

ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS A RIZOSFERA DO *CEREUS JAMACARU*

Rodolpho Stephan Santos Braga (1); Thereza Marinho Lopes de Oliveira (1); Maria José de Britto Costa Fernandes (2).

(1) Universidade Federal do Rio Grande do Norte. rodolpho.stephan@gmail.com

(1) Universidade Federal do Rio Grande do Norte. thereza_marinhol@hotmail.com

(2) Universidade Federal do Rio Grande do Norte. majofernandes@gmail.com

Introdução

A maior parte em que o semiárido abrange é coberta pelo Bioma Caatinga, que possui temperatura média anual elevada e baixo índice pluviométrico que varia entre 250 e 800 mm (MAIA, 2004). Perfazendo uma área com mais de 800.000 Km², correspondendo a quase 10% do território nacional e 70% do nordestino (IBGE, 2012).

Esse bioma apresenta uma rica biodiversidade, uma alta variedade de espécies endêmicas, heterogeneidade, assim como espécies com alta adaptação à deficiência hídrica, porém dentre os biomas brasileiros, a caatinga é um dos mais degradados decorrente de atividades antrópicas. Entendemos que apesar de existir pouco conhecimento científico sobre o seu potencial biotecnológico, nestas condições extremas, há a hipótese de que os microrganismos dessa região desenvolveram mecanismos de adaptação para sobrevivência às condições adversas assim como as plantas existentes neste bioma (GIULIETTI, 2004; FERREIRA, 2012).

Conforme Melo (2000) a rizosfera pode ser definida como a região do solo que é influenciada pela raiz da planta, com um ambiente rico em nutrientes e consequentemente em microrganismos, estes microrganismos residentes na rizosfera podem beneficiar ou prejudicar a planta e assim influenciar diretamente o desenvolvimento dos mesmos.

O solo é o principal reservatório de agentes microbianos de controle biológico, sendo o solo rizosférico preferido para isolamento de bactérias colonizadoras de raízes. E dentre essas bactérias encontram-se dois grupos que possuem razoável eficiência no controle, o primeiro é da família *Pseudomonadaceae*, onde se destaca o gênero *Pseudomonas*, e o segundo da família *Bacillaceae*, que são bactérias com capacidade de esporular, onde se destaca o gênero *Bacillus*.

Algumas espécies do gênero *Pseudomonas* são capazes de liberar fitormônios como o ácido indolacético (AIA), giberelinas ou citocininas na rizosfera de plantas, exercendo um efeito estimulador do crescimento da planta (LUGTENBERG, 2009).

Dentre as cactáceas, encontra-se o *Cereus jamacaru* (mandacaru), uma das plantas mais características do semiárido nordestino. De porte arbóreo, tronco muito grosso e ramificado, coberto de espinhos e fornecendo madeira de até 30 centímetros de largura (Lima, 1989).

Dessa forma, este trabalho, teve como objetivo realizar o isolamento de bactérias rizosféricas presente no mandacaru, dando ênfase as espécies dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*.

Metodologia

Para realizar o isolamento das bactérias foi utilizada uma amostra de solo da rizosfera do *Cereus jamacaru* (mandacaru), coletada no campus central da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em seguida transportada ao Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (LABMED) – UFRN. A metodologia deste trabalho foi baseada e adaptada dos trabalhos de Melo *et al.* (2000). Para isso, um frasco de vidro cor âmbar estéril e ferramentas esterilizadas, foram utilizadas para abrir um buraco no solo ao redor da planta e assepticamente, remover o solo a uma distância de aproximadamente 1cm da raiz. As amostras de solo foram então pesadas e 10g da amostra foi diluída em 90 mL de solução salina estéril (0,85g NaCl; 100mL H₂O), a qual foi em seguida agitada por 15 minutos. Após a agitação foram realizadas diluições decimais seriadas da amostra, onde 1,0 mL da solução inicial foi inoculada em tubos de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina até a diluição 10⁻⁵, fazendo agitação no Vortex de 30 segundos antes de realizar a próxima diluição.

A partir de 100 µL das diluições 10⁻³ e 10⁻⁵, adaptado de Araújo (2013), e através da técnica de Spread-Plate (plaqueamento por espalhamento), foram semeadas em dois diferentes meios de cultura sólidos: Ágar Nutriente (Peptona de Gelatina 5,0g/L; Extrato de Carne 3,0g/L; Ágar 15,0g/L) e o Ágar Cetrimide (Extrato Pancreático de Gelatina 20,00g/L; Cloreto de Magnésio 1,40g/L; Sulfato de Potássio 10,00g/L; Cetrimida 0,30g/L; Ágar 15,00g/L). Dessa forma, o plaqueamento foi realizado em duplicata e as placas foram incubadas em estufas a 30^oC e 37^oC, e as leituras realizadas em dois (2) e até seis (6) dias.

As placas que apresentaram crescimento no segundo dia, foi realizada a contagem das colônias e verificada o seu tipo morfológico, as que só apresentaram crescimento com seis dias

procedeu-se da mesma forma. As colônias que cresceram em AC, com morfologia semelhante ao gênero *Pseudomonas* foi realizada a prova da oxidase. A determinação da oxidase é um teste diferencial importante na identificação da família *Pseudomonaceae*, pois apresentam oxidase positiva. Todas as colônias foram selecionadas, purificadas e feita a coloração de Gram, sendo em seguida estocadas em meio de AN em tubo inclinado para posterior identificação e análise da atividade antimicrobiana.

Resultados e Discussão

Tabela 1. Densidade populacional de bactérias associadas a rizosfera da espécie mandacaru (*Cereus jamacaru*), nos meios AN e AC em diferentes diluições e temperaturas, com dois (2) e seis (6) dias.

Diluições	Dias	Meios de cultura	Temperatura °C	Densidade populacional UFC/g
10 ⁻³	2	AN	37	1,9 x 10 ⁵
10 ⁻³	2	AC	30	6,0 x 10 ⁵
10 ⁻³	2	AN	30	6,0 x 10 ⁴
10 ⁻³	6	AC	37	9,0 x 10 ⁴
10 ⁻⁵	6	AC	30	8,0 x 10 ⁶
10 ⁻⁵	6	AN	37	5,0 x 10 ⁶
10 ⁻⁵	6	AC	37	1,3 x 10 ⁷
10 ⁻⁵	6	AN	30	S/C

AN = Agar Nutriente AC = Agar Cetrimide S/C = sem crescimento

A quantificação das bactérias no AN e no meio AC, contidas na amostra de solo rizosférico coletada da espécie mandacaru, estão apresentadas na Figura 1. O número de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias no AC e no meio AN, foi de 1,3 x 10⁷ UFC/g a 8,0 x 10⁶ UFC/g e 1,9 x 10⁵ a 5,0 x 10⁶ respectivamente. Observamos que a densidade populacional foi mais elevada no meio AC, nas duas temperaturas e em ambas as diluições, em comparação ao meio AN, com

dois e seis dias de incubação, apesar do AC ser um meio seletivo para o gênero *Pseudomonas*, mostrando talvez uma predominância dessa espécie na rizosfera. Enquanto AC mostrou melhor crescimento a 30°C no AN a melhor temperatura de crescimento foi 37°C.

Avaliando o efeito das condições ambientais sobre populações microbianas, verificaram que na rizosfera, de modo geral, encontram-se maiores números de UFC/g de solo das populações microbianas, comparando-se com o solo não rizosférico, em amostras coletadas no Cerrado com vegetação nativa. A variação foi atribuída a condições climática, principalmente a distribuição desuniforme das chuvas. Essa desuniformidade da distribuição pluviométrica é, também, uma característica do Bioma Caatinga, portanto, a população microbiana pode sofrer influência do regime hídrico dessa região.

Na Tabela 2, podemos observar o aspecto colonial nos meios utilizados quanto às diferentes características morfológicas (tamanho, borda, aspecto e coloração).

Tabela 2. Tipos morfológicos encontrados na rizosfera da espécie mandacaru (*Cereus jamacaru*), de acordo com o meio de cultura utilizado (AN e AC) e em diferentes temperaturas (30°C e 37°C).

Meio de cultura	Tipos de colônias observadas
Ágar Nutriente (AN)	Rugosa com pigmento alaranjado; rugosa elevada com pigmento difuso; branca rugosa espreada; branca leitosa com bordas irregulares; branca pequena; branca mucóide.
Ágar Cetrimide (AC)	Rugosa branca com bordas irregulares; branca mucóide; branca rugosa pequena com bordas regulares.

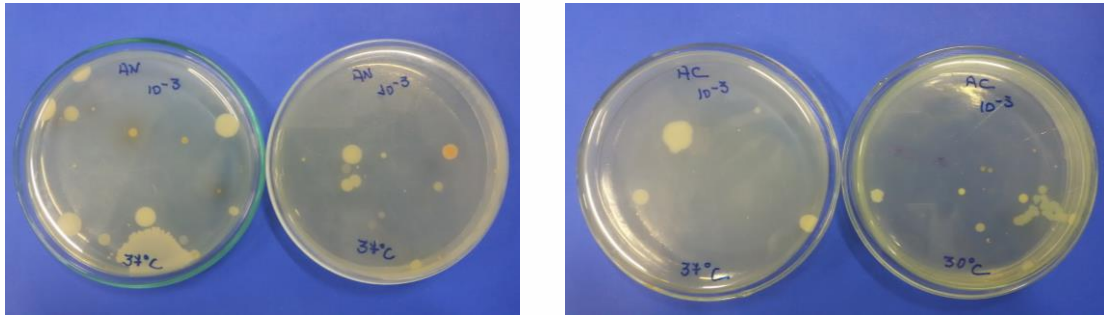


Figura 1. Isolamento de bactérias do solo rizosférico da planta mandacaru, apresentando diferentes tipos morfológicos nos meios de cultura Ágar Nutriente e Ágar Cetrímide na diluição 10^{-3} a 37°C .

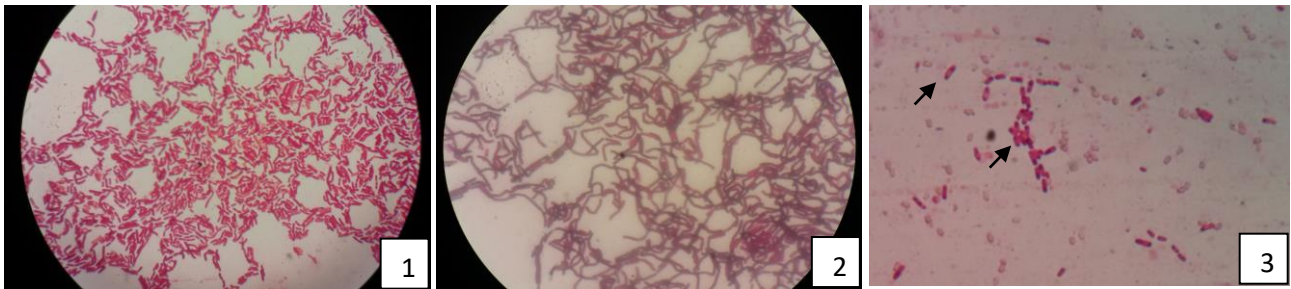


Figura 2. Morfologia bacteriana após coloração de Gram. (1) bacilos Gram negativos (2) bacilos Gram positivo, (3) bacilos esporulados.

Na Figura 1, vemos o crescimento das colônias com suas características morfológicas, nos diferentes meios, na diluição 10^{-3} e nas duas temperaturas, enquanto a Figura 2, mostra a coloração de Gram. Através dessa coloração é possível identificar e diferenciar os dois principais grupos de bactérias, Gram-positivas e Gram-negativas, além permite visualizar a forma, o arranjo e a presença de esporo.

Conclusão

Este trabalho evidencia a importância de estudos da microbiota do solo rizosférico e mostra a necessidade de mais experimentos para a caracterização das bactérias isoladas do Bioma caatinga. Entendemos, que existe uma dinâmica dos microrganismos no solo e na rizosfera e as flutuações numéricas destes ao longo do tempo. Portanto é necessário realizar coletas em diferentes épocas do ano para verificar a ocorrência de diferença na densidade bacteriana dessa população.

Referências

- CORRÊA, G.G.; SILVA, I.L.; LINS, M.R.C.R.; SILVA, W.O.; LOPES, W.; ARAÚJO, E.A.; VASCONCELOS, N.M.; FONTES-VIEIRA, J.M.; SILVA, D.T.F.; LIMA, G.M.S.; ARAÚJO, J.M. **Isolamento e atividade antimicrobiana de actinobactérias da rizosfera da caatinga.** In: I CONICBIO/ II CONOBIO/ VI SIMCBIO, V.2, 2013, Recife. Anais... Recife: UNICAP, 2013. p. 2-11.
- FERREIRA, C. **Descoberta metagenômica da dinâmica do microbioma da rizosfera de Mandacaru na Caatinga.** 2014, Piracicaba. Biblioteca Virtual. Disponível em : <<http://www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/131539/dinamica-do-microbioma-da-rizosfera-de-mandacaru-na-caatinga/>>. Acesso em 27 set. 2017. p. 25-26. 2014.
- GIULIETTI, A. M. et al. 2004. **Diagnóstico de vegetação nativa do bioma Caatinga.** In: J.M.C. SILVA, M. Tabarelli, M.T. FONSECA & L.V. LINS (orgs.). Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. p. 48-90.2004.
- GONÇALVES, G. S. **Estratégias de controle de invasão biológica por *Prosopis juliflora*, na Caatinga e ecossistemas associados.** 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Areia.
- IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Mapas de biomas e de vegetação.** Disponível em: <<https://ww2.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>>. Acesso em: 27 set. 2017.
- LIMA, D. A., 1989. **Plantas da Caatinga.** Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências. 1989.
- LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. **Plant-growth-promoting rhizobacteria.** Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v. 63, p. 541–556, 2009.
- MAIA, G. N. **Caatinga: Árvores e arbustos e sua utilidades.** 2. ed. Fortaleza: Printcolor Gráfica e Editora, 2012.
- MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle biológico.** v. 3. Jaguariúna, SP. EMBRABA Meio Ambiente, 2000.