

ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DO SOLO E DE RAÍZES DE *Gossypium hirsutum*, *Saccharum officinarum* E *Zea mays* CULTIVADOS EM SOLOS DO CERRADO¹

JULIANA RAINHO TEIXEIRA²; ADÃO DE SIQUEIRA FERREIRA³; MARIA AMÉLIA DOS SANTOS³

RESUMO

Bactérias endofíticas estão presentes em algumas espécies vegetais estudadas, colonizando intercelularmente e o sistema vascular. Existem vários efeitos positivos atribuídos a essas bactérias, como a promoção do crescimento vegetal, controle biológico de pragas e doenças nas plantas, fixação biológica de nitrogênio, indução de resistência sistêmica e produção de sideróforos. No presente trabalho, foi pesquisada a população endofítica de bactérias em raízes, folhas e caule de *Gossypium hirsutum*, *Saccharum officinarum* e *Zea mays* cultivados em solos do Cerrado. As amostras coletadas foram desinfetadas, maceradas e diluídas em série para obtenção das suspensões, que a partir de testes foram inoculadas em meios de cultura seletivos. Os frascos foram incubados a 30°C por 7 dias. A população de bactérias foi estimada com ajuda da tabela de McCrady. Posteriormente, as colônias de bactérias foram isoladas. A maioria dos isolados foram Gram negativos, mostrando uma ampla diferença para as características bioquímicas e fenotípicas, e uma grande diversidade biológica entre as espécies vegetais. Isto possibilita pesquisa alternativa para aplicação de novas biotecnologias de interesse agrícola.

Palavras-chave: proteção de plantas; milho; cana-de-açúcar; algodão; bactérias endofíticas

ABSTRACT

Endophytic bacteria are present in some species vegetable studied, colonizing intracellular and intercellular plant tissue. Some positive effects are attributed these bacteria, such as the plant growth-promoting, biological control, plant diseases, atmospheric nitrogen fixation, systemic resistance acquired and siderophore production. In the present work, was researched the endophytic population of bacteria in roots, leaves and stalks from *Gossypium hirsutum*, *Saccharum officinarum* and *Zea mays* cultivated in soils of the *Cerrado*. The samples collected was disinfected, macerated and diluted in series to obtain of the suspensions, which was inoculated in selective culture medium. The flasks were incubated at 30°C for 7 days. The population of bacteria was estimated by NMP with support of the McCrady table. After, the colonies of bacteria were isolated. The isolates were characterized based on physiological and biochemical aspects. The majority of the isolates were negative Gram, showing a wide difference to the phenotypic and biochemical characteristics, and great biological diversity among plants. This is a alternative research to apply in new biotechnologies of agricultural interest.

¹ FAPEMIG; ² Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas – Instituto de Biologia -Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 38400-902, juliana.rainho@hotmail.com; ³Docente do Instituto de Ciências Agrárias – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 38400-902.

Key words: plant protection; cotton; corn; sugarcane; endophytics bacteria

INTRODUÇÃO

O nitrogênio é um dos principais componentes das biomoléculas, fazendo parte da estrutura de ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas, etc, o que o torna, portanto, essencial à sobrevivência e crescimento dos organismos. Embora constitua quase 80% da atmosfera terrestre, o nitrogênio gasoso, N_2 , é quimicamente inerte a temperaturas comuns, e, diferentemente de outros elementos que ocorrem na natureza, suas reservas minerais são relativamente raras. Apesar de termodinamicamente favorável, a reação de redução de nitrogênio atmosférico a amônia – fixação do nitrogênio – requer uma energia de ativação extremamente alta, não ocorrendo espontaneamente sem a presença de catalisadores adequados. Na indústria, o processo de fixação do nitrogênio desenvolvido por Haber-Bosch para a síntese de amônia emprega altas temperaturas (entre 300 e 500°C) e pressões acima de 300 atm, sendo utilizados catalisadores a base de ferro (Kim & Rees, 1994).

A principal finalidade da amônia produzida é a fabricação de fertilizantes, e mais de 100 milhões de toneladas são

anualmente usados na agricultura, uma demanda que implica grandes custos financeiros, energéticos e, sobretudo, ambientais (Newton, 2000). Essa contaminação causa eutrofização de lagoas e a acidificação de solos cultiváveis, que por sua vez, provoca aumento das perdas de oligonutrientes e a liberação de metais pesados do solo para os sistemas aquíferos. Portanto, os custos econômicos e ambientais relacionados à fertilização nitrogenada têm estimulado a busca por alternativas que possam diminuir a utilização deste fertilizante sem que haja diminuição da produção. Uma das possibilidades é a inoculação de bactérias diazotróficas que podem associar-se a plantas para fixar nitrogênio atmosférico e, ou, produzir substâncias promotoras de crescimento de plantas (Azevedo, Maccheroni Júnior, Araújo, 2003). *Azotobacter vinelandii* era até pouco tempo a única bactéria reconhecida capaz de fixar nitrogênio em condições de total aerobiose, recentemente se descobriu outro sistema de fixação de nitrogênio tolerante a oxigênio em *Streptomyces thermoautotrophicus*. *Azobacter* fixa nitrogênio em aerobiose

por possuir um sistema bem integrado de proteção a sua nitrogenase que compreende: proteção conformacional, proteção respiratória, auto-proteção e outras mudanças morfológicas e fisiológicas que permitem-lhe crescer diazotroficamente em condições totalmente aeróbicas (Espín, www.microbiologia.org.mx/microbiose_nlinea/).

