



I Encontro Regional de Estudos Agroambientais

Responsabilidade Socioambiental da Pesquisa Científica

03 a 05 de dezembro de 2018, Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Alagoas

Diversidade de bactérias endofíticas associadas à Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)

Rafaela Ferreira da Silva Costa¹, Nayane Nathaly dos Santos Silva², Carolyne Beatriz Pereira Lima³, Nayane Matias Silva⁴, José Wesley Gabriel da Silva⁵, Laryssa Roberta Alves Farias⁶, Esmeralda Aparecida Porto Lopes⁷.

¹PIBIC; Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Alagoas-Campus I, Arapiraca – AL. E-mail: rafaelauneal2014@gmail.com; nayaneuneal2014@gmail.com; carol.lima25@outlook.com; nayanematias32@gmail.com; gabrielwess@gmail.com; laryssaalves074.lr@gmail.com; eportolopes@yahoo.com.br.

Resumo: Micro-organismos endofíticos são aqueles que habitam internamente nos tecidos vegetais pelo menos uma parte do seu ciclo de vida, sem causar dano aparente, podendo auxiliar no crescimento e desenvolvimento, realizando fixação biológica de nutrientes. Sabendo que a adubação química pode ter um alto custo benefício, e que para a maioria dos produtores familiares torna-se uma prática inviável. São necessários estudar tecnologias que envolvam o processo de fixação biológica de Nitrogênio com a finalidade de possibilitar a sustentabilidade na agricultura. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi de isolar bactérias endofíticas da mandioca da variedade Caravela. Foram utilizados os meios TSA; JNFB; LGI-P; LGI; NFB sólidos seletivos para crescimento de bactérias diazotróficas, inoculadas em três repetições, avaliadas suas características e realizado o teste de gram. Após as inoculações, os meios foram incubados em estufa bacteriológica e mantidos a uma temperatura de 31 °C. Os homogeneizados no agitador orbital, nos meios TSA, JNFB, LGI, LGI-P e NFB cresceram 4; 0; 0; 0 e 1 colônias, respectivamente e centrifuga, observou-se que nos meios cresceram 4; 0; 1; 1 e 2 colônias respectivamente. As possíveis estirpes de bactérias endofíticas presentes nas manivas da variedade Caravela podem ser dos gêneros *Bacillus*, *Azospirillum* e *Burkholderia*.

Palavras-chave: Biotecnologia, inoculação de diazotróficas, bactérias endofíticas.

Diversity of endophytic bacteria associated with Manihot (*Manihot esculenta* Crantz)

Abstract: Endophytic microorganisms are those that inhabit internally in the vegetal tissues at least a part of its life cycle, without causing apparent damage, being able to aid in the growth and development, realizing biological fixation of nutrients. Knowing that chemical fertilization can be very cost effective, and that for most of the family growers it is an impractical practice. It is necessary to study technologies that involve the biological Nitrogen fixation process in order to enable sustainability in agriculture. Therefore, the objective of the present study was to isolate endophytic bacteria from cassava of the Caravela variety. TSA media were used; JNFB; LGI-P; LGI; NFB solids selective for growth of diazotrophic bacteria, inoculated in three replicates, evaluated its characteristics and performed the gram test. After the inoculations, the media were incubated in a bacteriological oven and maintained at a temperature of 31 °C. The homogenized in the orbital shaker, media TSA, JNFB, LGI, LGI-P and NFB increased 4; 0; 0; 0 and 1 colonies, respectively and centrifuged, it was observed that in the media grew 4; 0; 1; 1 and 2 colonies respectively. The possible strains of endophytic bacteria present in the caravels of the Caravela variety may be of the genus *Bacillus*, *Azospirillum* and *Burkholderia*.

Key words: Biotechnology, inoculation of diazotrophs, endophytic bacteria.



I Encontro Regional de Estudos Agroambientais

Responsabilidade Socioambiental da Pesquisa Científica

03 a 05 de dezembro de 2018, Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Alagoas

INTRODUÇÃO

Micro-organismos endofíticos são aqueles que habitam, pelo menos por um período de seu ciclo de vida, nos tecidos internos de um vegetal, como raízes, folhas e caules, mas não causam aparentemente nenhum dano a seus hospedeiros (AZEVEDO, 1998; HOLDERNESS et al., 2000). Eles ocorrem em muitas, senão em todas as espécies de plantas cultiváveis, exercendo diversas funções de importância para o hospedeiro, como por exemplo, a proteção das plantas ao ataque de insetos, de doenças e ao ataque de mamíferos herbívoros por meio da produção de toxinas (AZEVEDO et al., 2002; STROBEL et al., 2004). Estes micro-organismos também exercem benefícios que promovem o crescimento das plantas através de mecanismos como: fixação biológica de nitrogênio (MOREIRA et al., 2013).

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), apesar de apresentar grande capacidade de adaptação a condições extremas, extrai elevadas quantidades de nutrientes do solo, principalmente N, e o custo dos adubos químicos e/ou orgânicos, quando adquiridos fora da propriedade, pode chegar a 35%-40% do custo da produção, o que torna esta prática inviável para a maioria dos pequenos agricultores (SOUZA et al., 2006). Então, verifica-se que nesses modelos de agricultura, tecnologias que envolvam o processo de fixação biológica de nitrogênio muitas vezes afirmam-se como a única possibilidade de viabilização de sustentabilidade da agricultura (GLICK, 2012). Nesse contexto, embora a cultura da mandioca apresente uma elevada ocorrência de bactérias diazotróficas (BALOTA et al., 1999; TEIXEIRA et al., 2007) determinar a diversidade de bactérias diazotróficas, nesta cultura com variedade agrícolas em Alagoas é fundamental para o

desenvolvimento de pesquisas básicas e aplicadas, permitindo não só no acúmulo de dados sobre estes micro-organismos, mas também, na seleção destes mais eficientes para maximizar a produtividade da mandioca, e com isso possibilitar a transferência/inclusão da tecnologia de inoculantes microbianos no programa da mandioca. Mediante o exposto, os objetivos do presente estudo foi o de isolar micro-organismos endofíticos da mandioca.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento das bactérias endofíticas na mandioca

Para o isolamento das bactérias, foram coletadas manivas (*M. esculenta* Crantz) da variedade Caravela de forma aleatória em um cultivo de mandioca localizado no povoado Bananeira no município de Arapiraca-AL. As coordenadas de satélite de Bananeiras são: latitude 9°49'0"S e longitude 36°37'0"W. As manivas foram lavadas em água corrente e sabão e após este procedimento, foram desinfestadas superficialmente segundo método descrito por Araújo et al. (2002), modificado com: álcool 70% (1 min), hipoclorito de sódio 2% (6 min), álcool 70% (30 s) e, posteriormente enxaguadas 3 vezes com água destilada. Sob condições assépticas, foram, então, cortadas em pequenos pedaços de 10 gramas colocadas em centrífuga e no agitador orbital com solução salina obtendo-se, assim, uma suspensão. Desta suspensão obtida, considerada como a diluição 10^{-1} , foi realizada a série de diluições até 10^{-9} em solução salina contida em tubos de ensaio, utilizando-se pipetador automático.

Foram utilizadas as últimas três diluições (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9}) com três repetições para o cultivo nos meios selecionados para o isolamento das



I Encontro Regional de Estudos Agroambientais

Responsabilidade Socioambiental da Pesquisa Científica

03 a 05 de dezembro de 2018, Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Alagoas

bactérias endofíticas. Com outra ponteira estéril, começando da maior diluição para as menores, retirou-se 0,1 ml e foi depositado em placas de petri contendo os meios Agar Triptona de Soja da marca Himedia (TSA) para isolar bactérias endofíticas do gênero *Bacillus*, o meio utilizado para avaliar as duas espécies de *Herbaspirillum* utilizadas no inoculante sendo valor de contagem a média das duas espécies (JNFB); o seletivo para *Gluconacetobacter diazotrophicus* - sacarose 10% (LGI-P); o seletivo para *Azospirillum amazonense* - sacarose 0,5% (LGI); e o meio seletivo para isolar *Azospirillum spp* (NFB). Destes meios sólidos citados acima, os que são para isolar, crescer e conservar bactérias diazotróficas são os: JNFB; LGI-P; LGI e NFB preparados segundo o Manual de Práticas Laboratoriais: um guia para pesquisa (FIGUEIREDO et al., 2013).

meios TSA, JNFB, LGI, LGI-P e NFB cresceram 4; 0; 1; 1 e 2 colônias respectivamente.

Caracterização morfológica

As tabelas 1 e 2 mostram as características de cada uma das colônias quanto à cor, textura, forma, margem e elevação.

Contagem das colônias

As placas foram incubadas à temperatura específica (à 31 °C), até o aparecimento de colônias contabilizadas individualmente pelas características apresentadas.

Diferentes colônias foram isoladas e os seus micro-organismos analisados macroscópica e microscopicamente. As bactérias foram ainda avaliadas sob microscopia óptica quanto à sua morfologia e coloração de Gram (gram-positivas ou gram-negativas).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantidade de colônias isoladas da mandioca, variedade caravela que foram suspensas utilizando a técnica do agitador orbital, nos meios TSA, JNFB, LGI, LGI-P e NFB cresceram 4; 0; 0; 0 e 1 colônias, respectivamente. Já usando a técnica da centrifuga, observou-se que os



I Encontro Regional de Estudos Agroambientais

Responsabilidade Socioambiental da Pesquisa Científica

03 a 05 de dezembro de 2018, Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Alagoas

