

Foto: Carlos Henrique S. Gadelha Meneses



Produção, extração e quantificação de exopolissacarídeos sintetizados por *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5^T em meio de cultivo líquido

Carlos Henrique S. Gadelha Meneses¹
Rodrigo Vassoler Serrato²
Luc Felicianus Marie Rouws³
Jean Luiz Simões de Araújo⁴
Marcia Soares Vidal⁵
José Ivo Baldani⁶

Introdução

A associação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* com cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) representa um tipo de interação endofítica obrigatória, visto que essa bactéria não pode ser isolada de solos livres de raízes e por ser isolada de plantas, fungos, insetos etc. (BALDANI e BALDANI, 2005; SARAVANAN et al., 2007). Estudos com cana-de-açúcar demonstraram que endofíticos como *G. diazotrophicus*, promovem o aumento do crescimento da planta, sem elevar custos com o emprego de insumos, no caso, os adubos nitrogenados (OLIVEIRA et al., 2006).

Diversos estudos têm mostrado que a produção de exopolissacarídeos (EPS) pode estar relacionada à interação de certas bactérias com plantas. EPS são

moléculas envolvidas na interação célula-célula em vários organismos, que promovem a adesão das bactérias à superfície dos vasos vasculares da planta e que também podem estar envolvidos no reconhecimento e determinação da natureza da associação planta-bactéria (RAMEY et al., 2004; DANHORN e FUQUA, 2007).

A presença de EPS associados a células bacterianas é reconhecida pela formação de colônias mucosas, no crescimento destas em meio de cultura sólido, por um bom aumento da viscosidade e, algumas vezes, por formação de gel em meios líquidos (SUTHERLAND, 1988).

O rendimento da produção de EPS é, na maioria dos

¹ Doutorando em Biotecnologia Vegetal, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro. E-mail: chmeneses@gmail.com.

² Professor do setor Litoral, Universidade Federal do Paraná. E-mail: rvserrato@ufpr.br.

³ Bolsista de Pós-Doutorado FAPERJ/Embrapa Agrobiologia. E-mail: lucrouws@hotmail.com.

⁴ Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, Eng^o Agrônomo, PhD em Genética. BR 465, km 7, Seropédica, RJ. CEP 23890-000. E-mail: jean@cnpab.embrapa.br.

⁵ Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia, Bióloga, DSc. em Genética. BR 465, km 7, Seropédica, RJ. CEP 23890-000. E-mail: marcia@cnpab.embrapa.br.

⁶ Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, Eng^o Agrônomo, PhD em Ciências do Solo. BR 465, km 7, Seropédica, RJ. CEP: 23890-000. E-mail: ibaldani@cnpab.embrapa.br.

casos, extremamente dependente de fatores ambientais, bem como de condições químicas, nas quais as bactérias são cultivadas, como, por exemplo, em relação às fontes de carbono e de nitrogênio (PACE e RHIGELATO, 1980; ALVES, 1991; PATIL et al., 2009).

Os exopolissacarídeos bacterianos são recuperados do meio de cultivo através de centrifugação, filtração, agentes precipitantes de EPS, diálise e liofilização. As centrifugações são utilizadas para separar as células do sobrenadante, onde está o EPS solúvel. Também são utilizadas para auxiliar na precipitação posterior do EPS presentes no sobrenadante, após tratamento com agentes precipitantes. O etanol é o agente precipitante mais comum, embora isopropanol ou cetonas podem também ser utilizados.

O método mais usado para a quantificação de carboidratos totais em amostras solúveis é o de Dubois, sendo considerado padrão para esse tipo de determinação (DUBOIS et al., 1956). O método se baseia na determinação de açúcares simples, polissacarídeos e seus derivados incluindo os metil-ésteres com grupos redutores livres. A mudança da cor da solução é medida na região do visível e é proporcional à quantidade de açúcares presentes na amostra. Segundo os autores, a reação é sensível e de cor estável.