Diversas pesquisas demonstram a capacidade de bactérias do solo, mais especificamente da rizosfera, na promoção de crescimento de plantas (Glick, 1995). No entanto, geralmente, a sobrevivência de bactérias diazotróficas na ausência de plantas é baixa, principalmente para espécies como *Herbaspirillum seropedicae*. Roesch et al. (2005) indicaram em seu trabalho, que a população de bactérias diazotróficas pode ser estimulada pela presença das plantas, e conseqüentemente, elevado a quantidade de células no solo para níveis detectáveis pela técnica utilizada ou que a bactérias estava presente no interior da semente desinfestada de sorgo (Olivares et al., 2006).

A fixação biológica do nitrogênio é, após a fotossíntese, o mais importante processo do planeta.

Na natureza, somente um pequeno número de microrganismos,

denominados diazotróficos ou fixadores de nitrogênio, é capaz de reduzir nitrogênio atmosférico à amônia. Esse processo é chamado de fixação biológica do nitrogênio (FBN) e realizado pelo complexo protéico da nitrogenase, a enzima que catalisa a reação (Eady & Postgate, 1974). A participação da FBN no ciclo biogeoquímico do nitrogênio é sobretudo importante na medida em que a atividade das bactérias diazotróficas representa cerca de 60% do nitrogênio anualmente fixado na Terra (Kim & Rees, 1994). As bactérias diazotróficas quebram a ligação que une os dois átomos do nitrogênio atmosférico, transformando-os em amônia. Em alguns casos, a FBN pode suprir quase todas as necessidades do vegetal. O reconhecimento da importância da microbiologia do solo e a busca de alternativas para diminuir o consumo de fertilizantes nitrogenados possibilitaram aumento de pesquisas na área de fixação biológica de nitrogênio. No Brasil, o fertilizante nitrogenado representa o maior custo entre os fertilizantes, já que sua compra não é subsidiada e a quantidade requerida pela planta é uma das maiores em relação aos outros macronutrientes, a exemplo do fósforo e potássio. A cana-de-açúcar que demanda grande quantidade de N,

apresenta uma baixa resposta à adubação nitrogenada, o que sugere que a interação de alguns microrganismos diazotróficos endofíticos com as plantas seja um sistema natural de reposição do N exportando anualmente dos solos pela colheita (Canuto et al., 2003). O papel da fixação biológica do nitrogênio, em outras plantas que não leguminosas, é de extrema importância para a condução sustentável da agricultura (Teixeira, Melo, Vieira, 2005).

As bactérias diazotróficas podem ser de vida livre ou associativa. Esta última subdivisão tem sido denominada endófita pois as bactérias colonizam os tecidos de plantas, intercelular ou intracelularmente, sem causar dano aparente à planta hospedeira. A simbiose ocorre quando planta e microrganismo estabelecem uma interação positiva, na qual a planta fornece nutrientes para o crescimento das bactérias e estas por sua vez fornecem nitrogênio para a planta. A simbiose pode ser detectada pela colonização das bactérias, na epiderme e córtex da raiz, ou sistemicamente, colonizando toda a planta (Moreira & Siqueira, 2002).

Avanços significativos ocorreram na área da fixação biológica de nitrogênio em gramíneas com a descoberta do meio semi-sólido NFB,

pelo grupo da Doutora Johanna Dobereiner na década de 70 do século passado. O meio é elaborado sem fonte nitrogenada, e com a condição de semi-sólido que cria um ambiente com baixo nível de oxigênio, semelhante ao que ocorre em nichos no solo ou na planta, onde estão localizadas bactérias diazotróficas microaerofílicas associadas a raízes de plantas. A formulação desse meio facilitou o isolamento de bactérias do gênero *Azospirillum*, levando à descoberta de duas novas espécies: *A. lipoferum* e *A. brasilense*. Após essa descoberta, muitas espécies de diazotróficas foram isoladas no Brasil, como *Gluconocetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e espécies de *Burkholderia* (Kuss, 2006).

Na Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas da EMBRAPA Agrobiologia, encontram-se 71% estirpes de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium* e *Sinorhizobium* isoladas de diversas espécies de leguminosas de grãos, forrageiras e espécies arbóreas, especialmente da Mata Atlântica e Amazônia; 25% são estirpes de *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, isoladas de trigo, arroz, sorgo, dendê, abacaxizeiro e bananeira e

de *Acetobacter*, isoladas de cana-de-açúcar e batata-doce. Também, mantêm culturas de *Azotobacter*, *Azoarcus*, *Beijerinckia* e outras obtidas por intercâmbio com coleções de diversos países; e 4% são culturas modificadas geneticamente para estudos com diferentes finalidades (Pitard, 2002).

Estudos com cana-de-açúcar demonstram que endofíticos como *Acetobacter diazotrophicus* e outras bactérias geram um aumento de produção sem elevar custos pois reduz o emprego de insumos como adubos nitrogenados (Döbereiner, 1992), demonstrando que os endofíticos são essenciais para a boa fixação de N₂ e o uso de N-fixado, para a nutrição das plantas.

