

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS: POTENCIALIDADES EM APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

**Marcella Augusta Falci Demarque, Pedro Henrique de Paula, Lincoln Xavier
Correa, Vanessa Sessa Dian, Serli de Oliveira Cabral, Dalila da Costa
Gonçalves, André da Silva Xavier.**

Universidade Federal do Espírito Santo - *Campus* Alegre, Alto Universitário, s/n Guararema, Alegre -
ES, 29500-000- Brasil, marcela.falcci@gmail.com, pedro1901ze@gmail.com
lincolnxavier229@gmail.com, vanessasessa2@gmail.com, biologiaserli@gmail.com,
dalilant@hotmail.com, andre.s.xavier@ufes.br

Resumo

As mudanças climáticas desafiam a produtividade agrícola e ameaçam a segurança alimentar do mundo. A utilização de bactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPB) é vista como uma alternativa sustentável para superar os desafios futuros. Dentre os diversos mecanismos empregados por essas bactérias para facilitar o crescimento das plantas, a atividade enzimática é um mecanismo promissor. Devido às potencialidades das bactérias produtoras de enzimas extracelulares, treze cepas bacterianas pré-selecionadas do acervo microbiológico do Laboratório de Biotecnologia Agrícola e Ambiental (BIOTA) foram cultivadas em meio sólido específico para amilase, protease e celulase por 8 dias a 28°C. O potencial enzimático foi avaliado para a produção das enzimas amilases, celulasas e proteases pela formação do halo de degradação de seus respectivos substratos. Em relação a atividade enzimática, 12 isolados apresentaram atividade proteolítica, 4 celulolítica e 1 amilolítica, sendo um isolado com atividade fortemente positiva para as três atividades.

Palavras-chave: Estresse da planta. Hidrolases extracelulares. Amilolíticas. Proteolíticas. Celulolítica.

Área do Conhecimento: Engenharia agrônoma

Introdução

As alterações climáticas estão agravando as condições de vida das plantas. As plantas, que são naturalmente sésseis, estão expostas a vários estresses de natureza biótica e abiótica, que tem ocasionado grandes prejuízos. Estudos apontam que a variabilidade climática pode reduzir em até um terço os rendimentos agrícolas (RAY *et al.*, 2019), por isso novas abordagens e tecnologias agrícolas sustentáveis que visam minimizar este impacto necessitam ser desenvolvidas.

Neste sentido, as bactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPB) endofíticas e epifíticas constituem uma valiosa fonte para obtenção de compostos sintéticos com propriedades biotecnológicas (SULTANA *et al.*, 2020), dentre elas a capacidade de produzir enzimas hidrolíticas extracelulares (OLANREWAJU *et al.*, 2017). Essas enzimas como amilases, proteases e celulasas podem auxiliar as plantas de várias maneiras, contribuindo para o aumento da resistência a estresses bióticos e abióticos, bem como na disponibilidade de nutrientes essenciais para seu crescimento (BENEDUZI, *et al.*, 2012). As enzimas hidrolíticas extracelulares desempenham um papel essencial em diversos aspectos da natureza, ecologia e ciclos biogeoquímicos (XIMENES *et al.*, 2021), conferindo-lhes relevância nas dinâmicas ambientais.

A utilização de PGPB pode ser um importante aliado para ecossistemas agrícolas em um cenário de mudanças diante de uma população crescente (RAY *et al.*, 2019; VOCCIANTE *et al.*, 2022). O presente estudo se concentra no potencial das enzimas amilase, celulase e protease, as quais se destacam por sua capacidade de hidrolisar amido, celulose e proteína, respectivamente. Objetivou-se com este trabalho avaliar *in vitro* as atividades enzimáticas de estirpes bacterianas previamente isoladas no Estado do Espírito Santo. Essa triagem inicial pode gerar dados importantes para aplicações biotecnológicas futuras, aproveitando o potencial dessas enzimas em diversas áreas de interesse agrícola e industrial.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Metodologia

