ISSN 1517-5030 / e-ISSN 1980-3982

Comunicado Técnico 500

Colombo, PR / Junho, 2024

Coleção de bactérias multifuncionais da Embrapa Florestas

Krisle da Silva[1], Julia Heduarda Giacomel Balbinott[2], Caroline Rusch Schulze[3] e Gabriela Yumi Nomi[2]

[1] Pesquisadora, Embrapa Florestas, Colombo, PR. [2] Estudantes de Biotecnologia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR, Curitiba, PR. [3] Estudante de Agronomia, Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, PR.

Introdução

Os microrganismos desempenham papeis cruciais nos ecossistemas e são encontrados em qualquer lugar do planeta Terra. A caracterização e preservação da diversidade microbiana são de fundamental importância não somente para a manutenção dos ecossistemas naturais e manejados, mas também para pesquisas científicas e explorações biotecnológicas com finalidades benéficas em diversos setores, como o industrial, agrícola, medicinal entre outros (De Vero et al., 2019). Desta forma, as coleções de culturas de microrganismos são cruciais para preservar e circular recursos biológicos, bem como para o progresso científico (Díaz-Rodríguez et al., 2021).

Comunidades microbianas interagem com diversas plantas, por meio de mecanismos diretos e indiretos, em agroecossistemas e regulam o crescimento e produtividade das culturas (Santoyo et al., 2019). Entre as comunidades microbianas encontram-se as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) que atuam de forma benéfica para o incremento da produção vegetal. As RPCPs são microrganismos que se encontram na rizosfera das plantas e desempenham funções que resultam no estímulo do crescimento das plantas, beneficiando-se dos compostos liberados pelas raízes (Ahemad; Kibret, 2014). Entre os mecanismos de promoção estão a fixação biológica de nitrogênio, solubilização do fosfato e produção de fitormônios, produção de sideróforos, indução de resistência sistêmica, produção de biofilme, entre outros (Santoyo et al., 2019; Olénska, et al., 2020).

No Brasil, o uso de bactérias promotoras do crescimento para a produção de bioinsumos tem sido cada vez mais abrangente na agricultura, buscando a produção agrícola com maior sustentabilidade. Para a busca de uma produção com maior sustentabilidade, foi criado o Programa Nacional de Bioinsumos (Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020) (Brasil, 2020). Segundo esse Programa, "bioinsumo é todo produto, processo ou tecnologia de origem vegetal, animal ou microbiana, destinado ao uso na produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agropecuários, nos sistemas de produção aquáticos ou de florestas plantadas, que interfiram positivamente no crescimento, no desenvolvimento e no mecanismo de resposta de animais, de plantas, de microrganismos e de substâncias derivadas e que interajam com os produtos e os processos físico-químicos e biológicos. Desta forma, os bioinsumos na forma de inoculantes bacterianos promotores de crescimento tem se destacado e oferecem uma solução inovadora para os sistemas agropecuários e florestais. No entanto, cabe ressaltar que, no setor florestal, o seu uso ainda é mais restrito que aquele de culturas agrícolas. Desta forma, são de grande relevância as coleções de culturas que preservam os microrganismos com

Embrapa Florestas

maior potencial para o desenvolvimento de novos produtos, na forma de novos bioinsumos.

O objetivo deste trabalho é apresentar a coleção de bactérias multifuncionais da Embrapa Florestas (CBMEF). Esta é uma coleção de trabalho com bactérias isoladas de solos e de espécies florestais, com potencial de beneficiar o desenvolvimento de mudas, por meio do incremento de produção de raízes, da parte aérea, da disponibilização de nutrientes, do controle biológico, entre outros.

A coleção

A CBMEF foi iniciada em 2017, a partir de 42 bactérias endofíticas promotoras de crescimento, isoladas de folhas de jaboticabeira (*Plinia peruviana*) (Queiroz et al., 2020). Posteriormente, foram adicionadas bactérias e actinobactérias endofíticas isoladas de folhas, meristemas e raízes de pupunheira (*Bactris gasipaes*), *Pinus* spp., *Eucalyptus* spp., *Ilex paraguariensis* e *Araucaria angustifolia.* Além disso, também foram isoladas bactérias e actinobactérias de formigas cortadeiras

Fotos: Krisle da Silva

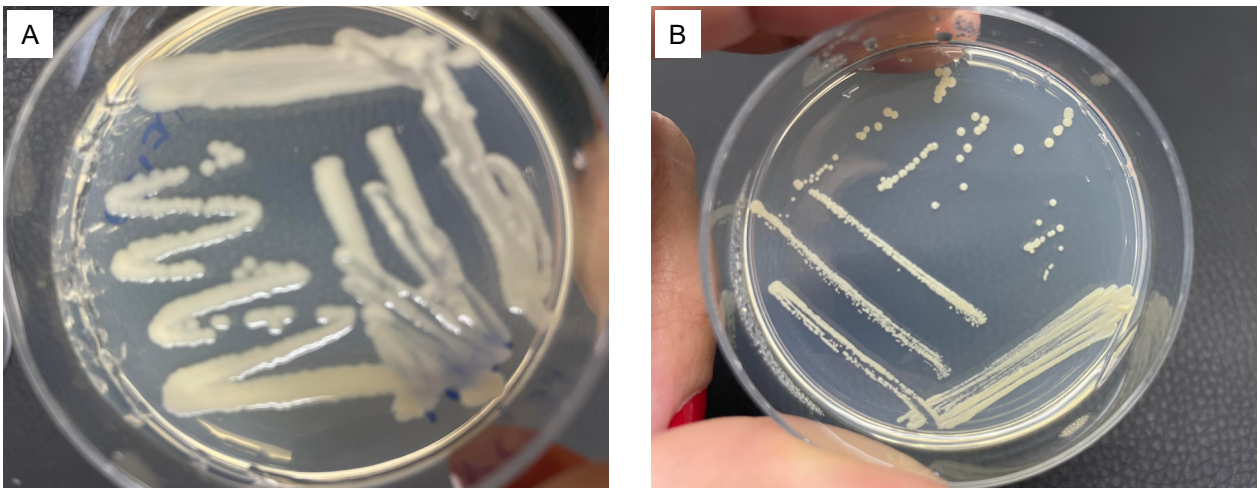

Figura 1. Placa de Petri contendo meio DYG'S sólido e bactéria (A) e actinobactéria (B).

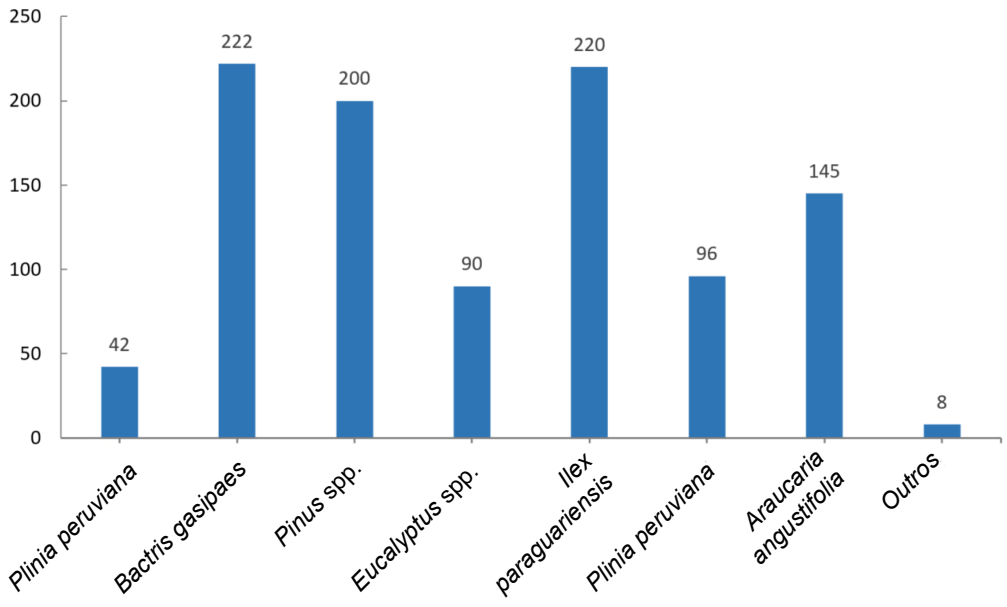

Figura 2. Origem e número de bactérias e actinobactérias presentes na bactérias multifuncionais da Embrapa Florestas (CBMEF).

(*Atta sexdens*), para possível controle biológico. A coleção conta, atualmente, com 1.023 bactérias e actinobactérias armazenadas (Figuras 1 e 2).

Caracterização fenotípica e genotípica dos isolados

Todos os microrganismos da coleção foram caracterizados em sua morfologia e fisiologia em meio de cultura DYG'S (Rodrigues Neto et al., 1986). A caracterização genotípica foi feita em 229 isolados, pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. O DNA desses isolados também está armazenado na coleção.