Existem muitos trabalhos com promoção de crescimento em milho utilizando rizobactérias com resultados positivos (Lalande et al., 1989; Döbereiner e Garcia-Salamone, 1995c; Ikeda et al., 1997; Botelho et al., 1998; Guitiérrez-Zamora e Martínez-Romero, 2001). As populações endofíticas de milho apresentaram características relacionadas à promoção de crescimento vegetal, como produção de AIA, capacidade de fixação de nitrogênio e de solubilização de fosfato. Algumas espécies promoveram o aumento do peso da raiz e da parte aérea,

apresentando assim, potencial para sua utilização (Cerigioli, 2005).

Cavallet et al. (2000) avaliaram a produtividade de milho em resposta à aplicação do produto biotecnológico comercial Graminante à base de *Azospirillum* spp. no tratamento de sementes. Os autores observaram aumento médio de 17 % na produtividade com o uso do Graminante.

A *Azotobacter paspali* se associa quase que exclusivamente com *Paspalum notatum* cv. Batatais, e se multiplica principalmente nas raízes da planta (Döbereiner, 1970), embora a atividade da nitrogenase tenha sido detectada também na rizosfera e rizoma, porém não nas folhas (Döbereiner et al., 1972).

O presente trabalho teve como objetivo isolar bactérias diazotróficas endofíticas associadas aos tecidos vegetais de *Gossypium hirsutum*, *Saccharum officinarum*, *Zea mays* e *Paspalum notatum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de algodão, cana-de-açúcar, milho e gramínea com sistemas radiculares intactos foram coletados e levados ao laboratório para posterior análise de quantificação e isolamento.

Para o isolamento das bactérias, as raízes das espécies vegetais estudadas foram imersas lavadas em água corrente. Após este procedimento, foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito durante 1 min, e posteriormente enxaguadas 3 vezes com água esterilizada. Sob condições assépticas, foram, então, cortadas em pequenos pedaços para posterior maceração em cadinho de porcelana contendo solução salina, obtendo-se, assim, uma suspensão. Para obtenção da suspensão de maceração do milho, as raízes desta planta foram cortadas em fragmentos de 10 mm de comprimento e trituradas em um copo de liquidificador por 1 min na maior velocidade, juntamente com solução salina.

Desta suspensão obtida, considerada como a diluição 10^{-1} , foi realizada a série de diluições até 10^{-6} em solução salina contida em tubos de ensaio, utilizando-se pipetador automático. Com outra ponteira estéril, começando da maior diluição para as menores, retirou-se 0,1mL e depositou no interior dos meios semi-sólidos LGI e LGI-P em vidros de penicilina. O meio LGI consistiu de 5 g de sacarose; 0,2 g de K_2HPO_4 ; 0,6 g de KH_2PO_4 ; 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,02 g de $CaCl_2$; 0,002 g de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 4mL de FeEDTA; 5mL de 0,5 % azul de

bromotimol em KOH 0,2 M; 1mL de solução de vitaminas; 1000mL de água destilada, 1,75g – para meio semi-sólido- ou 15g – para meio sólido- de ágar e pH ajustado em 6,0.

O crescimento de bactéria foi evidenciado pela a presença da película típica logo abaixo da superfície do meio depois de 7 dias de incubação a $30^\circ C$.

A população de bactérias foi estimada 4 a 6 dias após a incubação à $30^\circ C$ pela técnica do número mais provável (MPN) consultando a tabela de McCrady para 3 repetições por diluição.

As bactérias formadoras de cápsula (película característica) e as que mudaram a coloração do meio de azul para amarelo, foram submetidas a etapas posteriores de isolamento e purificação pelo método de estrias ou riscas em placas contendo meio LGI-P com 20 mg de extrato de levedura por litro e meio Batata-P. As colônias foram purificadas e mantidas no mesmo meio em baixa temperatura ($5^\circ C$).

Os isolados foram cultivados em meios de cultura sólidos AN, 523, LGI-P, Batata-P, Batata e LB acondicionados em placas de Petri para a caracterização morfológica de suas colônias.

A composição dos meios (Dobereiner, Baldani, Baldani, 1995) utilizados foi:

- AN (1000 mL de água destilada; 3 g extrato de carne; 5 g de peptona e 15 g de agar);
- 523 (1000 mL de água destilada; 10 g de sacarose; 8 g de caseína; 4 g de extrato de levedura; 2 g de K_2HPO_4 ; 0,3 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e 18 g de ágar);
- LGI-P (100 g de sacarose; 0,2 g de K_2HPO_4 ; 0,6 g de KH_2PO_4 ; 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,02 g de $CaCl_2$; 0,002 g de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 0,01 g de $FeCl_3 \cdot H_2O$; 5 mL de 0,5 % azul de bromotimol em KOH 0,2 M, 1000 mL de água destilada, 1,8 g de ágar e pH ajustado em 5,5);
- Batata-P (1000 mL de água destilada; 300 g de batata; 100 g de açúcar; 2 mL de solução de micronutrientes, 17 g de ágar e pH ajustado em 6,5 a 7,0);
- Batata (1000 mL de água; 200 g de batata; 2,5 g de ácido málico; 2,5 g de açúcar cristal; 2 mL de solução de micronutrientes; 1 mL de solução de vitaminas, 17 g de ágar e pH ajustado em 6,5 a 7,0);
- Luria Broth-LB (1000 mL de água; 10 g de peptona de caseína; 5 g de extrato de levedura; 10 g de NaCl e 15 g de ágar).

