

Isolamento e Caracterização de Bactérias Endofíticas de Cana-de-açúcar Raras e Comuns Com Ênfase na Fixação Biológica do Nitrogênio

Mayana Mirelly Horta Santos¹, Marcelo Ferreira Fernandes², Érika Cristina Teixeira dos Anjos Brandão³

Resumo

O nitrogênio (N) é um componente elementar para a nutrição de toda espécie vegetal. Entretanto, este macronutriente não é encontrado na forma assimilável na atmosfera terrestre. Um grupo de bactérias assimióticas, denominadas diazotróficas, converte o N₂ atmosférico em amônia através do processo de fixação biológica do N (FBN) em plantas não leguminosas. A cana-de-açúcar é uma planta em crescente expansão produtiva em solos brasileiros devido à sua importância para a geração de álcool biocombustível. Para o isolamento de bactérias ainda não cultivadas de cana-de-açúcar com maior potencial para a FBN propôs-se neste trabalho utilizar meios de cultura não convencionais. O objetivo do trabalho foi obter uma coleção de isolados de bactérias endofíticas raras e comuns de variedades de cana-de-açúcar e posterior caracterização por meio da atividade de redução do acetileno in vitro. O isolamento seguiu o método proposto por Dobereiner et al. (1995). Os meios de cultura utilizados foram: NFb, JNFb, LGI, LGIP, JMV e WG, além das suas diluições 1:5 (v/v) e meios NFb e LGI acrescidos de xilana ou celulose como fonte de carbono ou solução especial de vitaminas. O número de células/mL foi determinado nos dois isolamentos através da visualização de película característica de diazotróficos e resultados conferidos na tabela de McCrady (DOBEREINER et al., 1995). Para o teste de redução de acetileno in vitro, os isolados bacterianos foram crescidos nos meios específicos sem azul de bromotimol. O etileno produzido foi quantificado em um cromatógrafo a gás equipado com um detector de ionização e coluna GS-Carbon PLOT. O resultado do número mais provável demonstrou que houve diferença na detecção de película

¹Graduanda em Química Licenciatura, bolsista PIBIC/FAPITEC, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE, may_mirelly@hotmail.com.

²Engenheiro-agrônomo, doutor em Ciência do Solo, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, marcelo.fernandes@embrapa.br.

³ Doutora em Ciências Biológicas, bolsista DCR/CNPq, bolsista Pós-Doutorado/CAPES/Fapitec/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, erika.anjos@colaborador.embrapa.br.

característica de diazotróficos nos meios semissólidos em relação a variedade e ao meio de cultura utilizado, comparando-se especialmente com o número de isolados obtidos após recuperação destes isolados em meios sólidos. Dos 43 isolados de bactérias endofíticas testados cinco apresentaram atividade de redução de acetileno (ARA positivo), sendo que o isolado RB373 obtido da variedade RB92579 e do meio de cultura não convencional NFb + xilana, produziu quantidade de etileno convertido superior ao do isolado padrão *G. diazotrophicus* PAL-5, em média 1.287 nmol C₂H₄/μg BSA/dia. Bactérias isoladas de raízes de cana-de-açúcar utilizando-se meios convencionais modificados, como o NFb + xilana, apresentam potencial para alta fixação biológica do nitrogênio.

Palavras-chave: atividade de redução do acetileno, bactérias não cultiváveis, diazotróficas e *Saccharum*.

Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp) tem uma grande importância social para a economia mundial, por ser responsável pela produção de álcool e açúcar. Foi introduzida no Brasil no início do século XVI e prosperou principalmente na região Nordeste (Santana, 2014). Para uma boa produção agrícola a planta necessita de fonte adequada de nutriente para o seu desenvolvimento. Um dos elementos essenciais para a nutrição é o nitrogênio (N), é um macronutriente, que colabora para a formação de substâncias essenciais para as plantas (CLARKSON e HANSON, 1980). A ausência da adubação com este nutriente é um dos fatores mais limitantes para produção vegetal nos trópicos (Greenwood et al., 1991). Embora 80% da atmosfera sejam constituídos de N₂, esta fonte não é diretamente disponível às plantas. No entanto, um grupo específico de bactéria assimbiótico, denominado diazotróficas, é capaz de disponibilizar este N atmosférico para culturas associadas através do processo de fixação biológica do N (FBN) (BALDANI et al., 1997).