Essa técnica colorimétrica é usada para a detecção e quantificação de carboidratos totais, produzindo derivados com cromóforos distintos para pentoses e hexoses, que têm máximos de absorção em 480 e 490 nm, respectivamente (RAO e PATTABIRAMAN, 1989). Em meio ácido, pode ocorrer o ataque nucleofílico dos elétrons do anel aromático à carbonila aldeídica ou cetônica do carboidrato. Após a reação de adição, sucessivas desidratações ocorrem pela perda das hidroxilas do carboidrato em meio de ácido sulfúrico concentrado. A conjugação das ligações duplas, juntamente com a porção aromática, fornece cromóforos distintos para pentoses e hexoses. O mecanismo proposto baseia-se na diferença desses cromóforos, resultante da extensão da ressonância pelas ligações duplas adjacentes, sendo, portanto, dependente do número de carbonos (RAO e PATTABIRAMAN, 1989; FORD, 1980). Já é de conhecimento que a ocorrência de uma banda com máximo de absorção em 480 nm indica a presença de pentoses, enquanto o máximo de absorção em 490 nm

é característico de hexoses (DUBOIS et al., 1956). Essa análise, porém, é muito simples quando se trata de misturas complexas como frações de polissacarídeos. A quantidade de açúcares que estão presentes na amostra será responsável pela coloração final da solução, quanto maior a massa de carboidratos maior será a intensidade da coloração obtida na solução final.

Este comunicado teve como objetivo relatar o isolamento, purificação e quantificação da produção de exopolissacarídeos (EPS) por *G. diazotrophicus* PAL5^T cultivada em diferentes fontes de carbono.

Extração e purificação do EPS de *G. diazotrophicus* PAL5^T

A bactéria utilizada neste experimento foi *G. diazotrophicus* estirpe PAL5^T (ATCC49037). A estirpe foi cultivada em 5 ml de meio DYGS (g.l⁻¹ composição: glicose 2,0; peptona 1,5; extrato de levedura 2,0; K₂HPO₄ 0,5; MgSO₄.7H₂O 0,5, pH 6,0), (RODRIGUES NETO et al., 1986), após três dias as células bacterianas foram recolhidas por centrifugação a 4.000 rpm por 5 minutos, lavadas com solução salina (NaCl 0,7%), e ressuspendida em 1 ml da mesma solução. Após isso, frascos do tipo Erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml de meio LGI modificado (composição em g.l⁻¹: K₂HPO₄ 0,2; KH₂PO₄ 0,6; MgSO₄.7H₂O 0,2; CaCl₂. 2H₂O 0,02; Na₂MoO₄.2H₂O 0,002; FeCl₃.6H₂O 0,018), pH 5,5, contendo 1 mM de ácido glutâmico (ROUWS, 2007) e suplementado com quatro fontes de carbono independentes (sacarose, glicose, frutose e manitol, 20 g.l⁻¹). Os frascos foram inoculados com uma suspensão bacteriana de aproximadamente 1x10⁶ e cultivados sob agitação de 200 rpm a 30°C, até atingirem o final da fase *log*, com aproximadamente 0,7 de densidade óptica (D.O.₆₀₀).

As culturas foram então centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos numa temperatura de 4°C e o sobrenadante coletado. Paralelamente, numa proveta, foi adicionado um volume de 150 ml de etanol absoluto gelado equivalente a 3X do volume do sobrenadante (50 ml). O sobrenadante da cultura foi despejado em cima do etanol absoluto gelado e agitado vigorosamente para precipitação do EPS que está contido no sobrenadante. Após isso, a solução foi colocada em freezer -20°C por um período 24 horas, para aumentar o tempo de precipitação do material.

Após esse período de incubação à -20°C, as soluções foram centrifugadas a 10.000 x g por 15 minutos à 4°C e, em seguida, o sobrenadante descartado. O EPS precipitado foi ressolubilizado pela adição de água ultra pura (o mínimo de volume possível para solubilizar o EPS).

A Tabela 1 mostra que para todas as amostras, com exceção da glicose, ocorreu precipitação de EPS. Porém a única fonte de carbono que ocorreu precipitação de imediato foi o manitol. O material cultivado em frutose e sacarose precipitou após a incubação à -20°C. Porém, meio de cultura com sacarose não inoculado apresentou a formação de cristais (Tab. 1), provavelmente devido a capacidade de recristalização da sacarose na presença de etanol (KONONENKO e HERSTEIN, 1956).