As colônias que cresceram nesses meios de cultura foram recolhidas, com ajuda da alça de repicagem esterilizada, para lâmina de vidro devidamente limpa e realizou-se o

esfregação por toda a extensão da lâmina. Este esfregação foi fixado pela secagem ocorrida após a passagem da lâmina pela chama do bico de Bunsen, de modo leve e garantindo a fixação da mesma. A lâmina com o esfregação foi submetida à coloração de Gram. A lâmina com o esfregação, foi coberta com corante cristal violeta durante 1 min, e retirado com o uso de um filete d'água. Logo em seguida, adicionou-se solução de iodo pelo mesmo período anterior. A lâmina então, foi lavada com álcool e depois água, até que todos os reagentes presentes fossem removidos. Após este procedimento, safranina foi adicionada sobre a lâmina por 30 s e lavada novamente com filete d'água. A lâmina foi seca e levada ao microscópio, na lente de imersão, para observação da coloração e forma das células bacterianas. As bactérias Gram (-) apresentaram coloração vermelha e as Gram (+), coloração azulada.

Alguns isolados foram selecionados para realização dos testes bioquímicos com base nas características microscópicas e culturais anteriormente avaliadas.

O teste de utilização de citrato visou identificar microrganismo que utiliza o citrato como única fonte de carbono e energia. O meio citrato-Simmons apresentou a composição de

1000mL de água destilada; 2g de citrato de sódio; 0,2g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1g de $NH_4H_2PO_4$; 1g de K_2HPO_4 ; 5g de NaCl, 20g de ágar e 15ml de azul de bromotimol.

Após ser autoclavado, o meio citrato sólido de cor verde que estava em tubos de ensaio, foram inclinados para que o líquido endurecesse em posição inclinada, e possibilitasse assim fazer as estrias. Após 2 a 3 dias, as placas foram observadas quanto à mudança ou não de cor do meio de cultura, ou seja, se de verde (cor original do meio) passou para azul escuro. O resultado positivo foi a mudança de coloração da superfície do meio para azul.

Os testes de produção de indol e de H_2S (sulfeto de hidrogênio) assim como a prova de motilidade, foram conduzidos usando-se o meio SIM que tem coloração amarela e textura firme. A composição do meio SIM constou de 1000mL de água destilada; 30g peptona; 3g de extrato de carne; 0,10g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e 3g de agar.

O isolado presente em alça de metal de ponta reta foi inoculado no meio SIM em linha reta, através da técnica da punctura. Após 2 a 3 dias, observou-se:

- motilidade: não é uma prova bioquímica e sim fisiológica, indica

indiretamente a produção de flagelos. Se as bactérias cresceram por todo o meio, ou seja, crescem deslocando-se da linha de inoculação, o resultado seria positivo (presença de flagelo); negativo quando os microrganismos ficam restritos ao local da inoculação;

- produção de sulfeto de hidrogênio: se havia a presença de uma película preta na superfície do meio, a produção era positiva. O meio SIM tem o tiosulfato como fonte de enxofre e o sulfato ferroso como indicador da produção de sulfeto de hidrogênio. O sulfeto de hidrogênio produzido reage com o metal pesado formando sulfetos que apresentam coloração negra (precipitado preto insolúvel);

- produção de indol: o surgimento da coloração avermelhada no meio ao adicionar 2 a 3 gotas do reagente de Kovacs, indicou resultado positivo, ou seja, revelou a presença de indol pois o mesmo complexou-se com o aldeído, em meio ácido, formando o composto colorido. O reagente de Kovacs é composto por p-dimetilaminobenzaldeído em solução de HCl e álcool isoamílico. O indol é resultante da degradação do aminoácido triptofano pela enzima triptofanase.

Para o teste de produção de ácido foi usado o meio para fermentação de glicose que consistiu de

1000mL de água destilada; 1g de glicose; 2g de peptona; 5g de NaCl, 0,3g de KH_2PO_4 , 3g de ágar e 3mL de vermelho de metila. O meio, após preparado, foi adicionado ao tubo de ensaio em um volume de 5 mL. O resultado positivo foi a mudança da coloração do meio original que passou de verde para amarela.

O meio para teste de produção de urease consistiu de 1000mL de água destilada, 0,5g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,5g de K_2HPO_4 , 0,2g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5g de NaCl, 1g de extrato de levedura, 16mg de vermelho de cresol e 17g de ágar. O meio urease, de cor laranja em função do indicador de pH, foi devidamente preparado e autoclavado. A uréia foi diluída em água destilada (20g para 200mL) e posteriormente filtrada com seringa e filtro. Este filtrado foi adicionado ao meio ainda em estado líquido, com aproximadamente 60 °C, ou seja, antes de sua solidificação. A mistura foi pipetada para tubos de ensaio previamente esterilizados e inclinados para que o meio após solidificado possuísse superfície suficiente para realização das estrias. O resultado positivo foi a mudança da coloração laranja para rosa choque ou rosa cereja. A urease é uma enzima que degrada a uréia em duas moléculas de amônia e uma de anidrido carbônico.

RESULTADOS

Foram encontradas populações de $8,55 \times 10^3$, $9,9 \times 10^4$ e $4,05 \times 10^3$ bactérias endofíticas por grama de matéria fresca no caule, raiz e folha, respectivamente, de algodoeiro.