Há quase 100 anos reconhece-se que menos de 10% das células presentes em amostras de solo se multiplicam e formam colônias em meios de cultura em laboratório. O cultivo e a caracterização de bactérias diazotróficas ainda não cultivadas podem levar a um melhor entendimento do seu papel no ciclo do N e na sucessão primária (HUANG et al., 2011). Esforços de cultivo necessitam ser direcionados para cultivar novos representantes destes e de outros grupos diversos, de modo a permitir a caracterização adequada dos

aspectos genéticos, fisiológicos e ecológicos de divisões pouco conhecidas (HUGENHOLTZ et al., 1998). Uma importante ferramenta é criar sistemas artificiais que mimetizem as condições naturais. Algumas tentativas como simulações da condição química do habitat natural, interações entre fatores bióticos e abióticos, o uso da diversidade de micro-organismos (cocultivo) tem sido bem sucedidas (PHAM e KIM, 2012). O objetivo do trabalho foi obter uma coleção de isolados de bactérias endofíticas raras e comuns de variedades de cana-de-açúcar e posterior caracterização por meio da atividade de redução do acetileno in vitro.

Material e Métodos

Coletas de amostras biológicas de quatro variedades de cana-de-açúcar foram realizadas durante o período de novembro de 2013 e janeiro de 2014. As amostras de raízes foram levadas para o Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Tabuleiros Costeiros (Aracaju – SE) e ficaram armazenadas sob refrigeração até o processamento. Para a obtenção de isolados raros e comuns utilizou-se raízes de quatro genótipos de cana-de-açúcar (RB867515, RB92579, RB931530, SP791011) obtidos de plantios comerciais das Usinas Coruripe (Coruripe - AL) e da Usina São José de Pinheiro (Laranjeiras - SE). Neste trabalho propusemos utilizar meios semissólidos convencionais e não convencionais para o isolamento de bactérias diazotróficas assimbióticas ainda não cultivadas em condições de laboratório. Os meios convencionais são aqueles típicos para o crescimento de diazotróficas: NFB, JNFb, LGI, LGI-P, JMV, conforme descrição de Dobereiner et al. (1995). Além destes, utilizou-se o meio oligotrófico de Winogradski, também para o crescimento de diazotróficas, conforme composição descrita por Hara et al. (2009). Foram propostos também meios não convencionais como: os meios NFB e LGI acrescidos de xilana (obtido de madeira de faia, Sigma) e celulose (carboximetil-celulose, Acros Organics) na concentração de 0,05%. Os demais meios de cultura foram diluições 1:5 (v/v) dos meios citados anteriormente (NFB, JNFb, LGI, LGIP e JMV). Todos os meios de cultura foram solidificados com gelana 0,06% (Phytigel, Sigma). Para o isolamento, dez gramas de raízes foram lavadas e trituradas em liquidificador com solução salina a 0,85%. Em seguida, foram feitas diluições seriadas do inoculo original (10^{-2} a 10^{-7}). Para determinar a contagem de diazotróficos em cada tratamento (variedade/meio de cultura), fez-se a inoculação de 0,1 mL das três últimas diluições (10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}) em três frascos/diluição. Este método permitiu a contagem de frascos com película característica de diazotróficos formada nos meios semissólidos. Os resultados

da contagem são apresentados segundo a Tabela de McCrady para 3 tubos/diluição (DOBEREINER et al., 1995). Após a etapa das repicagens sucessivas para os meios semissólidos específicos procedeu-se a purificação em meios sólidos semelhantes aos originais solidificados com gelatina na concentração de 1,5%. As colônias morfológicamente diferentes foram armazenadas em meio líquido com glicerol 50% (-20 e -80°C) e em óleo mineral (4°C). Todos os isolados foram reativados em meio Digs com pH específico para cada meio de cultura, estes isolados foram posteriormente crescidos em meio Eosina Azul de Metileno (EMB, Oxoid) e incubados a 37°C durante 48 horas. O meio EMB é específico para família *Enterobacteriaceae*. O crescimento positivo pode ser forte indicio de este isolado pertencer a esta família, cujas espécies são potencialmente patogênicas a seres humanos. Devido a esta possibilidade as bactérias com crescimento positivo neste meio de cultura não serão utilizadas nos testes posteriores.

