérias, variação de pH e concentração de penas.....	43
4. Capítulo 2 – Statistical based design to assembly keratin-degrading artificial bacterial communities.....	49
Abstract.....	51
4.1 Introduction.....	52
4.2 Materials and Methods.....	53
4.3 Results.....	56
4.4 Discussion.....	63
Acknowledgments.....	64
References.....	64
5. Capítulo 3 – Role of Biofilm Formation and Keratinolytic Activity Upon Feather Biodegradation.....	69
Abstract.....	70

5.1 Introduction.....	71
5.2 Materials and Methods	
5.2.1 Microorganisms.....	71
5.2.2. Feather Meal Degradation.....	72
5.2.3 Scanning Electron Microscopy.....	72
5.2.4 Biofilm formation.....	72
5.2.5 Keratinolitic activity.....	73
5.3 Results and Discussion.....	74
5.4 Conclusions.....	79
References.....	79
6. Conclusões.....	82
7. Impacto.....	83
8. Perspectivas.....	83
9. Referências Bibliográficas.....	83
10. Currículo.....	90

## ABREVIATURAS

BCA – ácido bicincônico

C – controle

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

DMSO – dimetilsulfóxido

E – efeito

FC – fatorial completo

FCA – Franca

LB – Luria-Bertani

MEV – microscopia eletrônica de varredura

NP – Nova Petrópolis

OD570 – densidade ótica em 570 nm

OD600 – densidade ótica em 600 nm

PB – Plackett-Burman

PCR - reação em cadeia da polimerase

rpm – rotações por minuto

rRNA – RNA ribossomal

U – unidade de atividade enzimática

UFC – unidades formadoras de colônias

## RESUMO

A alta produção avícola nacional gera milhares de toneladas de penas de aves como resíduo por ano. Considerando que este resíduo é composto por aproximadamente 90% de queratina, a busca pelo tratamento e reaproveitamento desta proteína torna-se de grande interesse ambiental e econômico. A biodegradação por diversos microrganismos tem sido abordada como uma alternativa ao atual tratamento termo-mecânico. Este trabalho tem como objetivo estudar a aplicação de diferentes bactérias em comunidades na degradação de dois resíduos provenientes da indústria aviária: penas de aves cruas e farinha de pena. Como ferramentas para montagem de comunidades microbianas foram avaliados dois planejamentos experimentais: Plackett-Burman e Fatorial Completo. O primeiro deles foi utilizado no rastreamento de bactérias importantes na degradação de penas de aves cruas, resultando na seleção de quatro bactérias (*Bacillus subtilis* S14, *Bacillus cereus* NP4, *Bacillus subtilis* NP5 e *Macrococcus caseolyticus* FCA7) e no incremento de 4% na degradação deste resíduo comparando os microrganismos isoladamente e em comunidades. Quando penas não autoclavadas foram utilizadas, a adição de *Bacillus subtilis* NP5 foi suficiente para aumentar a degradação de 14% para 33%. O segundo planejamento avaliou a influência da presença de bactérias na degradação de farinha de penas. Assim como ocorre em penas de aves cruas, a bactéria *Bacillus subtilis* NP5 mostrou-se essencial para obtenção de alta degradação. Após observar a formação de biofilme sobre a superfície deste resíduo por microscopia eletrônica de varredura, foi avaliada a sua relação com a produção de queratinases e a degradação deste resíduo. Considerando as quatro bactérias isoladas e em comunidades, os resultados demonstram que não há uma relação direta entre os parâmetros avaliados. Porém, a maior degradação obtida pelo *Bacillus subtilis* NP5 parece envolver tanto a produção de queratinase quanto a alta formação de biofilme.



## ABSTRACT

The high Brazilian poultry production generates thousands of tons of feathers as a waste, per year. Since its is composed of approximately 90% of keratin, the search for treatment and reuse of this protein becomes of great environmental and economic interest. The biodegradation by various microorganisms has been discussed as an alternative to replace the current thermo-mecanical treatment. This work aimed to investigate the application of different bacterial strains in communities during degradation of two keratin wastes from the poultry industry: raw feathers and feather meal. Two experimental designs were used as tools for microbial communities: Complete Factorial and Plackett-Burman. The first one was used to screen bacteria of importance in the degradation of raw feathers. It allowed the selection of four bacteria (*Bacillus subtilis* S14, NP4 *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* NP5 and *Macrococcus caseolyticus* FCA7) and improved feather degradation in 4% by comparing the isolates and microbial communities. Using non-autoclaved feathers, the addition of *Bacillus subtilis* NP5 only was enough to increase the degradation of 14% to 33%. As occurs in raw feathers, the bacterium *Bacillus subtilis* NP5 was strongly involved and essential for obtaining high percentage of degradation. Biofilm formation in feather surface was demonstrated by scanning electron microscopy. Whether this phenomenon was directly related to the production of keratinase and degradation of this waste was also evaluated. Considering the action of each bacterium strain alone or in communities, results show that there is not a direct relationship between the evaluated parameters. It was demonstrated that the highest degradation obtained by *Bacillus subtilis* NP5 appears to involve both the production of keratinase and high biofilm formation.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 PRODUÇÃO DE AVES: MUNDO, BRASIL E RIO GRANDE DO SUL

Segundo a Associação Brasileira de Exportadores de Frango ([www.abef.com.br](http://www.abef.com.br)) , a produção mundial de carne de frango já ultrapassou 70 milhões de toneladas/ano, o que faz do Brasil o terceiro maior produtor de carne de frango (Figura 1) e o líder em exportação no mundo (Figura 2). Mais de 70% da produção nacional é proveniente da região sul, sendo que o Rio Grande do Sul é o terceiro maior produtor (Figura 3) juntamente com o estado de São Paulo.

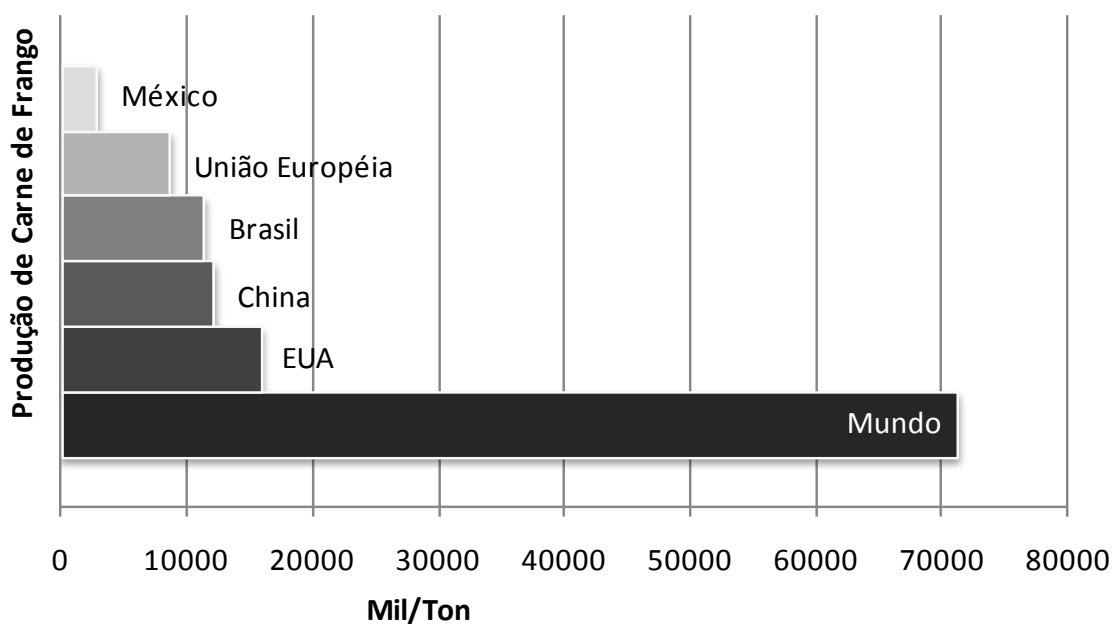


Figura 1: Produção mundial de carne de frango prevista para o ano de 2009 (Adaptado de ABEF, 2010).

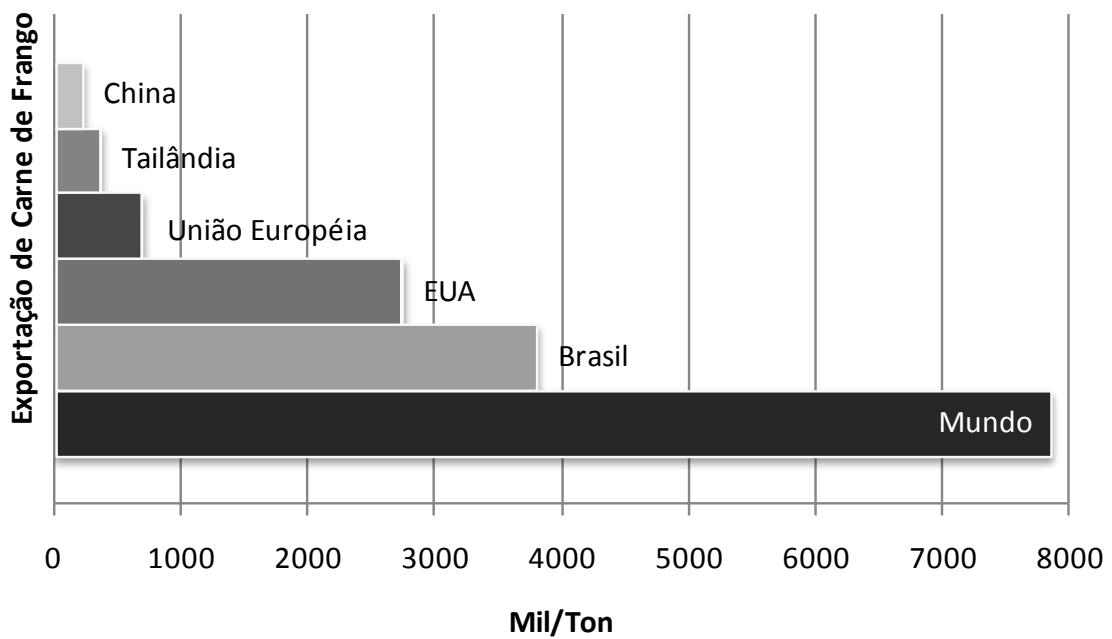


Figura 2: Exportação mundial de carne de frango prevista para o ano de 2009 (Adaptado de ABEF, 2010).

Dentre os principais resíduos gerados por esse segmento pecuário estão dejeções ou esterco, cama de aviário, aves mortas, ovos quebrados e penas. Considerando que as penas de aves podem atingir até 7% do peso de uma ave, cerca de 700 mil toneladas deste resíduo são produzidas por ano somente no Brasil. No mundo este valor pode ultrapassar 4 milhões de toneladas.

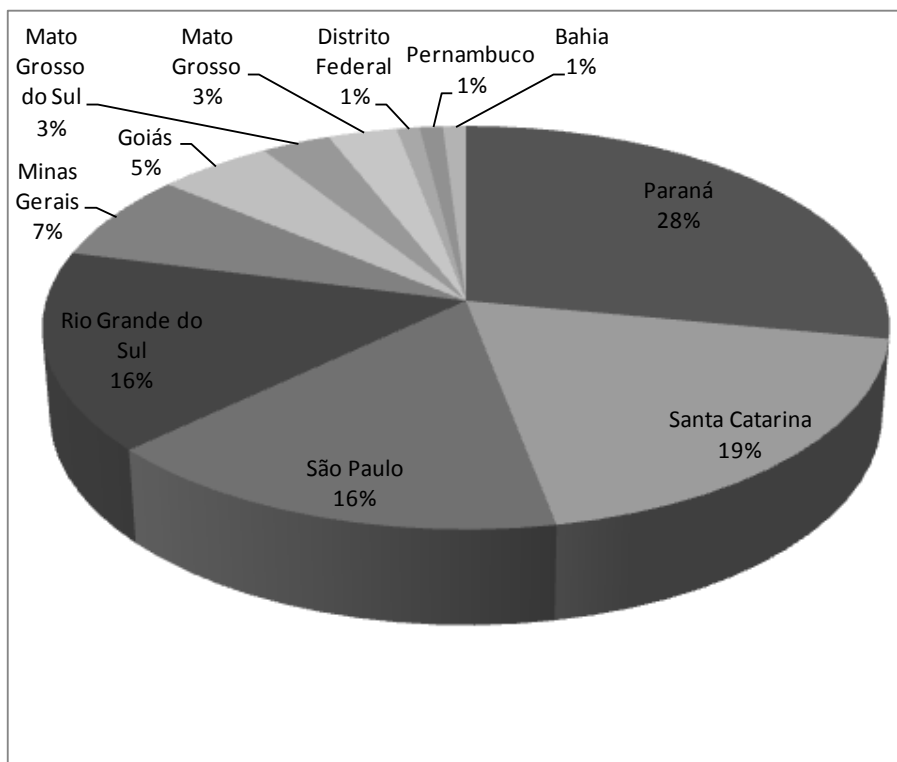


Figura 3: Panorama nacional de produção de carne de frango 2007/2008 (Adaptado UBA, 2010)

O aumento progressivo do consumo deste tipo de carne gera paralelamente um grave problema de acúmulo de resíduo de pena. Apesar das penas serem degradadas naturalmente, seu descarte em grandes quantidades se torna insustentável ao meio ambiente. Com isso, surge a necessidade de desenvolver um tratamento adequado para descarte e possível re-aproveitamento deste resíduo.

## 1.2 CARACTERÍSTICAS DO RESÍDUO: COMPOSIÇÃO E APLICAÇÕES

As penas de aves residuais da produção avícola apresentam alto potencial de re-aproveitamento, já que são compostas por aproximadamente 90% de queratina (ONIFADE et al., 1998). Esta é uma proteína fibrosa e insolúvel que tem funções primárias estruturais

e de proteção das aves. Devido a estas características, ela possui alta resistência mecânica. Esta rigidez se deve a presença de muitos resíduos de cisteína favorecendo a formação de pontes de dissulfeto na cadeia polipeptídica (Figura 4).

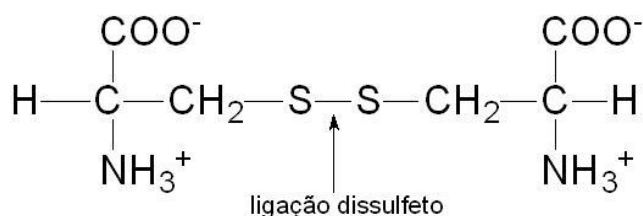


Figura 4: Pontes de dissulfeto entre dois resíduos de cisteína (Adaptado de ONIFADE et al., 1998)

Outro fator relevante é que a queratina não é hidrolisada por enzimas digestivas como pepsina e tripsina (GUPTA & RAMNANI, 2006). Isto faz com que ela apresente baixa digestibilidade. A solubilização total desta proteína ocorre quando as pontes de dissulfeto são rompidas, tornando a cadeia polipeptídica mais suscetível à ação enzimática. A quebra destas pontes pode ser feita pela adição de agentes redutores como ácido tioglicólico, sulfetos, sulfitos, dimetilsulfóxido e uréia (VERMELHO et al., 2008). Alguns estudos já identificaram microrganismos capazes de exercer esta mesma função devido à produção de enzimas chamadas dissulfeto redutases (SANGALI & BRANDELLI, 2000; YAMAMURA et al., 2002). A utilização destas enzimas em combinação com queratinases surge como alternativa ao uso de produtos químicos na digestão de penas, a fim de manter o valor nutricional deste substrato (VERMELHO et al., 2008).

Conforme sua estrutura secundária, a queratina pode ser classificada como  $\alpha$ -queratina, quando a cadeia polipeptídica se enrola formando  $\alpha$ -hélices bem rígidas, ou  $\beta$ -queratina quando folhas  $\beta$  formam filamentos flexíveis (Figura 5). O primeiro tipo é

encontrado principalmente em unhas, cascos, bicos, pêlos, chifre, lã, cabelo e epiderme; enquanto o segundo é característico das penas de aves, fios de seda e teias de aranha (VERMELHO et al., 2008).

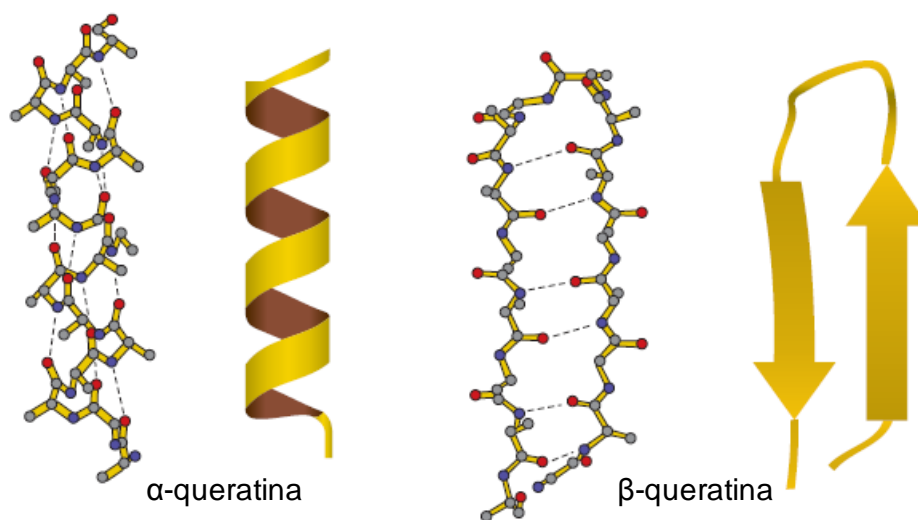


Figura 5: Dois tipos de estrutura secundária da queratina (Adaptado de VERMELHO et al., 2008)

O tratamento mais comum para processar estes resíduos, atualmente, utiliza alta pressão e temperatura para conseguir destruir a estrutura protéica e aumentar sua digestibilidade. Porém, ocorre também a destruição de muitos aminoácidos essenciais e produção de outros não assimiláveis, resultando em um produto de baixo valor nutricional (VERMELHO et al., 2008). A busca por métodos alternativos para o processamento de penas visa reduzir de custos e gastos de energia, além de elevar o valor nutricional do produto resultante (ONIFADE et al., 1998).

Observando a degradação natural das penas no meio ambiente, muitos trabalhos já identificaram microrganismos capazes de utilizar queratina como fonte de nutrientes

(ONIFADE et al., 1998). Esta habilidade se deve a produção de enzimas, chamadas queratinases, capazes de hidrolisar esta proteína. Alguns exemplos de microrganismos produtores de queratinases são mostrados na Tabela 1. Estas queratinases são peptidases, podendo ser endo ou exopeptidases, capazes de promover a hidrólise parcial da queratina. Os oligopeptídeos resultantes dessas hidrólises podem, então, servir de substrato para ação de outras peptidases e, dessa forma, potencialmente serem utilizados como fonte nutritiva por outros microrganismos não produtores de queratinases.

Tabela 1: Microrganismos e respectivas massas moleculares das queratinases por eles produzidas.

<b>Microrganismo</b>	<b>Massa Molecular (kDa)</b>
<i>Clostridium sporogenes</i> bv. pennavorans bv. nov. (IONATA et al., 2008)	28,7
<i>Doratomyces microsporus</i> (GRADISAR et al., 2000)	30-33
<i>Trichoderma atroviride</i> F6 (CAO et al., 2008)	21
<i>Bacillus pseudofirmus</i> FA30-01 (KOJIMA et al., 2006)	27,5
<i>Bacillus pumilus</i> (KUMAR et al., 2008)	65
<i>Bacillus subtilis</i> S14 (MACEDO et al., 2008)	27
<i>Fervidobacterium pennavorans</i> (FRIEDRICH & ANTRANIKIAN, 1996)	130
<i>Streptomyces gulbargensis</i> (SYED et al., 2009)	46
<i>Stenotrophomonas</i> sp. (CAO et al., 2009)	32,5
<i>Chryseobacterium indologenes</i> TKU014 (WANG et al., 2008)	54, 40 e 40

Dentre as principais aplicações do produto resultante da biodegradação de penas, destacam-se a utilização do hidrolisado rico em peptídeos e aminoácidos como suplemento em ração animal e aplicação deste em solos como fertilizante (ICHIDA et al., 2001). Estes resíduos também podem servir de substrato para produção de queratinases para aplicação na depilação de pele bovina em curtumes (MACEDO et al., 2008), como aditivo em rações animais (ODETALLAH et al., 2005), e também para uso humano em produtos cosméticos (MAZOTTO et al., 2010). Esta ampla gama de aplicações biotecnológicas incentiva a pesquisa e desenvolvimento de processos eficientes para produção de enzimas queratinolíticas e tratamento de resíduos queratinosos.

### 1.3 DEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS POR MICRORGANISMOS ISOLADOS E COMUNIDADES MICROBIANAS

No meio ambiente, a biodegradação de matérias orgânicas ocorre pela ação de microrganismos com diferentes capacidades metabólicas em comunidades (DAVEY & O'TOOLE, 2000) (Figura 6). Diferentes combinações de microrganismos com perfis metabólicos variados resultam em grande versatilidade de adaptação a ambientes adversos. Alguns exemplos destas condições incluem ambientes com alta concentração de sais (HOLLISTER et al., 2010), baixo pH e alta concentração de metais (BELNAP et al., 2010), e altas temperaturas (INSKEEP et al., 2010).

Muitos trabalhos já identificaram microrganismos produtores de enzimas específicas para biodegradação de outros resíduos recalcitrantes como celulose e lignina (LYND et al., 2002; MAKI et al., 2009), e compostos tóxicos (MACEDO et al., 2007; PURNOMO et al., 2010). Tradicionalmente, o estudo de biodegradação é iniciado pelo isolamento de microrganismos, identificação e utilização deste para obtenção de uma atividade



específica. Nos últimos anos a abordagem metagenômica mostrou que a diversidade microbiana no meio ambiente é muito superior a esperada, visto que muitas espécies não são cultiváveis em laboratório (BRADY et al., 2009). A caracterização e identificação de comunidades microbianas naturais por esta abordagem pode auxiliar na escolha racional de microorganismos para aplicação de consórcios em processos de biodegradação de resíduos.

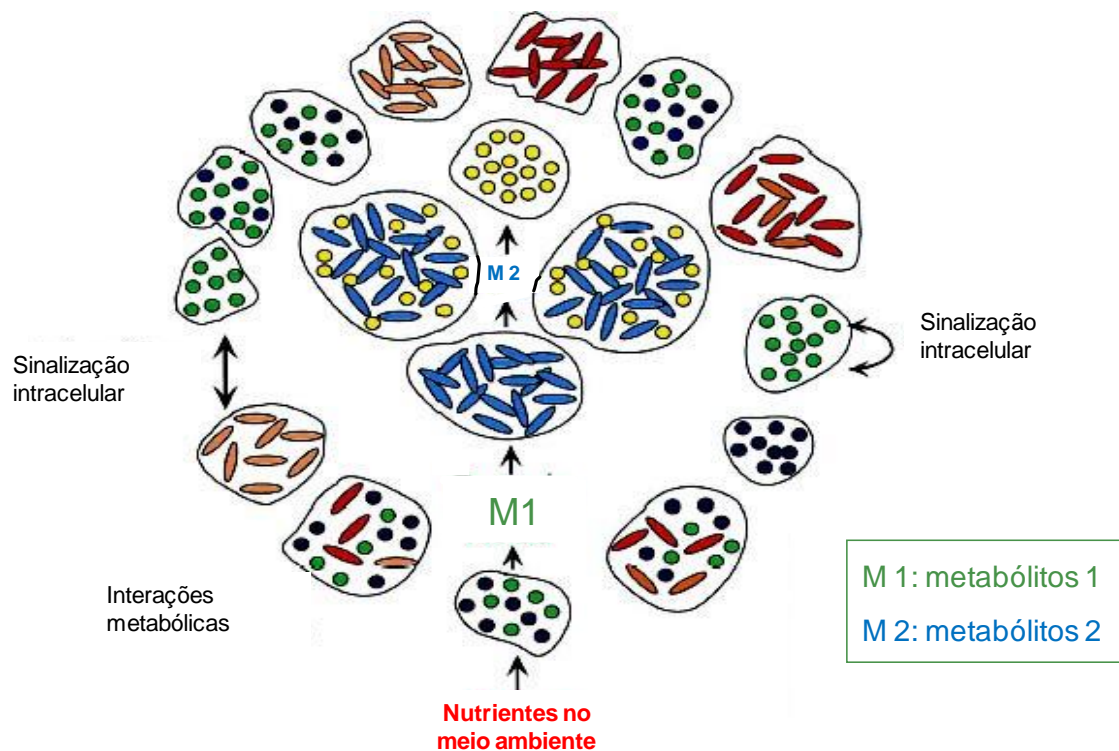


Figura 6: Consumo de nutrientes entre microcolônias, de espécies iguais ou diferentes, em uma comunidade natural (Adaptado de DAVEY & O'TOOLE, 2002).

A ação de múltiplos microrganismos é o princípio dos processos de compostagem já utilizados há muito tempo (GODDEN & PENNINGCKX, 1984; ICHIDA et al., 2001). Baseados na idéia de que a aplicação de comunidades microbianas melhora o processo degradativo, o grupo de pesquisa liderado por Igarashi desenvolveu comunidades artificiais

com maior capacidade de degradação de celulose (HARUTA et al., 2002; KATO et al., 2008). Contudo, obter uma comunidade adequada à função desejada implica na adequação de diferentes variáveis. Esta é gerada pela influência de múltiplos fatores como concentração celular, disponibilidade de nutrientes, interações entre os microrganismos envolvidos, capacidades metabólicas e produção de antibióticos (HARUTA et al., 2009). Um fenômeno importante a ser considerado quando se fala em substratos insolúveis como a queratina, é a formação de biofilme, visto que estes substratos servem como base para adesão de microrganismos e permitem um maior contato durante a biodegradação. A formação de biofilme envolve diferentes etapas (Figura 7). O início deste fenômeno acontece quando células planctônicas se aderem fracamente a uma superfície (processo reversível) formando uma monocamada celular. Após se fixarem, as células aderidas de forma irreversível se comunicam através de um sistema, mediado por moléculas sinalizadoras, chamado *quorum-sensing*. Dessa forma é atingido um determinado número de células (microcolônia) que promove a produção de uma matriz exopolissacarídica que protege a comunidade de situações adversas. A maturação deste biofilme consiste na formação de uma estrutura altamente organizada que permite a distribuição de nutrientes ou remoção de metabólitos entre os microrganismos envolvidos. Perturbações externas podem fazer que esta estrutura se rompa e promova o desprendimento e dispersão das células novamente. A forma de vida em biofilme pode ser composta por indivíduos de mesma espécie ou espécies diferentes, formando uma estrutura que promove a simbiose entre os envolvidos (DAVEY & O'TOOLE, 2000). Em biofilmes multi-espécie pode haver a secreção de enzimas que rompem a comunicação de bactérias heterólogas, que, presumivelmente, pode reduzir a competição por nutrientes (CHOUDHARY & SCHMIDT-DANNERT, 2010). Os biofilmes também podem apresentar enzimas

associadas a sua matriz, que juntamente com enzimas excretadas no meio circundante a ele, facilitam o processo de degradação de partículas insolúveis (ROMANÍ et al., 2008). Contudo a formação deste fenômeno envolve diversos fatores como a formação de um filme condicionante, condições ambientais favoráveis e características dos microrganismos envolvidos (DAVEY & O'TOOLE, 2000; JAIN & BHOSLE, 2009).

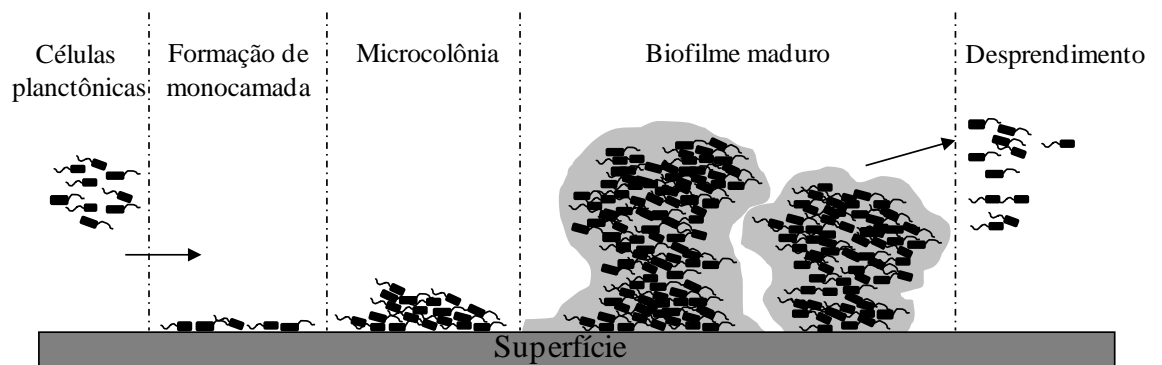


Figura 7: Etapas de formação de biofilme sobre uma superfície.

#### 1.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E MONTAGENS DE COMUNIDADES MICROBIANAS

Dois tipos de planejamento experimental foram usados neste trabalho: Plackett-Burman e Fatorial Completo.

##### 1.4.1 Planejamento Plackett-Burman (PB) (PLACKETT & BURMAN, 1946)

Este planejamento possui como característica principal o rastreamento de fatores importantes em um processo através do cálculo do efeito de muitas variáveis (independentes) envolvidas ao mesmo tempo. Dessa forma, consegue-se reduzir o custo e o tempo de desenvolvimento, assim como o melhoramento de um processo quando comparado com o método clássico em que é testada uma variável por vez (STOWE &

MAYER, 1966). Este desenho experimental é composto por  $N$  experimentos em que são avaliadas  $N-1$  variáveis. A estruturação dos experimentos é baseada em uma matriz pré-estabelecida conforme o número de variáveis a serem avaliadas (Tabela 2). A menor matriz possui 8 experimentos e a maior delas 100 experimentos, sendo que as intermediárias sempre terão número de experimentos múltiplos de quatro.

Os sinais positivos e negativos presentes na matriz representam o nível superior e o nível inferior, respectivamente, utilizados para cada variável. Os valores de cada nível são escolhidos pelo pesquisador, conforme conhecimento prévio sobre aquela variável. Um exemplo de escolha de variável e seus níveis é a avaliação da influência de do pH na produção de uma enzima, em que os pHs 5 e 8 representam o nível inferior e superior neste caso, respectivamente. Se o planejamento apresentar número de variáveis superior às realmente testadas, aquelas que não representam valores reais são chamadas de “variáveis falsas” (indicadas pelas letras entre parênteses na Tabela 2) e podem ser usadas para cálculo da variância. Alguns exemplos de uso deste tipo de planejamento experimental são: desenvolvimento e otimização de método para separação de impurezas farmacêuticas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (LI & sRASMUSSEN, 2003) e otimização da produção de uma protease alcalina por uma bactéria (CHAUHAN & GUPTA, 2004).

Tabela 2: Matriz de PB de 16 experimentos para avaliação de até 15 variáveis (Adaptado de STOWE & MAYER, 1966).

Experimento	A	B	C	D	E	F	(G)	H	I	J	K	L	M	(N)	(O)
1	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
2	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
3	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
4	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
5	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
6	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-
7	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
8	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
9	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
10	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
11	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
12	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
13	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
14	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-
15	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

#### 1.4.2 Fatorial completo (FC)

Neste caso, todas as combinações possíveis entre os níveis escolhidos para cada variável são realizadas. Assim como no planejamento PB, é necessária a escolha de dois

níveis para as variáveis selecionadas. Sabidamente, um planejamento deste tipo realizado sem replicatas permitiria somente a obtenção de dados descritivos (RODRIGUES & IEMMA, 2005). Porém, esta característica é superada através da realização de, no mínimo, três repetições no ponto chamado central (Figura 8). Este ponto central é o nível médio entre o nível superior e inferior e suas replicatas permitem a realização dos cálculos estatísticos e do erro puro. Adicionalmente são realizados experimentos em pontos extremos em relação ao nível inferior e superior, chamados de pontos axiais. Importante salientar que a diferença, entre estes pontos axiais e seus pontos referências depende do número de variáveis avaliadas e é pré-estabelecida.

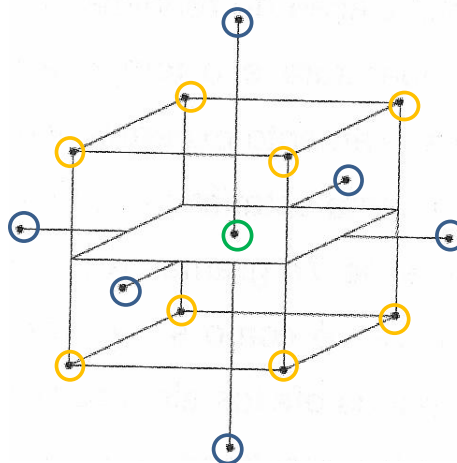


Figura 8: Delineamento fatorial completo para três variáveis estudadas. Círculos amarelos equivalem aos ensaios de três variáveis em dois níveis, círculos azuis representam os pontos axiais e o círculo verde o ponto central. (Adaptado de RODRIGUES & IEMMA, 2005).

As respostas obtidas no conjunto de experimentos realizados podem ser analisadas com a ajuda de softwares, que calculam o efeito de cada variável e as interações entre elas. Com base nestas respostas é criado um modelo preditivo de segunda ordem (Eq. 1).

Algumas das aplicações deste planejamento incluem a otimização de formulações e processos farmacêuticos (PUND et al., 2010), tratamento de resíduos (SAHU et al., 2009) e avaliação da atividade de enzimas (VIGNARDET et al., 2001). Após o cálculo de Análise de Variância (ANOVA), é feito um ajuste do modelo considerando os fatores significativos. O modelo preditivo gera superfícies de resposta onde é possível verificar as condições ideais das variáveis avaliadas para obter o melhor resultado (Figura 9).

$$Y = C_m + C_a + C_b + C_c + C_a^2 + C_b^2 + C_c^2 + C_{ab} + C_{ac} + C_{bc} \quad (\text{Eq. 1})$$

em que Y é a resposta analisada, C representa os coeficientes de regressão dos termos lineares, quadráticos e de interação de três variáveis analisadas (a, b, c), e  $C_m$  é o coeficiente de regressão da média.

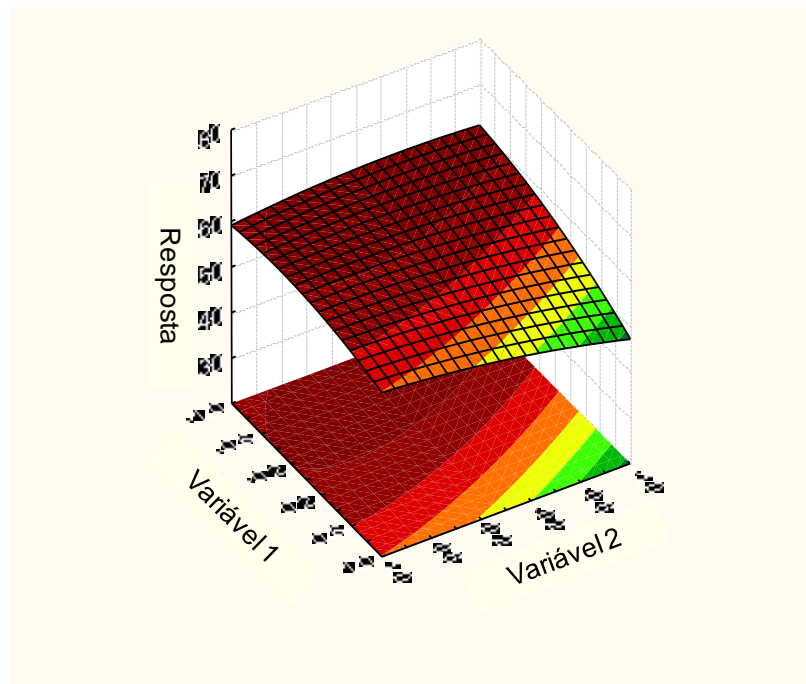


Figura 9: Exemplo de uma superfície de resposta gerada por um modelo de um planejamento experimental Fatorial Completo.

Até o momento, nenhum trabalho foi realizado com a finalidade de avaliar a influência de microrganismos em comunidade utilizando estas ferramentas de planejamento. Recentemente, CHEN et al. (2009) utilizou planejamento fatorial fracionado, que tem o mesmo objetivo do planejamento PB, para selecionar bactérias importantes no tratamento de efluentes e assim compor um consórcio microbiano.



## 2. OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Avaliar a associação de bactérias em comunidades quanto a capacidade de biodegradar resíduos queratinosos (penas cruas e farinha de pena) da indústria avícola.

### Objetivos específicos

- Rastrear microrganismos produtores de enzimas queratinolíticas;
- Avaliar as influências e interações microbianas através de diferentes planejamentos experimentais durante a biodegradação de resíduos queratinosos;
- Comparar a capacidade de degradação de penas cruas e farinha de penas por comunidades microbianas e por bactérias isoladas;
- Otimizar a degradação de penas de aves para aplicação industrial;
- Verificar a relação entre a formação de biofilme pelos microrganismos e a degradação de queratina.

