



## Caracterização Morfológica e Bioquímica de Rizobactérias Isoladas do Solo de uma Floresta Tropical Seca

Cláudia Maria da Silva, France Anne Dias Ruas, Jéssica Simões Pereira, Luiz Felipe da Silva Xavier, Henrique Maia Valério, Regina Cássia Ferreira Ribeiro

### Introdução

As Rizobactérias Promotoras de Crescimento (RPCP's) são bactérias que, em geral, podem ser classificadas em RPCPs extracelulares (eRPCP), quando presentes na rizosfera, no rizoplano ou nos espaços entre as células do córtex da raiz, e em RPCP's intracelulares (iRPCP), quando presentes no interior de células de raízes, geralmente em estruturas nodulares especializadas [1]. Dentre os grupos estudados, as principais RPCP's são encontradas entre as *Pseudomonas* spp. não fluorescentes e fluorescentes; espécies de *Bacillus*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Acetobacter* e *Herbaspirillum*; *Agrobacterium radiobacter*, *Enterobacter cloacae* e *Burkholderia cepacia* [2].

O objetivo deste trabalho foi realizar a identificação morfológica e bioquímica de rizobactérias isoladas de solo de uma Floresta Tropical Seca.

### Material e métodos

#### A. Área de estudo

O estudo foi realizado em três unidades de conservação (UCs) no Norte de Minas Gerais: na Reserva Biológica do Jaíba (criada em 1976, com 6.358 ha), no Parque Estadual Lagoa do Cajueiro (1998; 20.500 ha) e na Reserva Biológica Serra Azul (1998; 7.200 ha), localizados nos municípios de Matias Cardoso e Jaíba, no Vale do Médio Rio São Francisco.

#### B. Amostragem dos isolados de rizobactérias e caracterização morfológica

Para a obtenção dos isolados da rizosfera foi utilizada a metodologia proposta por Döbereiner *et al.* [3]. Após 24 horas de crescimento em estufa a 35 °C a leitura das colônias foi realizada e foram agrupadas em morfoespécie. Para isso, observaram-se os aspectos macromorfológicos das colônias, como a cor, tamanho, forma, crescimento, opacidade, superfície, borda, elevação e produção de muco. O agrupamento morfológico foi realizado considerando-se que os isolados tivessem no mínimo 5 características em comum. Cada colônia, representante de uma morfoespécie foi transferida para meio de cultura (APC) em placas para isolamento. Estes isolados foram levados para estufa à 35 °C por 24 horas. Após o crescimento, foi retirada uma alçada de cada isolado que foram colocados em meio de cultura padrão, em tubos de ensaio inclinado, e novamente foram levados para crescimento nas condições anteriormente descritas. Após o crescimento no tubo de ensaio foi retirada uma alçada de cada isolado que foi armazenada em microtubo com solução salina 0,85 % mantida em geladeira a 4 °C para análises posteriores.

#### C. Coloração de Gram

Esfregaços homogêneos em lâminas foram realizados e, depois de secos, foram fixados com calor. O esfregaço foi corado por cerca de 1 minuto com solução de cristal violeta (Laborclin, Brasil) e em seguida lavado com água corrente. Cobriu-se o esfregaço com solução de lugol (Laborclin, Brasil) por cerca de 1 minuto e, posteriormente, lavou-o com água corrente. O esfregaço foi descorado com solução de etanol + acetona 50% v/v e novamente lavado com água corrente. Logo após, foi realizada a contra-coloração com safranina por 1 minuto e lavagem final com água corrente. Após a secagem, as lâminas foram observadas em microscópio para serem classificadas em Gram-positivas e Gram-negativas.

#### C. Teste de catalase

Em uma lâmina foi colocada uma gota de peróxido de hidrogênio a 10% (v/v). Uma amostra (colônia colhida com uma alça de inoculação) de bactérias com 24 horas de crescimento foi aplicada sobre essa gota [4]. O aparecimento de bolhas caracteriza o organismo como catalase-positivo. As bolhas são formadas pelo oxigênio molecular liberado na reação.



## Resultados e Discussão

A caracterização morfológica permitiu agrupar as morfoespécies encontradas em três grupos (Grupo 1: Morfo1, Morfo2 e Morfo3; Grupo 2: Morfo4, Morfo6, Morfo7 e Morfo8; Grupo 3: Morfo5 e Morfo9). O diagrama de Venn (Figura 1) demonstra que 3 das 9 características morfológicas (Tabela 1) são comuns a todos os grupos. O grupo 1 e grupo 2 possuem quatro características morfológicas em comum (crescimento, opacidade, elevação e produção de muco). O grupo 2 e o grupo 3 compartilham 3 características morfológicas (crescimento, opacidade e elevação). O grupo 3 e o grupo 1 compartilham 3 características morfológicas (crescimento, opacidade e elevação). O agrupamento das morfoespécies permitiu verificar que existe uma alta similaridade entre as morfoespécies de cada grupo, indicando que provavelmente são muito próximas. Quanto à resposta a coloração de Gram e teste de catalase, a maioria dos isolados foi positivo (Tabela 1). É necessário submeter os isolados deste estudo à análise molecular para verificar de quais rizobactérias se tratam.