As bactérias/actinobactérias isoladas e purificadas são caracterizadas após o surgimento de colônias isoladas. Na caracterização morfofisiológica são avaliadas as seguintes características: tempo de crescimento (muito rápido, rápido, intermediário, lento, muito lento); forma da colônia (puntiforme, circular, irregular); elevação da colônia (plana, elevada, convexa, côncava, protuberante); borda da colônia (lisa, ondulada, dentada, filamentosa); superfície da colônia (lisa ou rugosa); produção de muco (pouco, moderado, abundante); consistência do muco (seco, aquoso, gomoso, viscoso, butírico); transparência do muco (translúcido, transparente, opaco); aparência do muco (homogêneo ou heterogêneo); e diâmetro da colônia (em mm), medido com um paquímetro (Hungria; Silva 2011).

A caracterização fenotípica e o armazenamento das bactérias são realizados no meio DYG'S (Rodrigues Neto et al., 1986), mas, para aquelas bactérias que não crescem bem neste meio, também é utilizado o meio ágar nutriente (American Public Health Association, 1917). Para actinobactérias é utilizado o meio ISP-2 (Pridham et al., 1957).

Meios de cultura

Dygs *(dextrose yeast glucose sucrose)*

Para o preparo de 1.000 mL do meio DYGS são necessários os seguintes reagentes:

- 2 g de glucose;
- 2 g de ácido málico;
- 1,5 g de peptona bacteriológica;
- 2 g de extrato de levedura;
- 0,5 g de K_2HPO_4;
- 0,5 g de $MgSo_4 7H_2O$;
- 1,5 g de ácido glutâmico;
- água destilada para completar 1.000 mL.

Após todos os ingredientes terem sido misturados homogeneamente com auxílio de um agitador magnético, o pH do meio é ajustado para 6,5 com a solução KOH 10%. Para o meio sólido, adiciona-se 15 g de ágar por litro.

Ágar nutriente

Para o preparo de 1.000 mL do meio AN são necessários os seguintes reagentes:

- 3 g de extrato de levedura;
- 5 g de peptona;
- 8 g de NaCl;
- 15 g de ágar bacteriológico;
- água destilada para completar 1.000 mL.

Meio ISP-2

Para o isolamento, caracterização e armazenamento de actinobactérias é utilizado o meio ISP-2 (Pridham et al., 1957). Para o preparo de 1.000 mL do meio ISP-2 são necessários:

- 4 g de extrato de levedura;
- 10 g de extrato de malte;
- 4 g de glicose;
- 20 g de ágar bacteriológico;
- água destilada para completar 1.000 mL.

Caracterização genotípica

Para a caracterização genotípica das bactérias/actinobactérias, o DNA genômico é extraído mediante utilização de *kits* comerciais. Após a obtenção do DNA, é realizada a amplificação do gene 16S rRNA, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991). Para isto, uma alíquota de 0,5 µL do DNA extraído é utilizada na reação em cadeia da polimerase (PCR), com um volume final de 25 µL por reação. As concentrações dos reagentes, por reação, são 0,2 µM de cada iniciador 27F e 1492R; 2,5 µM de cloreto de magnésio; tampão de PCR 10X; 0,2 µM de cada dNTP e 0,02 U de Taq DNA polimerase. As condições para a amplificação iniciam-se com

uma desnaturação sob temperatura inicial de 94 ºC durante 5 min, 30 ciclos de desnaturação (94 ºC por 40 s), anelamento (55 ºC por 40 s), extensão (72 ºC por 1,5 min) e uma extensão final (72 ºC por 7 min). O produto amplificado (aproximadamente 1.600 pares de base) é visualizado em gel de agarose 1%. O produto amplificado é enviado para empresa terceirizada, para o sequenciamento dos iniciadores 27F e 1492R. As sequências são submetidas à ferramenta *Basic local alignment search tool* (Blast) para verificar a identidade das sequências e identificação quanto ao gênero com as depositadas no GenBank (National Library of Medicine, 2024).

Preservação dos isolados

A preservação assegura a conservação de microrganismos sem a manipulação frequente e sem alterações em suas características. São utilizados três métodos de preservação, um em meio sólido, contendo óleo mineral sob temperatura de 20 °C, em microtubos, contendo água destilada estéril sob temperatura de 20 °C e outro por meio da criopreservação sob temperatura de -80 °C.

A preservação em meio sólido é realizada em microtubos de 1,5 mL. Neles são adicionados 750 µL de meio sólido, sendo que as bactérias são repicadas após a solidificação. Os tubos são incubados sob temperatura de 28 °C até o crescimento da cultura e, então, adicionados cerca de 100 µL de óleo mineral estéril sobre a superfície. Os tubos são colocados em caixas de papelão e armazenados sob temperatura de 20 °C (Figura 3).