Neste estudo, foram empregadas 13 cepas bacterianas previamente cultivadas em meio TSA 10% com baixa atividade de água (Aw), utilizando Sorbitol 285 g L⁻¹ (HALLSWORTH et al., 1998). As estirpes (UFES 101, UFES 104, UFES 135, UFES 145, UFES 146, UFES 155, UFES 157, UFES 158, UFES 160, UFES 200, UFES 201, UFES 203 e UFES 204) encontram-se preservados na coleção de microrganismos mantida no Laboratório de Biotecnologia Agrícola e Ambiental (BIOTA) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), situado no *campus* de Alegre-ES. Para a realização dos testes de produção extracelular de enzimas, os microrganismos foram reativados em meio BDA (Batata 200 g.L⁻¹; Dextrose, 20 g.L⁻¹ e Ágar, 15 g.L⁻¹), empregando o método de estrias para obtenção de colônia pura e em seguida, foram repicadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura caldo nutriente (Nutrient Broth) e levados para crescimento em incubadora tipo Shaker regulada para condição de 28 °C ± 2 °C e 160 RPM (Rotações Por Minuto), mantidas overnight. O potencial enzimático das bactérias foi avaliado quanto à produção das enzimas extracelulares de proteases, lipases e amilases pela formação de halo de degradação destas em meio específico.

Produção de enzimas extracelulares

Amilases

Com o objetivo de identificar bactérias produtoras de amilases, foi realizado o ensaio qualitativo conforme a metodologia adaptada de Sunitha *et al.* (2013), os diferentes isolados bacterianos foram cultivados em meio de cultura *Glucose Yeast Extract Peptone Agar* (GYP) (glicose - 1g, extrato de levedura - 0,1g, peptona - 9,5g, ágar - 16g e 1L de água destilada), com 0,2% de amido solúvel, ajustando o pH final para 6,0. O meio de cultura foi vertido em placas de Petri de 9 cm e as bactérias foram repicadas e incubadas durante 8 dias em estufa de crescimento (28 °C). Em seguida foram lavadas com 1% de iodo em 2% de iodeto de potássio durante 1h. A formação de halo de degradação ao redor da colônia indicou a presença de atividade amilolítica.

Celulases

No teste de celulase, foi realizado o ensaio qualitativo conforme a metodologia adaptada de Sunitha *et al.* (2013) e usando o meio de cultura GYP, acrescido de 0,5% de carboxy-methylcelulose, com pH final de 6,0, os mesmos isolados do ensaio anterior foram repicados em placas de Petri de 9 cm contendo o meio de cultura descrito e incubados durante 8 dias em estufa de crescimento (28 °C). As placas foram inundadas com solução aquosa de Vermelho Congo 0,2% e lavadas com 1M de NaCl por 30 minutos. A presença de halo amarelo ao redor da colônia indicou atividade celulolítica.

Proteases

Para análise da produção extracelular de enzimas que degradam proteína (protease), foi empregado um ensaio qualitativo conforme a metodologia adaptada de Sunitha *et al.* (2013), o meio de cultura GYP foi acrescido de 0,4% de gelatina, previamente diluída em água destilada esterilizada e teve seu pH ajustado para 6,0. A proporção de gelatina adicionada ao meio GYP foi de 5 mL para 100 mL de meio. O meio de cultura foi vertido em placas de petri de 9 cm, os isolados foram repicados e incubados durante 8 dias em estufa de crescimento (28 °C). As zonas livres formadas ao redor das colônias foram inundadas com sulfato de amônio aquoso saturado e a análise da presença de atividade proteolítica foi feita observando a formação de halo ao redor da colônia.

Resultados

Microrganismos epifíticos e endofíticos foram prospectados de locais fortemente acometidos por eventos ambientais extremos como escassez hídrica, elevada incidência de radiação solar, sais e temperaturas altas. Entre os isolados previamente testados em condições de baixa atividade de água,

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

6 estirpes endofíticas e 7 epifíticas foram analisadas qualitativamente para a produção de celulases, amilases e proteases. A Figura 1 evidencia a atividade enzimática nos meios enriquecidos.

Figura 1 - Análise qualitativa para atividade enzimática *in vitro*.

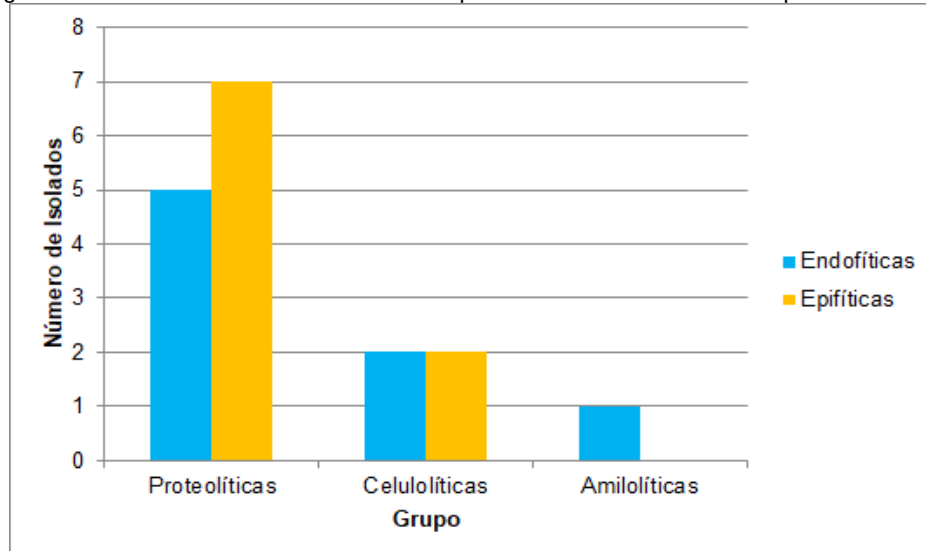


Fonte: O autor, 2023.

Notas: A. Zona de degradação amilolítica evidenciada após coloração com iodo. B. Zona de degradação celulolítica clara visualizada após coloração com vermelho do Congo. C. Halo translúcido de degradação proteolítica ao redor da colônia.

Das estirpes bacterianas avaliadas quanto à produção de enzimas extracelulares, 12 apresentaram atividade proteolítica (UFES 101, UFES 104, UFES 135, UFES 145, UFES 146, UFES 155, UFES 157, UFES 158, UFES 160, UFES 201, UFES 203 e UFES 204), essa característica foi evidenciada através da formação de halos ao redor das colônias. A atividade celulolítica foi detectada em 4 estirpes (UFES 155, UFES 200, UFES 201 e UFES 203), observados pela formação de halos de hidrólise em meio de cultura contendo carboximetilcelulose. Para a amilase uma única bactéria (UFES 155) foi identificada com potencial, evidenciada pela formação de um halo de hidrólise em meio de cultura contendo amido solúvel. A figura 2 demonstra as atividades enzimáticas identificadas.

Figura 2 - Atividades enzimáticas realizadas pelas bactérias endofíticas e epifíticas isoladas.



Fonte: O autor, 2023.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Discussão

As *Plant Growth-Promoting Bacteria* (PGPB) interagem de forma benéfica com as plantas, estimulando seu crescimento e desenvolvimento, além disso são capazes de fornecer compostos biologicamente ativos para a agricultura e indústria (ETESAMI *et al.*, 2018). Algumas enzimas hidrolíticas extracelulares, produzidas por estes microrganismos, têm sido alvo de pesquisa, auxiliando na sobrevivência das plantas contra fungos patogênicos (ALVES-JÚNIOR *et al.*, 2021), estresses ambientais e outros desafios. As PGPB endofíticas podem ser encontradas no interior das plantas, estabelecendo-se nos tecidos foliares e as epifíticas normalmente encontradas no solo, água ou nas rizosferas (DING; MELCHER, 2016).

As PGPB sintetizam enzimas extracelulares como celulases, proteases e amilases, que atuam na promoção indireta do crescimento das plantas (OLANREWAJU *et al.*, 2017). As amilases desempenham um importante papel na hidrólise do amido, convertendo-o em glicose, sendo essencial para o metabolismo energético da maioria dos seres vivos e contribuindo para a liberação de nutrientes no solo (GUPTA *et al.*, 2013).

Neste estudo específico, uma única estirpe isolada das raízes de uma planta rasteira apresentou atividade amilolítica, juntamente com outras atividades mencionadas, e também demonstrou crescimento a 50 °C (dados não publicados). Esse resultado pode estar relacionado ao contato direto das raízes com a rocha exposta a altas temperaturas solares, o que pode ter favorecido uma adaptação mais eficiente em comparação com as bactérias presentes nos tecidos foliares, ou pode estar associado à própria espécie da planta hospedeira (DING; MELCHER, 2016). Análises adicionais são necessárias para que tais dados possam ser considerados como um indicativo e utilizados como um viés na busca por bactérias similares.

A produção de celulases em quatro colônias isoladas, reforçam os achados previamente relatados por Silva *et al.* (2015). As celulases são enzimas que desempenham a hidrólise das ligações β -1,4 glicosídicas presentes na estrutura da celulose (GUPTA *et al.*, 2013), essa habilidade é de suma importância, considerando a composição geral da estrutura celular das plantas, que abriga a celulose, composta por hemicelulose, lignina e outros componentes (SHODA; SUGANO, 2005). A degradação da celulose favorece a obtenção de glicose pelas plantas e microrganismos, um nutriente crucial para seu desenvolvimento e sobrevivência, adicionalmente, atuam na degradação da parede celular de fitopatógenos, o que pode ser auspicioso para futuras aplicações como agentes de biocontrole. A atividade celulolítica foi comprovada em consórcios bacterianos isolados do solo de uma floresta na região do Chago (ROMANO *et al.*, 2013).

As proteases permitem que os microrganismos obtenham nutrientes de várias fontes de proteínas. Além de atuarem como (PGPB), desempenhando um papel importante na degradação da matéria orgânica vegetal, incluindo resíduos de plantas e biomassa no solo, atuam na degradação da parede celular de diversos patógenos (OLANREWAJU *et al.*, 2017). Dos 13 isolados avaliados nesse estudo, 12 mostraram-se capazes de produzir proteases, sendo esse o resultado mais relevante da pesquisa.

O potencial biotecnológico das enzimas hidrolíticas é amplo (ROMANO *et al.*, 2013; OLANREWAJU *et al.*, 2017; XIMENES *et al.*, 2021). Nossos resultados indicam que as estirpes bacterianas testadas produziram ao menos uma enzima extracelular, revelando o potencial biotecnológico de cada uma. Destaca-se o isolado UFES 155, que apresentou atividade positiva para todas as atividades enzimáticas.

Conclusão

Neste estudo, a produção de enzimas extracelulares produzidas por bactérias endofíticas e epifíticas revelou resultados promissores. Das 13 estirpes bacterianas 12 apresentaram atividades proteolíticas, 4 celulolíticas e 1 amilolítica. Especificamente, o isolado UFES 155 demonstrou uma notável atividade enzimática, sugerindo potencial para pesquisas futuras, possivelmente abrangendo outras atividades enzimáticas. Esses achados contribuem para avançar o conhecimento das relações simbióticas entre plantas e bactérias, auxiliando na busca de estratégias para mitigar impactos de estresses bióticos e abióticos, incluindo os desafios impostos pelas mudanças climáticas atuais.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Referências

ALVES-JÚNIOR, M.; DE SOUSA, F. O.; SILVA, T. F.; ALBINO, U. B.; GARCIA, M. G.; MOREIRA, S. M. C. DE O.; VIEIRA, M. R. DA S.; Functional and morphological analysis of isolates of phylloplane and rhizoplane endophytic bacteria interacting in different cocoa production systems in the Amazon. **Current research in microbial sciences**, v. 2, n. 100039, p. 100039, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100039> Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666517421000201#bib0020> Acesso em: 29 jul. 2023.

ARSHAD, M.; SHAHAROONA, B.; MAHMOOD, T. Inoculation with *Pseudomonas* spp containing ACC-deaminase partially eliminates the effects of drought stress on growth, yield, and ripening of pea (*Pisum sativum* L.). **Pedosphere**, Nanjing, v. 18, n. 5, p. 611-620, 2008. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(08\)60055-7](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(08)60055-7) Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1002016008600557> Acesso em: 28 jul. 2023.

BÉGUIN, P.; AUBERT, J. The biological degradation of cellulose. **FEMS microbiology reviews**, v. 13, n. 1, p. 25-58, 1994. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00033.x> Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article/13/1/25/561973> Acesso em: 27 jul. 2023.

BENEDUZI, Anelise; AMBROSINI, Adriana; PASSAGLIA, Luciana MP. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. **Genetics and molecular biology**, v. 35, p. 1044-1051, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000600020> Disponível em: <https://www.scielo.br/j/gmb/a/nBs38RzksfS9SwPZSKVd6kL/?lang=en> Acesso em: 27 jul. 2023.

DING, T.; MELCHER, U. Influences of plant species, season and location on leaf endophytic bacterial communities of non-cultivated plants. **PloS one**, v. 11, n. 3, p. e0150895, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150895> Disponível em: Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0150895> Acesso em: 29 jul. 2023.