### 3. Capítulo 1: DEGRADAÇÃO DE PENAS DE AVES CRUAS

#### 3.1. MATERIAIS E MÉTODOS:

##### 3.1.1. Identificação dos Isolados

As bactérias utilizadas neste trabalho foram previamente isoladas em meio seletivo ágar farinha de pena (5% m/V). As amostras foram obtidas de dois locais: solo de aviário em Nova Petrópolis (RS) e solo sob carcaça bovina em Franca (SP). Os isolados foram denominados com os seguintes prefixos NP e FCA, respectivamente. Os isolados foram identificados por coloração de Gram e filogeneticamente através do sequenciamento do gene 16S rRNA. O gene foi amplificado por PCR utilizando o par de primers universal F8-27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTGAG-3') e R1541-1522 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'), gerando fragmentos de 1200-1500 pb. As reações foram avaliadas em seqüenciador de DNA/nucleotídeos Applied Biosystems 377 e as sequências finais foram alinhadas usando o programa SEQUENCHER Version 4.0.5 (Gene Codes Corporation, USA). As sequências obtidas foram comparadas com as sequências de nucleotídeos disponíveis no GenBank utilizando o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) e Ribosomal Database Project (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

##### 3.1.2. Caracterização do consumo de diferentes fontes de carbono

O sistema de avaliação do consumo de fontes de carbono Biolog EcoPlate™ (Biolog Inc., Hayward, CA, USA) consistem em microplacas de 96 poços contendo 31 fontes de carbono mais utilizadas por microrganismos presentes no solo (Figura 10). Cada

placa contém cada uma destas fontes repetidas três vezes, sendo usada uma placa para cada bactéria selecionada. O pré-inóculo de cada microrganismo foi realizado cultivando-se em caldo Luria-Bertani (LB) a 180 rpm e 28 °C *overnight*. As culturas foram diluídas até OD 600nm de 0,3, centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos e as células foram ressuspendidas em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0. Foram inoculados 200 µL de suspensão bacteriana em cada poço da microplaca. As placas foram mantidas a temperatura ambiente por 12 dias e o acompanhamento do consumo destas fontes foi realizado pela leitura da absorbância em 590 nm, conforme orientações do fornecedor. A formação da coloração roxa ocorre pela respiração microbiana, devido ao consumo do respectivo substrato. A respiração celular reduz o corante tetrazólio presente nos diferentes poços com as fontes de carbonos.

A1 Água	A2 B-metil-D-glicosídeo	A3 Ácido D-galactônico γ-lactona	A4 L-arginina
B1 Ácido éster metílico pirúvico	B2 D-xilose	B3 Ácido D-galacturônico	B4 L-asparagina
C1 Tween 40	C2 i-Eritritol	C3 Ácido 2-hidróxi Benzóico	C4 L-fenilalanina
D1 Tween 80	D2 D-manitol	D3 Ácido 4-hidróxi Benzóico	D4 L-serina
E1 α-ciclodextrina	E2 N-acetil-D-glucosamina	E3 Ácido γ-hidroxitúrico	E4 L-treonina
F1 Glicogênio	F2 Ácido D-glucosamínico	F3 Ácido itracônico	F4 Ácido glicil-L-glutâmico
G1 D-celobiose	G2 Glicose-1-fosfato	G3 Ácido α-cetobutírico	G4 Feniletilamina
H1 α-D-lactose	H2 D,L-α-glicerol fosfato	H3 Ácido D-málico	H4 Putrescina

Figura 10: Fontes de carbonos presentes na placa Biolog EcoPlate™

### 3.1.3. Planejamento Experimental do tipo Plackett-Burman

Este planejamento teve como critérios de avaliação a porcentagem de degradação de penas e atividade queratinolítica das diferentes comunidades bacterianas e cultura pura de bactérias. A fonte de nutrientes utilizada nestes experimentos foi penas inteiras de aves previamente autoclavadas por 15 minutos. Os pré-inóculos foram preparados pelo crescimento *overnight* de cada bactéria isoladamente em caldo LB. Em ambos os experimentos a concentração celular de cada bactéria inoculada foi de  $10^7$  UFC ml<sup>-1</sup>. O meio líquido utilizado para avaliação da degradação e atividade queratinolítica foi: 1g de pena de galinha em 50 ml de tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0.

O primeiro experimento PB foi realizado utilizando-se 10 linhagens de diferentes espécies de bactérias (*Bacillus subtilis* NP5, *Stenotrophomonas nitritireducens* FCA9, *Kurthia gibsonii* NP7, *Bacillus cereus* NP8, *Bacillus cereus* NP4, *Macrococcus caseolyticus* FCA7, *Bacillus thuringiensis* FCA3, *Bacillus cereus* FCA8, *Bacillus cereus* FCA1, *Kurthia gibsonii* NP1) e teve a duração de 14 dias, sob agitação a 130 rpm e 25 °C, com coleta de alíquotas a cada dois dias para avaliação da atividade enzimática.

Dando seguimento, um segundo experimento com as quatro linhagens selecionadas, *Bacillus subtilis* S14 (número de acesso da sequência do gene 16S rRNA AY345856), *Bacillus cereus* NP4 (FN687187), *Bacillus subtilis* NP5 (FN687186) e *Macrococcus caseolyticus* FCA7 (FN687188), foi realizado durante quatro dias com coletas diárias de alíquotas.

O cálculo do efeito causado por determinada bactéria é baseado nos valores genéricos de degradação de penas ou atividade enzimática presentes na Tabela 3 (RODRIGUES & IEMMA, 2005)

Tabela 3: Modelo de uma tabela de Plackett-Burman para cálculo do efeito de uma bactéria.

Combinações	Bactéria 1	Degradação/Atividade enzimática
1	+	X1
2	+	X2
3	+	X3
4	-	X4
5	-	X5
6	-	X6
7	-	X7
8	+	X8
9	+	X9
10	+	X10
11	+	X11
12	-	X12
13	-	X13
14	-	X14
15	-	X15
16	+	X16

- Soma + (**Y1**): soma das respostas de interesse (atividade enzimática ou degradação) que estejam associadas ao sinal positivo de cada variável, ou seja,  $X1+X2+X3+X8+X9+X10+X11+X16$ ;

- Soma - (**Y2**): soma das respostas de interesse que estejam associadas ao sinal negativo de cada variável, ou seja,  $X_4+X_5+X_6+X_7+X_{12}+X_{13}+X_{14}+X_{15}$ ;
- Diferença (**Z**) entre a soma + (**Y1**) e soma - (**Y2**);
- Cálculo do efeito (**E**) de cada variável pela diferença dividida pelo número de experimentos na condição + e -, ou seja,  $Z/8$ .

#### 3.1.4. Estudo do efeito da presença e ausência de bactérias no meio de cultivo

*B. subtilis* S14, *B. cereus* NP4, *B. subtilis* NP5 e *M. caseolyticus* FCA7 foram utilizados para montar comunidades de quatro, três ou duas espécies. Os inóculos foram preparados da mesma forma que nos experimentos PB (seção 3.1.3). O volume de cultura necessário para obter a concentração celular de  $10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  de cada espécie, foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos para separação das células. Os sedimentos foram ressuspensos em um volume final de 50 ml de tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0 e inoculados em frascos de 125 ml contendo 0,5 g de penas não autoclavadas. Um controle foi feito sem a inoculação de bactérias com a finalidade de monitorar a ação da microbiota natural deste resíduo. A incubação do experimento foi mantida a 37 °C e 180 rpm por 4 dias. Ao final do experimento foi calculada a porcentagem de degradação de penas.

#### 3.1.5. Estudo da variação de pH e concentração de penas

Três pHs diferentes (7,0; 8,0 e 9,0) foram escolhidos para comparar sua influência no processo de degradação de penas. Os tampões utilizados foram fosfato de sódio 10 mM para pH 7 ou 8 e borato de sódio 25 mM para pH 9.

O pH que apresentou os melhores resultados (pH 8,0), foi utilizado para testar as concentrações de penas de 5 e 7,5% em 100 ml de tampão fosfato de sódio. Todos os experimentos foram mantidos a 37 °C e 180 rpm por 4 dias e feitos em duplicatas. Uma suspensão celular de cada bactéria na concentração de  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> no respectivo tampão foi utilizada como inóculo.

### 3.1.6. Cálculo da porcentagem de degradação

Ao final de cada experimento, o hidrolisado foi filtrado com papel filtro. O material retido foi seco em estufa a 60 °C durante 72h. A diferença de massa depois de seco e do material inicial foi utilizada para cálculo da porcentagem de material degradado.

### 3.1.7. Avaliação da atividade queratinolítica

No rastreamento das bactérias isoladas foram utilizados dois substratos para avaliação da atividade enzimática: azul de queratina (lã de ovelha impregnada com corante, Sigma-Aldrich) e azoqueratina sintetizada de acordo com TOMARELLI et al. (1949). A avaliação da atividade enzimática com azul de queratina foi realizada pela inoculação de 1,0 ml de cultura de cada bactéria, cultivada overnight em caldo LB, em um tubo de ensaio contendo 20 mg deste substrato em 5 ml de tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0. Os tubos foram mantidos a 200 rpm e 30 °C, sendo o acompanhamento feito pela coleta de alíquotas de 200 µl ao longo de 5 dias e leitura da absorbância a 595 nm.

Para avaliação da atividade enzimática sobre azoqueratina, alíquotas coletadas dos experimentos incubados foram centrifugadas a 10.000 rpm por 20 minutos. A atividade queratinolítica do sobrenadante foi testada adicionando 100 µl deste sobre uma suspensão de azoqueratina (1,5% em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 8,0) por 15 minutos a 50 °C.

O controle consiste da adição de 100 µl de água Mili-Q. A reação foi encerrada pela adição de 500 µl de solução de ácido tricloroacético 30%. Após centrifugação dos tubos reacionais a 11.000 rpm por 10 minutos foi feita a leitura da absorbância em 440 nm utilizando SpectraMax® M2/M2<sup>e</sup> (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Todos os ensaios foram realizados em quadruplicata.

### 3.1.8. Formação de biofilme e microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As penas utilizadas para visualização de formação de biofilme através de MEV foram inoculadas com a comunidade de quatro bactérias na concentração de  $7 \times 10^5$  UFC ml<sup>-1</sup> de cada linhagem. O controle consistiu de 0,5 g penas não inoculadas em 25 ml tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0. Estas foram mantidas a 180 rpm e 28 °C por 10 dias. Foram retiradas amostras nos tempos inicial, e após 3, 6 ou 10 dias, para tratamento e fixação. As amostras de pena controle e inoculada foram lavadas com tampão cacodilato 100 mM pH 7,2 e fixadas pelo tratamento com glutaraldeído 2% durante 2 horas e 30 minutos e tetróxido de ósmio 2,5% durante 2 horas. Após nova lavagem das amostras fixadas com tampão cacodilato foi feita a desidratação com gradiente de acetona (soluções de 30, 50, 70, 80, 90 e 100% por 5 minutos de contato em cada solução). Então as amostras foram submetidas ao ponto crítico e metalizadas com prata por 60s com Bal-Tec SCD 050 Sputter Coater. As penas foram examinadas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS com microscópio de varredura Jeol JSM-6060 na seguinte condição: 50 µA e 10 kV.



## 3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO:

### 3.2.1. Rastreamento de microrganismos e estudo de comunidades microbianas utilizando planejamento experimental Plackett-Burman

Este trabalho foi iniciado pela caracterização de 19 bactérias isoladas em meio seletivo contendo farinha de pena. A caracterização delas foi feita pela coloração de Gram, comparação da sequência do gene 16S rRNA e avaliação da atividade queratinolítica utilizando dois substratos queratinosos: azoqueratina e azul de queratina (Tabela 4). As diferenças entre as atividades enzimáticas obtidas com os dois substratos utilizados se devem a diferente origem da queratina de cada um deles. Isto modifica a especificidade das enzimas de acordo com a conformação da queratina em análise.

A partir dos resultados apresentados, foram selecionadas 10 isolados para avaliar o efeito resultante da associação destas em comunidades. Para isso foi utilizado como ferramenta o planejamento experimental do tipo Plackett-Burman (PB). Os critérios avaliados foram o percentual de pena degradada e atividade queratinolítica utilizando como substrato azoqueratina (Tabela 5).

Tabela 4: Características e identificação dos microrganismos isolados.

Isolado	Gram	Seqüenciamento do gene 16S rRNA	Identidade	Atividade queratinolítica	
				Azoqueratina*	Azul de Queratina*
NP1	Bacilo G+	<i>Kurthia gibsonii</i>	99%	36	88
NP2	Bacilo G+	<i>Bacillus cereus</i>	100%	239	105
NP3	Bacilo G+	<i>Bacillus cereus</i>	99%	239	118
NP4	Bacilo G+	<i>Bacillus cereus</i>	99%	330	138
NP5	Bacilo G+	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	1038	170
NP6	Bacilo G+	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99%	129	92
NP7	Bacilo G+	<i>Kurthia gibsonii</i>	99%	34	63
NP8	Bacilo G+	<i>Bacillus cereus</i>	99%	334	115
NP9	Bacilo G+	<i>Bacillus fusiformis</i>	99%	11	152
FCA1	Bacilo G+	<i>Bacillus cereus</i>	99%	388	86
FCA2	Bacilo G+	<i>Bacillus cereus</i>	98%	388	50
FCA3	Bacilo G+	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99%	345	72
FCA4	Bacilo G+	<i>Bacillus cereus</i>	99%	196	95
FCA5	Bacilo G+	<i>Bacillus cereus</i>	99%	208	89
FCA6	Bacilo G+	<i>Bacillus cereus</i>	99%	178	132
FCA7	Coco G+	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	99%	167	104
FCA8	Bacilo G+	<i>Bacillus cereus</i>	99%	336	121
FCA9	Coco G-	<i>Stenotrophomonas nitritireducens</i>	99%	144	65
FCA10	Bacilo G+	<i>Bacillus cereus</i>	99%	174	109

\* 1 U.ml<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> = aumento de 0,01 unidade de absorbância

Tabela 5: Porcentagem de degradação de penas e atividade queratinolítica de comunidades microbianas de até 10 microrganismos.

Combinções	Microrganismos										Degradação (%)	Atividade queratinolítica*
	NP5	FCA9	NP7	NP8	NP4	FCA7	FCA3	FCA8	FCA1	NP1		
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15	2059
2	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	14	1942
3	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	14	1815
4	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	10	1772
5	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	10	1861
6	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	6	246
7	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	5	95
8	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	14	1709
9	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	12	2136
10	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	7	167
11	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	6	45
12	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	6	128
13	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	6	164
14	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	14	1868
15	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	14	1694
16	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	7	178
E <sub>a</sub>	0,413	-0,004	0,018	-0,002	0,017	0,002	-0,017	0,011	0,007	0,005		
E <sub>d</sub>	7,8	0,4	0,5	1,1	1,9	1,5	0,9	-0,1	0,3	0,6		

\* 1 U.ml<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> = aumento de 0,01 unidade de absorbância

“+” indica presença do microrganismo e “-” indica ausência deste.

E<sub>a</sub> = efeito relacionado à atividade enzimática

E<sub>d</sub> = efeito relacionado à degradação de pena

Como referência do efeito individual de uma bactéria sobre os parâmetros avaliados, foi feito o cultivo do microrganismo NP5 nas mesmas condições das comunidades. A porcentagem de degradação obtida por esta bactéria foi de 14% e atividade igual a 1036 U ml<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Neste primeiro experimento foi verificado que não há relação entre a atividade queratinolítica e porcentagem de degradação de penas. Este

resultado está de acordo com os obtidos por SON et al. (2008), que também verificaram a não proporcionalidade entre atividade enzimática e degradação de penas por *Bacillus pumilis*. Especula-se que esta falta de coerência deve-se a fração intracelular dos microrganismos, através da cooperação com as enzimas envolvidas neste processo (GUPTA & RAMNANI, 2006). Dessa forma, a associação de distintos microrganismos, neste estudo, mostrou que é possível elevar a taxa de degradação deste resíduo.

Com o planejamento feito foi calculado o efeito das diferentes variáveis dentro das comunidades. A bactéria NP5 mostrou forte influência positiva nos dois critérios avaliados, enquanto as bactérias NP4 e FCA7 mostraram influência positiva quando considerada a porcentagem de degradação das penas. Utilizando como critério de seleção a degradação de penas, estas três bactérias foram escolhidas para seguir o estudo da interação entre microrganismos no processo de biodegradação de penas de aves.

### 3.2.2 Caracterização do consumo de fontes de carbono

Nesta fase, a bactéria *B. subtilis* S14 foi adicionada ao estudo visto sua reconhecida alta produção de queratinases (MACEDO et al., 2005). Esta bactéria, juntamente com as três espécies selecionadas anteriormente, foi escolhida para seguir o estudo de comunidades microbianas. O caracterização do consumo de fontes de carbono por estas bactérias foi feito utilizando Biolog EcoPlate™, conforme descrito nos materiais e métodos deste capítulo. O consumo das 31 fontes de carbono testadas por cada bactéria isolada está ilustrado na Figura 11, em que é revelado as diferenças metabólicas entre elas.

### 3.2.3 Planejamento Plackett-Burman com os quatro isolados selecionados

Baseado nas diferenças metabólicas apresentadas no ensaio com as placas Biolog Ecoplate™, um segundo planejamento PB foi realizado para verificar o efeito destas quatro bactérias durante a biodegradação de penas de aves (Tabela 7).

Neste planejamento foi confirmada a influência positiva da bactéria NP5 na obtenção de alta atividade queratinolítica e degradação. Outro fator identificado neste experimento foi que as bactérias NP4 e FCA7 influenciam positiva e negativamente este processo dependendo do parâmetro considerado. Este comportamento mostra que a interação entre os microrganismos interfere na biodegradação tanto quanto a produção de queratinases, uma vez que estas duas bactérias apresentam baixa atividade enzimática isoladamente.

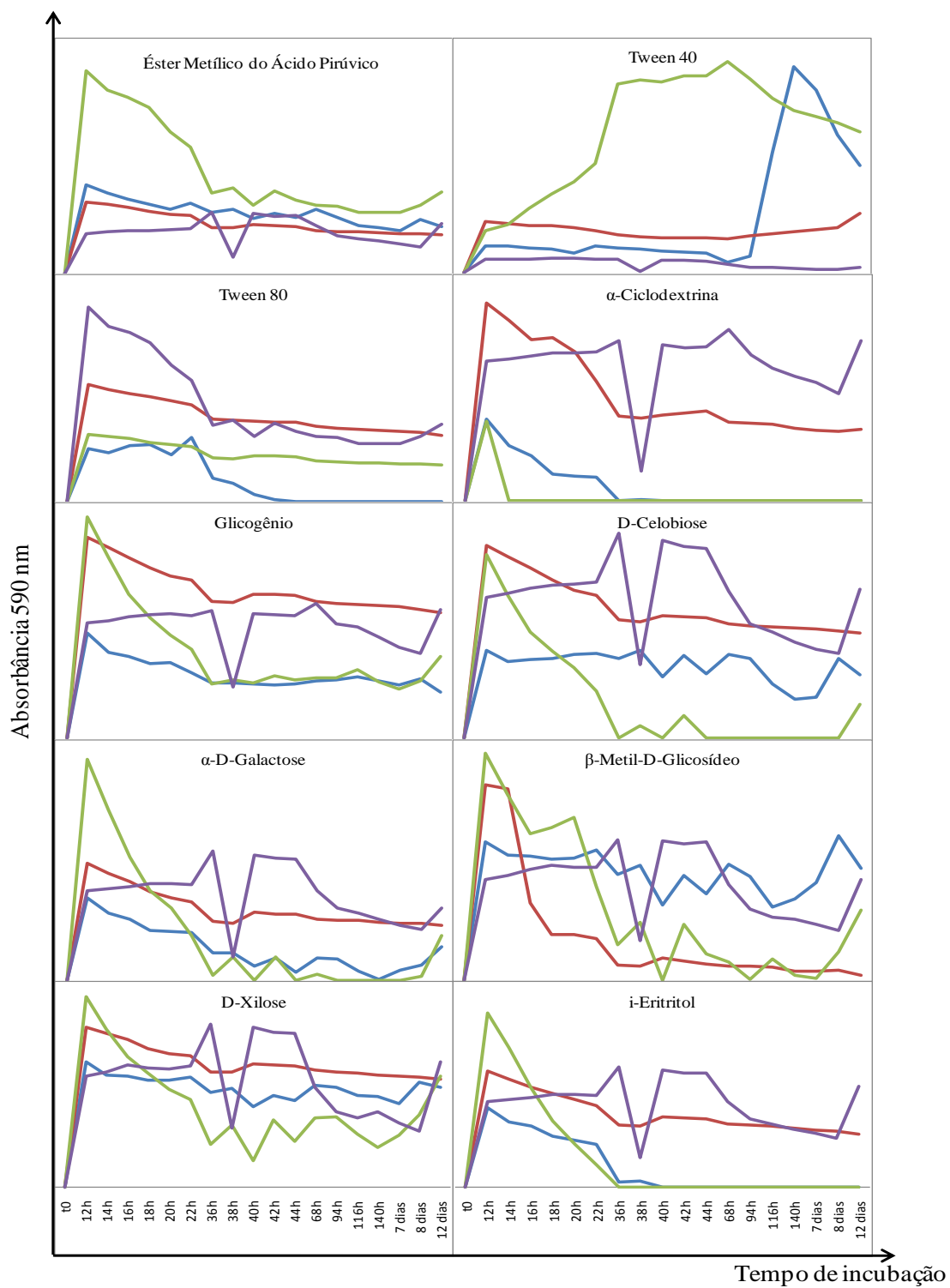


Figura 11: Perfil de consumo de diferentes fontes de carbono (EcoPlate Biolog™) pela bactérias *B. subtilis* S14 (azul), *B. cereus* NP4 (vermelho), *B. subtilis* NP5 (verde) e *M. caseolyticus* FCA7 (roxo). Ensaios realizados em triplicata.

