

PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO POR RIZOBACTÉRIAS ASSOCIADAS A CACTÁCEAS

Leonardo Figueiredo Landim¹, Adailson Feitoza de Jesus Santos²

1. Graduando em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade do Estado da Bahia (UNEB)
2. Professor da UNEB – Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais– Campus III - Orientador

Resumo

Os Produtos gerados com base em biopolímeros bacterianos tornam-se cada vez mais atraentes ao mercado industrial devido a sua natureza biodegradável. É pesquisa em muitas áreas, principalmente quando se objetiva reduzir o uso de polímeros baseados em derivados de petróleo. O objetivo deste trabalho foi selecionar rizobactérias nativas da Caatinga com potencial para sintetizar exopolissacarídeos e definir a melhor condição para produção dos mesmos. Os isolados com maior potencial para produzir substância mucoide foram submetidos em Delineamento Composto Central Rotacional com 3 variáveis: pH, temperatura e glicose como fonte de carbono. Para produção fermentativa, foram montados dois tratamentos: fermentação estática e sob agitação constante. O isolado PH9.1 destacou-se no ensaio 13. O diâmetro da camada mucoide foi de 2,15 centímetros, superior aos demais isolados. A fermentação estática apresentou rendimento superior para massa fresca e seca, 6,4 e 4,2 g/L do polímero respectivamente.

Autorização legal: ICMBio – Autorização para atividades com finalidade científica Nº 20512.

Palavras-chave: EPS; Bactérias; Caatinga

Apoio financeiro: Fapesb/CNPq

Trabalho selecionado para a JNIC: Universidade do Estado da Bahia - UNEB

Introdução

As plantas naturalmente adaptadas às condições áridas e/ou semiáridas possuem um microbioma tolerante a esses ambientes, podendo influenciar o crescimento vegetal e reduzir os efeitos negativos de estresses abióticos. As bactérias deste microbioma apresentam diversos mecanismos que as capacitam a sobreviver em regiões semiáridas apresentando potencial para auxiliar as plantas a tolerar tais condições como: produção de biopolímeros (MILOSEVIC et al., 2012).

Os exopolissacarídeos (EPS) são biopolímeros compostos produzidos por diversos micro-organismos e são liberados fora da célula ou mantidos aderidos na parede celular (REYES-GAVILAN, 2006). Sua produção vem sendo relacionada como mecanismo de adaptação destes micro-organismos às diversas condições de estresse como solos salinos, estresse hídrico e variações de temperatura (ROPER et al., 2007). Adequado à natureza biodegradável, os produtos gerados a partir dos biopolímeros tornam-se cada vez mais atraentes ao mercado, reduzindo a possibilidade de uso e acúmulo de derivados de petróleo no ambiente (REHM et al., 2010). A composição do biopolímero sintetizado dependerá principalmente da espécie do micro-organismo e o do tipo de nutrientes fornecidos (SUTHERLAND et al., 2001).

Sob a perspectiva industrial estes EPSs são empregados como espessantes, gelificantes e emulsificantes. Diversas pesquisas têm sido intensificadas na área da saúde humana, com intuito de aplica-los como agentes antitumorais (ARUN et al., 2017). São utilizados em leites fermentados, pois melhoram a qualidade, não alterando as propriedades e na presença de EPS dispensa a utilização de aditivos não naturais (LIN; CHANG CHIEN, 2007). A produção industrial exceto a goma xantana era estimada na ordem de 60.000 t/ano em 2002, com taxa de crescimento acima de 20% ao ano, antevê um mercado anual de US\$ 2 bilhões em 2018, com papel fundamental na sociedade moderna, em diversos setores da economia mundial (PRADELLA, 2006).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi selecionar rizobactérias associadas a cactáceas nativas da Caatinga com potencial em sintetizar exopolissacarídeos e determinar a melhor condição de cultivo para produção dos mesmos.

Metodologia

A habilidade em produzir exopolissacarídeos (EPS) foi determinada utilizando a metodologia descrita por Paulo et al., (2012) com os isolados proveniente do solo rizosférico de 3 gêneros de plantas (*Pilosocereus* spp.,

Tacinga spp. e *Melocactus* spp.) da família Cactácea coletado na ESEC-Raso da Catarina.

Um volume de 5 µL de suspensão bacteriana ($OD_{600nm} = 0.3$) foi inoculado em discos de papel filtro estéril de 5 mm Ø e dispostos sobre o meio de cultura modificado por Guimarães et al., (1999) contendo: 2% de extrato de levedura, 1,5% de K_2HPO_4 , 0,02% de $MgSO_4$, 0,0015% de $MnSO_4$, 0,0015% de $FeSO_4$, 0,003% de $CaCl_2$, 0,0015% de $NaCl$, 1,5% de Agar e 10% de sacarose, com pH ajustado para 7.5 e incubadas a 30°C por 48hs. A produção de EPS foi observada a partir da formação da camada mucóide ao redor dos discos. Essa camada foi removida e transferida para tubos de ensaio contendo 2 mL de etanol absoluto. A formação de um precipitado confirma a presença de EPS.

Os isolados que apresentaram produção de EPS foram submetidos a diferentes condições de cultivo, utilizando o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) de acordo com Rodrigues e lemma (2009), com 3 variáveis: pH (5.5, 6.0, 7.0, 8.0 e 8.5), temperatura (28, 32, 38.5, 45 e 49° C) e glicose como fonte de carbono (1, 2.8, 5.5, 8.2 e 10%), totalizando 18 ensaios. A variável dependente foi expressa em centímetros e consistiu na medida do diâmetro da camada mucóide ao redor dos discos. Para isso, utilizou-se o mesmo meio da seleção inicial. Foi utilizado o programa Estatistic 7.0 e teste de Anova a 0,5% de probabilidade.

O isolado que apresentou maior camada mucóide foi ativado e repicado no meio de cultura sólido modificado por Guimarães et al., (1999). Após o crescimento adicionou-se três alçadas de cultura em dois Erlenmeyers contendo 50 mL do mesmo meio empregando a melhor fonte de carbono (%), pH e a temperatura ideal para produção. Foram montados dois tratamentos: fermentação estática e sob agitação constante a 120 rpm, ambos incubados por 24 h. Após, adicionou-se 10 mL do pré-inóculo em Erlenmeyers contendo 100 mL de meio e mantido nas mesmas condições. Após 72 h de incubação, as células foram removidas do caldo fermentado através de centrifugação (14.000 rpm, 15' - 4° C). Foram analisadas: massa fresca e seca da biomassa bacteriana. O sobrenadante recuperado foi misturado com etanol absoluto gelado na proporção de 1/3 (v/v) e agitado vigorosamente para precipitação do EPS. O material foi então mantido em freezer -20° C durante 24 h e centrifugado (14.000 rpm, 15' - 4° C). Descartou-se o sobrenadante e o EPS precipitado foi mantido em estufa a 50° C até atingir massa seca constante. As análises foram feitas em triplicata e os dados avaliados através da análise de variância e teste de Scott-Knott a 0,5% com o software Sisvar.

Resultados e Discussão

Das 90 bactérias nativas da Caatinga isoladas do solo rizosférico, 20 isolados apresentaram produção de EPS, destes, 15 se destacaram quanto a sua capacidade de sintetizar camada mucóide no período de 48 h.

Das condições testadas no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi aplicada regressão linear para se estimar a condicional de forma que a distância entre os pontos e a curva ajustada seja a menor possível, assim o isolado PH9.1 se destacou no ensaio 13 (pH 7,0 – temperatura 38,5 – glicose 1%) em comparação aos demais isolados nas diferentes condições. A medida do diâmetro da camada mucóide ao redor do disco foi de 2,15 centímetros.

A partir dos resultados apresentados foi possível obter o gráfico de colunas que ordena as frequências das ocorrências, selecionando vários itens ou fatores de acordo com a ordem de importância, apontando que a temperatura e a porcentagem da fonte de carbono tiveram fator que significativamente ($p < 5$) influenciou a produção do polímero nas condições testadas. Nampoothiri et al., (2003) afirma que o pH deve ser considerado como um dos fatores que afeta diretamente a produção de EPS. Porém para o isolado PH9.1 o pH não teve influência direta.

Para determinação da otimização do processo foi utilizado à superfície de resposta e curva de contorno, permitindo assim, estimar as condições máximas para produção de EPS. Para temperatura e pH (Figura 01), a produção de EPS é nula e sua produtividade específica não é prevista quando a temperatura é abaixo de 30° C e pH abaixo de 6.0 ou acima de 8.5, com um aumento gradativo mais significativo a partir de 35 °C com máxima produção dentro da faixa de pH 7.0 e temperatura de 38,5 a 49° C. Diferente da pesquisa realizada por Dupont et al. (2000) que utilizando a mesma fonte de carbono não encontraram diferença significativa de fermentação entre 32 a 38 °C. Para o modelo empregando glicose e pH (Figura 02) tiveram impactos positivos na estimativa de máxima produção no pH 6,0 a 8,0 e glicose de 1 a 2,8%. Na superfície e curva da glicose e temperatura (Figura 03) é apontada estimativa máxima com temperatura acima de 38,5° C e com 1% de glicose, dentro das condições ideais estimadas para o EPS. Dessa forma, mostra o potencial de comercialização já que os valores das fontes de carbono industriais tornam a produção de alto custo (RUAS-MADIEDO et al, 2005). Validando assim, as relações existentes entre os principais fatores que compõem um

processo e uma variável resposta de interesse.

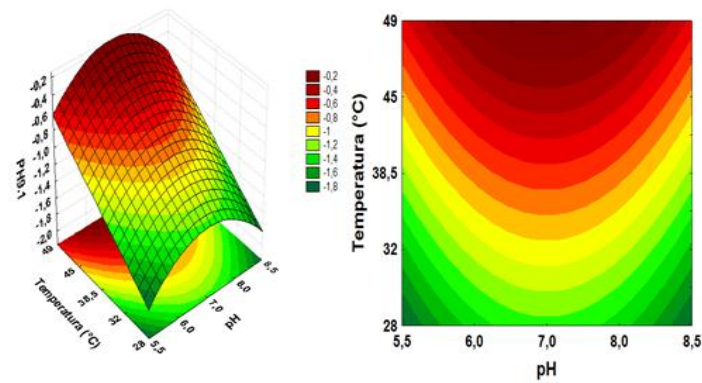


Figura 01: Superfície de resposta e curva de contorno em função das variáveis: temperatura e pH.

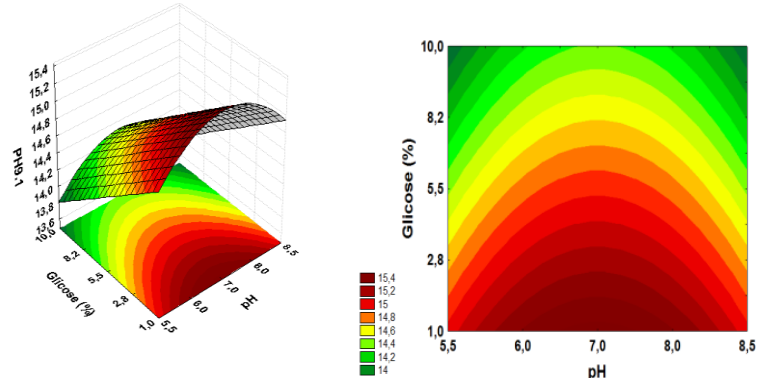


Figura 02: Superfície de resposta e curva de contorno em função das variáveis: glicose e pH.

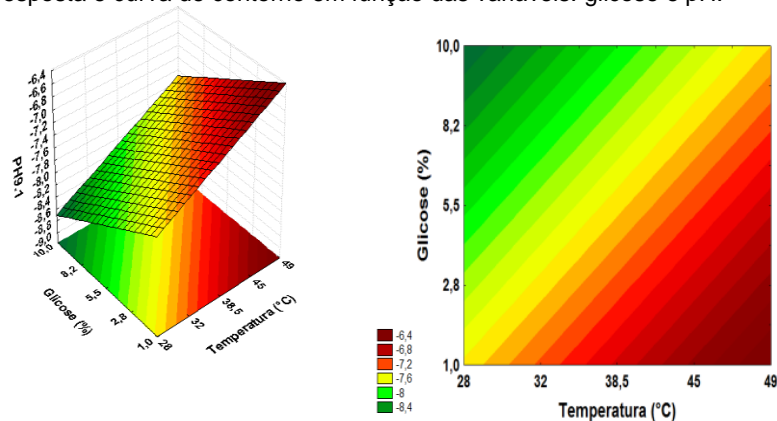


Figura 03: Superfície de resposta e curva de contorno em função das variáveis: glicose e temperatura.

Na etapa de fermentação, a condição estática apresentou uma camada mucóide espessa de cor roseada com incrustações na sua superfície, já em condição de agitação constante não foram verificadas características morfológicas, apresentando o meio, coloração mais escura. No processo de recuperação do Biopolímero pôde-se observar uma massa precipitada indicando a presença massiva do EPS.

A biomassa bacteriana removida foi comparada entre os tratamentos em fermentação estática e sob agitação, porém não houve diferença significativa, para a massa fresca (4,8 e 3,4 g/L) e seca das células (0,7 e 1,6 g/L) respectivamente. Quando analisados o rendimento do EPS, após a recuperação, verificou-se que houve diferença quando comparados os dois tipos de processos fermentativos. A fermentação em condição estática apresentou rendimento superior para a massa fresca e seca do EPS de 6,4 e 4,2 g/L comparado ao tratamento sob agitação que apresentou 2,5 e 1,3 g/L respectivamente.

A biomassa celular não influenciou diretamente no rendimento final nas condições do ensaio 13, em contrapartida, ao adicionar oxigênio no sistema através da agitação, a produção do EPS foi comprometida, uma vez que o EPS sintetizado sob fermentação estática apresentou melhor rendimento.

Conclusões

Rizobactérias associadas a cactáceas nativas da Caatinga possuem a capacidade de produção de EPS. Foram definidas as melhores condições de produção de EPS para o isolado PH9.1.

Referências bibliográficas

- ARUN, J.; SELVAKUMAR, S.; SATHISHKUMAR, R.; MOOVENDHAN, M.; ANANTHAN, G.; MARUTHIAH, T.; PALAVESAM, A. **In vitro antioxidant activities of an exopolysaccharide from a salt pan bacterium *Halolactibacillus miurensis***. Carbohydrate Polymers, v.155, p. 400-406, 2017.
- DUPONT J, MAGNIN S, PARONNAUD J, ROQUEBERT M.F. **The genus *Phaeoacremonium* from a molecular point of view**. Phytopathologia Mediterranea 39, 119–24, 2000.
- GUIMARÃES DP, COSTA F, RODRIGUES MJ, MAUGERI F. **Optimization of dextran synthesis and acidic hydrolysis by surface response analysis**. Braz. J. Chem. Eng. 16:129-139. 1999
- LIN, T.Y.; CHANG CHIEN, M.-F. **Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time**. Food Chemistry, v. 100, n. 4, p. 1419-1423, 2007.
- MILOSEVIC NA; MARINKOVIC JB; TINTOR BB. **Mitigation abiotic stress in crop plants by microorganisms**. Proc. Nat. Sci, 123:17-26. 2012
- NAMPOOTHIRI, K. M.; SINGHANIA, R. R.; SABARINATH, C.; PANDEY, A. **Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis***. Process Biochemistry, London, v.38, p.1513-1519, 2003.
- PAULO EM, VASCONCELOS MP, OLIVEIRA IS, AFFE HMJ, NASCIMENTO R, MELO IS, ROQUE MRA, ASSIS SA. **An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation**. Ciênc. Tecnol. Aliment. 32:710-714. 2012.
- PRADELLA, J. G. C. - **“Biopolímeros e Intermediários Químicos”**, relatório técnico nº 84396-205, Centro de Tecnologia de Processos e Produtos, Laboratório de Biotecnologia Industrial – LBI/CTPP (2006).
- REHM, B. H. A., **Bacterial biopolymers: biosynthesis, modifications and applications**. Nature Rev Microbiol;8:578 592. 2010
- RODRIGUES, M. I., IEMMA, F.A., **Noções sobre experimentos fatoriais; Comparação do uso das metodologias; Estratégia experimental para fatoriais fracionados e delineamento composto central rotacional (DCCR)**. In: **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**, v. 1, capítulo 3, 4, 5, Campinas, SP, 2 ed., Editora Cárita, 2009.
- ROPER, M.C.; GREVE, L.C.; LABAVITCH, J.M.; KIRKPATRICK, B.C. **Detection and visualization of an exopolysaccharide produced by *Xylella fastidiosa* in vitro and in planta**. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 73, p. 7252-7258, 2007.
- RUAS-MADIEDO, P.; ALTING, A.C.; ZOON, P. **Effect of exopolysaccharides and proteolytic activity of *Lactococcus lactis* subsp. cremoris strains on the viscosity and structure of fermented milks**. International Dairy Journal, v. 15, n. 2, p. 155-164, 2005.
- RUAS-MADIEDO, P.; REYES-GAVILÁN, C.G.D.L. **Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria**. Journal of Dairy Science, v.88, n.3, p.843-856, 2006.
- SUTHERLAND, I. W., **Microbial polysaccharides from gram-negative bacteria**. Int Dairy J;11: 663-674. 2001.