A eficiência de FBN dos isolados foi determinada pelo método de redução do acetileno *in vitro*, em meios semissólidos específicos para cada isolado, semelhante ao do isolamento, sem N e sem azul de bromotimol. Culturas em estoque dos isolados bacterianos obtidos na etapa do isolamento com película característica de diazotróficas foram utilizadas para inoculação dos frascos com meios semissólidos específicos. Erlenmeyers contendo 15 mL de meio Digs líquido foram inoculados com 50 μ L dessas culturas e incubados a 32°C por 48h para ativação das mesmas. Após a verificação da turvação, alíquotas de 40 μ L foram utilizadas para inoculação de frascos de penicilina (10 mL) contendo 5mL de meios semissólidos específicos. Esses frascos foram fechados com tampão de algodão e incubados a 32°C no escuro. Após o aparecimento da película e/ou a turvação dos meios, características do crescimento bacteriano, cada frasco foi então fechado com um septo de borracha, sendo 10% da atmosfera dos meios (0,5 mL) substituída por acetileno de alta pureza, através de uma seringa hipodérmica (HAAHTELA et al., 1981). A produção de etileno foi determinada após 7 dias de incubação a 32°C. Para uma melhor determinação deste composto cada isolado foi feito em triplicata. 100 μ L da amostra gasosa da atmosfera dos frascos foi injetado no cromatógrafo a gás (Perkin-Elmer, Clarus 500) com um detetor de ionização de chamas (FID) e coluna GS – CarbonPLOT (Agilent Technologies). As temperaturas de operação do injetor, da coluna e do detetor foram de 100°C, 150°C 180°C, respectivamente. Para a corrida do gás de arraste foi utilizado Nitrogênio ultrapuro (99,99%). A eficiência relativa de FBN *in vitro* dos isolados

foi expressa em nmol de etileno/ μ g de proteína/dia. A conversão das áreas cromatográficas por unidade de massa foi feita com a criação de uma curva padrão com quantidades crescentes desse gás. Os isolados que apresentaram picos de etileno foram separados para quantificar o teor de proteína de cada frasco através do método de Bradford (1976), conforme o protocolo “Micro 2 mL Assay” descrito pelo fabricante do reagente utilizado (Sigma, St. Louis, EUA). Nesse protocolo partes iguais das amostras e do reagente de Bradford são misturados. Desta forma, foram retiradas alíquotas de 1mL das amostras com resposta positiva acetileno-etileno, as quais foram levadas em sequência para um banho-maria a 100°C, por 20 min (em triplicata). E após 5 minutos foram feitas leituras em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595nm (ZAIA et al., 1998). Os efeitos dos isolados sobre a atividade de redução relativa de acetileno (ARA) foram comparados utilizando-se o teste de Dunnett ($p = 0,05$). Como controle foi empregada a estirpe PAL5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* para comparação com os isolados de cana-de-açúcar. Essas análises foram feitas utilizando-se o software S-PLUS versão 4.

Resultados e Discussão

No 1º isolamento foram obtidos 123 isolados e no 2º isolamento 95 isolados bacterianos. Destes, 69 (56,1%) apresentaram crescimento negativo em meio EMB a 37°C no 1º isolamento e 40 (42%) no 2º isolamento. Os isolados que apresentaram crescimento negativo em EMB a 37°C são aqueles que serão caracterizados quanto à atividade de redução de acetileno e molecular. Os resultados referentes a estes isolamentos podem ser observados, na Tabela 1.