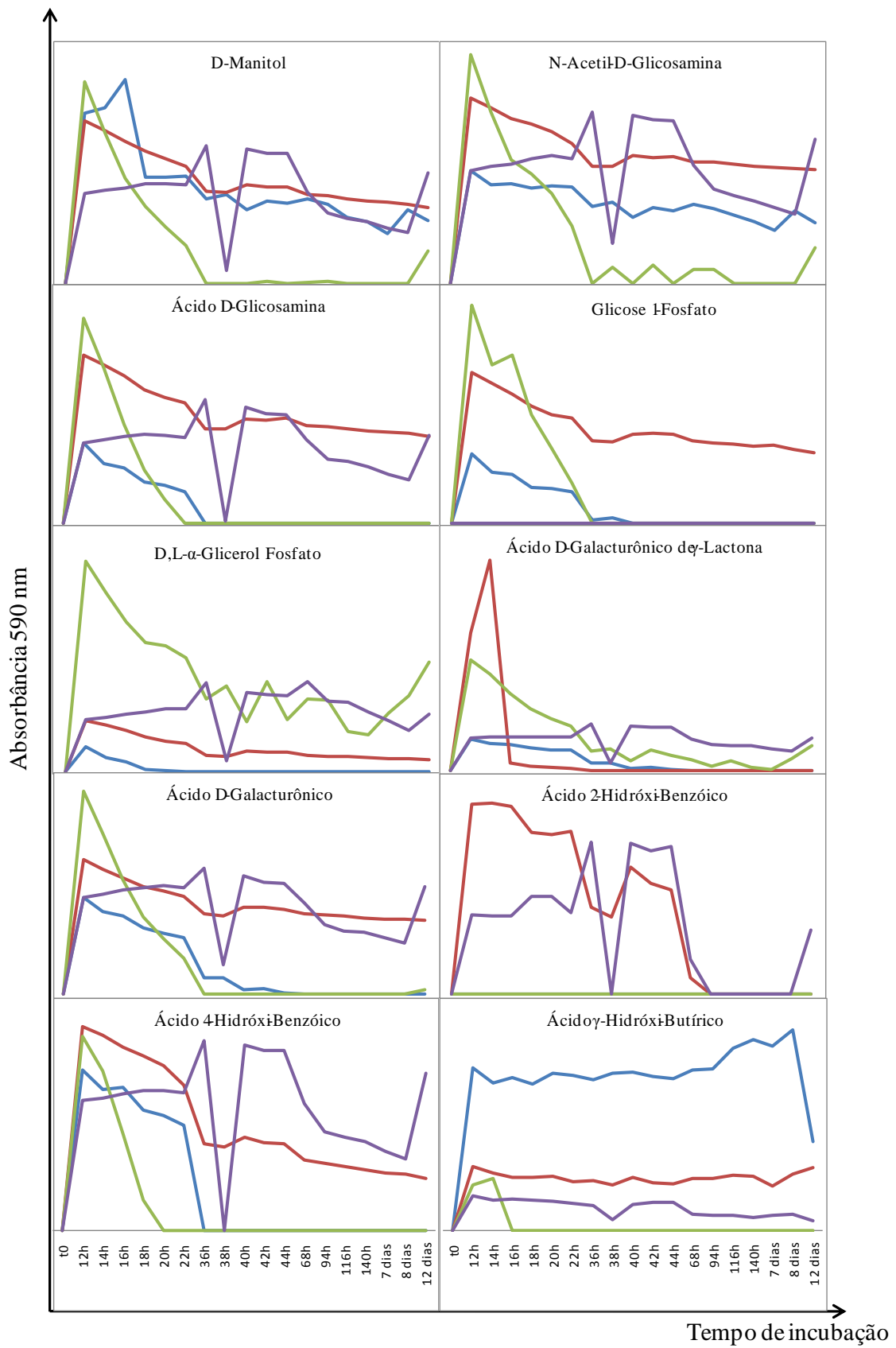


Figura 11 (Continuação)

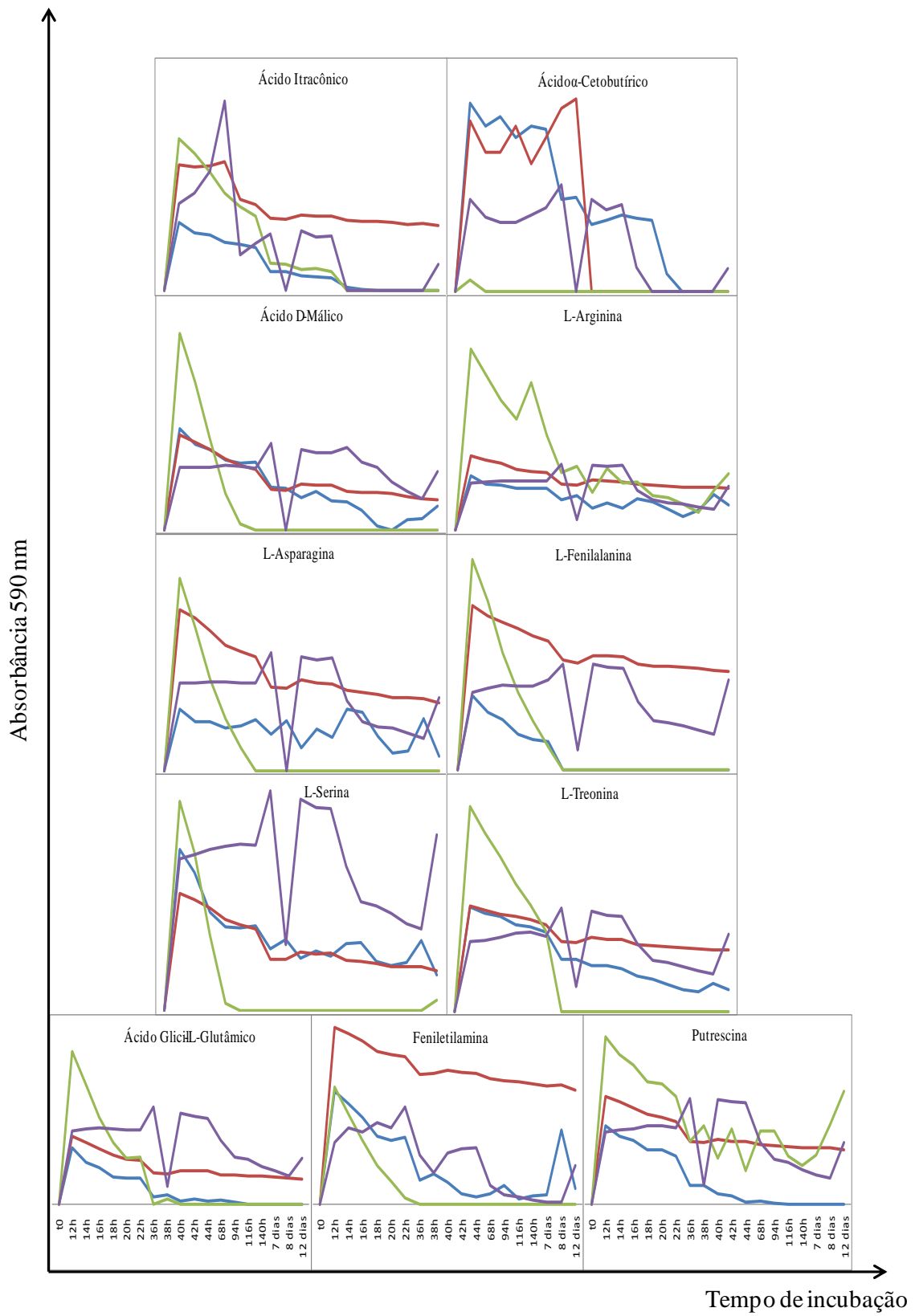


Figura 11 (continuação)



Tabela 7: Estudo do efeito das combinações microbianas e dos isolados na degradação de penas e atividade queratinolítica.

Combinações	NP5	NP4	FCA7	S14	Degradação	Atividade
					(%)	queratinolítica *
1	+	+	+	+	20	1093
2	+	+	-	+	16	944
3	+	-	+	+	12	1048
4	-	+	+	+	19	261
5	+	-	+	-	20	1020
6	+	+	-	-	13	872
7	-	+	+	-	17	279
8	-	-	-	+	15	762
9	-	+	-	-	16	279
10	+	-	-	-	14	1036
11	-	-	+	-	9	9
$E_a^\dagger$	0,166	0,049	-0,009	0,007		
$E_d^\dagger$	3,25	-1,08	1,83	0,19		

“+” indica presença do microrganismo e “-” indica ausência deste.

\*  $1 \text{ U.ml}^{-1}.\text{h}^{-1}$  = aumento de 0,01 unidade de absorvância

$E_a$  = efeito relacionado à atividade enzimática

$E_d$  = efeito relacionado à degradação de pena

† Efeitos baseados nas primeiras sete combinações

Apesar da aparente baixa porcentagem de degradação obtida, as penas tiveram suas bábulas completamente degradadas, restando somente a raqui (Figura 12). Resultados

semelhantes foram obtidos pela ação de *Trichoderma atroviride* (CAO et al., 2008) e *Bacillus subtilis* P13 (PILLAI & ARCHANA,2008). Entretanto, neste último trabalho, a biodegradação das penas foi realizada pela adição de um extrato contendo proteases e diferentes agentes redutores. Assim, ocorre mais facilmente o rompimento de pontes de dissulfeto e a ação das proteases sobre a queratina.



Figura 12: Pena controle (esquerda) e após quatro dias de degradação (direita) pela combinação cinco do planejamento Plackett-Burman (Tabela 7).

#### 3.2.4 Formação de biofilme sobre penas e visualização por microscopia eletrônica de varredura

A formação de biofilmes microbianos está envolvida em diversos processos de biodegradação. Devido à natureza insolúvel das penas, foi analisado se este resíduo serve como suporte para a ocorrência deste fenômeno durante a biodegradação. A comunidade

escolhida para inoculação nas penas foi composta pelas quatro bactérias selecionadas para o segundo planejamento PB (Figura 13).

A microscopia eletrônica de varredura mostrou que a bactéria *M. caseolyticus* FCA7 é a principal envolvida na fase inicial de formação de biofilme, tendo alguns bacilos associados a ela. Este resultado juntamente com o efeito negativo que esta bactéria exerce na produção de queratinase, indica que a influência positiva desta bactéria sobre a degradação pode ser devido a sua capacidade de formação de biofilme sobre as penas.

### 3.2.5 Avaliação da biodegradação de penas visando aplicação industrial: presença e ausência de bactérias, variação de pH e concentração de penas

Nesta fase do trabalho as penas utilizadas não foram autoclavadas, visando à redução de etapas e custos para uma futura aplicação no tratamento destes resíduos. Seguindo o estudo de comunidades microbianas, foi avaliada a biodegradação na presença e ausência das quatro bactérias em uma concentração celular superior de  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> (Tabela 8).

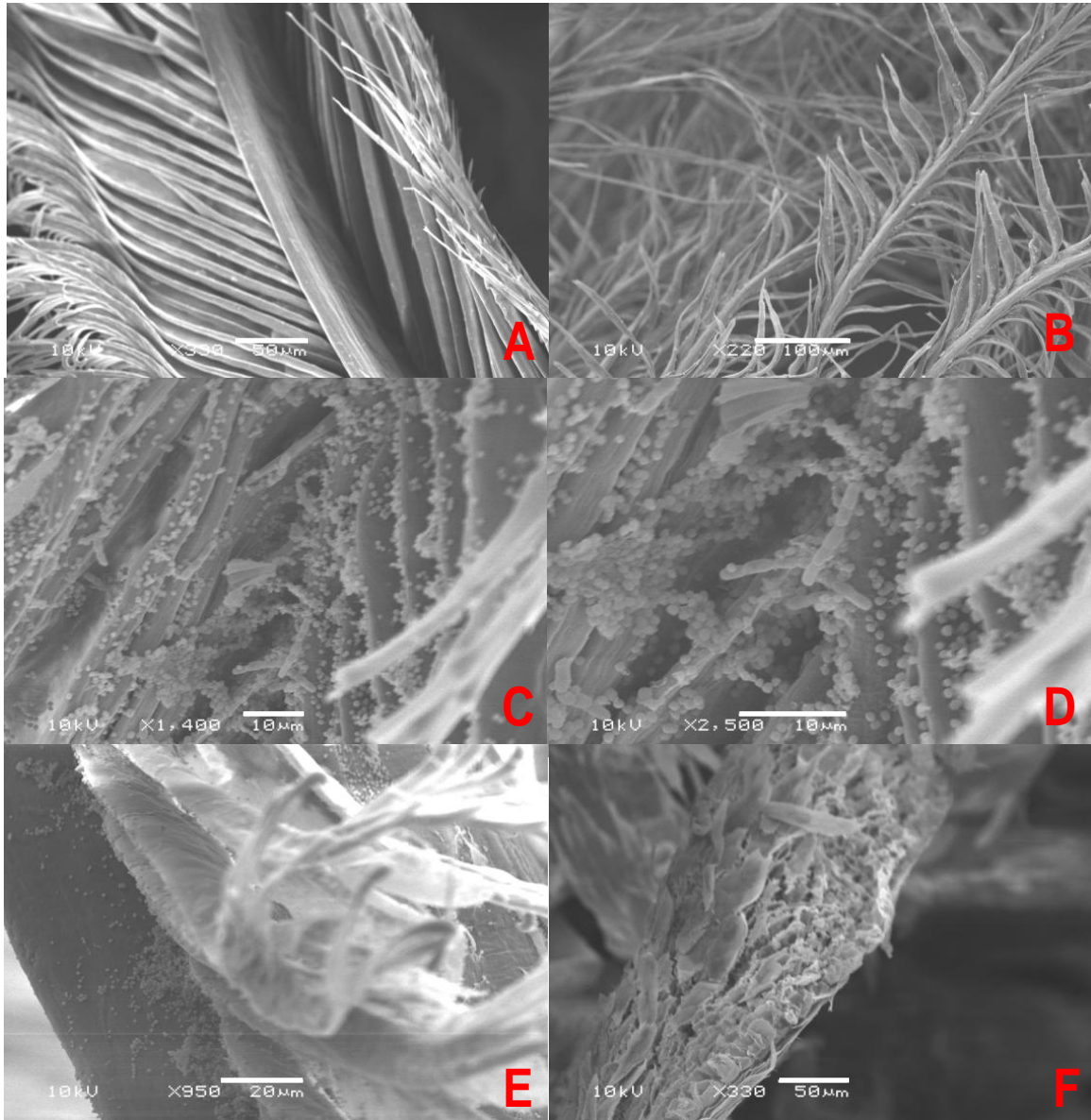


Figura 13: Microscopia eletrônica de varredura de penas inoculadas com comunidade microbiana. A: Controle (barra corresponde a 50  $\mu\text{m}$ ), B: pena inoculada no tempo inicial (barra corresponde a 100  $\mu\text{m}$ ), C and D: pena inoculada no terceiro dia (barra corresponde a 10  $\mu\text{m}$ ), E: pena inoculada no sexto dia (barra corresponde a 20  $\mu\text{m}$ ), F: pena inoculada no décimo dia (barra corresponde a 50  $\mu\text{m}$ ).

Tabela 8: Biodegradação de penas não autoclavadas na presença e ausência de bactérias

Combinações	S14	NP4	NP5	FCA7	Degradação (%)
1	+	+	+	+	6
2	+	+	+	-	6
3	+	+	-	+	2
4	+	-	+	+	8
5	-	+	+	+	10
6	+	+	-	-	4
7	+	-	+	-	18
8	+	-	-	+	4
9	-	+	+	-	10
10	-	+	-	+	4
11	-	-	+	+	18
12	+	-	-	-	12
13	-	+	-	-	2
14	-	-	+	-	12
15	-	-	-	+	4
Controle negativo	-	-	-	-	14

“+” indica presença do microrganismo e “-” indica ausência deste.

Naturalmente, as penas provenientes da indústria avícola já contêm uma microbiota capaz de degradar parcialmente este resíduo. Quando avaliada a degradação das penas pela adição de quatro, três, duas ou somente um isolado exógeno, a inserção das combinações *B. subtilis* NP5/*B. subtilis* S14 ou *B. subtilis* NP5/*M. Caseolyticcus* FCA7 contribuíram

para o aumento da degradação de 14% para 18%. Este resultado mostrou-se de acordo com os efeitos positivos destas bactérias encontrados no planejamento PB com penas autoclavadas. Contudo, a adição das demais combinações provavelmente estimulou a competição entre os microrganismos provocando a diminuição da porcentagem de biodegradação.

O efeito de diferentes pHs neste processo foi avaliado escolhendo as associações *B. subtilis* NP5/*B. subtilis* S14, *B. subtilis* NP5/*M. Caseolyticus* FCA7 e as bactérias *B. subtilis* NP5 e *B. subtilis* S14 isoladamente. As porcentagens de biodegradação obtidas nos pHs 7,0; 8,0 e 9,0 estão apresentados na Figura 14.

