

## ISOLAMENTO BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM MUDAS DE EUCALIPTO

Rayka Kristian Alves Santos<sup>1\*</sup>, Joilson Silva Ferreira<sup>1</sup>, Joelma da Silva Santos<sup>1</sup>, Vinicius Alves Rodrigues<sup>1</sup>, Carmela Amália Scipioni<sup>1</sup>, Vitor Alves Monteiro da Silva<sup>1</sup>, Theilon Henrique de Jesus Macedo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia UESB- Campus de Vitória da Conquista, Estrada do Bem Querer, km 4, Caixa Postal 95 -Vitória da Conquista - BA CEP: 45083-900

\*e-mail: raykakristian@yahoo.com.br

---

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi isolar bactérias associadas à diferentes genótipos e clones de Eucalipto. Foram realizados três isolamentos: o primeiro com mudas com idade de 100 dias de *Eucalyptus urophylla* clone AEC144; o segundo com plantas de 190 dias dos clones AEC144 (*E. urophylla*) e 1528 (*E. urograndis*); e o terceiro com plantas de 130 dias de *E. urophylla*. Para o isolamento, amostras de 10g de raiz com solo aderido e 10 g de folha, foram coletadas, depois realizada diluição seriada de  $10^{-2}$  a  $10^{-7}$ . Alíquotas de 100  $\mu$ L, foram colocadas em triplicata em frascos de penicilina contendo os meios semissólidos isentos de nitrogênio: NFb, JNFb, JMV, LGI. A quantificação das bactérias foi realizada pela técnica do número mais provável.

**Palavras-chave:** *Eucalyptus urophylla*, bactérias diazotróficas, fixação biológica de nitrogênio.

### 1 INTRODUÇÃO

Conhecer a população de bactérias benéficas associadas à cultura que está sendo estudada é essencial, pois, é possível mensurar em qual etapa do crescimento da planta essas bactérias estarão interferindo, e quais bactérias serão utilizadas para determinados processos.

Nesse contexto, a etapa de isolamento e caracterização dessas bactérias faz-se necessário, pois cada cultura tem um grupo de bactérias que preferencialmente se associam a ela, seja pelo tipo de exsudato produzido, pH, aeração, componentes químicos do solo ou outras populações microbianas que se encontram aderidas àquela planta.

O eucalipto é uma cultura com grande importância econômica, principalmente por sua grande diversidade de produtos (REMADE, 2001; GOMIDE et al., 2010; ARAÚJO et al., 2010; VIVAN et al., 2011), entretanto os estudos voltados a microbiologia do solo são bastante escassos sendo importante mensurar estas bactérias e seu papel na associação com o eucalipto. Em vista disso, são necessárias pesquisas que busquem explorar mais o estudo da diversidade e funções dessas bactérias que, possivelmente, são influenciadas pelos genótipos na cultura do eucalipto.

Por conseguinte, o objetivo deste trabalho foi isolar e quantificar bactérias promotoras de crescimento de plantas em diferentes genótipos e clones de plantas de eucalipto.

### 2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no laboratório de Microbiologia do Solo da UESB – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, onde foram realizados três experimentos de isolamento de bactérias na cultura do eucalipto.

O primeiro experimento teve início em 03 de dezembro de 2015, quando foram utilizadas mudas de *Eucalyptus urophylla* clone AEC144 com idade de 100 dias; o segundo foi realizado em 21 de fevereiro de 2016, com plantas com idade de 190 dias de *Eucalyptus urophylla* clone AEC144 e *E. urograndis* clone 1528; e o terceiro foi realizado em 18 de agosto de 2016, com plantas com idade de 130 dias de *E. urophylla* clone AEC144.

O processo de isolamento das bactérias foi realizado igualmente para todos os três experimentos, então, as mudas e plantas de eucalipto foram desinfestadas superficialmente em água corrente e, em seguida, com água destilada, para eliminação dos resíduos do solo. As plantas foram separadas em raiz e parte aérea. As amostras foram fragmentadas pesando-se 10g. Em seguida, foram trituradas em liquidificador com 90 mL de solução salina, a fim de obter uma solução na concentração  $10^{-1}$ .