Tabela 1. Morfologia das colônias na técnica do agitador orbital

Meios	Colônias	Meios de cultivo				
		Cor	Textura	Forma	Margem	Elevação
TSA	A	Nude	Sólida	Circular	Inteira	Convexa
	B1	Branca	Cremosa	Circular	Ondulada	Umbilicada
	B2	Bege	Cremosa	Circular	Lobada	Achatada
NFB	C	Amarelo	Cremosa	Irregular	Lobada	Achatada

Tabela 2. Morfologia das colônias na técnica da centrífuga

Meios	Colônias	Meios de cultivo				
		Cor	Textura	Forma	Margem	Elevação
TSA	B1	Branca	Cremosa	Circular	Lobada	Umbilicada
	D	Extremidade esbranquiçada com interior cinza	Cremosa	Circular	Inteira	Achatada
JNFB	E	Branca	Cremosa	Circular	Dentada	Umbilicada
LGI-P	F	Esbranquiçada	Sólida	Circular	Inteira	Achatada
NFB	G	Esbranquiçada com interior escuro	Cremosa	Circular	Filamentosa	Umbilicada
	H	Esbranquiçada com interior escuro	Cremosa	Circular	Filamentosa	Achatada

Caracterização fisiológica

As 13 colônias foram transferidas para seus meios específicos de crescimento e analisadas suas características fisiológicas, mas só quatro cresceram. Nas análises fisiológicas foi possível observar que as colônias apresentaram características semelhantes. A B1* apresentou coloração roxa sendo assim gram-positiva; B1 apresentou tanto colônias com coloração rosa como roxa sendo assim positiva e negativa; NFB* e NFB também positiva. 2 estirpes isoladas da técnica do agitador orbital, apresentaram o símbolo* como código de identificação as outras 2 são isoladas da técnica da centrífuga. Apenas a colônia B1 do meio TSA da centrífuga foi gram-negativa, no entanto as demais obtiveram resultados iguais sendo gram-positivas. Essas colônias de

bactérias endofíticas foram conservadas e farão parte do banco de bactérias da Universidade Estadual de Alagoas.

CONCLUSÕES

A técnica da centrífuga foi mais eficiente para suspender bactérias. As bactérias endofíticas cresceram no meio TSA. As possíveis estirpes de bactérias endofíticas presentes nas manivas da variedade Caravela podem ser dos gêneros *Bacillus*, *Azospirillum* e *Burkholderia*.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Alagoas e a professora do curso de Ciências



I Encontro Regional de Estudos Agroambientais

Responsabilidade Socioambiental da Pesquisa Científica

03 a 05 de dezembro de 2018, Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Alagoas
Biológicas, Esmeralda Aparecida Porto Lopes.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI JUNIOR, W.; ELSAS, J. D. VAN.; VUURDE, J. W. L. VAN.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interactions with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4906-4914, 2002.

AZEVEDO, J. L. **Micro-organismos endofíticos**. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (eds.). *Ecologia Microbiana*. Ed. EMBRAPA, Jaguariuna-SP. p 117-137, 1998.

BALOTA, E. L.; LOPES, E. S.; HUNGRIA, M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 1265-1276, 1999.

FIGUEIREDO, M.V.B.; ANTUNES, J.E.L.; RODRIGUES, A.C.; BARROS, B.G.F.; BARRETO, M.C.S.; PORTELA, R.W.S.; GABRIEL, A.L.; GOUVEIA, C.K.; SANTANA, M.V.S.; OLIVEIRA, W.M.; MORAES, R.L.C.; BURITY, H.A.; OLIVEIRA, J.P. **Manual de práticas laboratoriais: um guia para pesquisa**. 1^o ed. Recife, PE: Instituto Agrônomo de Pernambuco- IPA, cap. 2, p. 37, 2013.

GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 20, 2012.

HOLDERNESS, M.; BRIDGE, J.; GOLD, C.S. **Pest management in organic systems**. In: Holderness M, Sharrock S, Frison E, Kairo M (eds). *Organic banana: Towards an organic banana initiative in the Carribean*, IPGRI, Rome, pp. 133–142, 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, J. R.; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, p. 48, 2001.

MOREIRA, F.S.; LIMA, A.S.; JESUS, E.C.; SILVA, K.; NOBREGA, R.S.A.; FLORENTINO, L.A. **Bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico que nodulam leguminosas**. In: MOREIRA, F.S.; CARES, J.E.; ZANETTI, R.; STÜMER, S.L. *O ecossistema do solo: componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal*. Lavras: Ed. UFLA. cap.17, p. 325-340, 2013.

SOUZA, L.D.; SOUZA, L.S.; GOMES, J.C. Exigências edáficas da cultura da mandioca. In: SOUZA, L.S.; FARIAS, A.R.N.; MATTOS, P.L.P.; FUKUDA, W.M.G. SOUZA. **Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, cap. 8, p. 70-214, 2006.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257–268, 2004.

TEIXEIRA, M.A.; MELO, I.S.; VIEIRA, R.F.; COSTA, F.E.C.; HARAKAVA, R. Micro-organismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília- DF, v. 42, n. 1, p 43-49, 2007.