

Prospecção de bactérias endofíticas de plantas nativas e cultivadas e seu potencial para a desconstrução de biomassa lignocelulósica

Letícia B. M. Lima^{1,2*}, Micaele F. Caratti^{1,2}, Ana Carolina M. G. Silva^{1,2}, Thais F. C. Salum², Wellington L. Araújo³, Maria C. Quecine⁴, Betania F. Quirino² e Léia C. L. Fávoro²

Introdução

A produção de energia renovável derivada de biomassa constitui uma alternativa para reduzir o uso intensivo de combustíveis fósseis e para diversificar e garantir o suprimento de energia no futuro (FÁVARO; POLETTTO, 2013). O interesse na utilização de biomassa lignocelulósica para a produção de biocombustíveis e químicos renováveis tem despertado a atenção da comunidade científica para os desafios que precisam ser vencidos. A bioconversão de componentes celulósicos em açúcares fermentáveis, no entanto, continua a ser um desafio devido ao alto custo de enzimas para o processo de hidrólise enzimática (MARGEOT et al., 2009). Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi prospectar bactérias da “Coleção de Microrganismos Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias” da Embrapa Agroenergia, provenientes de diferentes biomas brasileiros, bem como selecionar e identificar taxonomicamente potenciais linhagens produtoras de enzimas lignocelulolíticas.

Métodos

Bactérias endofíticas (6.816 linhagens) das espécies vegetais *Saccharum officinarum*, *Eucalyptus* sp., *Glicine max*, *Paullinia cupana*, *Utricularia* sp., *Tecoma stans*, *Blechnum brasiliense*, *Rhizophora mangle*, *Avicennia nitida* e *Laguncularia racemosa* foram transferidas da Universidade de São Paulo para a Embrapa Agroenergia. Estas bactérias foram avaliadas quanto à capacidade de degradação dos substratos carboximetilcelulose (CMC), xilana, pectina, amido, ABTS {ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico} e RBBR {Remazol Brilliant Blue R}. A degradação destes substratos indica a produção de celulase, xilanase, pectinase, amilase, lacase e ligninase, respectivamente. As bactérias foram submetidas a duas etapas de triagem. A primeira triagem (qualitativa) foi realizada em duplicata para as 6.816 linhagens e a análise foi realizada considerando a presença ou

1 Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brasil

2 Embrapa Agroenergia, Brasília, Distrito Federal, Brasil

3 Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil

4 Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brasil

*leticia.lima@colaborador.embrapa.br; leia.favaro@embrapa.br

ausência de halo de degradação nos diferentes substratos. Para esta triagem, as bactérias foram cultivadas em Tryptic Soy Broth em microplacas de 96 poços e em seguida foram inoculadas em placas de Petri de 150 x 15 mm contendo os meios de cultura seletivos, com auxílio de repicador de 96 fios. A incubação foi realizada a 28°C por até 20 dias. As linhagens que degradaram CMC e xilana na primeira etapa foram submetidas a uma segunda triagem (semi-quantitativa), que foi realizada em experimentos com quatro repetições, de modo a se obter o índice enzimático (IE = diâmetro do halo/diâmetro da colônia) (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1977). As bactérias selecionadas foram identificadas por meio da análise da região 16S do DNA ribossômico (LANE, 1999), contra a base de dados do GenBank (não curada) e contra a base de dados Ribosomal Database Project (curada).

Resultados e Conclusões

Os resultados da primeira triagem mostraram que 22,1%, 3,4%, 0,5% e 0,8% das linhagens degradaram CMC, xilana, pectina e amido, respectivamente. Não houve degradação de ABTS e RBBR nas condições utilizadas, mesmo após 20 dias de cultivo. Na segunda etapa de triagem foram avaliadas 940 bactérias degradadoras de CMC e 144 bactérias degradadoras de xilana. Os resultados mostraram que 35,9% das bactérias degradaram CMC e 26,3% degradaram xilana. Vinte e uma linhagens que apresentaram os maiores valores de índice enzimático em CMC (índice enzimático variando de 6,0 a 16,4) foram identificadas como pertencentes ao Filo Firmicutes e ao gênero *Bacillus* (12 linhagens de *B. amyloliquefaciens*; 4 linhagens de *B. pumilus*; 2 linhagens de *B. methylotrophicus*, 1 linhagem de *B. safensis*; 1 linhagem de *B. aerius*; 1 linhagem de *B. anthracis*). As espécies *B. aerius* e *B. methylotrophicus* foram, pela primeira vez, descritas como produtoras de celulases.

Este trabalho demonstrou que bactérias associadas a plantas são uma fonte prolífica de novas linhagens com potencial biotecnológico. A identificação taxonômica das bactérias selecionadas está em andamento e poderá revelar outras espécies com potencial de produção de enzimas para utilização como suplemento de coquetéis enzimáticos para hidrólise de biomassa, dentro do conceito de biorrefinarias. Além disso, este trabalho contribui para a agregação de valor ao germoplasma microbiano mantido na Embrapa Agroenergia.

Apoio Financeiro

Embrapa e CNPq

Referências

FAVARO, L. C. de L.; POLETTO, C. M. Bioprospecção e melhoramento genético de fungos para produção de enzimas aplicadas em biocombustíveis. In: MACHADO, C. M. M. (Ed.). **Microorganismos na produção de biocombustíveis líquidos**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2013. p. 35-79.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect cellulose activity of micro-organisms. **Journal of General Microbiology**, London, v. 98, n. 1, p. 109-115, 1977.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: Wiley & Sons, 1999. p. 115-175.

MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 20, n. 3, p. 372-380, 2009.