O número de células/mL, que reflete a presença de película característica de diazotróficos nos meios semissólidos, antes do isolamento das bactérias em cultura pura, referentes ao 1º isolamento das variedades de cana-de-açúcar, foi superior para a variedade RB867515 em relação a variedade RB92579. No entanto, este resultado não se refletiu no número de isolados obtidos após repicagem para o meio sólido; verificou-se que 54 isolados foram obtidos para a RB867515, enquanto 68 foram obtidos da variedade RB92579. Hara et al. (2009) verificaram que algumas espécies de *Pseudomonas* spp. Fixadoras de N são incapazes de crescer em meio sólido. Eles afirmaram que nos meios semissólidos não há apenas um isolado bacteriano, mas sim um consórcio de espécies e por isso nem todas as espécies são capazes de crescer isoladamente em cultura pura.

Quanto aos meios de cultura utilizados observou-se que para os meios específicos NFb e JNFb o número de células/mL apresentou-se superior quando comparados aos demais. Marra et al. (2012) também observaram que o número de células/g de raízes também variaram em diferentes meios de cultura, destacando-se os meios NFb e JNFb quando comparados ao meio LGI.

Para o 2º isolamento pode-se destacar que o número de células/mL foi inferior ao do 1º isolamento. Pode-se destacar o que ocorreu no meio de cultura NFB + solução de vitaminas com um total de 110×10^6 células/mL. No entanto, quando acrescentou-se a mesma solução de vitaminas no meio específico LGI observou-se que o número de células/mL correspondeu a 0, ou seja, houve ausência de película característica para diazotróficos. Quanto ao número de isolados obtidos no 2º isolamento obteve-se maior número de isolados em cultura pura na variedade RB931530, destacando-se o número de isolados obtidos nos meios NFb, com ou sem suplementação de fontes de carbono (xilana e celulose).

Tabela 1. Número mais provável (NMP) (número de células/mL) e número de isolados obtidos por tratamento (variedade e meio de cultura) utilizado nos dois isolamentos de cana-de-açúcar.

Tratamento	1º isolamento		NMP (nº células x 10 ⁶ /mL)	Nº de isolados bacterianos obtidos	NMP (nº células x 10 ⁶ /mL)	Nº de isolados bacterianos obtidos
	RB867515	RB92579				
NFb	140			4	57	6
NFb (1:5)	57			3	13	8
JNFb	125			5	35	8
JNFb (1:5)	140			5	62	5
LGI	56			5	2	8
LGI(1:5)	17			6	2,5	9
LGIP	1,7			4	0,4	3
LGIP (1:5)	2,8			5	0,4	2
JMV	2			8	2,5	7
JMV (1:5)	55			5	80	7
WINOGRADSKI	12			4	2,5	5

Continua...

Tabela 1. Continuação.

	2º isolamento					
	RB931530		SP791011		RB92579	
	NMP (nº células x 10 ⁶ /mL)	Nº de isolados bacterianos obtidos	NMP (nº células x 10 ⁶ /mL)	Nº de isolados bacterianos obtidos	NMP (nº células x 10 ⁶ /mL)	Nº de isolados bacterianos obtidos
NFb	25	6	9,5	3	7,5	2
NFb (1:5)	9,5	3	45	3	1,5	3
LGI	15	2	4,5	4	1,4	3
LGI(1:5)	9,5	2	1,5	2	0,4	2
LGIP	15	4	0,7	0	0,7	0
LGIP (1:5)	7,5	4	1,5	3	0,6	3
NFb + xilana	25	7	3,5	1	9,5	3
LGI + xilana	9,5	5	1,1	0	0,4	1
NFb + celulose	3,5	1	1,5	1	0,9	3
LGI + celulose	9,5	3	7,5	3	25	4
NFb + solução de vitaminas	110	7	1,1	1	1,5	4
LGI + solução de vitaminas	0	0	0,9	1	0	0