Foram obtidos mais de 80 isolados que se encontram estocados em ependorfs e mantidos na geladeira.

Algumas colônias crescidas em meio Batata-P (Figura 1) apresentaram uma película (cápsula) cobrindo-as. Depois da caracterização à temperatura ambiente em meio de cultura 523 e AN (Figuras 2A, 2B e 2C), os isolados foram enquadrados em 40 indivíduos diferentes. Estes ao serem submetidos à coloração simples e de Gram, foram caracterizados, em sua maioria, como bactérias Gram negativas e em forma de bastão (Figuras 2D e 3; Tabela 1).

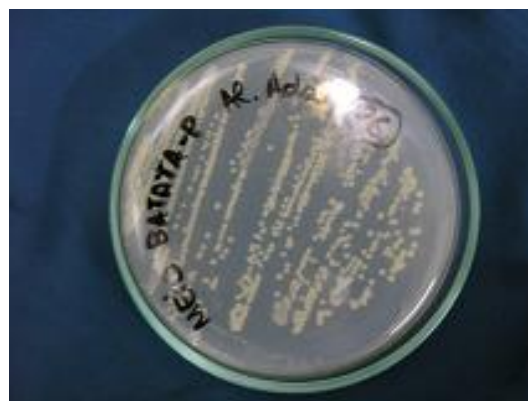


FIGURA 1 – Colônias de bactérias crescidas em meio Batata-P que não produziram cápsula

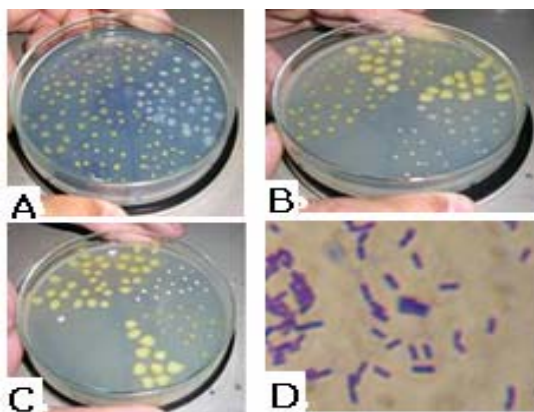


FIGURA 2 – Colônias bacterianas caracterizadas à temperatura ambiente em A, B e C. Em D, Formato de bastonete das células bacterianas Gram positivas.



FIGURA 3 – Preparados de colônias bacterianas em lâminas microscópicas submetidas a coloração simples e diferencial (Gram).

FIGURA

TABELA 1 - Caracterização de 15 isolados obtidos de raízes de milho, algodão, cana-de-açúcar e gramínea por características microscópicas.

Nº	Isolados (origem)	Gram	Forma	Motilidade
1	M.SN. (milho)	-	Bastonete	+
2	M.V. 10-5 (milho)	-	Bastonete	-
3	M.N. 10-2 (milho)	-	Bastonete	-
4	Al.Ju01 (algodão)	+	Coco	+
5	Al.Ju07 (algodão)	+	Coco	-
6	Al.Ju07a (algodão)	+	Coco	-
7	Al.Ju31a (algodão)	+	Coco	-
8	Al.Jo05 (algodão)	-	Bastonete	+
9	Al.Jo09 (algodão)	-	Bastonete	+
10	Al.Jo13 (algodão)	-	Bastonete	-
11	Al.Jo17 (algodão)	-	Bastonete	+
12	Al.Jo26 (algodão)	+	Bastonete	-
13	Al.Jo30 (algodão)	-	Bastonete	NCB
14	IDPRGr01 (gramínea)	-	Indefinida	NCB
15	IDPRCa01 (cana-de-açúcar)	NCB	NCB	NCB

NCB = não houve crescimento bacteriano.

Dentre os 40 indivíduos, estes foram repicados em meios de cultura diversos para análise da colônia em cada meio.

Destes isolados, foram selecionados 15, com características diferentes (Tabela 2)

que também foram submetidos ao testes bioquímicos (Tabela 3).

TABELA 2 – Caracterização de quinze isolados obtidos de raízes de milho, algodão, cana-de-açúcar e gramínea por características culturais das colônias em meios de cultura.

Nº	Isolados	523	NA	LGI-P
1	M.SN.	Md/borda irregular/ redonda/amarela/ aspecto gosmento	_____	_____
2	M.V. 10-5	Gr/borda irregular/ branca com centro branco mais escuro	_____	Pq/redonda/ esbranquiçada**
3	M.N. 10-2	Md/redonda/centro escuro e borda esbranquiçada	_____	Pq/redonda/incolor**
4	Al.Ju01	Md/redonda/rosa claro	Redonda/densa/ rosa	Redonda/firme/rosa claro
5	Al.Ju07	Redonda/borda irregular/amarela	Redonda/borda irregular/amarela	Redonda/firme/ esbranquiçada
6	Al.Ju07a	Redonda/amarela	_____	Pq/ esbranquiçada
7	Al.Ju31a	Pq /branca	Redonda/amarela	Redonda/ esbranquiçada
8	Al.Jo05	Redonda/esbranquiçada	_____	Pq/esbranquiçada*
9	Al.Jo09	Redonda/branca/não firme	_____	Pq/esbranquiçada*
10	Al.Jo13	Redonda/branca	_____	Pq/esbranquiçada**
11	Al.Jo17	Redonda/branca	_____	Pq/esbranquiçada *
12	Al.Jo26	Redonda/branca	_____	Gr/esbranquiçada*
13	Al.Jo30	Redonda/branca	_____	Gr/esbranquiçada *
14	IDPRGr01	Redonda/esbranquiçada	_____	NCB
15	IDPRCa01	Redonda/esbranquiçada	_____	Gr/redonda/plana/centro mais escuro/não firme**

NCB = não houve crescimento bacteriano; * Bactéria não acidificou o meio (sem alteração de cor do meio original); ** Bactéria acidificou o meio (mudança de cor); Pq = pequena; Md = média; Gr = grande.