Para purificação do EPS coletado de cada amostra, todos os tratamentos foram submetidos ao processo de precipitação etanólica no mínimo três vezes. Após a última precipitação, o EPS foi dissolvido no mínimo de água ultra pura possível, congelado e quantificado.

Quantificação da massa de EPS obtida de cada cultura

Curva de Calibração

O material ressolubilizado obtido do processo de purificação foi submetido a quantificação pelo método fenol-sulfúrico conforme Dubois et al. (1956). Uma alíquota de 0,5 ml das soluções a serem analisadas foi transferida para tubos de ensaio de vidro, adicionado 0,5 ml de solução de fenol 5% e agitado levemente. Em seguida foi adicionado 2,5 ml de H₂SO₄ concentrado diretamente sobre a amostra e homogeneizado levemente. Após esse processo a amostra foi incubada 15 minutos a temperatura ambiente para o resfriamento da solução.

Uma curva de calibração foi obtida utilizando glicose como padrão para posterior estimativa da quantidade de açúcares totais em cada amostra. Soluções padrão de glicose através de diluições seriadas (a partir de uma solução de 10 mg.ml⁻¹) nas seguintes concentrações foram feitas: 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 200 µg.ml⁻¹. Após o preparo de todos os padrões e amostras, foram realizadas leituras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 485nm, em cubetas de vidro, para gerar a curva de

Tabela 1. Precipitação de exopolissacarídeos após extração etanólica da suspensão produzida pelo meio de cultivo contendo diferentes fontes de carbono e na presença e ausência da bactéria *G. diazotrophicus* PAL5 cultivada.

Fontes de Carbono	Imediata	Precipitação	
		Após Refrigeração	Após Centrifugação
Glicose (não inoculado)	-	-	-
Glicose (inoculado)	-	-	-
Frutose (não inoculado)	-	-	-
Frutose (inoculado)	-	+	+
Sacarose (não inoculado)	-	-	+
Sacarose (inoculado)	-	+	+
Manitol (não inoculado)	-	-	-
Manitol (inoculado)	+	+	+

Os sinais + e - representam a precipitação e não precipitação de EPS, respectivamente.

calibração e quantificar cada tratamento. Como controle negativo foi utilizado um branco com 0,5 ml de água destilada como amostra.

A partir da análise de regressão linear pode-se considerar que este modelo para curva de calibração teve um bom ajuste, com um coeficiente de determinação (R²) de 0,99, indicando que o modelo matemático elaborado a partir dos padrões foi adequado. A densidade óptica relacionada a cada concentração de carboidratos nos padrões variaram de 0 à 0,89 nas diferentes concentrações testadas. Para quantificação de açúcares total, obteve-se então a equação: $f = 100,53 x + 5,1052$. Segundo a análise de regressão linear, não há evidência de falta de ajuste do modelo, como apresentado na Fig. 1-A.

O experimento foi executado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) e todos os tratamentos foram compostos de três repetições independentes. Os dados foram analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey à $p < 0.01$. Para estimativa da curva padrão foi realizada uma análise de regressão linear, assim

sendo determinado um modelo matemático para estimativa da quantidade de EPS e o coeficiente de determinação desse modelo.

Estimativa da concentração de carboidratos totais

Analisando-se a variável relacionada a concentração de carboidratos totais, verifica-se que houve um efeito significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F, para as diferentes fontes de carbono utilizadas para a produção de EPS por *G. diazotrophicus* (Tab. 2).

O método aplicado acusa a presença de carboidratos totais que pode ser considerado normalmente equivalente à quantidade de EPS (Fig. 1-B) (DURLU-OZKAYA et al., 2007; KODALI et al., 2009). A quantidade de EPS excretado pela estirpe selvagem PAL5^T em meio de cultura contendo diferentes açúcares, ou seja, glicose, frutose, sacarose e manitol, apresentaram alto grau de variabilidade, quando comparadas com os controles e entre os tratamentos, onde as médias das quantidades de carboidratos totais produzida variaram de 6,7 a 296,9 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, como apresentado na Figura 1-B. O cultivo da bactéria em meio contendo glicose apresentou a menor produção de EPS secretado (6,7 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) enquanto que em meio contendo a frutose e a sacarose os valores de média variaram de 61,1 e 190,1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente. Como mencionado anteriormente, cristais se formaram durante a precipitação de meio de cultura não inoculado com a sacarose, o que explica o nível alto de carboidratos totais neste tratamento (Fig. 1-B). No entanto, a maior produção de carboidratos totais foi observada na presença de manitol, onde os valores quantificados foram de aproximadamente 297 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Os resultados apresentados mostraram que a produtividade de EPS aumentou aproximadamente 97% em comparação com glicose quando a bactéria foi cultivada em manitol, mostrando que a produção de EPS por *G. diazotrophicus* varia de acordo com o tipo de fonte de carbono utilizado no meio de cultura. Resultado semelhante foi obtido para *Burkholderia cepacia*, onde a adição de açúcares derivados de álcool (manitol e glicitol) promoveu uma maior produção de EPS, quando comparados com glicose, frutose e sacarose (BARTHOLDSON et al., 2008). Porém, para *Lactobacillus casei*, a galactose apresentou uma produção duas vezes maior do que a glicose (MOZZI et al., 2001).

Tabela 2. Valores de F calculado para quantificação de carboidratos totais em quatro diferentes fontes de carbono.

Fonte de Variação	GL	F
Fontes de Carbono	7	2714,7**
Erro total	16	
CV%	23	0,89

(**) valores significativos a 1% de probabilidade, pelo teste F.

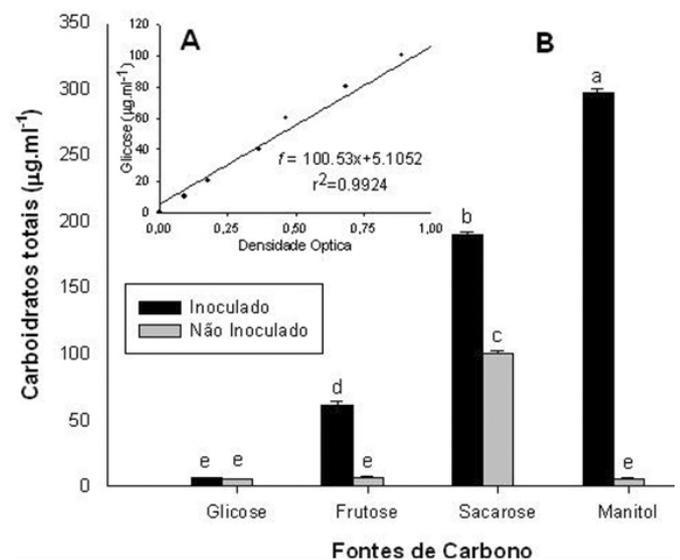


Fig. 1. Variação na produção de EPS por *G. diazotrophicus* cultivada em diferentes fontes de carbono. **A.** Curva de calibração para estimativa da concentração de carboidratos totais. **B.** Médias da concentração de carboidratos totais nas diferentes fontes de carbono. Médias seguidas por diferentes letras em cada coluna diferiram estatisticamente, entre si, para o teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Conclusões

Os resultados de pesquisa do presente trabalho mostram que a técnica usada é adequada para quantificar o EPS recuperado por precipitação etanólica de culturas de *G. diazotrophicus* PAL5^T. Foi observado que a fonte de carbono usada influenciou fortemente produção de EPS, sendo glicose a pior e manitol a melhor fonte de carbono para a obtenção de EPS. Foi também possível comprovar que *G. diazotrophicus* PAL5^T é produtora de exopolissacarídeo quando cultivada em sacarose, frutose e manitol como únicas fonte de carbono.