A criopreservação envolve a utilização de técnicas que permitem a conservação de microrganismos em condições de baixa temperatura. Para isto, as bactérias e actinobactérias são cultivadas em placas de Petri contendo o meio sólido. Após o período de crescimento, que pode variar de acordo com a bactéria, é checada a pureza. Com auxílio de uma alça estéril, alíquota com cerca de 1 µL é retirada da cultura que é, então, transferida para criotubos contendo 1 mL de meio líquido contendo 30% de glicerol. Os criotubos são acondicionados em caixas plásticas (Figura 4) em *freezer*. Para cada bactéria/actinobactéria, são preparados dois microtubos.

A preservação em água é realizada utilizando 1 mL de água destilada em criotubos, que deverão ser esterilizados duas vezes em autoclave, por 20 min. As bactérias são cultivadas da forma descrita na criopreservação e adicionadas aos criotubos contendo água. Os criotubos são mantidos sob temperatura de 20 °C.

Foto: Krisle da Silva

Figura 3. Microtubos contendo as bactérias e actinobactérias preservadas em meio sólido Dygs recobertas com óleo mineral estéril sob temperatura de 20 °C.

Foto: Krisle da Silva

Figura 4. Criotubos contendo bactérias armazenadas em meio Dygs contendo 30% de glicerol sob temperatura de -80 °C.

Gerenciamento dos dados

Os dados de cada microrganismo são armazenados no sistema corporativo AleloMicro da Embrapa, incluindo informações sobre a identificação da espécie, o local e hospedeiro de isolamento, nome da pessoa responsável pelo isolamento, nome do responsável pelo depósito, procedimento para preservação, número de cópias preservadas, meio de cultivo e dados de caracterização fenotípica e genotípica.

Testes de promoção de crescimento

As bactérias isoladas são testadas quanto à capacidade de promoção de crescimento vegetal (Figura 5). Os testes se iniciam em condições de laboratório, com uma seleção inicial, após a caracterização morfológica das colônias. As bactérias selecionadas são avaliadas em condições de laboratório quanto à presença de características promotoras de crescimento (produção de compostos indólicos, fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fósforo e outros). Posteriormente, as bactérias são testadas mediante inoculação das mudas em viveiros.

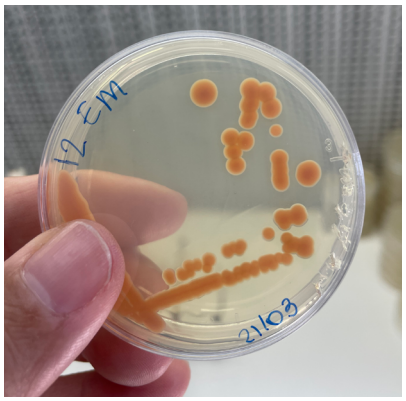

Foto: Krisle da Silva

Bactérias caracterizadas e selecionadas

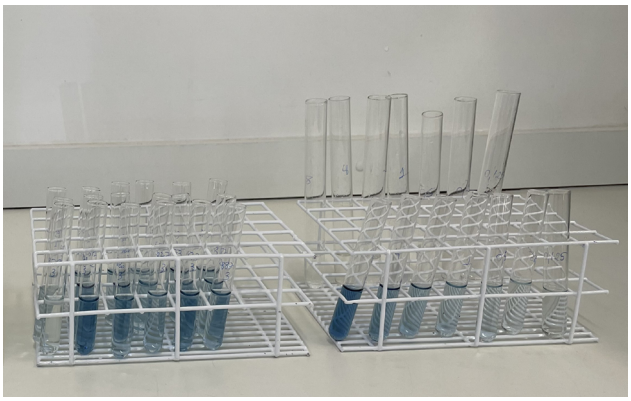

Foto: Krisle da Silva

Testes de promoção de crescimento em laboratório – Ex.: solubilização de fósforo.

Foto: Krisle da Silva

Testes em viveiros (inoculação em plantas)

Figura 5. Sequência de atividades de seleção, avaliação de características promotoras de crescimento e avaliação de bactérias em mudas florestais.

Considerações finais

As coleções microbianas representam uma valiosa reserva de recursos genéticos, capaz de proporcionar significativos benefícios à sociedade. Na Embrapa Florestas, os micro-organismos da coleção têm demonstrado potencial para aplicação no cultivo de mudas de espécies florestais, sejam elas nativas ou exóticas. A utilização desses micro-organismos pode desempenhar um papel fundamental no estabelecimento bem-sucedido dessas mudas em ambientes naturais, seja para fins comerciais ou na recuperação de áreas degradadas. Estudos estão sendo conduzidos com o objetivo de verificar os efeitos desses micro-organismos na produção de mudas florestais.