ETESAMI, H.; MAHESHWARI, D. K. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 156, n. 30, p. 225-246, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.013> Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651318301921?casa_token=cBrm-xalNyEAAAAA:X4KW7joTRgb6-eeS3-WTIC0Jfhc4C5INT2bEUirpXusEOwyTh70k97r2xhIKaPzU2kkHrKPvsqYE Acesso em: 28 jul. 2023.

GUPTA, R.; RATHI, P.; GUPTA, N.; BRADDOO, S. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 37, p. 63-71, 2003. <https://doi.org/10.1042/BA20020059> Disponível em: https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1042/BA20020059?casa_token=lr_CPwoGOUsAAAAA%3A3bbVXdx1e1-ca93Fb6tAlwdEsqr8gQvaDqnBRoP9ZJDMC8YwZu-Qsrc2xgrulUJZOKRSJViXluc24JAE Acesso em: 28 jul. 2023.

HALLSWORTH, John E.; NOMURA, Yoshiyuki; IWAHARA, Masayoshi. Ethanol-induced water stress and fungal growth. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 5, p. 451-456, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(98\)80150-5](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(98)80150-5) Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0922338X98801505>

OLANREWAJU, Oluwaseyi Samuel; GLICK, Bernard R.; BABALOLA, Olubukola Oluranti. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 1-16, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9> Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-017-2364-9> Acesso em: 18 jul. 2023.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

RAY, D. K.; WEST, P. C.; CLARK, M.; GERBER, J. S.; PRISHCHEPOV, A. V.; CHATTERJEE, S. Climate change has likely already affected global food production. **PloS one**, v. 14, n. 5, p. e0217148, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217148> Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0217148> Acesso em: 28 jul. 2023.

ROMANO, N; GIOFFRÉ, A; SEDE, S. M; CAMPOS, E; CATALDI, A; TALIA, P. Characterization of cellulolytic activities of environmental bacterial consortia from an Argentinian native forest. **Current Microbiology**, v. 67, p.138-147, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0345-2> Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-013-0345-2> Acesso em: 20 jul. 2023.

SHODA, M.; SUGANO, Y. Recent advances in bacterial cellulose production. **Biotechnology and bioprocess engineering: BBE**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 2005. <https://doi.org/10.1007/BF02931175> Disponível em: Recent advances in bacterial cellulose production | SpringerLi

SULTANA, S.; PAUL, S. C.; PARVEEN, S.; ALAM, S.; RAHMAN, N.; JANNAT, B.; HOQUE, S.; RAHMAN, M. T.; KARIM, M. M. Isolation and identification of salt-tolerant plant-growth-promoting rhizobacteria and their application for rice cultivation under salt stress. **Canadian journal of microbiology**, v. 66, n. 2, p. 144-160, 2020. <https://doi.org/10.1139/cjm-2019-0323> Disponível em: <https://cdnsiencepub.com/doi/abs/10.1139/cjm-2019-0323> Acesso em: 11 jul. 2023.

SUNITHA, V. H.; NIRMALA DEVI, D.; SRINIVAS, C. Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2013. <https://doi.org/10.5829/idosi.wjas.2013.9.1.72148> Disponível em: <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=7223ddc174fc58c7f7dfd99c0d99f9e544679020> Acesso em: 20 jun. 2023.

VOCCIANTE, M.; GRIFONI, M.; FUSINI, D.; PETRUZZELLI, G.; FRANCHI, E. The role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in mitigating plant's environmental stresses. **Applied Sciences**, v. 12, n. 3, p. 1231, 2022. <https://doi.org/10.3390/app12031231> Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3417/12/3/1231> Acesso em: 20 jul. 2023.

XIMENES, I. A. T.; DE OLIVEIRA, P. C. O.; WEGERMANN, C. A.; DE MORAES, M. C. Magnetic particles for enzyme immobilization: a versatile support for ligand screening. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 204, n. 10, p. 114286, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114286> Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708521003976?casa_token=oe-okJzbjmwAAAAA:RNQtnOA0oqzaHvD_UpFWrzHA8SUyuExIYNPgd6dUOyqOY-y2wV__JpORaRION_YdbYroMZdv8g Acesso em: 19 jul. 2023.

Agradecimentos

Ao Centro de Ciências Agrárias Engenharias e ao Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI) da Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Alegre, nas dependências dos quais os experimentos ocorreram, bem como o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, também a Fundação de Apoio à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), juntamente com o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).