TABELA 3 – Caracterização de quinze isolados obtidos de raízes de milho, algodão, cana-de-açúcar e gramínea por testes bioquímicos.

Nº	Isolados (origem)	Utilização de citrato	Produção de			Urease
			H ₂ S	Indol	Ácido	
1	M.SN. (milho)	+	+	-	+	+
2	M.V. 10-5 (milho)	+	-	-	+	-
3	M.N. 10-2 (milho)	+	-	-	+	+
4	Al.Ju01 (algodão)	-	-	-	+	-
5	Al.Ju07 (algodão)	-	-	-	-	-
6	Al.Ju07a (algodão)	-	-	-	-	-
7	Al.Ju31a (algodão)	-	-	-	+	-
8	Al.Jo05 (algodão)	-	-	-	NCB	-
9	Al.Jo09 (algodão)	+	-	+	+	-
10	Al.Jo13 (algodão)	+	-	-	+	-
11	Al.Jo17 (algodão)	- *	-	+	+	-
12	Al.Jo26 (algodão)	- *	-	-	+	-
13	Al.Jo30 (algodão)	- *	NCB	NCB	NCB	-
14	IDPRGr01 (gramínea)	-	NCB	NCB	+	+
15	IDPRCa01 (cana-de-açúcar)	- *	NCB	NCB	+	-

NCB = não houve crescimento bacteriano; * Meio ficou amarelo, ou seja, produziu ácido.

O teste de utilização de citrato (Figura 4) foi positivo para os isolados de milho e alguns de algodão (Figura 5), ou seja, a bactéria utilizou o citrato como fonte de carbono e por tanto, mudou a cor do meio para azul. Isolados de algodão, em sua maioria, e de cana-de-açúcar e gramínea foram citrato negativos (não utilizam o citrato como fonte de carbono) e por isso, não promoveram mudança da cor do meio.



FIGURA 4 – Isolados submetidos ao teste do citrato. Bactérias citrato positivas representadas pelos três tubos de ensaio com meio de coloração azul.



FIGURA 5 – Meio de cultura de cor verde com bactérias citrato negativas. Meio de cor azul, bactérias citrato positivas.

A fermentação é um processo metabólico de óxido-redução que ocorre em meio anaeróbio. Pelo teste da fermentação da glicose (Figuras 7 e 8), observou-se que a bactéria pode ou não utilizar este carboidrato como fonte de carbono. O meio de fermentação da glicose proporcionou o resultado: produção ou não de ácido (mudança de cor do meio).

O teste em meio SIM (Tabelas 1 e 3), revelou além da motilidade da bactéria, se ela produz indol e H_2S . Alguns dos isolados de algodão apresentaram-se como sendo indol positivos (Figura 6). Os demais isolados deram todos negativos.



FIGURA 6 – Bactérias indol positivas (coloração vermelha).



FIGURA 8 – Em detalhe, à esquerda bactéria produtora de ácido e à direita, bactéria não produtora.



FIGURA 7 – Isolados inoculados em meio de fermentação da glicose e armazenados em estufa à 30°C por 48h.



FIGURA 9 – Isolados bacterianos em meio urease. Os três tubos à esquerda mostram urease positivo (rosa choque). Os três à direita, urease negativo.

Em meio urease, apenas três dos isolados selecionados foram positivos quanto à produção de urease (Figura 9)

após 24 h de incubação à 30°C, sendo eles de cana-de-açúcar e gramínea.

DISCUSSÃO

O processo de caracterização das bactérias isoladas foi efetuado através da determinação de um número mínimo de propriedades. Sabe-se que quanto menor o número de observações efetuadas, maior o risco de erros de identificação. Portanto, os isolados desse presente trabalho devem ser observados, ainda, para outras características, principalmente, bioquímicas. Fernandes, Fernandes, Rodrigues (2001) trabalharam com 20 isolados obtidos de folhas e raízes de coqueiro e utilizaram muito mais testes bioquímicos do que o presente trabalho. No entanto, a identificação dos isolados ainda não ficou completamente esclarecida. A investigação das atividades metabólicas das bactérias “*in vitro*” auxilia o microbiologista na identificação, pois muitas vezes, um determinado microrganismo possui um sistema enzimático específico, promovendo transformação bioquímica específica.

Uma provável explicação para os isolados bacterianos que não cresceram em meio SIM e cresceram nos outros, é que estes podem ser

sensíveis ao ferro presente no meio SIM, ou seja, o ferro pode ser tóxico à bactéria, impedindo-a de crescer.

Os isolados que em meio citrato transformaram o meio de verde para amarelo, possuem permease citrato, que faz o transporte do citrato para o interior da célula bacteriana, produzindo muito ácido deixando o meio amarelo, e não azul.

Em meios sólidos, onde não houve o crescimento bacteriano, provavelmente, deve-se ao fato de que os isolados não estavam devidamente ativos ou o inóculo colhido para realização da repicagem não continham bactérias.

O resultado obtido com a maior contagem do NMP de bactérias em raízes de algodoeiro do que com outras partes da planta já foi encontrado por outros autores. Júnior et al. (200) trabalharam isolando bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar, encontraram maior frequência de bactérias ocorrendo nas raízes.

Herbaspirillum spp., *Azoarcus* spp. e *Acetobacter diazotrophicus*, são bactérias endofíticas obrigatórias (Döbereiner, Baldani, Baldani, 1995).

Como não foram utilizados, respectivamente, os meios JNFb e NFb, *Herbaspirillum* spp. e *Azospirillum* spp.

provavelmente não estão entre os isolados encontrados, visto que estes meios são específicos para isolamento destes grupos de bactérias.

Acetobacter diazotrophicus é a única espécie desse gênero capaz de fixar N₂ e é selecionada através do meio LGI-P. Em meio sólido acrescido de 20mg de extrato de levedura, após incubados à 30°C por uma semana, as colônias formadas são pequenas e de cor laranja (Döbereiner, Baldani, Baldani, 1995). No presente trabalho, a maioria das colônias crescidas em LGI-P, apresentou coloração esbranquiçada, sendo assim, tudo indica que os isolados avaliados não sejam de *Acetobacter diazotrophicus*.

O meio Batata-P é capaz de purificar *Acetobacter diazotrophicus* e apresenta colônias inicialmente claras e úmidas, tornando-se de coloração chocolate após sete a dez dias de incubação à 30°C (Döbereiner, Baldani, Baldani, 1995). Os resultados obtidos a partir deste meio, foram colônias claras e com um aspecto úmido, como descrito anteriormente. Porém, a coloração chocolate não foi observada.

Testes em meio LGI foram realizados, mais não obtiveram resultados satisfatórios como em LGI-P, por este motivo não foram descritos no presente trabalho. Provavelmente houve

mais crescimento em meio LGI-P, por este conter em sua composição, uma alta concentração de sacarose em relação ao meio LGI.

Cabe salientar que baseado na análise de seqüência do 16 s rRNA, *A. diazotrophicus* foi redenominada como *Gluconobacter diazotrophicus*. Essa bactéria é Gram negativo, tolerante à ácido, aeróbio obrigatório e as células são do formato de bastonete medindo de 0,7-0,9 µm por 1-2 µm. As células bacterianas podem ser visualizadas individualmente, em pares ou estruturas como cadeias sem endósporos.

Pelas características dos três isolados originados de milho, há possibilidade de tratar-se de espécie da ordem Enterobacteriales que caracteriza por apresentar formato de bastonete, Gram negativo, anaeróbicos facultativos que, se forem capazes de se locomover, fazem por meio de flagelos peritríquios. Fermentam a lactose para produzir ácido e gás (Tortora, Funke, Case, 2005). Há necessidade da realização de mais testes bioquímicos como fermentação/oxidação de sorbitol e produção de acetoína, para confirmação correta. Hinton & Bacon (1995) descreveram a ocorrência de *Enterobacter cloacae* como simbiote endofítico em raízes de milho. Bactérias do gênero *Enterobacter* fixam

nitrogênio, porém requerem compostos nitrogenados para crescer sob condições estritamente anaeróbicas (Marin, Baldani, Teixeira, Baldani).

As espécies de *Herbaspirillum* e *Azoarcus* são isoladas pela inoculação em meio semi-sólido JNFb que não foi usado no presente estudo. Assim como o LGI, o meio JNFb apresenta também ausência de fonte de nitrogênio para selecionar bactérias diazotróficas.

O sucesso na utilização de bactérias diazotróficas não está relacionado apenas a habilidade de selecionar isolados, mas de integrar a incorporação e manutenção dessas populações no campo com os sistemas de produção agrícola utilizados.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que (1) existe grande diversidade de bactérias endofíticas; (2) as plantas estudadas se diferenciam quanto às características dos isolados; (3) os isolados são diferentes quanto as características bioquímicas e nutricionais e (4) as bactérias isoladas podem ser de grande utilidade na busca de alternativas nos processos biotecnológicos aplicados à agricultura.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof. Dra Maria Amelia dos Santos, ao meu orientador Prof. Dr. Adão de Siqueira Ferreira e à todos aqueles que diretamente ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, J.L.; MACCERONI JÚNIOR, W.; ARAÚJO, W.L. Importância dos microrganismos endofíticos na agricultura. **Revisão Anual de Proteção de Plantas**, v. 11, p. 333-363, 2003.

BOTELHO, G. R.; GUIMARÃES, V.; DE BONIS, M.; FONSECA, M. E. F.; HAGLER, A. N.; HAGLER, L. C. M. Ecology of a plant growth-promoting strain of *Pseudomonas fluorescens* colonizing the maize endorhizosphere in tropical soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p. 499-504, 1998.

CANUTO, E. de L.; SALLES, J.F.; OLIVEIRA, A.L.M.; PERIN, L.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Respostas de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias

diazotróficas endofíticas. **Agronomia**, v. 37, n.2, p.67-72, 2003.

CAVALLET, L. E.; PESSOA, A.C.dos S.; HELMICH, J.J.; HELMICH, P.R.; OST, C.F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 4, n.1, p. 129-132, 2000.

CERIGIOLI, M. M. Diversidade de bactérias endofíticas de milho (*Zae mays* L.) e potencial para promoção de crescimento. Disponível em: <http://www.bdtd.ufscar.br/tde_arquivos/16/TDE-2006-02-10T15:50:03Z-815/Publico/TeseMMC.pdf> Acesso em: 28 fev. 2007.

DÖBEREINER, J. Further research on *Azotobacter paspali* and its variety specific occurrence in the rhizosphere of *Paspalum*. *Flügge Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde (Abteilung 2)*, Alemanha, v.124, p.233-230, 1970.

DÖBEREINER, J. Recent changes in the concept of plant-bacteria interact: endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, v. 44, p. 310-313, 1992.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI: Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1995. 60 p.

DÖBEREINER, J.; DAY, J.M.; DART, P.J. Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the *Paspalum notatum*-*Azotobacter paspali* association. *Journal of General Microbiology*, London, v.71, p.103-116, 1972.

DÖBEREINER, J.; GARCIA DE SALAMONE, I. Biological dinitrogen fixation in maize. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL: O MILHO EM PERSPECTIVA, 1992. Belo Horizonte. **Anais**. Sete Lagoas: Embrapa/CNPMS, 1995. p. 286-294.

EADY, R.R.; POSTGATE, J.R. Nitrogenase. **Nature**, v. 249, p.805-810, 1974.

ESPÍN, G. Biología de *Azotobacter vinelandii*. Disponível em: <http://www.microbiologia.org.mx/microbiosonline/CAPITULO_09/Capitulo09.pdf> Acesso em: 28/02/07.

- FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.P.M.; RODRIGUES, L. da S. Bactérias diazotróficas associadas a coqueiros na região de baixada litorânea em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n.12, p. , 2001.
- GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 109-117, 1995.
- GUTIÉRREZ-ZAMORA, M. L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Natural endophytic association between *Rizhobium etli* and maize (*Zae mays* L.). *Journal of Biotechnology*, v. 91, p. 117-126, 2001.
- HINTON, D. M. BACON, C. W. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 129, n. 2, p. 117-125, 1995.
- IKEDA, K.; TOYOTA, K.; KIMURA, M. Effects of soil compaction on the microbial populations of melon and maize rhizoplane. **Plant and Soil**, v.189, p. 91-96, 1997.
- JACOBS, M. J.; BUGBEE, W. M.; GABRIELSON, D. A. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 206-210, 1985.
- JÚNIOR, F. B. R.; SILVA, L. G.; REIS, V. M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n.5, 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v35n5/4720.pdf>> Acesso em: 28/02/07.
- KIM, J.; REES, D.C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochemistry**, v. 33, p. 389-397, 1994.
- KUSS, A .V. **Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado**. Santa Maria. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria, 2006. 109 p.
- LALANDE, R.; BISSONNETTE, N.; COUTLÉE, D.; ANTOUN, H. Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potencial. **Plant and Soil**, v.115, p. 7-11, 1989.
- MARIN, V. A.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, J. I.

Fixação Biológica de Nitrogênio: bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical.

Disponível em: <http://www.cnpab.embrapa.br/servicos/download/doc091.pdf> Acesso em: 28/02/07.

McINROY, J. A.; KLOEPPER, J. W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil*, v. 173, p. 337-342, 1995.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico. In: _____ **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. p. 399-471.

NEWTON, W.E. Nitrogen fixation in perspective. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E. **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000.

OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Occurrence of endophytic diazotrofs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Graminae. **Biology**

and Fertility of Soils, Berlin, v.21, p.197-200, 1996.

PALUS, J. A.; BORNEMAN, J.; LUDDEN, P. W.; TRIPLETT, E. W. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zae mays* L. and *Zea luxurians* Iltis and Doebley. **Plant and Soil**, v. 186, p. 135-142, 1996.

PITARD, R.M. Banco de germoplasma de bactérias diazotróficas e actinomicetos. EMBRAPA Agrobiologia, 2002. Disponível em: <http://www.cnpab.embrapa.br/pesquisas/projetos/022000446.html> Acesso em: 29 set. 2005.

ROESCH, L. F.; CAMARGO, F.; SELBACH, P.; SÁ, E. S.; PASSAGLIA, L. Identificação de cultivares de milho eficientes na absorção de nitrogênio e na associação com bactérias diazotróficas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 924-927, 2005.

STURZ, A. V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. **Plant and Soil**, v.175, p. 257-263, 1995.

TEIXEIRA, M.A.; MELO, I.S. de; VIEIRA, R.F. Ocorrência de bactérias

diazotróficas endofíticas na mandioca
(*Manihot esculenta* Crantz).
Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente,
2005. 19 p. (Boletim de Pesquisa e
Desenvolvimento 34).

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.;
CASE, C.L. **Microbiologia**. Porto
Alegre: Artmed, 2005. 894 p.

TREVET, I. W.; HOLLIS, J. P. Bacteria
in the storage organs of healthy plants.
Phytopathology, v. 38, p. 960-967,
1948.