Tabela 2. Isolados de bactérias diazotróficas cana-de-açúcar e seus respectivos tratamentos (variedade e meios de cultura) e médias de atividade de redução do acetileno (ARA relativo)

Isolados	Variedade	Meio de cultura	ARA relativo (nmol C ₂ H ₄ /μg BSA/dia)
RB172	RB867515	LGIP	18*
RB261	RB92579	LGI (1:5)	29*
RB282	RB92579	LGIP (1:5)	42*
RB373	RB92579	NFb + xilana	1.287*
SP293	SP791011	NFb + celulose	12*
Gd	-	LGIP	358
PAL-5 ^a	-	LGIP	358

^a A estirpe PAL-5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* foi utilizada como referência para ARA relativo.

* Valores médios de ARA relativo (nmol C₂H₄/μg BSA/dia) significativamente diferentes ao da referência padrão Gd PAL-5, pelo teste de Dunnet ($p \leq 0,05$).

De 43 isolados testados quanto à atividade de redução do acetileno in vitro, detectada por cromatografia gasosa, foi observado que o isolado RB373 produziu em média 1.287 nmol de etileno/μg BSA/dia, cerca de 3,5 vezes maior do que o isolado de referência *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL-5. Porém, outros quatro isolados foram significativamente diferentes da *G. diazotrophicus* PAL-5, produzindo uma quantidade menor de etileno/frasco (tabela 2). Ainda restam 66 isolados a serem testados quanto à atividade de redução do acetileno. Hara et al. (2009) também observaram em meio solidificado com gelana uma produção de etileno in vitro variando de 47 a 1.041 nmol de etileno/dia.

Conclusões

Bactérias endofíticas com película característica para organismos diazotróficos são capazes de crescer em meios convencionais e não convencionais (modificados). Um isolado endofítico obtido da variedade RB92579 e do meio de cultura NFb + xilana é positivo para fixação biológica do nitrogênio.

Agradecimentos

À Fapitec pela concessão de Bolsa de Iniciação Científica PIBIC à aluna de graduação. E à Fapitec/CAPES pela concessão de Bolsa de Pós-doutorado a segunda autora.

Referências

CLARKSON, D.T.; HANSON, J.B. The mineral nutrition of higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 31, p. 239-298, 1980.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI, 1995. 60 p.
GREENWOOD, D.J.; GASTAL, F.; LEMAIRE, G; DRAYCOTT, A.; MILLARD, P.; NEETSON, J.J. Growth rate and % N of field grown crops: theory and experiments. **Annals of Botany**, v. 67, p. 181-190, 1991.

HAAHTELA, K.; WARTIOVAARA, T.; SUNDMAN, V.; SKUJINS, J. Root-associate N_2 fixation acetylene reduction by Enterobacteriaceae and *Azospirillum* strains in cold-climate spodosolos. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, p. 203-206, 1981.

HARA, S.; HASHIDOKO, Y.; DESYATKIN, R.V.; HATANO, R.; TAHARA S. High Rate of N_2 Fixation by East Siberian Cryophilic Soil Bacteria as Determined by Measuring Acetylene Reduction in Nitrogen-Poor Medium Solidified with Gellan Gum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 9, p. 2811-2819, 2009.

HUANG, L.; FENG-ZAO, T.; YONG-SHENG, S.; CAI-YUN, W.; SHENG-LONG, W.; WEI-QIU, L.; WEN, S. Biodiversity, abundance, and activity of nitrogen-fixing bacteria during primary succession on a copper mine tailings. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 78, p. 439-450, 2011.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 18, p. 4765-4774, 1998.

MARRA, L.M.; GRAZZIOTTI, P.H.; NUNES, U.R.; MOREIRA, F.M.S. Bactérias diazotróficas em sempre-viva. **Bioscience Journal**, v. 28, p. 17-24, 2012. Supplement 1.

PHAM, V.H.T.; KIM, J. Cultivation of unculturable soil bacteria. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 9, p. 475-484, 2012.

SANTANA, A.L. **Cana-de-açúcar**. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/plantas/cana-de-acucar/>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.