Esse trabalho apresenta alinhamento às metas dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Agenda 2030 da ONU (especialmente os ODS 12 e 15), pois trata-se do resultado da biodiversidade microbiana, com potencial para desenvolvimento de insumos biológicos para o uma produção florestal sustentável e o uso eficiente dos recursos naturais.

Referências

AHEMAD, M. S.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **Journal of King Saud University-Science**, n. 26, p. 1-20, 2014. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods of water analysis**. 3rd ed. New York, 1917.

BRASIL. Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020. Institui o Programa Nacional de Bioinsumos e o Conselho Estratégico do Programa Nacional de Bioinsumos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, seção 1, p. 105, 27 maio 2020.

DE VERO, L.; BONIOTTI, M.B.; BUDRONI, M.; BUZZINI, P.; CASSANELLI, S.; COMUNIAN, R.; GULLO, M.; LOGRIECO, A. F.; MANNAZZU, I.; MUSUMECI, R.; PERUGINI, I.; PERRONE, G.; PULVIRENTI, A.; ROMANO, P.; TURHETTI, B.; VARESE, G. C. Preservation, characterization and exploitation of microbial biodiversity: the perspective of the Italian network of culture collections. **Microorganisms**, n. 7, p. 685, 2019. https://doi.org/10.3390/microorganisms7120685.

DÍAZ-RODRÍGUEZ, A. M.; SALCEDO GASTELUM, L. A.; FÉLIX PABLOS, C. M.; PARRA-COTA, F. I.; SANTOYO, G.; PUENTE, M. L.; BHATTACHARYA, D.; MUKHERJEE, J.; DE LOS SANTOS-VILLALOBOS, S. The Current and future role of microbial culture collections in food security worldwide. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, n. 4, p. 614739, 2021. DOI: https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.614739.

HUNGRIA, M.; SILVA, K. **Manual de curadores de germoplasma**: microorganismos: rizóbios e bactérias promotoras do crescimento vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011. 21 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 333; Embrapa Soja. Documentos, 332). Disponível em: https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/933488/1/doc333332.pdf.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: Wiley, 1991. p. 115-148.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **GenBank**. Disponível em: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. Acesso em: 26 abr. 2024.

OLÉNSKA, E.; MALEK, W.; WÓJCIK, M.; SWIECICKA, I.; THIJS, S.; VANGRONSVELD, J. Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: a methodical review. **Science of the Total Environment**, n. 743, p. 140682, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140682.

PRIDHAM, T. G.; ANDERSON, P.; FOLEY, C.; LINDENFELSER, L. A.; HESSELTINE, C. W.; BENEDICT, R. G. A selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomycetes*. **Antibiotics Annual**, n. 1, p. 947-953, 1957.

QUEIROZ, E.G.; DEGENHARDT, J.; QUOIRIN, M.; SILVA, K. da. Endophytic bacteria associated with tissue culture and leaves of *Plinia peruviana*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 55, e01844, 2020. DOI: https://doi. org/10.1590/S1678-3921.pab2020.v55.01844.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JUNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.

SANTOYO, G.; SÁNCHEZ-YÁÑEZ, M.; DE LOS SANTOS-VILLALOBOS, S. Methods for detecting biocontrol and plant growth-promoting traits in rhizobacteria. In: REINHARDT, D.; SHARMA, A. K. (ed.). **Biology research**. Singapore: Springer, 2019. p.133-149.

Embrapa Florestas
Estrada da Ribeira, Km 111, Guaraituba
Caixa Postal 319
83411-000, Colombo, PR
Fone: (41) 3675-5600
www.embrapa.br/florestas
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Patrícia Póvoa de Mattos*

Vice-presidente: *José Elidney Pinto Júnior*

Secretário-executivo: *Elisabete Marques Oaida*

Membros: *Annete Bonnet, Cristiane Aparecida Fioravante Reis, Elenice Fritzsons, Guilherme Schnell e Schühli, Marilice Cordeiro Garrastazú, Sandra Bos Mikich, Susete do Rocio Chiarello Penteado, Valderês Aparecida de Sousa*

Comunicado Técnico 500
ISSN 1517-5030 / e-ISSN 1980-3982
Junho, 2024

Edição executiva e revisão de texto: *José Elidney Pinto Júnior*

Normalização bibliográfica: *Francisca Rasche* (CRB-9/1204)

Projeto gráfico: *Leandro Sousa Fazio*

Diagramação: *Celso Alexandre de O. Eduardo*

Publicação digital: PDF

Ministério da Agricultura e Pecuária

Todos os direitos reservados à Embrapa.

CGPE 18604