

## Biopolímeros sintetizados por duas estirpes de *Rhizobium tropici* sob diferentes temperaturas<sup>(1)</sup>

**Alexandra de Andrade Santos<sup>(2)</sup>; Maria Vanilda dos Santos Santana<sup>(3)</sup>; Josemir Ferreira da Silva Junior<sup>(4)</sup>; José de Paula Oliveira<sup>(5)</sup> e Márcia do Vale Barreto Figueiredo<sup>(6)</sup>**

<sup>(1)</sup> Trabalho executado com recursos do CNPQ, IPA e UFRPE.

<sup>(2)</sup> Doutoranda em Ciências do Solo; Universidade Federal Rural de Pernambuco; Recife, Pernambuco; (andrax82@hotmail.com); <sup>(3)</sup> Bolsista da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE); Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA); <sup>(4)</sup> auxiliar de pesquisa; Bolsista; Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA); <sup>(5)</sup> Pesquisador do Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA), <sup>(6)</sup> Pesquisadora do Instituto Agrônômico de Pernambuco IPA/SEAGRI e Professora membro permanente do PPGCS/UFRPE.

**RESUMO:** Os biopolímeros são polissacarídeos, também conhecidos como gomas ou exopolissacarídeos (EPS), sua síntese pelos micro-organismos é influenciada pelas condições ambientais, porém estas influências ainda não estão bem elucidadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento reológico, a produção e produtividade de EPS sintetizados por duas estirpes de rizóbios em diferentes temperaturas. As estirpes de *Rhizobium tropici*, IPA 403 e IPA 49 foram cultivadas em meio YEM a pH 7,0, em agitador rotatório por 48 horas nas temperaturas de 28, 33 e 38° C. Realizou-se a medição da viscosidade aparente do caldo bacteriano e a determinação da produção e produtividade de biopolímeros das duas estirpes. Foi observada a maior viscosidade aparente do caldo bacteriano pela estirpe IPA 403 quando cultivada a 33° C, sendo esta estirpe a que mais produziu EPS. Maior produção e produtividade também foram encontradas nesta temperatura pelas duas estirpes estudadas. Sendo indicado o cultivo da IPA 403 na temperatura de 33° C para obtenção de maior produção e produtividade do biopolímero, bem como para uma maior viscosidade aparente do caldo bacteriano.

**Termos de indexação:** EPS, Rizóbio, reologia.

### INTRODUÇÃO

Os biopolímeros são polissacarídeos sintetizados por micro-organismos (Sutherland et al., 1992), são biodegradáveis, dentre esses estão os exopolissacarídeos (EPS), que atuam no processo de FBN simbiótica e na adaptação de rizóbios a estresses ambientais, (Bomfeti, 2011), ainda podem apresentar importantes aplicações na indústria química, farmacêutica, alimentícia e na agricultura, devido às suas características físico-químicas (Kumar, et al., 2007; Borschiver, et al., 2008).

A síntese de EPS pelos *Rhizobium* é complexa, sendo influenciada pelas condições ambientais (Becker & Pühler, 1998; Duta et al., 2006). Os estudos sobre a comercialização e produção de goma de rizóbios são escassos, sendo uma fonte inexplorada de polissacarídeos microbianos, altamente promissores para aplicações industriais e agrícolas (Bomfeti, 2011; Moretto, 2014; Öner, 2013). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento reológico, a produção e produtividade de EPS sintetizados por duas estirpes de rizóbios em diferentes temperaturas.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas duas estirpes de *Rhizobium tropici* IPA 403 e IPA 49 (Oliveira, 2012), cultivadas em meio YEM - manitol extrato de levedura (Vincent, 1970 (modificado)) a pH 7,0, a partir da produção de pré-inóculo (incubado em meio YEM sob agitação a 28° C, até atingir uma  $DO_{560nm} = 0,7$  e inóculo (obtido pela transferência de 1mL do pré-inóculo, incubado em agitador rotatório a 200 rpm por 48 horas ( $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>)).