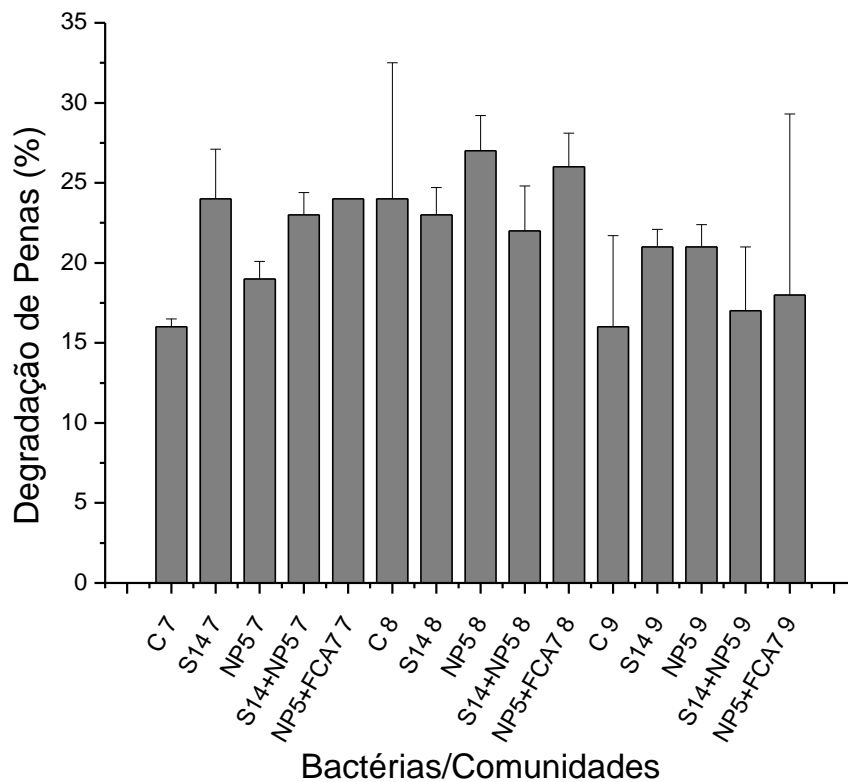


Figura 14: Degradação de penas em diferentes pHs. C=controle sem adição de bactérias. Número após o código da bactéria ou associação indica o pH testado. Ensaios realizados em duplicata.

A variação de porcentagem de degradação entre as duplicatas dos experimentos provavelmente se deve a diferenças da microbiota que acompanha as penas, dificultando a interpretação destes resultados. Porém, existe a tendência de maior biodegradação em pH levemente alcalino (pH 8,0) com a adição do *B. subtilis* NP5 isoladamente ou associado a *M. caseolyticus* FCA7.

Como um dos objetivos deste trabalho é promover a mudança de escala do processo para o tratamento de grandes quantidades destes resíduos, foi avaliado o aumento da concentração de penas. Conforme os resultados anteriores, *B. subtilis* NP5 isoladamente e sua associação com *M. caseolyticus* FCA7 foram utilizados para testar concentrações de 5,0 e 7,5% de penas em meio tamponado pH 8,0 (Figura 15).

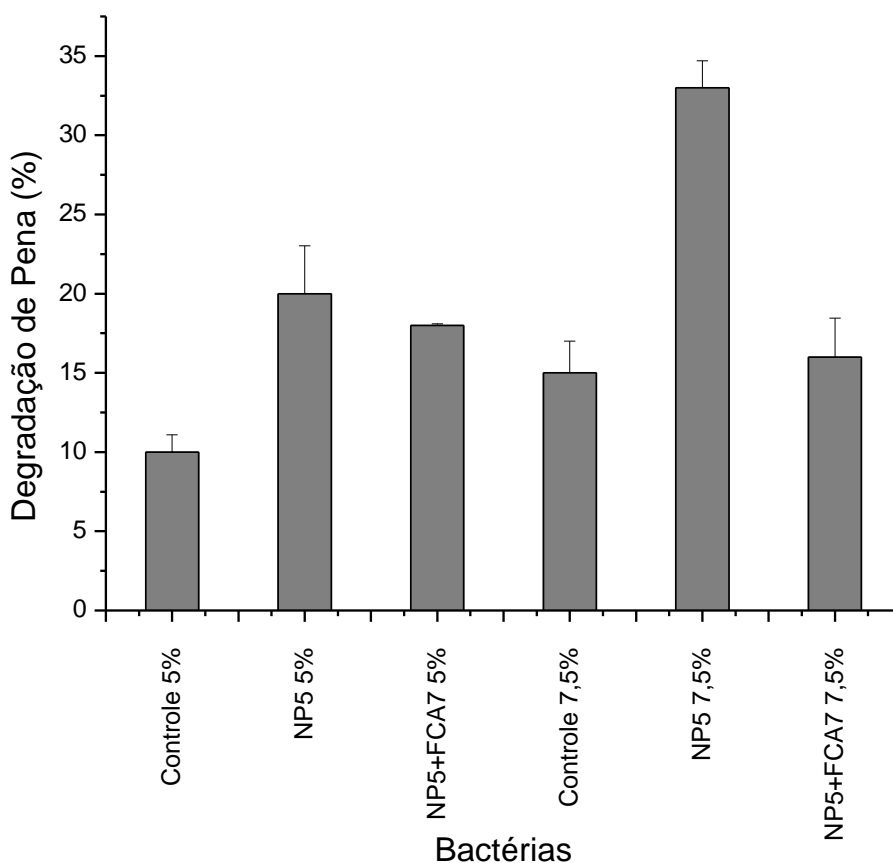


Figura 15: Biodegradação de penas cruas em concentração de 5,0 e 7,5%.

A adição de microrganismos em meios contendo 5,0 e 7,5% de pena foi vantajosa frente ao controle sem inoculação de bactérias externas. Em ambos os casos, a inserção do *B. subtilis* NP5 isolado promoveu melhores taxa de biodegradação conseguindo atingir 33% na maior concentração testada. SHIGERI et al. (2009) desenvolveram uma máquina de biodegradação de penas juntamente com resíduos de comida em um total de 5 litros de meio, resultando em 70% de degradação após 14 dias a temperatura entre 50 e 70 °C. O resultado obtido nessa dissertação é bastante promissor considerando que as penas são produzidas na ordem de milhares de toneladas, havendo ainda perspectiva de aumentar estes valores na transposição para biorreatores em grande escala, além dos ajustes de outros parâmetros como agitação durante o processo.



## 4. Capítulo 2: STATISTICAL BASED DESIGN TO ASSEMBLY KERATIN-DEGRADING ARTIFICIAL BACTERIAL COMMUNITIES

Running title: Keratin-degrading communities

Danielle Campiol Arruda<sup>1</sup>, Simone Hickmann Flôres<sup>2</sup>, Carlos Termignoni<sup>1,3</sup>, Wolf-Rainer Abraham<sup>5</sup> and Alexandre José Macedo<sup>1,4\*</sup>

Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>1</sup>Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, <sup>2</sup>Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, <sup>3</sup>Departamento de Bioquímica and <sup>4</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. <sup>5</sup>Helmholtz Center for Infection Research, Chemical Microbiology, Braunschweig, Germany.

\* Corresponding author. Mailing address: Av. Ipiranga, 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre RS, Brazil.

Phone/Fax: +55 51 3308 5354. E-mail: alexandre.macedo@ufrgs.br

Re: Statistical based design to assembly keratin-degrading artificial bacterial communities  
(AEM01096-10 Version 1)

Dear Dr. Macedo:

You have successfully submitted your manuscript via the Rapid Review system. The control number of your manuscript is AEM01096-10 Version 1. Take note of this number, and refer to it in any correspondence with the Journals Department or with the editor. You may log onto the Rapid Review system at any time to see the current status of your manuscript and the name of the editor handling it. The URL is <http://www.rapidreview.com/ASM2/author.html>. To find contact information for the editor handling your manuscript, go to the following URL:

Thank you for submitting your manuscript for consideration.

Barbara Slinker

Production Editor

Applied and Environmental Microbiology (AEM)

## ABSTRACT

Keratin accumulation is a serious environmental problem, since poultry industry produces huge amount of feather waste. This hard-to-degrade keratinous sub-product could be used as valuable supplements in animal feed if increasing its digestibility, as for example, by a partial keratin hydrolysis through biodegradation. This study evaluates the association of four different bacteria species, *Bacillus subtilis* S14, *Bacillus cereus* NP4, *Bacillus subtilis* NP5, and *Macrocooccus caseolyticus* FCA7, in a community, regarding the feather meal biodegradation useful for industrial purposes. A full factorial experimental design was used to evaluate the effect of each strain and the interactions among them in a keratin-degrading community. Results show that each strain has a particular effect over the community. Also, particular individual effects could be contradictory, according to different interactions. Considering all microorganisms tested, *B. subtilis* NP5 was essential to obtain a high feather meal biodegradation and the additional presence of other bacteria did not enhance the biodegradation. The absence of one or two bacteria confirmed the superior performance of *B. subtilis* NP5. Taking *B. subtilis* NP5 apart, *B. subtilis* S14, *B. cereus* NP4, and *M. caseolyticus* FCA7 produced a better feather meal biodegradation, when compared with each strain alone at the same bacterial cell concentration. This report shows that use of bacterial strains as variables in the full factorial design is an important tool to characterize bacterial influence and interactions on keratin biodegradation, aiming feather meal treatment to reuse as a valuable nutritional product.

Keywords: microbial communities, statistical design, feather biodegradation

#### 4.1 INTRODUCTION

An important animal waste generated worldwide is chicken feather, reaching the order of 200 thousand of tons per year. Brazil is the largest world exporter of chicken meat (<http://www.abef.com.br/default.php>) and this hard-to-degrade keratinous waste is transformed into feather meal or disposed in landfills. Although this byproduct is used as animal feed, due to its low digestibility it has a poor nutritional value (23). In order to be used as a valuable supplement in animal feed, it is necessary to increase its digestibility, for example by partial keratin hydrolysis through biodegradation. Indeed, biodegradation is the result of a synergistic action of different microorganisms, for example the ones found in composting processes (19, 21, 25). It is well known that some toxic compounds are processed in bioremediation systems using exogenous microorganisms or improving the environment in order to stimulate a particular indigenous bacterial population (12, 22).

There are many reports describing and characterizing the use of isolated microorganisms, or enzymes, to degrade recalcitrant organic waste such as cellulose (10, 14) and keratin (8, 11). Therefore, microbial communities can be used as an alternative to achieve higher biodegradation level, when compared to isolated microorganisms. Reports showing the achievement of a biodegradation useful for industrial purposes through artificial microbial communities are scarce in the literature. In this context, an auxiliary tool for setting up different microbial communities might be the statistical experimental design. Some statistical tools for experimental design are widely used to optimize enzyme production, process and formulation development (2, 17, 20, 24). Traditionally, the effect of different variables and their interactions are studied by a full factorial design in order to reduce time and costs of a specific process (18). Potentially, this method can be used to choose organisms to assembly microbial communities suitable for industrial purposes.

The aim of this study was to evaluate the use of a full factorial experimental design by assembling a keratin-hydrolyzing microbial community in order to reach high feather meal biodegradation. The rate of feather meal degradation was used as the dependent variable to assess the influence of each strain (independent variable) and their interactions inside communities. Additionally, the potential nutritional value of the feather meal hydrolysate obtained from the different bacteria alone and in communities was assessed.

## 4.2 MATERIALS AND METHODS

### **Isolation and identification of microorganisms**

The selection of the four bacteria used in this study was based on their keratin degradation ability. The bacteria were isolated (see below) and cultivated in feather meal agar (feather meal 40 and agar 20, in g l<sup>-1</sup>) at 37°C and identified on the basis of 16S rRNA gene sequence comparison using the NCBI/BLAST databank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Strains named S14 (Accession number AY345856), NP4 (FN687187), NP5 (FN687186), and FCA7 (FN687188) were closest related to *Bacillus subtilis* (100%), *Bacillus cereus* (100%), *Bacillus subtilis* (100%), and *Macrocooccus caseolyticus* (99%), respectively. *Bacillus subtilis* S14 was isolated from soil and previously characterized (13). *B. cereus* NP4 and *B. subtilis* NP5 were isolated in a local poultry farm, while *M. caseolyticus* FCA7 was isolated from a sample of soil collected below a bovine carcass.

### **Growth conditions and pre-inoculum preparation**

Bacterial cultures were grown in 6 ml Luria-Bertani (LB) broth under agitation in a shaker at 180 r. p. m. and 28 °C. Overnight cultures were collected and diluted to 10<sup>-6</sup> using 10

mM sterile sodium phosphate buffer, pH 7. Dilutions  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ , and  $10^{-6}$  were homogenized and then plated (50  $\mu$ L) into LB agar in triplicate and incubated overnight at 37 °C. Cell growth was quantified as colony forming units (CFU) and OD at 600 nm. The pre-inoculum was prepared using LB broth in an incubator shaker at 180 r. p. m. and 28 °C.

### **Inoculum preparation and community assembly**

Cell growth of pre-inoculae cultures were determined spectrophotometrically by measuring the absorbance at 600 nm (SpectraMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). To assembly communities, a volume of bacterial suspension with a known number of cells was centrifuged at 10,000 r. p. m. for 15 minutes. Cells were resuspended in sterile sodium phosphate buffer 10 mM pH 7 and added to 2.5 g of autoclaved feather meal (final volume of 100 ml).

### **Protein concentration**

Concentration of soluble protein released during the biodegradation process was measured by a BCA protein assay (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, USA) in triplicate, according to the manual manufacturer, using bovine serum albumin as the standard.

### **Determination of feather meal degradation**

After four days of culture, feather meal cultures were filtrated with cheesecloth, washed with ethanol 70% and dried at 60 °C to a constant weight. Percentage of biodegradation was calculated by the difference of residual feather meal dry weight and initial weight. In

all experiments a control without bacterial inoculum was made. All experiments were made in duplicates, exception for complete factorial design.

### **Experimental design**

In this study a two-order model of a full factorial design was used as a tool to assemble communities and to evaluate the effect of four bacteria (S14, NP4, NP5 and FCA7) on feather meal biodegradation. The assembly of communities was made grouping each bacterium at low level ( $10^2$  CFU ml<sup>-1</sup>) or high level cell concentration ( $10^6$  CFU ml<sup>-1</sup>). Additionally, four experiments were assembled where all bacteria were in a mean cellular concentration ( $10^4$  CFU ml<sup>-1</sup>), called central point, to calculate experimental error. Also, eight other experiments were done in which community assembly was changed in a way that only one strain was modified at each time being at one extreme situation (absent or at  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>). This experimental design provided a mathematical model with a total number of experiments of  $2^n + 2n + 4$ , where  $n$  is the number of variables. The statistical software STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) was used to analyze this experimental design and generated the response surface.

### **Statistical analysis**

The effect of (i) each strain, (ii) their interactions and (iii) the generated model in the full factorial design was calculated using the software STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Feather meal biodegradation and concentration of soluble protein variation in the non-factorial experiments were evaluated by ANOVA and the means were compared by Tukey test.

### 4.3 RESULTS

#### Biodegradation of feather meal by the strains and communities

To evaluate the potential of each bacterium to degrade feather meal, the four strains were cultivated in a pure culture at four cell concentrations. Also, four-strain communities were prepared varying cell concentrations (Figure 1).

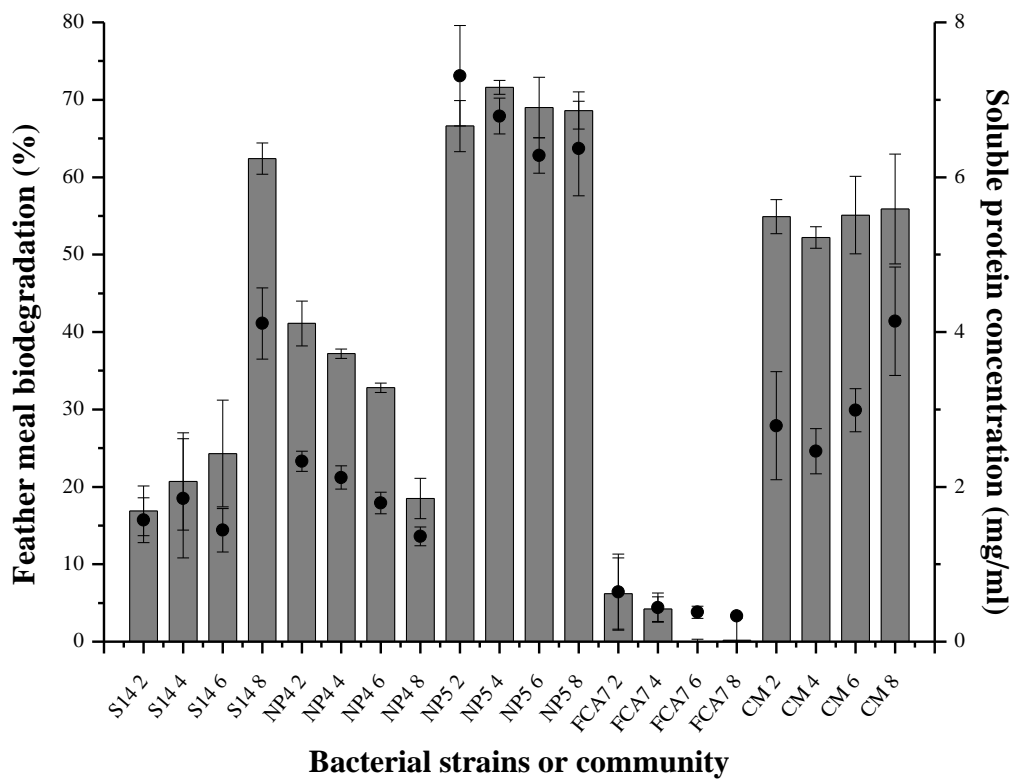


Figure 1: Biodegradation (bars) and soluble protein concentration (full circles) in feather meal hydrolysates produced by bacterial strains and 4-strains communities (CM) at different cell concentrations. The number after bacteria acronym and CM represents the cell concentration of each bacterium: 2 for  $10^2$  CFU ml<sup>-1</sup>, 4 for  $10^4$  CFU ml<sup>-1</sup>, 6 for  $10^6$  CFU ml<sup>-1</sup>, 8 for  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>.



Comparing pure cultures and bacterial communities, *B. subtilis* NP5 showed the higher feather meal biodegradation (Figure 1), without significant difference among the cell concentrations used. *B. subtilis* S14 presented the same high biodegradation at  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>. On the other hand, *B. cereus* NP4 showed the lowest biodegradation at the highest inocula cell concentration. *M. caseolyticus* FCA7 presented the lowest biodegradation, without significant differences among inocula cell concentrations.

Concentration of soluble protein was used to compare keratin hydrolysis in order to infer the potential nutritional value of each hydrolysate. *B. cereus* NP4 and *M. caseolyticus* FCA7 presented no statistical differences in soluble protein concentration at all cell concentration tested (Figure 1). *B. subtilis* S14 showed its highest protein solubilization at the same cell concentration where it reached its best biodegradation. Among all strains, the highest protein solubilization was presented with *B. subtilis* NP5, irrespective of its cell concentration. Clearly, the four-strains communities (CM in Figure 1) did not show advantages when compared with *B. subtilis* NP5 alone.

