



## Caracterização de bactérias endofíticas isoladas de bananeira

PEDRO THIAGO MEDEIROS PAIXÃO, Debora Franciene Gomes Silva Pereira, ANUNCIENE BARBOSA DUARTE, Gleika Larisse Oliveira Dorasio de Souza, Bruno Rafael Alves Rodrigues, Silvia Nietzsche, Adelica Aparecida Xavier

### Introdução

A bananeira (*Musa spp.*) é uma das fruteiras mais cultivadas em todo território nacional. As exportações brasileiras de banana somaram 82 mil toneladas de janeiro a outubro de 2013, alta de 8% frente ao mesmo período de 2012, segundo a Secretaria de Comércio Exterior (Secex) [1]. Minas Gerais apresenta produtividade de 16.456 kg/ha, superior ao rendimento médio nacional (14.282 kg/ha). A produção mineira se concentra na região Norte, beneficiada pelo sistema de produção irrigada, sendo os principais municípios produtores: Jaíba, Janaúba e Matias Cardoso, que respondem por 27,4% da produção estadual [2].

A cultura da banana é uma planta muito exigente em nutrientes, principalmente potássio (K) e nitrogênio (N) [3]. Sendo o nitrogênio um elemento muito instável no solo, passível de inúmeras possibilidades de perdas [4], uma das formas de se potencializar esse nitrogênio no solo é através da simbiose com microrganismos fixadores. A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é considerada um dos processos biológicos mais importantes, no qual alguns gêneros de bactérias captam o nitrogênio presente no ar, tornando-o assimilável pelos vegetais [5].

Assim como outras plantas, a bananeira está associada a microrganismos, que podem trazer benefícios às mesmas. Dentre estes, estão as bactérias endofíticas, que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízos ao seu hospedeiro (Hallmann et al., 1997) [6]. Eles ocorrem em muitas, senão em todas as plantas cultiváveis, e um dos benefícios que podem trazer, é a fixação de N, atuando no interior das plantas [7].

Diante deste contexto o objetivo deste trabalho foi caracterizar bactérias endofíticas isoladas de raízes de bananeira com relação a fixação biológica de nitrogênio.

### Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Montes Claros, campus de Janaúba – MG. As bactérias utilizadas foram coletadas nos municípios: Nova Porteirinha (seis áreas de plantio), Janaúba (duas áreas de plantio), Jaíba (cinco áreas de plantio), Porteirinha (uma área de plantio) e Matias Cardoso (uma área de plantio).

Inicialmente foi feita uma triagem entre os 38 isolados (Tabela 1) com o intuito de definir quais isolados possuíam a capacidade de crescer em meio NFB semi-sólido isento de nitrogênio. O meio de cultura utilizado foi composto por 5,0g de ácido málico; 0,5g de  $K_2HPO_4$ ; 0,2g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,1 g de NaCl; 0,02g de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 2mL de solução de micronutrientes (0,04g de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ; 1,20g de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 1,40g de  $H_3BO_3$ ; 1,00g de  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ; 1,175g de  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ; em um litro de solução); 2mL de azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2N KOH); 4mL de Fe-EDTA (solução a 1,64%); 1mL de solução de vitaminas (10mg de biotina; 20mg de piridoxol-HCl; em 100mL de solução); 4,5g de KOH, para preparo de um litro de meio. O pH deste meio foi ajustado para 6,8 e acrescido 1,8g de ágar, caracterizando o estado semissólido (DOBEREINER *et al.*, 1995) [8]. Para a realização do ensaio os isolados foram cultivados primeiramente em meio TSA (*Triptic Soy Agar*), durante 48 horas.

Após o crescimento bacteriano foi realizada a raspagem das placas adicionando-se solução salina 0,85% as células bacterianas, obtendo-se assim uma suspensão bacteriana, em condições assépticas de câmara de fluxo laminar. Após esta etapa, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm para precipitação das células bacterianas. A ressuspensão foi realizada por meio da adição de solução salina a 0,85%. Inoculou-se 250  $\mu$ L dessa suspensão bacteriana ajustada a DO de 0,5 de absorbância (aproximadamente  $10^8$  ufc/mL<sup>-1</sup>) em comprimento de onda de 540 nm em espectrofotômetro, em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio NFB semissólido. Os tubos de ensaio foram incubados em temperatura de 28°C por dez dias, quando foi observado o crescimento bacteriano.

Após a realização da triagem inicial os isolados que apresentaram capacidade de crescimento foram selecionados para o ensaio da atividade da nitrogenase em cromatografia gasosa.

### Resultado e Discussão

Dentre as bactérias isoladas apenas 23,68% (*Bacillus subtilis*, isolados 13 e 112; *Bacillus safensis*, isolado 20; *Bacillus pumilus*, isolados 29 e 61; *Bacillus megaterium*, isolado 36; *Bacillus thuringiensis*, isolado 105; *Bacillus amyloliquefaciens*, isolado 171 e *Rhizobium* sp, isolado 112) foram capazes de demonstrar crescimento em meio NFb após dez dias de inoculação (Tabela 1). Em relação aos outros gêneros identificados somente o isolado 115, do gênero *Rhizobium* sp., também demonstrou a mesma habilidade

Com relação à caracterização bioquímica das bactérias diferentes habilidades múltiplas foram observadas entre os isolados avaliados. Devido ao crescimento lento em meio livre de nitrogênio e pela incapacidade de redução do acetileno em cromatografia gasosa, podemos sugerir que as bactérias apresentam uma baixa capacidade para FBN. Não podendo portanto serem descritas como rizobactérias diazotróficas. Em contrapartida, Martinez *et al.*, (2003) [9], e Ngamau *et al.*, (2012) [10], indicaram a presença de bactérias diazotróficas isoladas a partir da cultura da bananeira.

## Conclusão

As bactérias endofíticas isoladas a partir de raízes de bananeira não apresentam grande potencial para fixação biológica de nitrogênio.

## Referências

- [1] <http://www.mercadodocacau.com/noticia/23978/brasil-exporta-22-por-cento-a-mais-de-banana-para-o-mercosul-em-2013.html>
- [2] FONTE: IBGE – PESQUISA AGRÍCOLA MUNICIPAL \*LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA (MAR 2013)
- [3] [http://www.cnpmf.embrapa.br/index.php?p=perguntas\\_e\\_respostas-banana.php](http://www.cnpmf.embrapa.br/index.php?p=perguntas_e_respostas-banana.php)
- [4] [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoVarzeaTropical/manejo\\_nitrogenio.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoVarzeaTropical/manejo_nitrogenio.htm)
- [5] <http://www.agrosustentavel.com.br/downloads/fbn.pdf>
- [6] HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, v.43, p.895-914, 1997.
- [7] <http://www.scielo.br/pdf/pab/v42n1/06.pdf>
- [8] DÓBEREINER, J. *et al.*, Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. 60p.1995.
- [9] MARTÍNEZ, L. *et al.* Diazotrophic bacteria associated with banana (*Musa* spp.). *Plant and Soil*, v. 257, n. 1, p. 35-47, 2003.
- [10] NGAMAU, C. N. *et al.* Isolation and identification of endophytic bacteria of bananas (*Musa* spp.) in Kenya and their potential as biofertilizers for sustainable banana production. *African Journal of Microbiology Research*, v. 6, n. 34, p. 6414-6422, 2012.

Tabela 01: Caracterização dos isolados de bactérias endofíticas quanto ao crescimento em meio NFb.

<b>Isolados</b>	<b>Organismo mais relacionado</b>	<b>Crescimento em meio NFb</b>
6	<i>Bacillus pumilus</i>	-
13	<i>Bacillus subtilis</i>	+
18	<i>B. axarquiensis</i>	-
20	<i>Bacillus safensis</i>	+
22	<i>K. pneumoniae</i>	-
29	<i>Bacillus pumilus</i>	+
31	<i>Bacillus subtilis</i>	-
36	<i>B. megaterium</i>	+
43	<i>Bacillus pumilus</i>	-
59	<i>Bacillus pumilus</i>	-
61	<i>Bacillus pumilus</i>	+
78	<i>Bacillus pumilus</i>	-
80	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-
86	<i>Bacillus subtilis</i>	-
93	<i>Bacillus subtilis</i>	-
97	<i>Bacillus subtilis</i>	-
100	<i>Enterobacter sp.</i>	-
102	<i>Bacillus sp.</i>	-
105	<i>Bacillus thuringiensis</i>	+
112	<i>Bacillus subtilis</i>	+
115	<i>Rhizobium sp.</i>	+
119	<i>Bacillus safensis</i>	-
123	<i>Bacillus subtilis</i>	-
130	<i>Bacillus altitudinis</i>	-
131	<i>Bacillus cereus</i>	-
135	<i>Bacillus pumilus</i>	-
137	<i>Bacillus safensis</i>	-
142	<i>Bacillus subtilis</i>	-
156	<i>Bacillus subtilis</i>	-
163	<i>Bacillus safensis</i>	-
171	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+
172	<i>Bacillus subtilis</i>	-
173	<i>Bacillus altitudinis</i>	-
177	<i>Bacillus pumilus</i>	-
179	<i>Bacillus pumilus</i>	-
189	<i>Bacillus pumilus</i>	-
192	<i>Bacillus cereus</i>	-

---

+ positivo para a reação; - negativo para a reação