Para as avaliações as estirpes (IPA 403 e IPA 49) foram incubadas por 48 horas a 28, 33 e 38° C, mantidos sob agitação rotatória (200rpm), sendo para isto transferido 2,5 mL do inóculo para 100 mL de meio YEM em Erlenmeyers de 500 mL (Xavier, 2009; Barreto, 2008). O experimento foi realizado com o delineamento experimental em blocos casualizados com arranjo fatorial 2 x 3 com três repetições, foi avaliado o comportamento reológico do caldo bacteriano através da leitura da viscosidade aparente e a produção e produtividade de exopolissacarídeos (EPS).

Foram utilizados dois spindles o SC4-18 (viscosidade de 1,5 a 30 mPa.s) e o SC4-31 (viscosidades 15 a 300 mPa.s) dependendo da viscosidade apresentada pelo caldo bacteriano, e as



leituras foram realizadas com viscosímetro rotacional Brookfield, modelo LVDV II+P e banho termostático modelo TC 502, na temperatura de 25°C que foi controlada através de banho termostático acoplado ao equipamento.

Após avaliação da viscosidade do caldo bacteriano o EPS foi recuperado, adicionado álcool etílico absoluto na proporção 3:1, e colocado para secar em estufa a 30° ± 1° C até atingir peso constante e a massa seca foi determinada em balança de precisão.

### Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando o Guided Data Analysis Procedure do SAS (SAS Institute, 2004), com nível de significância de 5% pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey (p<0,05).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1 podemos observar que as estirpes de *Rhizobium tropici* IPA 403 e IPA 49 (Oliveira, 2012), apresentaram um comportamento pseudoplástico, no mosto fermentado, ou seja, a viscosidade aparente decresce com o aumento da taxa de cisalhamento. Os resultados corroboram com os encontrados por Fernandes Junior et al., 2010 e Barreto et al., 2011. Este comportamento é esperado em soluções poliméricas de polissacarídeos microbianos (Amanullah et al., 1996; Aranda-Selverio et al., 2010; Barreto, 2011).

As menores viscosidades foram apresentadas pela estirpe IPA 49 quando comparada com a IPA 403, indicando que a estirpe IPA 403 apresenta maior produção de EPS.

A viscosidade aparente aumentou na temperatura de 33° C em relação à temperatura de 28° C, já quando as estirpes foram mantidas a temperatura de 38° C houve diminuição da viscosidade, sendo a estirpe IPA 49 a que diminui mais, não sendo possível ler sua viscosidade com as hastes utilizadas. Para a estirpe IPA 403 a viscosidade diminuiu 56,82 % em relação à IPA 403 a 33° C, a qual foi a maior viscosidade aparente apresentada (44,81 mPa.s).

Em relação à produção e produtividade dos biopolímeros a estirpe IPA 403 foi superior em relação à IPA 49 (Tabela 1), independente do tempo de crescimento tendo em vista que a interação entre estirpe e temperatura não foi significativa pelo teste de Tukey (p<0,05). A estirpe IPA 403 apresentou maior produção e produtividade de EPS em relação à estirpe IPA 49, em 50 % e 51 %, respectivamente.

**Tabela 1** – Produção e produtividade de biopolímeros sintetizados por duas estirpes de *Rhizobium tropici* por 48 horas de cultivo.

Estirpe	Produção (g.L <sup>-1</sup> )	Produtividade (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
IPA 403	1,279 a	0,027 a
IPA 49	0,637 b	0,013 b
CV (%)	32,70	32,75

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Houve aumento na produção e produtividade de EPS quando as duas estirpes foram mantidas a temperatura a 33° C, porém estas bactérias quando cultivadas a 28° C, não diferiu estatisticamente em relação ao cultivo a 33° C pelo teste de Tukey (p<0,05) (Tabela 2), no entanto quando cultivadas a 38° C, houve diminuição na produção e produtividade de biopolímero.

A temperatura é importante na síntese de polissacarídeos, na faixa de 25 a 35° C. Nesta faixa é encontrado o maior crescimento e a maior produção de EPS, onde cada espécie bacteriana apresenta a sua temperatura ótima (Gandhi et al., 1997; Kawai et al., 1992; Schmidell, 2001).

**Tabela 2** – Produção e produtividade de biopolímeros sintetizados por duas estirpes de *Rhizobium tropici* cultivadas a 28, 33 ou 38° C por 48 horas.

Temperatura	Produção (g.L <sup>-1</sup> )	Produtividade (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
28° C	1,236 a	0,0257 a
33° C	1,431 a	0,0298 a
38° C	0,207 b	0,0043 b

Letras iguais não se diferenciam pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

## CONCLUSÕES

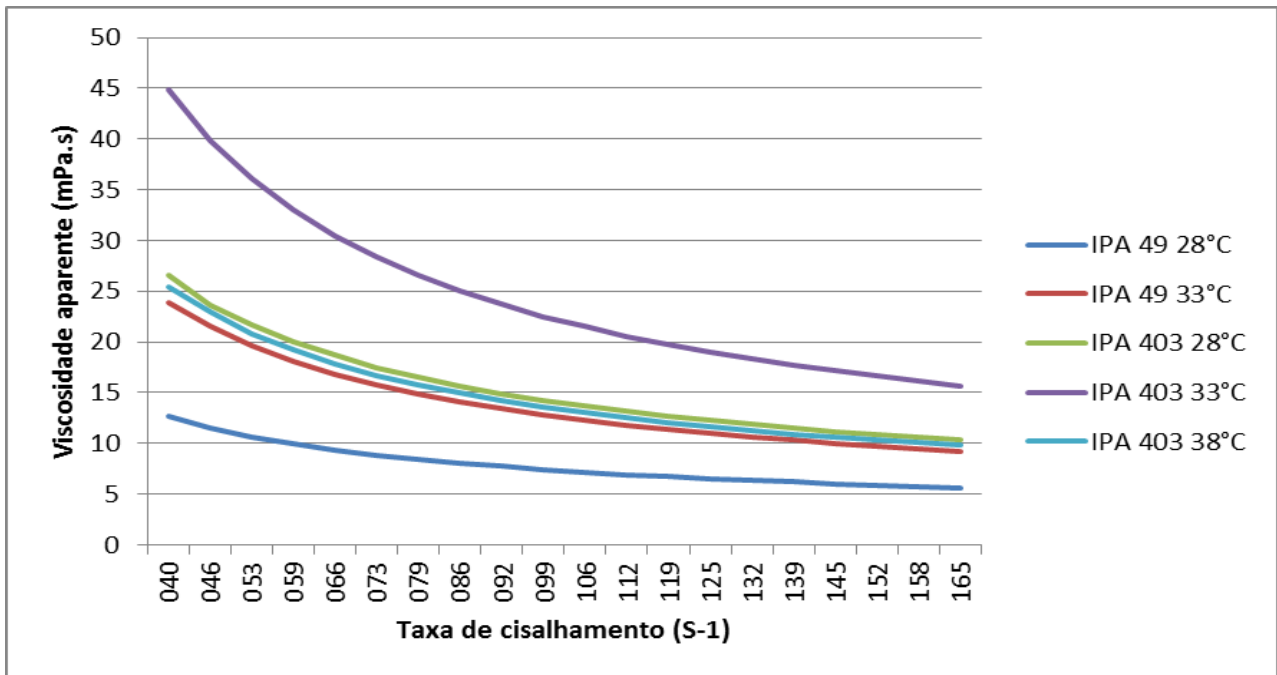
A estirpe de *Rhizobium tropici* IPA 403 sintetiza mais biopolímero do que a IPA 49, produzindo caldo bacteriano mais viscoso na temperatura de 33° C. Pode-se sugerir que o cultivo da estirpe IPA 403 no período de 48 horas na temperatura de 33° C, permite uma maior produção e produtividade de biopolímero.

## REFERÊNCIAS

AMANULLAH, A.; SERRANO, L. C.; GALINDO, E.; NIENOW, A. W. Reproducibility of pilot scale xanthan fermentations. *Biotechnol Prog*, 12:466-473, 1996.



- ARANDA-SELVERIO, G.; PENNA, A.L.B.; CAMPOS-SÁS, L.F.; SANTOS JÚNIOR, O.; VASCONCELOS, A.F.D.; SILVA, M. DE L.C. DA; LEMOS, E.G.M.; CAPANHARO, J.C.; SILVEIRA, J.L.M.S. Propriedades reológicas e efeito da adição de sal na viscosidade de exopolissacarídeos produzidos por bactérias do gênero *Rhizobium*. *Quim Nova*, 33:895-899, 2010.
- BARRETO, M. C.S. Inovações tecnológicas baseadas na produção de biopolímero com viabilidade para inoculantes rizobianos. Recife, Universidade Federal de Pernambuco, 2008. (Dissertação de Mestrado).
- BARRETO, M.C.S.; FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; SILVA, M.L.R.B.; LIMA-FILHO, J.L. Produção e comportamento reológico de biopolímeros produzidos por rizóbios e caracterização genética. *R Bras Agrociência*, v.2-4:221-227, 2011.
- BECKER A, PÜHLER A: Production of exopolysaccharides. In *Rhizobiaceae* Edited by: Spink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ. Kluwer Acad Publ. Dordrecht, Boston, London; 1998, 97-118.
- BOMFETI, C.A.; FLORENTINO, L.A.; GUIMARÃES, A.P.; CARDOSO, P.G.; GUERREIRO, M.C. & MOREIRA, F.M.S. Exopolysaccharides produced by the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of leguminosae. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 35:657-671, 2011.
- BORSCHIVER, S.; ALMEIDA, L.F.M.; ROITMAN, T. Monitoramento Tecnológico e Mercadológico de Biopolímeros. *Polímeros*, 18.3:256-261, 2008.
- DUTA, F. P.; FRANÇA, F. P.; LOPES, L. M. A. Optimization of culture conditions for exopolysaccharides production in *Rhizobium* sp. using the response surface method. *Electron J of Biotechnol*. 9.4:391-399, 2006.
- FERNANDES JÚNIOR, P.I.; ALMEIDA, J.P.S.; PASSOS, S.R.; OLIVEIRA, P.J.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R. Produção e comportamento reológico de exopolissacarídeos sintetizados por rizóbios isolados de guandu. *Pesq Agropec Bras*, 45.12:1465-1471, 2010.
- GANDHI, H. P.; RAY, R. M.; PATEL, R. M. Exopolymer production by *Bacillus* species. *Carbohydr Polym*, Barking, 34:323-327, 1997.
- KAWAI, H.; ISOBE, Y.; KORIBE, M.; TOKUDA, J.; TOKUNO, I.; ENDO, K.; KAWAI, F. Production of a novel extracellular polysaccharide by a *Bacillus* strain isolated from Soil. *Biosci Biotechnol Biochem*, 56.6:853-857, 1992.
- KUMAR, A.S.; MODY, K.; JHA, B. Review article: Bacterial exopolysaccharides – a perception. *J. Basic Microbiol*, 47:103-107, 2007.
- MORETTO, C. Potencial biotecnológico de rizóbios como bioemulsificante e bioissorvente de cobre e cromo. Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, 2014. (Tese de Doutorado)
- OLIVEIRA, J.P.; FIGUEIREDO, M.; SILVA, M.; MALTA, M.; VENDRUSCOLO, C.; ALMEIDA, H. Production of Extracellular Biopolymers and Identification of Intracellular Proteins and *Rhizobium tropici*. *Curr Microbiol*, 65:686–691, 2012.
- ÖNER, E. T. Microbial Production of Extracellular Polysaccharides from Biomass. In: FANGG, Z. ed. *Pretreatment Techniques for Biofuels and Biorefineries* New York: Reinhold, 2013. p. 35 – 56.
- SCHMIDELL, W. Em *Biotecnologia Industrial*; SCHMIELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., eds.; EDGARD BLÜCHER: São Paulo, 2001, vol. 2, cap. 6.
- SAS INSTITUTE INC. SAS Leaning Edition 2.0 for Windows. CD-ROM for Windows 32 bits – 2004.
- SUTHERLAND, I. W.; TAIT, M. I. Biopolymers. *Encyclopedia of Microbiology*, 1:339-349, 1992.
- VINCENT, J. M. A manual for the practical study of *Rhizobium* of root bacteria. Oxford; Blackwells Scientific Publication, 1970. 164p.
- XAVIER, T. F.; Produção e caracterização de exopolissacarídeos (EPS) sintetizados por microorganismos diazotróficos. Recife, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009. (Dissertação de Mestrado)



**Figura 1** – Viscosidade aparente das estirpes de rizóbio IPA 403 e IPA 49 cultivadas por 48 horas nas temperaturas de 28, 33 e 38° C.