### **Community assembly and biodegradation evaluation with experimental design**

The full factorial experimental design was used to select strain and cell concentration for community assembly. Soluble protein concentration and feather meal biodegradation presented by communities are shown in Table 1. Based on biodegradation, the effect of each strain was calculated using the software STATISTICA 7.0 (Table 2). Analysis of variance (ANOVA) was employed (data not shown) for the determination of significant parameters using Fisher statistical test. Considering only statistically significant terms ( $p < 0.05$ ), feather meal biodegradation is described by a reduced two-order model equation:

$$y = 59.42 - 1.03 S14 + 1.70 NP4 + 5.14 NP5 - 4.18 FCA7 - 1.33 NP4^2 - 2.27 FCA7^2 - 1.59 S14NP5 - 4.93 NP4NP5 + 2.61 NP4FCA7 + 3.51 NP5FCA7$$

where  $y$  means feather meal biodegradation,  $S14$  is *B. subtilis* S14 cell concentration,  $NP4$  is *B. cereus* NP4 cell concentration,  $NP5$  is *B. subtilis* NP5 cell concentration, and  $FCA7$  is *M. caseolyticus* FCA7 cell concentration.

The regression equation obtained has a  $R^2$  value of 0.7410, an adjusted  $R^2$  value of 0.7351 (95% confidence level), and a calculated  $F$ -value 1.93 times higher than tabulated  $F$ -value.

*B. subtilis* NP5 presented a pronounced positive effect (increase) on feather meal. Indeed, high keratin biodegradation was achieved only in *B. subtilis* NP5-containing communities. Generally, all communities where *B. subtilis* NP5 was present at  $10^6$  CFU  $\text{ml}^{-1}$  cell concentration presented a high percentage of feather meal biodegradation. However, comparing communities 4 ( $10^2$ ) with community 8 ( $10^6$ ) or comparing community 12 ( $10^2$ ) with 16 ( $10^6$ ), *B. subtilis* NP5 slightly decreases the biodegradation at  $10^6$  CFU  $\text{ml}^{-1}$  (Table 1). Explicitly, this situation is predicted by the model because interaction between *B. subtilis* NP5 and *B. cereus* NP4 has a negative effect (Table 2).

Table 1. Biodegradation of feather meal and soluble protein by different 4- strains and 3- strain communities at different cell concentrations

Experiment	[Microorganisms] <sup>a</sup>				SP <sup>b</sup> (mg/ml)	Feather meal degradation (%)
	S14	NP4	NP5	FCA7		
1	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	1.35	56.5
2	10 <sup>6</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	1.65	48.8
3	10 <sup>2</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	3.19	58.5
4	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	2.48	60.9
5	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>2</sup>	5.15	64.4
6	10 <sup>6</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>2</sup>	5.58	60.0
7	10 <sup>2</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>2</sup>	3.78	66.4
8	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>2</sup>	2.30	56.0
9	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>6</sup>	1.25	26.2
10	10 <sup>6</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>6</sup>	0.94	24.6
11	10 <sup>2</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>6</sup>	2.95	53.2
12	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>6</sup>	2.56	55.9
13	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	4.00	62.8
14	10 <sup>6</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	4.45	58.5
15	10 <sup>2</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	3.30	63.7
16	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	3.07	53.2
17	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	1.75	58.3
18	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	2.83	59.2
19	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	3.48	59.9
20	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	3.07	57.1
21	0	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	3.15	59.3
22	10 <sup>8</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	3.51	63.9
23	10 <sup>4</sup>	0	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	5.81	63.3
24	10 <sup>4</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	2.92	50.7
25	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	0	10 <sup>4</sup>	2.94	58.9
26	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>4</sup>	4.30	70.4
27	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	0	4.01	60.0
28	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>8</sup>	3.24	46.5

<sup>a</sup> Cell concentration (CFU/ml);

<sup>b</sup> Soluble proteins.

Table 2. Effect of bacteria and their interactions in the full quadratic model obtained from  $2^4$  factorial design

Strains	Effect		<i>p</i> -value
	Type	Value	
S14	linear	-2.05	0.02539*
S14	quadratic	-0.10	0.84642
NP4	linear	3.40	0.00627*
NP4	quadratic	-2.40	0.01655*
NP5	linear	10.28	0.00024*
NP5	quadratic	1.42	0.06364
FCA7	linear	-8.37	0.00045*
FCA7	quadratic	-4.28	0.00323*
S14/NP4	interaction	0.28	0.68015
S14/NP5	interaction	-3.18	0.01345*
S14/FCA7	interaction	0.80	0.27763
NP4/NP5	interaction	-9.85	0.00050*
NP4/FCA7	interaction	5.22	0.00326*
NP5/FCA7	interaction	7.02	0.00137*

\* statistically significant

Also, the same behavior was observed due the absence or high cell concentration of *B. subtilis* NP5 in communities 25 and 26 (Table 1). Soluble protein concentration was also higher when *B. subtilis* NP5 was present at  $10^6$  CFU ml<sup>-1</sup> or  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>, highlighting the importance of this bacterium to obtain a high keratin hydrolysis. The response surface resulting from this model (Figure 2) shows that the highest biodegradation is obtained only

when *B. subtilis* NP5 was at  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup> and the other bacteria were at low cell concentration or absent.

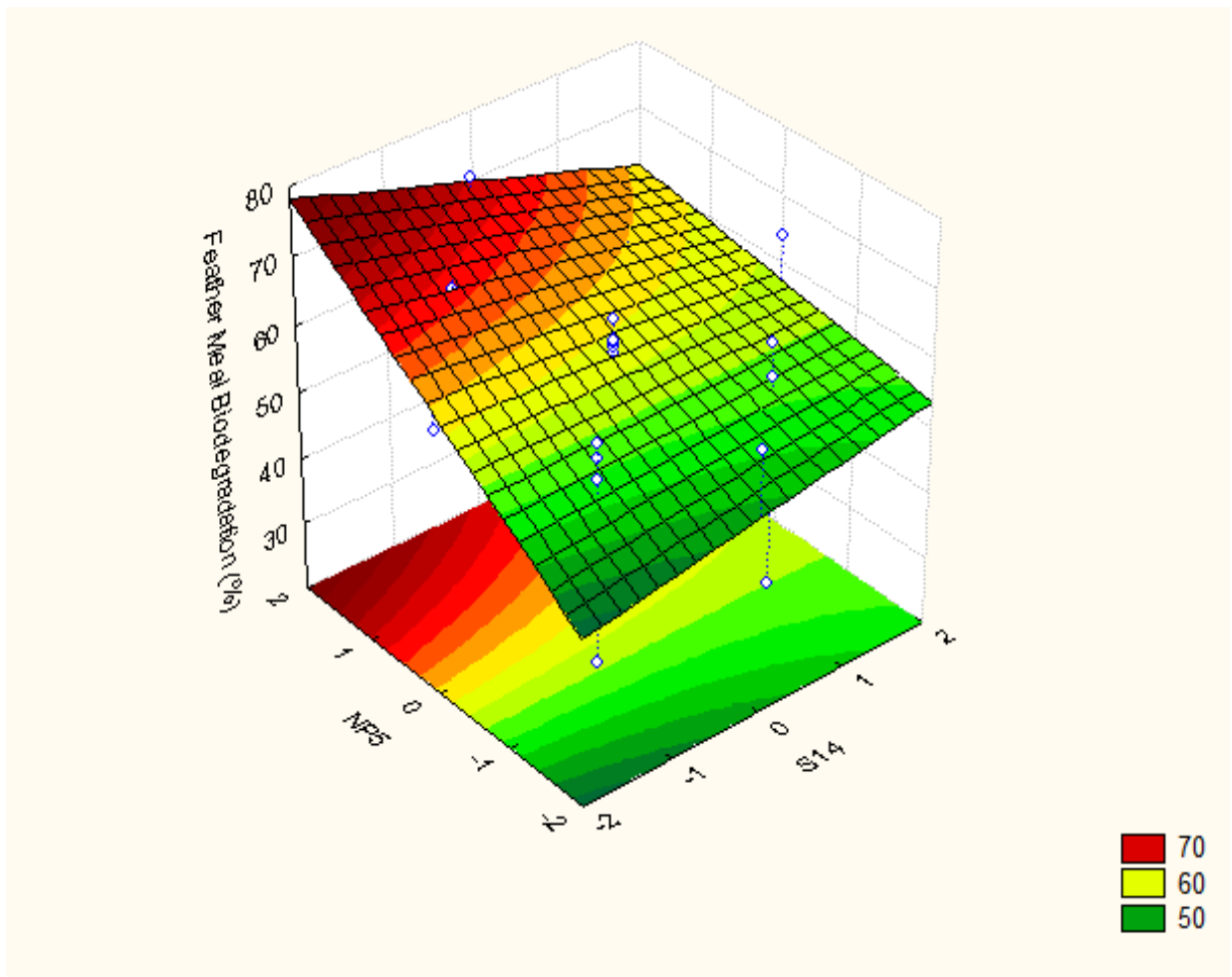


Figure 2: Response surface of feather meal biodegradation: effects of *B. subtilis* NP5 and *B. subtilis* S14 when *B. cereus* NP4 and *M. caseolyticus* FCA7 were at  $10^4$  CFU ml<sup>-1</sup>.

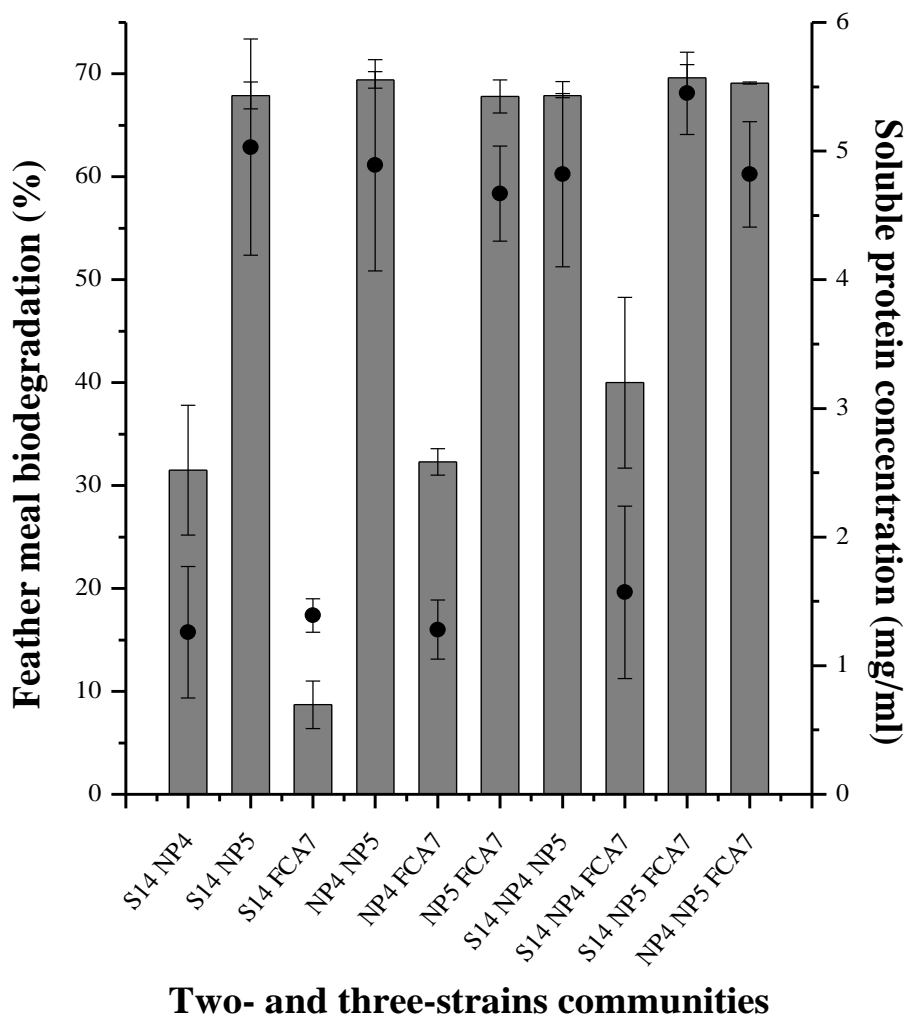


Figure 3. Biodegradation (bars) and soluble protein concentration (full circles) in feather meal hydrolysates produced by 2 and 3- strains communities at the same cell concentrations presented in community 26 of full factorial design. All the experiments were done in duplicates and assembly as the same way that in the experimental design.

#### 4.4 DISCUSSION

Four strains were selected to study the effect of their association in a community using an experimental design in order to improve feather meal biodegradation. The interaction between microorganisms can be affected by different factors such differences in the growth rate, metabolism or production of signaling molecules (1). Results show that each strain has a particular effect in the community and, according to bacterial interactions, this effect could be ambivalent. The model explains 73.5% of the total variation in these communities, which is considered a satisfactory percentage in this kind of experimental design (16). The ambivalent effect of each strain in feather meal biodegradation is due to the presence of a complex web of metabolic and regulatory interactions (5, 22). Moreover, the presence of a third party member sometimes produces unpredictable indirect effects (6, 9) and impairs the understanding of interactions in communities. It is important to emphasize that the effects presented here are valid only in this four-strain community, since the individual role of each strain results from the mutual influence among community members. As far as we know there is a unique report using fractional factorial experimental design to assemble a bacterial consortium able to raise total organic carbon biodegradation (3).

In an attempt to improve biodegradation and verify if *B. subtilis* NP5 maintains its strong influence, community composition was changed by removing one or two strains at a time, from the community which presented the best result in the full factorial experimental design (experiment 26 in Table 1). Again, *B. subtilis* NP5 proved to be essential to achieve higher levels of biodegradation and protein solubilization (Figure 3). However, the withdrawal of one or two strains from the community decreases keratin biodegradation,

comparing with the community of experiment 26 (Table 1), and achieves a similar result as *B. subtilis* NP5 alone. It seems that *B. subtilis* NP5, which shows the best biodegradation performance, dominates the community, having advantage in the substrate competition. Association among *B. subtilis* S14, *B. cereus* NP4, and *M. caseolyticus* FCA7 (without *B. subtilis* NP5) produces a better feather meal biodegradation (Figure 3) than each strain alone at the same inocula cell concentration (Figure 1). This observation is in accordance with other studies, which show that microbial consortium is advantageous relatively to the use of one strain alone (4, 15).

Since the four strains studied here had different feather meal biodegradation capacity, we establish a four-strain community using the full factorial design as a tool to assemble communities and calculate the effect of each one and interactions between them. This paper demonstrates the use of bacteria as variable in this kind of experimental design and helps to understand microbial relationships and also biodegradation processes optimization for industrial purposes.

### **Acknowledgments**

The authors wish to thank CAPES for D. C. A. scholarship. We are in debit with Andréia Estrela, who performed part of the 16S sequencing. We acknowledge the funding obtained from CAPES (Nanobiotec-Brazil).

### **REFERENCES**

- 1. Camilli, A., and B. L. Bassler.** 2006. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*. **311**:1113-1116.



2. **Chauhan, B., and R. Gupta.** 2004. Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR-14. *Process. Biochem.* **39**:2115-2122.
3. **Chen, Y., C. Lin, G. Jones, S. Fu, and H. Zhan.** 2009. Enhancing biodegradation of wastewater by microbial consortia with fractional factorial design. *J. Hazard. Mater.* **171**:948-953.
4. **Haruta, S., Z. Cui, Z. Huang, M. Li, M. Ishii, and Y. Igarashi.** 2002. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**:529-534.
5. **Haruta, S., S. Kato, K. Yamamoto, and Y. Igarashi.** 2009. Intertwined interspecies relationships: approaches to untangle the microbial network. *Environ. Microbiol.* **11**:2963-2969.
6. **Huisman, J., and F. J. Weissing.** 2001. Fundamental unpredictability in multispecies competition. *Am. Nat.* **157**:488-494.
7. **Ichida, J. M., L. Krizova, C. A. LeFevre, H. M. Keener, D. L. Elwell, and E. H. Burt Jr.** 2001. Bacterial inoculums enhances keratin and biofilm formation in poultry compost. *J. Microbiol. Methods.* **47**:199-208.
8. **Ionata E., F. Canganella, G. Bianconi, Y. Benno, M. Sakamoto, A. Capasso, M. Rossi, and F. La Cara.** 2008. A novel keratinase from *Clostridium sporogenes* bv. pennavorans bv. nov., a thermotolerant organism isolated from solfataric muds. *Microbiol. Res.* **163**:105-112.
9. **Kato, S., S. Haruta, Z. J. Cui, M. Ishii, and Y. Igarashi.** 2008. Network relationships of bacteria in a stable mixed culture. *Microb. Ecol.* **56**:403-411.

10. **Lynd, L. R., P. J. Weimer, W. H. van Zyl, and I. S. Pretorius.** 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**:506-577.
11. **Macedo, A. J., W. O. da Silva, R. Gava, D. Driemeier, J. A. Henriques, and C. Termignoni.** 2005. Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:594-596.
12. **Macedo, A. J., K. N. Timmis, and W. Abraham.** 2007. Widespread capacity to metabolize polychlorinated biphenyls by diverse microbial communities in soils with no significant exposure to PCB contamination. *Environ. Microbiol.* **9**:1890-1897.
13. **Macedo, A. J., W. O. da Silva, and C. Termignoni.** 2008. Properties of a non collagen-degrading *Bacillus subtilis* keratinase. *Can. J. Microbiol.* **54**:180-188.
14. **Maki, M., K. T. Leung, and W. Qin.** 2009. The prospects of cellulose-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int. J. Biol. Sci.* **5**:500-516.
15. **McMahon, M. J. L., and A. J. Daugulis.** 2008. Enhancement of biogenic sulfide production in a packed-bed bioreactor via critical inoculum design and carrier material selection. *Biotech. Bioeng.* **5**:855-863.
16. **Potumarthi, R., C. Subhakar, A. Pavani, and A. Jetty.** 2008. Evaluation of various parameters of calcium-alginate immobilization method for enhanced alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* NCIM-2042 using statistical methods. *Bioresour. Technol.* **99**:1776-1786.

- 17. Pund, S., A. Joshi, K. Vasu, M. Nivsarkar, and S. Shishoo.** 2010. Multivariate optimization of formulation and process variables influencing physic-mechanical characteristics of site-specific release isoniazid pellets. *Int. J. Pharm.* **388**:64-72.
- 18. Rodrigues, M. I., and A. F. Iemma.** 2005. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos, 1st ed. Casa do Pão editora, Campinas, SP.
- 19. Ryckeboer, J., J. Mergaert, J. Coosemans, K. Deprins, and J. Swings.** 2003. Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *J. Appl. Microbiol.* **94**:127–137.
- 20. Sahu, J. N., J. Acharya, and B. C. Meikap.** 2009. Response surface modeling and optimization of chromium (VI) removal from aqueous solution using Tamarind wood activated carbon in batch process. *J. Hazard. Mater.* **172**:818-825.
- 21. Tiquia, S. M., J. M. Ichida, H. M. Keener, D. L. Elwell, E. H. Burt Jr., and F. C. Michel Jr.** 2005. Bacterial community profiles on feathers during composting as determined by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rDNA genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**:412-419.
- 22. Trigo, A., A. Valencia, and I. Cases.** 2009. Systemic approaches to biodegradation. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**:98-108.
- 23. Vermelho, A. B., C. Termignoni, A. J. Macedo, A. Brandelli, and E.P.S. Bon.** 2008. Enzimas queratinolíticas: aplicações biotecnológicas, p. 289-306. *In* E. P. S. Bon, M. A. Ferrara, M. L. Corvo, A. B. Vermelho, C. L. A. Paiva, R. B. De Alencastro, and R. R. R. Coelho (Org.), *Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado*, 1st ed. Interciência, Rio de Janeiro, RJ.