Referências Bibliográficas

- ALVES, P. S. A. **Efeito de alguns nutrientes na formação da goma xantana por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* LMI-3**. Rio de Janeiro, 1991. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants. Special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.77, p. 549-579, 2005.
- BARTHOLDSON, S. J.; BROWN, A. R.; MEWBURN, B. R.; CLARKE, D. J.; FRY, S. C., CAMPOPIANO, D. J.; GOVAN, J. R. W. Plant host and sugar alcohol induced exopolysaccharide biosynthesis in the *Burkholderia cepacia* complex. **Microbiology**, Reading, v. 154, p. 2513-2521, 2008.
- DANHORN, T.; FUQUA, C. Biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.61, p.401-422, 2007.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington-DC, v. 28, n. 3, p.350-356, 1956.
- DURLU-OZKAYA, F.; ASLIM, B.; OZKAYA, M. T. Effect of exopolysaccharides (EPSs) produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains to bacteriophage and nisin sensitivity of the bacteria. **Lwt-Food Science And Technology**, Switzerland, v. 40, n. 3, p. 564-568, 2007.
- FORD, C. W. Estimation of hexose:pentose ratios in solution using the phenol-sulfuric acid method. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 32, p. 153-156, 1980.
- KODALI, V. P.; DAS, S.; SEM, R. An exopolysaccharide from a probiotic: Biosynthesis dynamics, composition and emulsifying activity. **Food Research International**, Ottawa, v. 42, p. 695-699, 2009.
- KONONENKO, O. K.; HERSTEIN, K. M.. Nonaqueous solvents for sucrose. **Industrial & Engineering Chemistry Chemical & Engineering Data Series**, Washington, DC, v. 1, n. 1, p. 87-92, 1956.
- MOZZI, F.; ROLLAN, G.; de GIORI, G. S.; de VALDEZ, G. F. Effect of galactose and glucose on the exopolysaccharide production and the activities of biosynthetic enzymes in *Lactobacillus casei* CRL 87. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 1, p. 160-167, 2001.
- OLIVEIRA, A. L. M. de; CANUTO, E. D. de; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, The Hague, v. 284, p. 23-32, 2006.
- PACE, G. W.; RIGHELATO, R. C. Production of extracellular microbial polysaccharides. **Advances in Biochemical Engineering**, New York, v. 15, p. 41-70, 1980.
- PATIL, K. P.; CHAUDHARI, B. L.; CHINCHOLKAR, S. B. Applied and Environmental Microbiology Screening for pharmaceutically important exopolysaccharide producing streptococci and partial optimization for EPS production. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, Guntur, v. 3, n. 3, 2009.
- RAMEY, B.; KOUTSOUDIS, M.; VON BODMAN, S. B.; FUQUA, C. Biofilm formation in plant-microbe associations. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 7, p. 602-609, 2004.
- RAO, P.; PATTABIRAMAN, T. N. Reevaluation of the phenol sulphuric acid reaction for the estimation of hexoses and pentoses. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 181, p. 18-22, 1989.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopathologica**, Campinas, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.
- ROUWS, L. F. M.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; HEMERLY, A. S.; BALDANI, J. I. Validation of a Tn5 transposon mutagenesis system for *Gluconacetobacter diazotrophicus* through characterization of a flagellar mutant. **Archives of Microbiology**, New York, v. 189, p. 397-405, 2008.

SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN, M.; OSBORNE, J. THANGARAJU, M.; SA, T. M. Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing Acetobacteraceae members: their possible role in plant growth promotion, **Microbial Ecology**, v. 55, n. 1, p. 130-140, New York, 2007.

SUTHERLAND, I. W. Bacterial surface polysaccharides: structure and function. **Internacional Review of Cytology**, New York, v. 113, , p. 233-269, 1988.

SUTHERLAND, I. W. Polysaccharides in the adhesion of marine and freshwater bacteria. In: BERKELEY, R.C.W., LYRCH, J.M., MELLING, J., RUTHER, P.R., VINCENT, B. (eds). **Microbial Adhesion to Surfaces**. London, p. 329- 338, 1982.

Comunicado Técnico, 122

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agrobiologia
Endereço: BR465, km7 - Caixa Postal 74505
CEP 23851-970 - Seropédica/RJ, Brasil
Fone: (21) 3441-1500
Fax: (21) 2682-1230
Home page: www.cnpab.embrapa.br
E-mail: sac@cnpab.embrapa.br
1ª edição

1ª impressão (2009): 50 exemplares

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Comitê de Publicações

Presidente: Norma Gouvêa Rumjanek
Secretária-Executiva: Carmelita do Espírito Santo
Membros: Bruno José Rodrigues Alves, Ednaldo da Silva Araújo, Guilherme Montandon Chaer, José Ivo Baldani, Luis Henrique de Barros Soares.

Expediente

Revisão de texto: Stefan Schwab e José Ivo Baldani
Normalização bibliográfica: Carmelita do Espírito Santo
Tratamento das ilustrações: Maria Christine Saraiva Barbosa
Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia