



## Curva de crescimento e produção de carboidratos em cinco bactérias isoladas de plantas de arroz (*Oryza sativa*)

Maynara Thays Faria Lima de Souza<sup>1</sup> \* (IC), Lucas Leonardo da Silva<sup>2</sup> (PG), Karina Freire D'Eça Nogueira Santos<sup>3</sup> (PG) (PQ), Plínio Lazaro Faleiro Naves<sup>4</sup> (PQ), Claudia Cristina Garcia Martin-Didonet<sup>5</sup> (PQ).

\*e-mail autor: maynarathays123@gmail.com

<sup>1</sup>UEG – Discentes Curso de Farmácia, CCET. Br 153 nº 3.105 - Fazenda Barreiro do Meio - Anápolis - Goiás - Brasil. Caixa Postal: 459. CEP: 75.132-903. <sup>2</sup> Mestre Programa de Mestrado CAPS CCET-UEG - Anápolis - Goiás, <sup>3</sup> Pos-Doc/Pesquisadora Programa de Mestrado CAPS CCET-UEG, Anápolis - Goiás, <sup>4</sup> Pesquisador(a). Programa de Mestrado CAPS CCET-UEG, Anápolis - Goiás

Resumo: Há grande demanda pelo isolamento e caracterização de bactérias endofíticas de arroz nativas do Cerrado produtoras de exopolissacarídeos (EPS). O presente trabalho teve como objetivo avaliar bactérias endofíticas de plantas de arroz quanto a capacidade de produção de EPS, por meio de ensaios fisiológicos e genéticos. Cinco isolados identificados como produtores de EPS (R5, R25A, R31, R58 e R82) foram utilizados. As bactérias foram cultivadas em meio caldo batata (CB) e em meio RDM por 48 hs sendo coletadas aliquotas a cada 12 horas para as demais determinações. Foi determinado o crescimento ( $DO_{600nm}$ ) e realizado a dosagem de proteínas e carboidratos totais com metodologias padrões, assim como a análise genética por PCR da região rDNA intergênica. A partir dos dados, foi observado que as bactérias apresentaram um maior crescimento e maiores teores de proteínas e carboidratos totais quando cultivadas em meio CB. Pela extração de EPS foi obtido que 3 isolados foram capazes de produzir este polímero tendo destaque o isolado R82 com maior rendimento. Pela análise genética da região rDNA intergênica foi possível observar que há pouca similaridade genética entre os isolados avaliados, indicando a variabilidade das bactérias associadas a planta de arroz produtoras de EPS.

Palavras-chave: biopolímeros bacterianos, bactérias endofíticas, cultivo bacteriano.

### Introdução

As bactérias presentes no interior de tecidos vegetais são denominadas genericamente de endofíticas. Estas bactérias vêm sendo muito estudadas por se associar com plantas cultivadas de importância econômica e muitos gêneros também estão sendo alvo de estudo por serem produtoras de biopolímeros (FANG e



CATCHMARK, 2015). Os gêneros mais estudados de bactérias endofíticas associadas à plantas são: *Rhizobium*, *Gluconacetobacter* e *Azospirillum*, sendo que a produção de exopolissacarídeos (EPS) já foram descritos também para estes gêneros (CIEŚLA et al, 2016; FANG e CATCHMARK, 2015; ROSSI et al., 2016). Os exopolissacarídeos são exsudados pela bactéria e possuem funções biológicas como o reconhecimento e infecção, contra dissecação e participando também de biofilmes entre outros papéis (VANDERLINDE et al., 2013; CIEŚLA et al, 2016) . Cada espécie e estirpe de bactéria podem apresentar uma grande variação quanto à composição dos EPS que produz, ainda com dependência das condições ambientais de crescimento (VOLFSON et al., 2013). Os EPS bacterianos possuem facilidade e rapidez a obtenção, com menor número de etapas de purificação, sendo que ainda utilizam matéria prima de menor custo (SANTOS et al. 2012). Hoje os EPS são utilizados nas indústrias de alimento, farmacêutica, cosméticos, têxtil, entre outras, assim como na produção de emulsionantes, floculantes com ampla utilização (REHM 2010).

Assim, há grande demanda pela determinação em bactérias endofíticas de arroz quanto ao crescimento e capacidade produzir EPS, e que poderão ser fontes de bactérias nativas do Cerrado com potencial para utilização na produção biotecnológica de EPS.

## Material e Métodos

**Material biológico:** As bactérias utilizadas neste estudo foram isoladas de raízes de plantas de arroz cultivadas no bioma Cerrado segundo Ferreira et al. (2014). Para o estudo foram selecionadas 5 isolados: R5, R25A, R31, R58 e R82 sendo utilizada como bactérias de referência a bactéria *Rhizobium tropici* BR322

**Manutenção e Curva de Crescimento, produção de EPS e Biomassa:** A manutenção das bactérias foi realizada através do cultivo dos isolados em placas com o meio sólido YM (HUNGRIA et al. 1994) e posterior cultivo em meio líquido/caldo e estoque dos isolados em glicerol (30%) em freezer. Para a elaboração da curva de crescimento as bactérias foram crescidas em caldo batata



por 24 hs em agitador orbital (140 rpm) e estes foram utilizados como pré-inóculo (100 uL) em 100 mL do meio caldo batata (CB) e do meio RDM. As culturas foram crescidas sob agitação (140 rpm) a 25 °C nos dois meios sendo coletadas alíquotas (2 mL) com 12, 24 e 48 hs de crescimento e procedido as análises em triplicata. A partir das alíquotas de cada bactérias, foi determinado o crescimento por espectrofotometria (DO 600nm) e as dosagens de proteína e carboidrato utilizando as metodologias padrões de Bradford (BRADFORD 1976) e antrona (MORRIS, 1948), repectivamente. Para a caracterização da produção de EPS as bactérias foram crescidas em 100 mL dos meios, por 48 hs e os EPS foram extraídos segundo Ernandes e Garcia-Cruz (2009).

#### **Extração do DNA e análise da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA**

**(IGS):** A extração do DNA genômico das bactérias foram realizada segundo Ausubel et al. (1999) adaptado segundo Oliveira (2016). A região espaçadora intergênica (16S-23S rRNA) (IGS) foi amplificada por reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos pHRf (5'-TGC GGC TGG ATC ACC TCC TT-3') e p23r (5'-CCG GGT TTC CCC ATT CGG-3') seguindo as condições de amplificação de Massol-Deya et al. (1995). Em seguida foi realizada a análise dos fragmentos amplificados por eletroforese, em gel de agarose (1,3%), em tampão TBE (1x), a 90V, por 60 minutos e os géis foram corados em brometo de etídio. O gel foi fotografado e os perfis de bandas formados comparados com o marcador de peso molecular 1Kb-DNA-Ladder.

**Análise dos dados:** Os resultados obtidos através da análise da região IGS foram convertidos em dados binários e utilizados para construção de uma matriz. A partir deste processo foi derivada uma matriz de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard (J) para a construção do dendrograma, por intermédio do algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group with Arithmetic Means*), através do software NTSYS-pc® 2.10.

## Resultados e Discussão

Com os dados obtidos foi possível elaborar as curvas de crescimento sendo observado que as bactérias apresentaram melhor desenvolvimento no meio CB do que no meio RDM. Isto se deve a capacidade das bactérias de crescer melhor em



meios mais complexo como o caldo CB. A escolha do meio é feita pelo favoritismo do metabolismo das bactérias pelas fontes de carbono sendo esta um elemento essencial para sua sobrevivência (REIS E TEIXEIRA, 2005; FERNANDES JUNIOR, 2010; VARGAS et al, 2012). Deste modo a realização de estudos para definir os meios de cultura mais eficientes para cada bactéria é necessário assim como observar outras características físico-químicas do cultivo como foi observado para as bactérias testadas.

Nas amostras da curva de produção ainda foram dosados os teores de proteína e carboidrato total para observar as características fisiológicas das bactérias testadas. Pode-se observar que as bactérias comportam-se de maneiras diferentes em determinados meios de cultivo, e esse comportamento é definido pelos nutrientes existentes nos meios (FERNANDES JUNIOR, 2010). Pelos resultados obtidos foi observado que o crescimento no meio CB induziu a uma maior atividade enzimática dos cinco isolados estudados, havendo assim maior produção de proteínas. Também a quantidade de carboidratos produzida pelos isolados foi maior no meio CB sendo indicativo de preferência do metabolismo dessas bactérias pelos nutrientes presentes nesse meio.

Pelo procedimento de extração de polissacarídeos por precipitação com álcool, foi observada formação de EPS nos isolados R5, R58 e R82 cultivados no meio CB, não sendo possível obter o biopolímero quando foi realizado o cultivo no meio RDM. CASTELLANE (2007) e ANTUNES et al (2003) demonstraram produção de EPS por *R. tropici*, no meio RDM, porém os mesmos autores afirmam que a produção do polissacarídeo depende da composição do meio de cultivo, da genealogia do microrganismo e do tempo de cultivo. A formação de EPS por rizóbios tem função na proteção das células bacterianas quando estas são de vida livre e também tem papel importante na formação de nódulos quando esses microrganismos estão em simbiose com plantas (LEONEL et al, 2016). Outros estudos serão necessários para a utilização destas bactérias e ainda do meio CB para padronização e otimização da produção de EPS.

Pela análise dos fragmentos de amplificação por PCR da região intergênica (IGS), foi possível observar a presença de 1 a 4 bandas com tamanhos entre 1000 e



1500 pares de bases (pb). O dendrograma obtido a partir da análise do PCR indicou a que cada isolado apresentou apenas 50% de similaridade entre si, sendo que os isolados mais próximos foram o R25A e o R31, com pouco menos de 50% de similaridade enquanto que o isolado mais distante geneticamente foi o R82.

### Considerações Finais

- Foi possível constatar que o melhor meio para o crescimento das 6 bactérias testadas foi o meio CB enquanto que no meio RDM o crescimento foi muito baixo.
- A análise das amostras da curva de crescimento quanto a capacidade de produção de proteínas e carboidratos totais pelas bactérias isoladas de arroz (R5, R25A, R31, R58 e R82) e a bactéria controle (*R. tropici* BR322) também foram maiores no meio CB do que no meio RDM.
- Quanto à produção de EPS, foi possível observar a presença deste polímero nos isolados R5, R58 e R82 já as demais, não foi obtido este biopolímero.
- O isolado R82 foi o mais promissor quanto a capacidade de produção de EP.
- Pela análise genética da região rDNA intergênica foi possível observar que há pouca similaridade genética entre os isolados avaliados, indicando a variabilidade das bactérias associadas a planta de arroz produtoras de EPS.

### Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, professora Dr<sup>a</sup> Claudia Didonet, pelos ensinamentos, orientações, broncas, correções e principalmente pela paciência comigo. A Karina, por me ajudar e ensinar sempre. Aos amigos do laboratório de microrganismos, especialmente ao Lucas Leonardo por sempre me ajudar em tudo, pelas orientações e ensinamentos. À CCET-UEG, ao Curso de Farmácia CCET-UEG, ao CNPq e a bolsa BIP/UEG.

### Referências

CASTELLANE, T. C. L. **Análise de polissacarídeos essenciais para a nodulação do feijoeiro por *Rhizobium tropici* cultivados em diferentes fontes de carbono.** 2007. 74f. Dissertação. (Mestrado em Agronomia–Produção Vegetal), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.



CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, E. G. M. Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, p.1503-1506, 2007.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Análise dos parâmetros cinéticos para produção de levana por *Zymomonas mobilis* utilizando fermentação submersa utilizando fermentação submersa. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 31, n. 1, p. 35-41, 2009.

FANG, L.; CATCHMARK, J. M. Characterization of cellulose and other exopolysaccharides produced from *Gluconacetobacter* strains. **Carbohydr. Polym.**, v.115, p. 663–669, 2015.