- 24. Vignardet, A., Y. C. Guillaume, L. Michel, J. Friedrich, and J. Millet.** 2001. Comparison of two keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design. *Int. J. Pharm.***224**:115-122.
- 25. Vivas, A., B. Moreno, S. Garcia-Rodriguez, and E. Benitez.** 2009. Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste. *Bioresour. Technol.* **100**:1319-1326.

## 5. Capítulo 3: ROLE OF BIOFILM FORMATION AND KERATINOLITIC ACTIVITY UPON FEATHER BIODEGRADATION

Running title: Biofilm formation influences feather biodegradation

Danielle Campiol Arruda<sup>1</sup>, Carlos Termignoni<sup>2</sup>, Alexandre José Macedo<sup>1,3\*</sup>

Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>1</sup>Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica and <sup>3</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

\* Corresponding author. Mailing address: Av. Ipiranga, 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre RS, Brazil.

Phone/Fax: +55 51 3308 5354. E-mail: alexandre.macedo@ufrgs.br

Este manuscrito será submetido a revista *International Biodeterioration & Biodegradation*.

## ABSTRACT

Keratin is the major component of feather waste from poultry industry. It is well known that different microorganisms have the ability to produce keratinase and promote feather degradation. This protein is insoluble and it is already identified that it could be substrate to biofilm formation. However, there is no relation among enzyme activity, biofilm formation and keratin degradation in literature. Here, it was chosen four bacterial strains, *Bacillus subtilis* S14 and NP5, *Bacillus cereus* NP4 and *Micrococcus caseolyticus* FCA7, to evaluate these criteria using them isolated or in association in a community. Three of them showed that feather meal biodegradation is proportional to keratinase production. However, the best one, *Bacillus subtilis* NP5, presents high biodegradation and strong, biofilm formation, but independently of keratinase production. Association of them reduces all parameters, probably as a result of microbial competition by nutritional source. An important factor pointed, is that active enzymes could present not only in the extracellular medium, but also in biofilm matrix. This assumption justifies the absence of relation of biofilm formation and keratinase activity with high feather meal biodegradation.

## 5.1 INTRODUCTION

Biofilm formation is an old characteristic of prokaryotes and occurs in many biotic and abiotic surfaces (Hall-Stoodley et al., 2004). An increase in studies relating biofilm formation and bioremediation process of chemical pollutants have been published in the last decades (Singh et al., 2006). This phenomenon is already described in biodegradation of organic wastes such as cellulose (Zhang et al., 2007) and keratin (Ichida et al., 2001). Keratin, specifically beta-keratin, is the main protein of feathers. It is a hard to degrade substratum and accumulate in the environment as organic waste from poultry industry. The use of microorganisms to turn it into a valuable and digestible product, rich in peptides and aminoacids, is a strategy to recycle and re-use this protein. It is well know that keratinase production is an essential factor to degradation of many keratin substrates (Gupta and Ramnani, 2006; Vermelho et al., 2008). To improve this process it is important to understand how biofilm formation, enzyme production and degradation were related in this complex system of keratin biodegradation. Here, we verify the ability of biofilm formation of four different bacteria and their combinations in communities with the corresponding feather meal biodegradation and keratinolytic activity.

## 5.2 MATERIALS AND METHODS

5.2.1 Microorganisms. Bacterial strains used were *Bacillus subtilis* S14 (Acession number AY345856) e NP5 (FN687186), *Bacillus cereus* NP4 (FN687187) e *Macrocooccus caseolyticus* FCA7 (FN687188). They were maintained in feather meal agar (40 g l<sup>-1</sup>) at 4 °C.

5.2.2. Feather Meal Degradation. After four days of culture, feather meal cultures were filtrated with cheesecloth, washed with ethanol 70% and dried at 60 °C to a constant weight. Percentage of biodegradation was calculated by the difference of residual feather meal dry weight and initial weight. In all experiments a control without bacterial inoculum was made.

5.2.3 Scanning Electron Microscopy. Biofilm formation was examined by scanning electron microscopy (Jeol JSM-6060 Scanning Electron Microscopy, 50  $\mu$ A and 10 kV) of the inoculated feather with the four microorganisms at cell concentration of  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup> and a control feather uninoculated. Feather samples were harvested at initial time and three days after the inoculation. The samples were washed with cacodilate buffer 100 mM pH 7.2, fixed with glutaraldehyde 2% during 2.5 h and osmium tetroxide 2% during 2 h. After dehydrated with acetone gradient and critical point, the feathers were metalized with silver.

5.2.4 Biofilm formation. The ability of biofilm formation was evaluated with crystal violet (CV) assay. Each strain was grown in Luria Bertani (LB) broth at 180 rpm and 28 °C overnight, then  $10^7$  UFC ml<sup>-1</sup> was inoculated in feather meal broth (40 g L<sup>-1</sup> of autoclaved feather meal in 40 ml of sodium phosphate buffer 10 mM pH 7.0) for cultivation during 24 hours at 180 rpm and 30 °C. Strains cultures were centrifuged at 10,000 rpm for 15 minutes, cell pellet was washed with sodium phosphate buffer 10 mM pH 7.0, centrifuged again at the same conditions and re-suspended in LB broth for inoculation of 200  $\mu$ l in each well of 96-well microtiter plates. Plates were kept at 37 °C during four days. Biofilm formation of isolate strains or community was monitored at initial time, 24, 48, 72 and 96 hours. At each time, supernatants were removed and the wells rinsed three times with 200  $\mu$ l of saline solution. For fixation of biofilms, plates were maintained at 60 °C for one hour, and then stained with 0.4% CV solution. After 15 minutes, CV was removed by washing



the plates under running tap water and dissolution of CV bounded was release adding 200 µl of dimethyl sulfoxide (DMSO). The OD570 threshold value over which strains were considered to be significant biofilm formers was fixed at 0.4. Each plate included eight wells of LB broth without bacteria as control wells. Classification of biofilm formation presented in Figure 1 was based in Stepanovic et al. (2007), where a strong biofilm (S) is considered four times the cut-off value (average OD of negative control + 3.SD of negative control), moderate (M) is between 2 and 4 times the cut-off value, and weak (W) is smaller than 2 times the cut-off value . The presence of each bacterium in the community was evaluated by substitution of one of them for it supernatant. The supernatant production was done by individual cultivation in feather meal broth. The culture was centrifuged (10,000 rpm during 30 minutes) and the supernatant was filtered with a 0.21 µm filter (Minisarte). The supernatant was used to substitute the correspondent bacteria in the biofilm formation assay.

5.2.5 Keratinolytic activity. Azokeratin suspension (1.5% in sodium phosphate buffer 50 mM pH 8.0) was the substrate to evaluated keratinolytic activity (Macedo et al., 2008). An aliquot (1 mL) of feather meal biodegradation culture was centrifuged for 20 minutes at 10,000 rpm and the supernatant (100 µl) used to assay enzymatic activity. All assays were made for each strain or community in quadruplicate with at least two independent experiments (Figure 2).

### 5.3 RESULTS AND DISCUSSION

Scanning electron microscopy of feathers inoculated with the four-strains community showed the presence of biofilm on its surface (Figure 1). It revealed that *M. caseolyticus* FCA7 was the main bacteria directly involved at the first steps of biofilm formation, since it is the only coccus present. The observed phenomenon motivate our group to study the involvement of biofilm formation during feather meal biodegradation.

The four-bacteria community used showed different abilities to degrade chicken feathers, wherein *B. subtilis* NP5 has the better results and *M. caseolyticus* FCA7 worst results. Three inoculae cell concentrations,  $10^4$ ,  $10^6$  and  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>, were used to investigate the profile of biofilm formation and keratinase production of different bacteria and their relation with previous described feather meal biodegradation was shown in Figure 2. *B. subtilis* S14 presented strong biofilm formation at concentrations of  $10^4$  and  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>. Nevertheless, at  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup> biofilm formation was maintained constant during the four days assayed and presented better keratinase production, leading to high biodegradation. The other *B. subtilis*, NP5, showed the highest biodegradation among all bacteria, with a strong biofilm formation in the first two days and growing keratinolytic activity with cell concentration. Although, keratinolytic activity and biofilm formation were important factors to reach high feather meal biodegradation; there was no established relationship between them. Biofilm-associated enzymes were already described (Zhang et al., 2007) to be responsible for partial cellulosic waste hydrolysis. At cell concentration of  $10^4$  and  $10^6$  CFU ml<sup>-1</sup> *B. subtilis* NP5 degraded similar percent of feather meal with low keratinolytic activity in extracellular medium. This phenomenon might be due to the presence of keratinase soaked in biofilm matrix that was not detectable in the enzymatic

assay. Absence of keratinase production by *M. caseolyticus* FCA7 reflected its inability to use feather meal as unique nutritional source (no or very low feather meal biodegradation). Thus strong biofilm formation at high cell concentration of  $10^6$  CFU ml<sup>-1</sup> and  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup> was a way to FCA7 survive in this condition. *Bacillus cereus* NP4 formed a moderate biofilm only at  $10^4$  CFU ml<sup>-1</sup> and showed decreasing keratinolytic

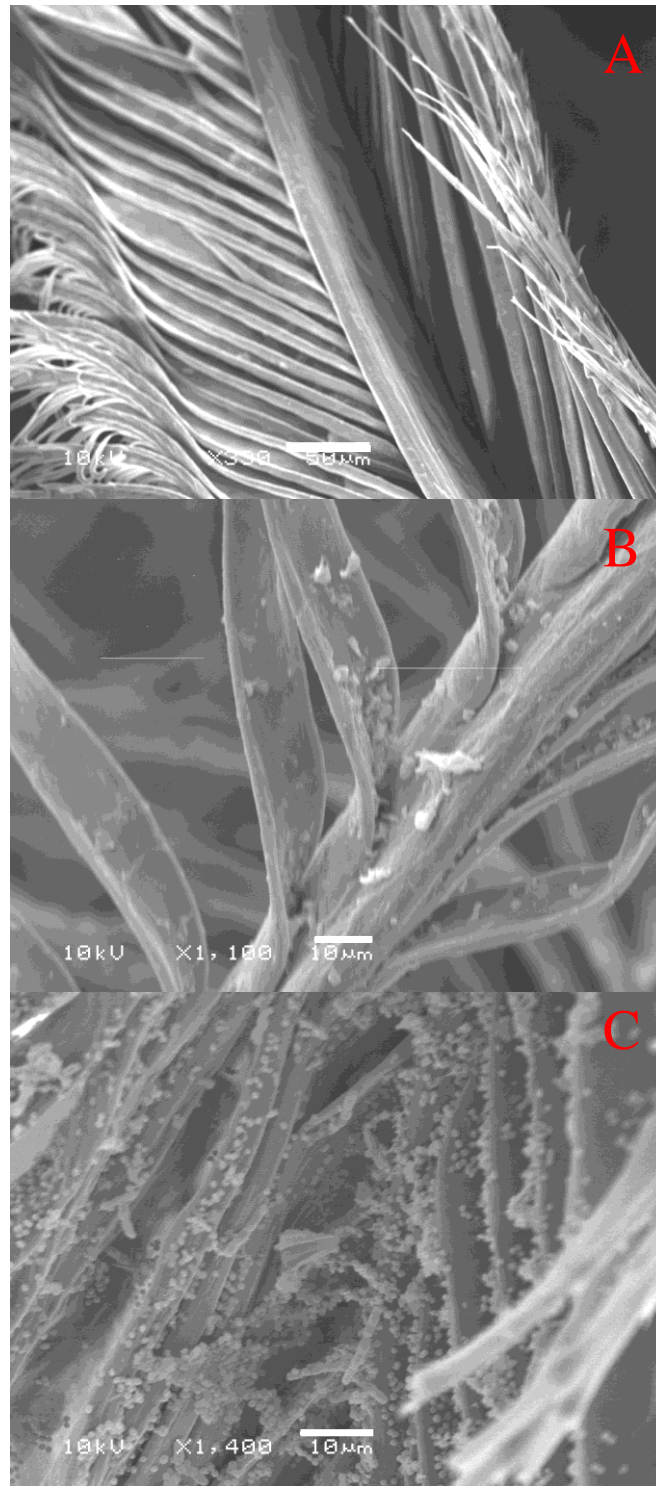


Figure 1: Scanning Electron Microscopy of feather uninoculated (A – scale bar is 50 µm), four-strains community inoculated at initial time (B – scale bar is 10 µm) and after three days (C – scale bar is 10 µm).

activity with increasing cell concentration. In this case biofilm formation favors enzyme production to improve keratin biodegradation.

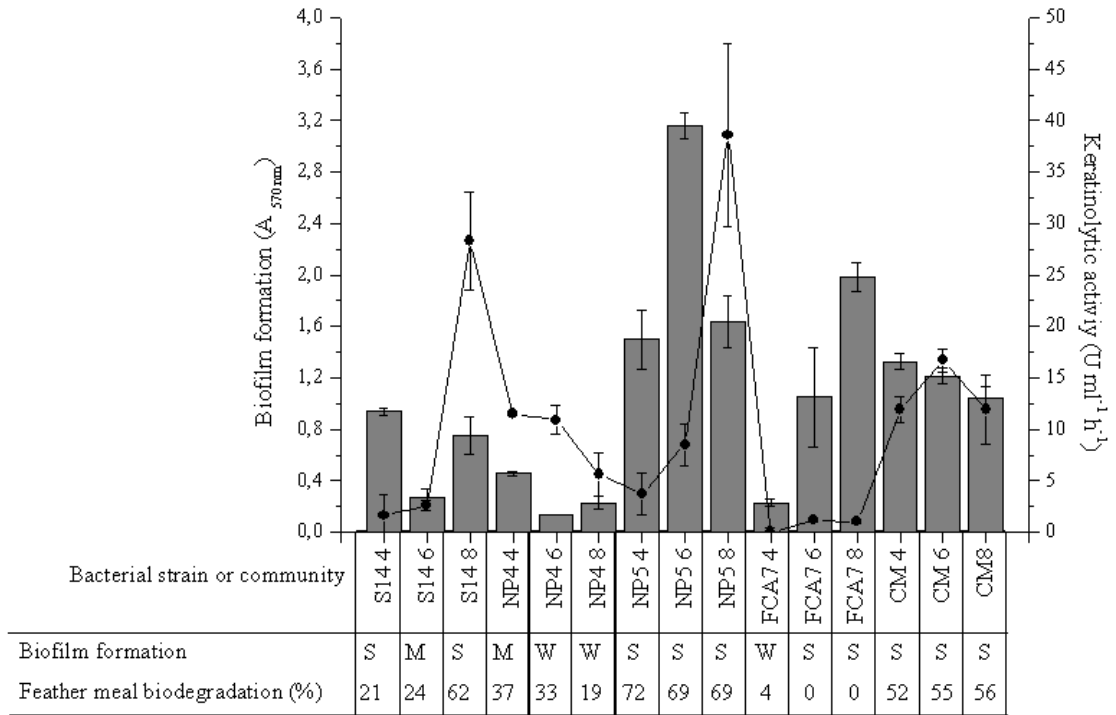


Figure 2: Biofilm formation (bars), keratinolytic activity (circles) and corresponding feather meal biodegradation of strains or communities at different cell concentrations. Numbers after strain number code refers to cell concentration: 4 to  $10^4$  CFU  $\text{ml}^{-1}$ , 6 to  $10^6$  CFU  $\text{ml}^{-1}$  and 8 to  $10^8$  CFU  $\text{ml}^{-1}$ . One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that increases absorbance by 0.1. Strong (S), moderate (M) and weak (W) is the classification of biofilm formation according section 5.2.4.

Four strains grouped together, reduced biodegradation when compared with isolate *B. subtilis* S14 and NP5 as consequence of a moderate keratinase production. Since many *Bacillus* spp. (Gupta and Ramnani, 2006; Mazzoto et al. 2010; Tiwary and Gupta 2010)

presented ability to degrade feather keratin, it was expected that association of different ones would improve feather meal biodegradation. However, high cell concentration could stimulate the production of metabolites in order to promote bacterial competition among them instead of keratinase production.

The replacement of one bacterium to its supernatant was made to evaluate individual biofilm formation influence in the four-strains community at  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup> (Figure 3). When *B. subtilis* S14 and *M. caseolyticus* FCA7 were replaced by their supernatants, biofilm formation decayed three and two times, respectively, proving that they were relevant partners to form a multispecies biofilm. *B. subtilis* NP5 and *B. cereus* NP4 supernatant did not alter biofilm formation, indicating that they were not directly physically involved in this phenomenon but produced some molecules that stimulated the other strains to maintain the biofilm formation.

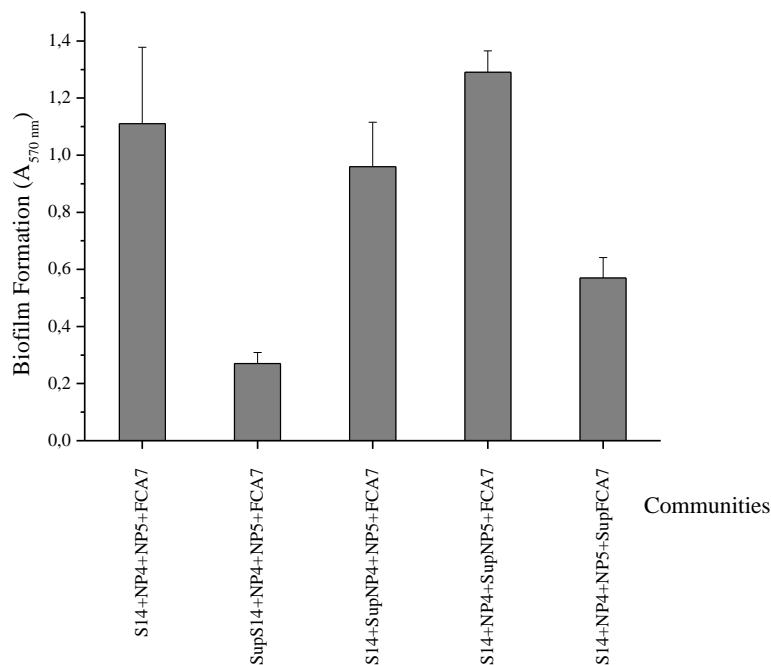


Figure 3: Biofilm formation of four-strain community and communities with replacement of one bacterium at time for their supernatants.

## 5.4 CONCLUSIONS

Our study reports for the first time a quantitative relationship between biofilm formation and keratinolytic activity and their respective keratin biodegradation. For three of four isolate bacteria studied (*B. subtilis* S14, *B. cereus* NP4 and *M. caseolyticus* FCA7) keratinolytic activity was proportional to biodegradation, while there was no pattern for biofilm formation. However, a combination of keratinase production and strong biofilm formation culminates in the highest performance to degrade feather meal obtained by *B. subtilis* NP5. In this study, the associations of microorganisms prejudice keratin biofilm biodegradation since competition among them modified biofilm formation and reduce keratinolytic activity. An important issue pointed here is that enzymatic activity in the formation. However, a combination of keratinase production and strong biofilm process of keratin biodegradation is possibly related to the presence of biofilm matrix besides extracellular enzymes. This situation is revealed for a specific single species biofilm forming by *B. subtilis* NP5, but is not valid for multispecies biofilms. Therefore evaluated and control biofilm formation can be a relevant factor to be considered when high keratin biodegradation is desired.

## REFERENCES

- Gupta, R., Ramnani, P., 2006. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70, 21–33.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* 2, 95-108.

Ichida, J.M., Krizova, L., LeFevre, C.A., Keener, H.M., Elwell, D.L., Burt Jr, E.H., 2001. Bacterial inoculums enhances keratin and biofilm formation in poultry compost. *Journal of Microbiological Methods* 47, 199-208.

Macedo, A.J., da Silva, W.O.B., Termignoni, C., 2008. Properties of non-collagen degrading *Bacillus subtilis* keratinase. *Canadian Journal of Microbiology*, 54, 180-188.

Mazotto, A.M., Cedrola, S.M., Lins, U., Rosado, A.S., Silva, K.T., Chaves, J.Q., Rabinovitch, L., Zingali, R.B., Vermelho, A.B., 2010. Keratinolytic activity of *Bacillus subtilis* AMR using human hair. *Letters in Applied Microbiology*, 50, 89-96.

Singh, R., Paul, D., Jain, R.K., 2006. Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology*, 14, 389-397.

Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Čirković, I., Ruzicka, F., 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 115, 891-899.

Tiwary, E., Gupta, R., 2010. Medium optimization for a novel 58 kDa dimeric keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15: biochemical characterization and application in feather degradation and dehairing of hides. *Bioresource Technology* 101, 6103-6110.

Vermelho, A.B., Termignoni, C., Macedo, A.J., Brandelli, A., Bom, E.P.S., 2008. Enzimas queratinolíticas: aplicações biotecnológicas. In: Bon, E.P.S., Ferrara, M.A., Corvo, M.L., Vermelho, A.B., Paiva, C.L.A., De Alencastro, R.B., Coelho, R.R.R. (Org.), *Enzimas em*



Biotecnologia: produção, aplicações e mercado (1st ed.) Interciência, Rio de Janeiro, pp. 289-306.

Zhang, B., He, P.J., Lu, F., Shao, L.M., Wang, P., 2007. Extracellular enzyme activities during regulated hydrolysis of high-solid organic wastes. *Water Research*, 41, 4468-4478.

## 6. CONCLUSÕES

- Planejamento PB permitiu a seleção de três bactérias importantes na biodegradação de penas de aves;
- *B. subtilis* NP5 mostrou-se essencial para obtenção de alta degradação de resíduos queratinosos e atividade queratinolítica;
- Comunidade de 4 bactérias é capaz de formar biofilme sobre a superfície da pena;
- Associação entre *B. subtilis* NP5 e *M. caseolyticus* FCA7 atinge 20% de degradação de penas inteiras de aves autoclavadas;
- Em penas de aves não autoclavadas a adição de *B. subtilis* NP5 em pH 8,0 e concentração de penas de 7,5% dobrou a porcentagem de biodegradação deste resíduo;
- Planejamento fatorial completo mostrou-se uma ferramenta eficaz para avaliação dos efeitos individuais de bactérias e interações entre elas dentro de uma comunidade;
- A alta degradação de farinha de penas (70%) foi obtida quando *B. subtilis* NP5 estava presente em concentração celular superior a demais bactérias presentes na comunidade (*B. subtilis* S14, *B. cereus* NP4, *M. caseolyticus* FCA7);
- A superfície de respostas gerada por este planejamento indica que a quanto maior a concentração celular de *B. subtilis* NP5, maior a biodegradação deste resíduo;
- A relação entre formação de biofilme e biodegradação de farinha de penas varia conforme a bactéria analisada; para *B. subtilis* NP5 a alta biodegradação é um resultado entre alta formação de biofilme e produção de queratinases.

## 7. IMPACTO

- Aplicação industrial: adequação do processo degradativo de penas em grande escala (compra de biorreator de 1100 L) no aviário escola da UFRGS;
- Adaptação de ferramentas estatísticas não utilizadas previamente para seleção e montagens de comunidades microbianas.

## 8. PERSPECTIVAS

- Uso de técnicas baseadas na extração de ácidos nucleicos para acompanhamento da dinâmica de comunidades microbianas;
- Avaliação da presença de enzimas no biofilme formado.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABEF - Associação Brasileira de Exportadores de Frango, Relatório Anual 2008/2009. Disponível em <http://www.abef.com.br>. 24 de junho de 2010.
2. BELNAP, C.P.; PAN, C.; VERBERKMOES, N.C.; POWER, M.E.; SAMATOVA, N.F.; CARVER, R.L.; HETTICH, R.L.; AND BANFIELD, J.F. Cultivation and quantitative proteomic analyses of acidophilic microbial communities. **International Society for Microbial Ecology Journal**, v. 4, p. 520-30, 2010.

3. BRADY, S.F.; SIMMONS, L.; KIM, J.H.; SCHMIDT, E.W. Metagenomic approaches to natural products from free-living and symbiotic organisms. **Natural Products Reports**, v. 26, p. 1488-503, 2009.
4. CAO, L.; TAN, H.; LIU, Y.; XUE, X.; ZHOU, S. Characterization of a new keratinolytic *Trichoderma atroviride* strain F6 that completely degrades native chicken feather. **Letter in Applied Microbiology**, v. 46, p. 389-394, 2008.
5. CAO, Z.J.; ZHANG, Q.; WEI, D.K.; CHEN, L.; WANG, J.; ZHANG, X.Q.; ZHOU, M.H. Characterization of a novel *Stenotrophomonas* isolate with high keratinase activity and purification of the enzyme. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 181-188, 2009.
6. CHOUDHARY, S.; SCHMIDT-DANNERT, C. Applications of quorum sensing in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 1267-1279, 2010.
7. CHAUHAN, B.; GUPTA, R. Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR-14. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2115-2122, 2004.
8. CHEN, Y.; LIN, C.; JONES, G.; FU, S.; ZHAN, H. Enhancing biodegradation of wastewater by microbial consortia with fractional factorial design. **Journal of Hazardous Materials**, v. 171, p. 948-953, 2009.
9. DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 847-867, 2000.
10. FRIEDRICH, A.B.; ANTRANIKIAN, G. Keratin degradation by *Fervidobacterium pennovarans*, a novel thermophilic anaerobic specie of the order Thermotagales. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2875-2882, 1996.
11. GODDEN, B.; PENNINCKX, M.J. Identification and evolution of the cellulolytic microflora present during composting of cattle manure: on the role of actinomycetes sp. **Annals of Microbiology**, v. 135B, p. 69-78, 1984.

12. GRADISAR, H.; KERN, S.; FRIEDRICH, J. Keratinase of *Doratomyces microsporus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 196-200, 2000.
13. GUPTA, R.; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 21-33, 2006.
14. HOLLISTER, E.B.; ENGLDOW, A.S.; HAMMETT, A.J.M.; PROVIN, T.L.; WILKINSON, H.H.; GENTRY, T. J. Shifts in microbial community structure along an ecological gradient of hypersaline soils and sediments. **International Society for Microbial Ecology Journal**, v. 4, p. 829-838, 2010.
15. HARUTA, S.; CUI, Z.; HUANG, Z.; LI, M.; ISHII, M.; IGARASHI, Y. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 529-534, 2002.
16. HARUTA, S.; KATO, S.; YAMAMOTO, K.; IGARASHI, Y. Intertwined interspecies relationships: approaches to untangle the microbial network. **Environmental Microbiology**, v. 11, p. 2963-2969, 2009.
17. ICHIDA, J.M., KRIZOVA, L.; LEFEVRE, C.A.; KEENER, H.M., ELWELL, D.L.; BURTT JR, E.H. Bacterial inoculums enhances keratin and biofilm formation in poultry compost. *Journal of Microbiological Methods*, v. 47, p.199-208, 2001.
18. INSKEEP, W.P.; RUSCH, D.B.; JAY, Z.J.; HERRGARD, M.J.; KOZUBAL, M.A.; RICHARDSON, T.H.; MACUR, R.E.; HAMAMURA, N.; JENNINGS, R.; FOUKE, B.W.; REYSENBACH, A.L.; ROBERTO, F.; YOUNG, M.; SCHWARTZ, A.; BOYD, E.S.; BADGER, J.H.; MATHUR, E.J.; ORTMANN, A.C.; BATESON, M.; GEESEY, G.; FRAZIER, M. Metagenomes from high-temperature chemotrophic systems reveal geochemical controls on microbial community structure and function. **PLoS One**. v. 19, p. e9773, 2010.
19. IONATA, E.; CANGANELLA, F.; BIANCONI, G.; BENNO, Y.; SAKAMOTO, M.; CAPASSO, A.; ROSSI, M.; LA CARA, F. A novel keratinase from *Clostridium*

- sporogenes* bv. *pennavorans* bv. nov., a thermotolerant organism isolated from solfataric muds. **Microbiological Research**, v. 163, p. 105-112, 2008.
20. JAIN, A.; BHOSLE, N. Biochemical composition of the marine conditioning film: implications for bacterial adhesion. **Biofouling**, v. 25, p. 13–19, 2009.
21. KATO, S.; HARUTA, S.; CUI, Z. J.; ISHII, M.; IGARASHI, Y. Network relationships of bacteria in a stable mixed culture. **Microbial Ecology**, v. 56, p. 403-411, 2008.
22. KOJIMA, M.; KANAI, M.; TOMINAGA, M.; KITAZUME, S.; INOUE, A.; HORIKOSHI, K. Isolation and characterization of a feather-degrading enzyme from *Bacillus pseudofirmus* FA30-01. **Extremophiles**, v. 10, p. 229-235, 2006.
23. KUMAR, A.G.; SWARNALATHA, S; GAYATHRI, S.; NAGESH, N.; SEKARAN, G. Characterization of an alkaline active-thiol forming extracellular serine keratinase by the newly isolated *Bacillus pumilus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 411-419, 2008.
24. LI, W.; RASMUSSEN , H.T. Strategy for developing and optimizing liquid chromatography methods in pharmaceutical development using computer-assisted screening and Plackett–Burman experimental design. **Journal of Chromatography A**, v. 1016, p.165-180, 2003.
25. LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN ZYL, W.H.; PRETORIUS. I.S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 506-577, 2002.
26. MACEDO, A.J.; DA SILVA, W.O.B.; GAVA, R.; DRIEMEIER, D.; HENRIQUES, J.A.P.; TERMIGNONI, C. Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 594-596, 2005.

27. MACEDO, A.J.; TIMMIS, K.N.; ABRAHAM, W. Widespread capacity to metabolize polychlorinated biphenyls by diverse microbial communities in soils with no significant exposure to PCB contamination. **Environmental Microbiology**, v. 9, p. 1890-1897, 2007.
28. MACEDO, A.J.; BEYS DA SILVA, W.O.; TERMIGNONI, C. Properties of a non collagen-degrading *Bacillus subtilis* keratinase. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 180-188, 2008.
29. MAKI, M., LEUNG, K.T.; QIN, W. The prospects of cellulose-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, p. 500-516, 2009.
30. MAZOTTO, A.M.; LAGE CEDROLA, S.M.; LINS U.; ROSADO, A.S.; SILVA, K.T.; CHAVES, J.Q.; RABINOVITCH, L.; ZINGALI, R.B.; VERMELHO, A.B. Keratinolytic activity of *Bacillus subtilis* AMR using human hair. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, p. 89-96, 2010.
31. ODETALLAH, N.H.; WANG J.J.; GARLICH, J.D.; SHIH J.C.H. Versazyme Supplementation of Broiler Diets Improves Market Growth Performance. **Poultry Science**. v. 84, p. 858-864, 2005.
32. ONIFADE, A.A.; AL-SANE, N.A.; AL-MUSALLAM, A.A.; AL-ZARBAN, S. A Review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. **Bioresource Technology**, v. 66, p. 1-11, 1998.
33. PILLAI, P.; ARCHANA, G. Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel *Bacillus subtilis* isolate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.78, p. 643–650, 2008.
34. PLACKETT, R.L.; BURMAN, J.P. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. **Biometrika**. v. 33, p. 305-325, 1946.

35. PUND, S.; JOSHI, A. ; VASU, K.; NIVSARKAR, M.; SHISHOO, S. Multivariate optimization of formulation and process variables influencing physic-mechanical characteristics of site-specific release isoniazid pellets. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 388, p. 64-72, 2010.
36. PURNOMO, A.S.; MORI, T.; KAMEI, I.; NISHII, T.; KONDO, R. Application of mushroom waste médium from *Pleurotusostreatus* for bioremediation of DDT-contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, p. 397-402, 2010.
37. RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. 1° ed. Campinas: Casa do Pão editora, 2005.
38. ROMANÍ, A.M.; FUND, K.; ARTIGAS, J.; SCHWARTZ, T.; SABATER, S.; OBST, U. Relevance of Polymeric Matrix Enzymes During Biofilm Formation. **Microbial Ecology**, v. 56, p. 427-436, 2008.
39. SAHU, J.N.; ACHARYA, J.; MEIKAP, B.C. Response surface modeling and optimization of chromium (VI) removal from aqueous solution using Tamarind wood activated carbon in batch process. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, p. 818-825, 2009.
40. SANGALI, S.; BRANDELLI, A. Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain kr2. **Journal of Applied. Microbiology**. v. 89, p. 735–743, 2000.
41. SHIGERI, Y.; MATSUI, T.; WATANABE, K. Decomposition of intact chicken feathers by a termophile in combination with an acidulocomposting garbage-treatment process. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.73, p. 2519-2521, 2009.
42. SON, H.J.; PARK, H.C.; KIM, H.S.; LEE, C.Y. Nutritional regulation of keratinolytic activity in *Bacillus pumilis*. **Biotechnology Letters**, v.30, p. 461-465, 2008.



43. STOWE, R.A.; MAYER, R.P. Efficient Screening of Process Variables. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 58, p. 36-40, 1966.
44. SYED, D.G.; LEE, J.C.; LI, W.J.; KIM, C.J.; AGASAR, D. Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1868-1871, 2009.
45. TOMARELLI, R.M.; CHAMEY, J.; HARDING, M.L. The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of peptic tryptic activity. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**.v. 34, p. 428-433, 1949.
46. UBA - União Brasileira de Avicultores, Relatório Anual 2009. Disponível em <http://www.uba.org.br>, 25 de junho de 2010.
47. VERMELHO, A.B.; TERMIGNONI, C.; MACEDO, A.J.; BRANDELLI, A.; BON, E.P.S. Enzimas queratinolíticas: aplicações biotecnológicas. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L.; VERMELHO, A.B.; PAIVA, C.L.A.; DE ALENCASTRO, R.B.; COELHO, R.R.R. (Org.) **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 1. Ed., 2008, p. 289-306.
48. VIGNARDET, A.; GUILLAUME, Y.C.; MICHEL, L.; FRIEDRICH, J.; MILLET, J. Comparison of two keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, p. 115-122, 2001.
49. WANG, S.L.; HSU, W.T.; LIANG, T.W.; YEN, Y.H.; WANG, C.L. Purification and characterization of three novel keratinolytic metalloproteases produced by *Chryseobacterium indologenes* TKU014 in a shrimp shell powder medium. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5679-5686, 2008.
50. YAMAMURA, S.; MORITA, Y.; HASAN, Q.; YOKOYAMA, K.; TAMIYA, E. Keratin degradation: a cooperative action of two enzymes from *Stenotrophomonas* sp. **Biochemistry and Biophysical Research Communication**, v. 294, p. 1138-1143, 2002.

## 10. CURRÍCULO

### *Dados pessoais*

Nome Danielle Campiol Arruda  
Nome em citações bibliográficas ARRUDA, D.C.  
Sexo Feminino  
Endereço profissional Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia.  
Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43431, sala 217  
Agronomia - 91501-970 - Porto Alegre, RS - Brasil  
Telefone: (51) 33086082  
URL da Homepage: <http://www.cbiot.ufrgs.br/cenbiot/>

### *Formação acadêmica/Titulação*

2002 - 2006 Graduação em Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil. *Título:* O Potencial Terapêutico do chá Ayahuasca.  
*Orientador:* Grace Gosmann.

### *Atuação profissional*

#### **Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.**

#### Vínculo institucional

2007 - Atual Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Mestranda

#### Atividades

2007 - Atual Atividades de Participação em Projeto, Centro de Biotecnologia.  
Projetos de pesquisa: produção de enzimas queratinolíticas.

#### **Reserva Natural Farmácia de Manipulação, RS, Brasil.**

#### Vínculo institucional

2006 - 2007 Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Farmacêutica responsável, Carga horária: 44

#### *Projetos de Pesquisa*

2007 - Atual Produção de enzimas queratinolíticas  
*Situação:* em andamento;  
*Natureza:* pesquisa.  
*Integrantes:* Alexandre José Macedo - Coordenador  
Danielle Campiol Arruda - Integrante.

### *Áreas de atuação*

1. *Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia.*

#### *Idiomas*

Inglês Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

#### *Produção em C,T & A*

##### *Apresentações de Trabalho*

1. ARRUDA, D.C. ; MALLMANN, L. ; GALEAZZI, L. ; TERMIGNONI, C. ; MACEDO, A.J. . Degradação de penas de galinha por comunidade microbiana. 2009. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
2. ARRUDA, D.C. ; TERMIGNONI, C. ; MACEDO, A.J. . Functional Activity of Microbial Communities on Feather Degradation. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. ARRUDA, D.C. ; MALLMANN, L. ; TERMIGNONI, C. ; MACEDO, A.J. . Modelo para estudo de interações entre microrganismos: possível aplicação em comunidades presentes na clínica.. 2008. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

#### *Eventos*

##### *Participação em eventos*

1. XXXVIII Anual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society (SBBq).Functional Activity of Microbial Communities on Feather Degradation. 2009. (Congresso).
2. 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia. ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE DEGRADAÇÃO DE PENAS DE AVES E FORMAÇÃO DE BIOFILME POR COMUNIDADES MICROBIANAS. 2009. (Congresso).
3. I Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Animais. Degradação de penas de galinha por comunidade microbiana. 2009. (Simpósio).
4. I Símposio Internacional de Microbiologia Clínica. Modelo para estudo de interações entre microrganismos: possível aplicação em comunidades presentes na clínica.. 2008. (Simpósio).
5. XI Escola de Verão em Química Farmacêutica Medicinal e I Escuela de Verano Latinoamericana de Química Medicinal. 2005. (Outra).
6. XXXI Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos - UFRGS. 2005. (Outra).
7. I Escola de Inverno em Química Combinatória. 2005. (Outra).
8. XXX Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos - UFRGS. 2004. (Outra).