Posteriormente, realizaram-se diluições seriadas de  $10^{-2}$  a  $10^{-7}$ , transferindo-se 1 mL da suspensão de cada diluição para tubos de ensaio, diluições, alíquotas de 0,1mL, foram inoculadas em triplicata, em frascos de vidros de penicilina contendo 5 mL dos meios semissólidos livres de nitrogênio (N): JNFb para *Herbaspirillum spp.*, NFb para *Azospirillum spp.* JMV para *Burkholderia spp.*, LGI para *A. amazonense*.

Os frascos foram incubados a 30°C, por cinco dias, após esse período, foram considerados positivos para contagem aqueles que desenvolveram uma película aerotóxica típica, próxima da superfície do meio. A contagem da população de bactérias diazotróficas foi realizada pela técnica do Número Mais Provável (NMP), utilizando a tabela de McCrady para três repetições por diluição (DÖBEREINER et al., 1995).

Os meios que formaram películas características foram repicados para novos meios semissólidos, até formação de nova película. Em seguida, foram riscadas em placas de Petri, em meios sólidos específicos e em meio sólido batata, incubadas em estufa a 30°C, por cinco dias, a fim de identificar a purificação dos isolados. Quando purificados, os isolados foram estocados em meio de cultura batata, adicionados ao meio de cultura óleo mineral estéril, e estocados para posteriores caracterizações.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Isolamento bacteriano em diferentes genótipos

Houve formação de película característica nos meios semissólidos NFb e JNFb nas folhas e raiz de eucalipto, em todos os isolamentos, demonstrando a presença de bactérias diazotróficas. Entretanto, no 2º isolamento para *E. urograndis*, nos meios JMV e LGI, em folha e raiz, respectivamente, não houve formação da película (Tabela 1).

É possível observar pela média geral, que a população de bactérias foi superior no isolamento realizado com a raiz das plantas; somente no meio JNFb que a população de bactérias na folha foi superior (Tabela 1).

Tabela 1: População de bactérias promotoras de crescimento vegetal isoladas de eucalipto em diferentes genótipos.

Isolamento	NMP							
	NFb		JNFb		JMV		LGI	
	F	R	F	R	F	R	F	R
<i>E. urophylla</i>	4,5x10 <sup>3</sup>	4,5x10 <sup>5</sup>	2,5x10 <sup>3</sup>	2,5x10 <sup>5</sup>	1,5x10 <sup>3</sup>	2 x10 <sup>5</sup>	9,5x10 <sup>2</sup>	4,5x10 <sup>4</sup>
<i>E. urophylla</i>	1,1x10 <sup>2</sup>	1,4x10 <sup>5</sup>	1,4x10 <sup>6</sup>	4,5x10 <sup>4</sup>	1,1x10 <sup>2</sup>	3x10 <sup>4</sup>	4,0x10 <sup>1</sup>	1,4x10 <sup>7</sup>
<i>E. urograndis</i>	9,0x10 <sup>1</sup>	9,5x10 <sup>3</sup>	4,0x10 <sup>1</sup>	4,5x10 <sup>3</sup>	0	4,5x10 <sup>3</sup>	2,5x10 <sup>3</sup>	0
<i>E. urophylla</i>	4,5x10 <sup>3</sup>	9,5x10 <sup>4</sup>	9,5x10 <sup>3</sup>	9,5x10 <sup>4</sup>	1,5x10 <sup>3</sup>	2x10 <sup>5</sup>	2,5x10 <sup>3</sup>	9,5x10 <sup>5</sup>
Média geral	2,3x10 <sup>3</sup>	1,73x10 <sup>5</sup>	3,5x10 <sup>5</sup>	9,8 x10 <sup>4</sup>	7,7 x10 <sup>2</sup>	1,08x10 <sup>5</sup>	1,49x10 <sup>3</sup>	3,78x10 <sup>6</sup>

\*NMP: número mais provável; F: folha; R: raiz.

Houve o maior número de isolados no primeiro isolamento com mudas com idade de 100 dias de *E. urophylla* (clone AEC144), sendo 7 isolados de raiz e 6 das folhas, nos demais isolamentos, todos foram de raiz, totalizando 19 isolados de eucalipto (Tabela 2), sendo deste total, 9 isolados de JNFb (similares *Herbaspirillum* spp.), 9 isolados de JMV (similares *Burkholderia* spp.), 1 isolado de LGI (similar *A. amazonense*), e não foi possível isolar bactérias similares a outras espécies de *Azospirillum* spp. (NFb).

Tabela 2: Isolados bacterianos associados às mudas e plantas de diferentes genótipos de eucalipto

1° isolamento	
Espécie	<i>E. urophylla</i> clone AEC144
Material	Mudas com 100 dias
ISOLADOS	UESBJNF4E
	UESBJNF1E
	UESBJNR2E
	UESBJNR3E
	UESBJNR4E
	UESBJNR6E
	UESBLGF2E
	UESBJMR2E
	UESBJMR5E
	UESBJMR6E
	UESBJMF1E

	UESBJMF3E
	UESBJMF2E
<b>2° isolamento</b>	
<b>Espécie</b>	<i>E. urophylla</i> clone AEC144
<b>Material</b>	Plantas 190 dias
<b>ISOLADOS</b>	UESBJNR32E
	UESBJMR32E
<b>2° isolamento</b>	
<b>Espécie</b>	<i>E. urograndis</i> clone 1528
<b>Material</b>	Plantas 190 dias
<b>ISOLADOS</b>	UESBJMR21E
<b>3° isolamento</b>	
<b>Espécie</b>	<i>E. urophylla</i> clone AEC144
<b>Material</b>	Plantas 130 dias
<b>ISOLADOS</b>	UESBJNR5E
	UESBJMR3E
	UESBJNR1E
Total de isolados	19

É possível observar que, mesmo com valores altos da população inicial de bactérias (Tabela 1), esse número não refletiu no número total de isolados. Acredita-se que microrganismos oportunistas e não diazotróficos foram favorecidos por compostos ricos em carbono, presentes nos meios, e pela síntese dos compostos nitrogenados, favorecendo, assim, o crescimento da película. Entretanto, nas sucessivas repicagens, as colônias isoladas não mantiveram seu crescimento.

Algumas espécies não fixadoras conseguem utilizar traços de N que, geralmente, existem nos outros compostos nitrogenados do meio de cultura, e bactérias não fixadoras também podem crescer como contaminantes à custa da amônia excretada no meio de cultura pelas bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> (MOREIRA, 1994).

Em estudo com *E. urograndis*, Procopio (2004) relatou também uma baixa frequência de isolamento em diferentes clones, e sugere que isso seja devido à variação de compostos fenólicos e óleos essenciais produzidos pela planta, o que dificulta o isolamento.

Outro fato que pode ter ocorrido é a possibilidade do eucalipto se associar a bactérias de outros gêneros, que são isoladas em diferentes meios de cultivo, que não foram testados neste trabalho.

#### 4 CONCLUSÃO

Dezenove bactérias promotoras de crescimento foram isoladas de diferentes genótipos eucalipto, sendo 12 isolados de raiz e 7 de folha.

#### 5 REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A. R. A.; FONSECA, F. S. T.; HENDGES, T. L. Análise de viabilidade econômica da produção de eucalipto na cidade de Balsas- MA para a geração de energia. **Revista Científica Faculdade de Balsas**, n. 1, p. 1- 21, 2010.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Embrapa-SPI, Brasília, 1995. 60 p.

GOMIDE, J. L.; FANTUZZI NETO, H.; REGAZZI, A. J. Análise de critérios de qualidade da madeira de eucalipto para produção de celulose kraft. **Revista Árvore**, v. 34, p. 339- 344, 2010.

MOREIRA, F. M. S. Parte III. Diazotróficos Associativos: Métodos de isolamento e identificação de microrganismos associativos fixadores de N<sub>2</sub>. In: Hungria, M.; Araujo, R.S. (Eds.). **Manual de métodos empregados em estudos de Microbiologia Agrícola**, EMBRAPA, p.337-353, 1994.

PROCÓPIO, R. E. **Diversidade de bactérias endofíticas de *Eucalyptus* spp. e avaliação do seu potencial biotecnológico**. 2004. 120f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

REMADE, **Revista da Madeira**. Ano 11 - n. 59, setembro de 2001. Disponível em: <http://www.remade.com.br>.

VIVAN, G. A.; BARBOZA, F. da S.; LUZ, M. L. S. da.; LUZ, C. A. S. da.; RAMIREZ, O. P.; GOMES. M. C.; SOARES, F.C. Estudo técnico e econômico de um sistema móvel de extração de óleo essencial de eucalipto. **Cerne**, v. 17, n. 1, p. 23-31, 2011.