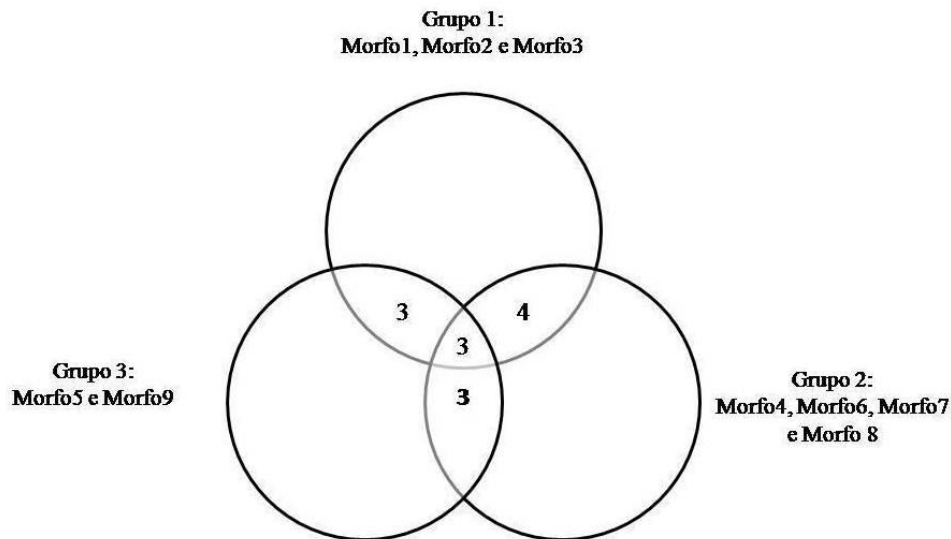
Neste trabalho, o conhecimento da diversidade morfológica e da caracterização bioquímica dos microrganismos estudados foi considerado e, através da separação das colônias em morfoespécie e da sua identificação bioquímica é possível analisar a riqueza e abundância em função de parâmetros como, por exemplo, estágio e estação do ano. Muitos trabalhos ainda são realizados considerando a classificação de bactérias em gênero [5] ou ainda considerando apenas os aspectos morfológicos para identificação, demonstrando assim a importância da identificação preliminar de microrganismos que serve como base para trabalhos futuros [6].

## Conclusão

Os resultados para a morfologia, coloração de Gram e para o teste de catalase mostram que os isolados possuem características muito próximas. Esses isolados devem ser submetidos às técnicas moleculares e identificados para verificar se revelam novas *Taxa* de rizobactérias bem como para confirmar aquelas já descritas.

## Referências

- [1] GRAY E, J. & SMITH, D. L. (2005) Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 395-412.
- [2] MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P. & DONATO, V. M. S. (2004). Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, Recife 1: 89-111.
- [3] DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D. & BALDANI, J. I. (1995). Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Rio de Janeiro: **EMBRAPA-CNPAB**, 60p.
- [4] TRABULSI, L. R. & ALTERTHUM (2005). *Microbiologia*. 4º ed., Atheneu, São Paulo.
- [5] RIBEIRO, C. M. & CARDOSO, E. J. B. N. (2011). Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). *Microbiol Res*, doi:10.1016/j.micres.2011.03.003.
- [6] SILVA, T. F. & MELLONI, R. (2011). Densidade e diversidade fenotípica de bactérias Diazotróficas não simbióticas em solos da Reserva biológica serra dos Toledos. Itajubá (MG) *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, 35: 359-371.



**Figura 1.** Diagrama de Venn mostrando as interseções entre os grupos de Morfoespécies encontradas.

**Tabela 1.** Características morfológicas e bioquímicas das colônias das 9 morfoespécies.

Morfo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>Morfológico</b>									
Cor	branca	branca	creme	creme	branca	creme	creme	creme	amarela
Tamanho (mm)	<1	<1	>2	1 a 2	>2	1 a 2	>2	1 a 2	>2
Forma	circular	circular	espalha	filiforme	ramificada	circular	espalha	radiada	espalha
Crescimento	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h
Opacidade	opaca	opaca	opaca	opaca	opaca	opaca	opaca	opaca	opaca
Superfície	lisa	lisa	lisa	rugosa	rugosa	lisa	lisa	lisa	lisa
Borda	perfeita	perfeita	perfeita	ondulada	ondulada	perfeita	perfeita	perfeita	perfeita
Elevação	plana	plana	plana	plana	plana	plana	plana	plana	plana
Muco	não	não	não	não	não	não	não	não	sim
<b>Bioquímico</b>									
Forma	cocos	cocos	estreptobacilos	bacilos	estreptobacilos	bacilos	bacilos	bacilos	cocos
Gram	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo
Catalase	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo