

## AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE HIDRO RETENÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *Cereus peruvianus* MILL. (Cactaceae)

Karen Miranda Bispo Defendi (PIBIC/CNPq), Jesieli Beraldo-Barrazzo (Coorientadora), Julio Cesar Polonio (Coautor), Maria de Fátima Pires da Silva Machado (Orientadora). E-mail: mfpsmachado@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

**Área e subárea do conhecimento:** Ciências biológicas / Microbiologia / Microbiologia Aplicada

**Palavras-chave:** Exopolissacarídeos; bactérias endofíticas; hidrogel.

### RESUMO

Bactérias endofíticas produtoras de Exopolissacarídeos (EPS) são capazes de minimizar estresse hídrico em plantas. O EPS favorece o desenvolvimento um composto hidrofílico e viscoso com característica de hidrogel. Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de retenção de água em solo dos EPSs produzido por bactérias endofíticas isoladas de *Cereus peruvianus*. Para determinar o EPS com maior eficiência para retenção de água estes foram aplicados em solo e armazenamento em estufa a uma temperatura de 32 °C durante 8 horas e a cada 2 h pesagens do solo foram realizadas. A análise então demonstrou, que não houve retenção significativa de água pelos EPSs, porém foi possível concluir que a produção dos EPSs depende de fatores de cultivo e de genótipo especificidade das linhagens.

### INTRODUÇÃO

Bactérias endofíticas produtoras de EPS apresentam reconhecida capacidade de minimizar estresse hídrico em plantas. A produção de EPS endofítico, favorece o desenvolvimento de biofilme bacteriano que se constitui em uma matriz multicelular capaz de proteger as células bacterianas e vegetais contra dessecação. Os EPSs produzem um composto hidrofílico e viscoso, conferindo características semelhantes à de hidrogéis, os quais, são utilizados para aplicação em solos com o objetivo de aumentar sua capacidade de absorção de água. Os Hidrogéis possibilitam a formação de uma rede radicular que permite a absorção e aprisionamento da água nos poros do solo. Bactérias endofíticas isoladas da planta somaclone de *C. peruvianus* regenerada (*in vitro*), apresentaram alta capacidade de produção de EPS, destacando-se os isolados das espécies *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus amyloliquefaciens* (Beraldo-Borrazzo *et al.*, 2021). Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de hidro retenção dos EPSs produzidos

pelas linhagens de bactérias endofíticas isoladas de *C. peruvianus*, quando aplicados em solo e submetidos a uma condição de simulação de seca.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Obtenção do EPS bacteriano*

Em Erlenmeyers com 150 mL dos meios de cultura S e MS foi adicionado 1 mL do inóculo padronizado das bactérias endofíticas na concentração de  $10^8$  UFC·mL<sup>-1</sup>, correspondente a escala McFarland 0,5. O crescimento foi realizado em agitador orbital mantido a temperatura de 28 °C sob agitação de 180 rpm por 48 h. Os pré-inóculos foram transferidos de forma asséptica para Erlenmeyers contendo 900 mL dos respectivos meios e mantido nas mesmas condições já descritas. Após esse período, os meios de cultivo foram centrifugados a 4000 rpm a 5 °C durante 20 minutos e a precipitação do EPS foi realizada utilizando álcool etílico absoluto P.A. (99,5%) na proporção 3:1 de álcool.

Para eliminação de proteínas foi adicionado ao EPSs ácido tricloroacético 20% e mantido em geladeira por 12 h. Após, o material foi centrifugado a 2500 rpm por 20 minutos e as proteínas sedimentadas foram desprezadas. Para eliminar o ácido tricloroacético e moléculas de baixo peso molecular, o material foi submetido por 24 h ao processo de diálise contínuo.

### *Análise de hidro retenção dos EPS em solo*

Para determinar o EPS com maior eficiência para retenção de água, foram montadas dez repetições pesando 10 g de substrato em copos plásticos de 200 mL e adicionado a estes 10 mL de água sendo esta a condição controle. Os EPSs obtidos foram diluídos na mesma quantidade de água (10 mL), sendo esta a condição experimental tratado. Após, foi realizado o armazenamento em estufa a uma temperatura de 32 °C durante 8 horas e a cada 2 h pesagens do solo foram realizadas

A fim de comparar os resultados do ensaio de hidro retenção nas condições avaliadas, os dados obtidos foram submetidos a análise de variância empregando o teste de *Two way* (Anova) o teste Tukey *pos-hoc* adotando o nível de significância de 5%, utilizando a plataforma PAST (Hammer *et al.*, 2001).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

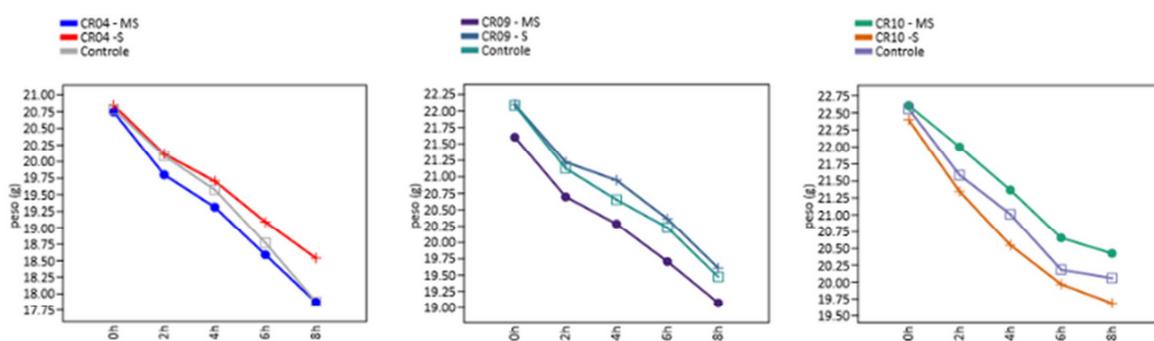
As três linhagens de bactérias endofíticas foram capazes de produzir EPS tanto no meio MS como no meio S. Contudo, houve diferença no rendimento dos EPSs produzidos de acordo com o meio de cultivo utilizado (Tabela1). Isto porque, as fontes de carbonos presentes nos meios cultivos são distintas, sendo que o meio S possui como fonte de carbono a glicose enquanto o meio MS possui a sacarose.

**Tabela 1:** Rendimento dos EPSs produzidos pelas linhagens CR04 (*B. subtilis*), CR09 (*B. licheniformis*) e CR10 (*B. amyloliquefaciens*) em meio MS e S.

Linhagem	EPS produzido (g) Meio MS	EPS produzido (g) Meio S
<b>CR04</b>	0,30 g	0,28 g
<b>CR09</b>	0,20 g	0,19 g
<b>CR10</b>	0,27 g	0,19 g

No ensaio de hidro retenção foi possível observar que os EPSs produzidos em meio MS apresentaram maior capacidade de retenção de água quando comparados aos EPSs produzidos em meio S. A análise estatística demonstrou que *p*-valor encontrado é inferior 0,05 indicando que há diferença significativa na retenção de água pelos EPSs aplicados de acordo com o meio de cultivo utilizado (Figura 1). Os tratamentos com EPS/CR04-MS; EPS/CR09-MS e EPS/CR10-MS apresentaram uma diferença de 2,95 g; 2,5 g e 2,25 g de solo tratado, respectivamente, entre a 0 h e a 8ª h. Isto significa que o EPS produzido por CR10, obteve a maior capacidade de retenção ao longo das 8 horas, sendo seguido por CR09 e CR04 (Figura 1). A análise estatística *Two way* (Anova) e o teste Tukey *pos-hoc* apontaram que houve diferença significativa para retenção de água no solo entre os EPS produzidos em meio MS, pois apresentou  $p < 0,05$ . O mesmo ocorre entre os EPS produzidos em meio S, o que indica que as linhagens bacterianas produzem EPSs com capacidade de retenção diferentes.

Apesar das diferentes capacidades de retenção demonstradas entre os EPSs produzidos, a retenção de água quando comparada o tratado com o controle não foi significativa, pois no teste estatístico *Two way* (Anova) e no teste Tukey *pos-hoc* foi obtido um *p*-valor superior a 0,05.



**Figura 1 -** (A) Gráfico ensaio de hidro retenção da linhagem CR09 (*B. licheniformis*). (B) Gráfico ensaio de hidro retenção da linhagem CR10 (*B. amyloliquefaciens*), (C) Gráfico ensaio de hidro retenção da linhagem CR04 (*B. subtilis*).

A fim de obter-se maiores quantidades de EPSs, o aumento da concentração de açúcar no meio de cultivo MS foi realizado, já que este foi o que apresentou melhores resultados para o rendimento dos EPSs produzidos.

## CONCLUSÕES

Embora não tenha sido estatisticamente significativo a capacidade de hidro retenção dos EPSs nas condições experimentais avaliadas, as indicações do presente estudo constatarem que a capacidade biossintética de bactérias endofíticas produtoras de EPS são dependentes de fatores de cultivo e de genótipo especificidade das linhagens, sendo o EPS produzido pela linhagem CR10 (*Bacillus amyloliquefaciens*) foi o que apresentou maior capacidade de hidro retenção entre as linhagens avaliadas. Além disso, análises futuras serão realizadas para avaliar se o aumento da fonte de carbono otimiza a produção de EPSs, como também, se obtidas maiores quantidades de EPSs, se estes serão capazes de alcançar valores significativos de hidro retenção.

## AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos a Universidade Estadual de Maringá, ao Laboratório de Biotecnologia Microbiana, ao Laboratório Cultura de Tecidos e Eletroforese de Vegetais pelo apoio e estrutura disponibilizados a mim e ao CNPq pelo apoio financeiro durante a realização do projeto.

## REFERÊNCIAS

BERALDO-BORRAZZO, J. *et al.* Communities of endophytic bacteria from Mill. (Cactaceae) plants obtained from seeds and from *in vitro*-regenerated somaclone. **South African Journal of Botany**, v. 142, p. 335-343, November, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0254629921002532?via%3Dihub>. Acesso em 09 de setembro de 2023.

HAMMER, O. *et al.* Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4 p.1-9, May, 2001. Disponível em: [https://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/past.pdf](https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf). Acesso em: 09 setembro 2023.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, July, 1962. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>. Acesso em 09 de setembro de 2023.