

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO DE BIOTECNOLOGIA

**Bactérias diazotróficas produtoras de biofilme isoladas da filosfera de plantas
infestantes em ambientes de Cerrado**

Jade Pereira de Moraes

Monografia apresentada à
Coordenação do Curso de
Biotecnologia, da
Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia – MG

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO DE BIOTECNOLOGIA

**Bactérias diazotróficas produtoras de biofilme isoladas da filosfera de plantas
infestantes em ambientes de Cerrado**

Orientador:

Prof. Dr.º. Adão de Siqueira Ferreira, ICIAG,
UFU

Monografia apresentada à
Coordenação do Curso de
Biotecnologia, da
Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia – MG

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Bactérias diazotróficas produtoras de biofilme isoladas da filosfera de plantas
infestantes em ambientes de Cerrado

Orientador:

Prof. Dr. Adão de Siqueira Ferreira, ICIAG,
UFU

Homologado pela coordenação
do Curso de Biotecnologia em

__/__/____

Nilson Nicolau Junior

Uberlândia – MG

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO DE BIOTECNOLOGIA

**Bactérias diazotróficas produtoras de biofilme isoladas da filosfera de plantas
infestantes em ambientes de Cerrado**

Jade Pereira de Moraes

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: ____

Nome e assinatura do Presidente da
Banca Examinadora:

Uberlândia, 31 de outubro de 2024

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a toda minha família, minha mãe, minha irmã, meus sobrinhos, meu namorado, minha sogra e meus amigos que contribuíram e estiveram presentes em cada uma das etapas enfrentadas durante minha graduação.

Um agradecimento especial ao Prof. Adão de Siqueira Ferreira por ter acreditado em mim e me acolhido no laboratório e também a toda equipe do LAMAA, principalmente a Júlia Araújo de Lima e Ellen Kalinda Gouveia por todos os ensinamentos e apoio durante a elaboração do trabalho.

Resumo

A filosfera, superfície das folhas, abriga uma grande diversidade de microrganismos, principalmente em matas nativas, como o Cerrado. Esses microrganismos podem auxiliar na promoção do crescimento de plantas de diversas formas, como por exemplo na fixação de nitrogênio atmosférico e na produção de biofilme. Nesse estudo, foram coletadas cinco plantas de duas diferentes espécies em áreas de menor interferência antrópica e agrícola. Os microrganismos presentes nas folhas das plantas coletadas foram isolados através de diluição seriada e crescimento microbiano em diferentes meios de cultura e posteriormente caracterizados quanto ao aspecto das colônias, forma, arranjo e coloração de gram. Além disso, foi feita a análise da produção de biofilme através do método do cristal violeta e procedimentos de extração de DNA, PCR e visualização em gel de eletroforese para detecção do gene *nifH* nas amostras. Os resultados mostraram que as bactérias isoladas são boas formadoras de biofilme no geral e que uma das amostras possui o gene *nifH* em seu genoma, o que revela um desempenho promissor para possíveis aplicações agrícolas, com potencial para estimular o crescimento vegetal.

Palavra-chave: FBN, *nifH*, *quorum sensing*.

Abstract

The phyllosphere, the surface of the leaves, houses a great diversity of microorganisms, especially in native forests, such as the Cerrado. These microorganisms can help promote plant growth in several ways, such as fixing atmospheric nitrogen and producing biofilm. In this study, five plants of two different species were collected in areas with less human and agricultural interference. The microorganisms present in the leaves of the collected plants were isolated through serial dilution and microbial growth in different culture media and subsequently characterized regarding the appearance of the colonies, shape, arrangement and gram color. In addition, biofilm production was analyzed using the crystal violet method and DNA extraction, PCR and gel electrophoresis visualization procedures to detect the *nifH* gene in the samples. The results showed that the isolated bacteria are good biofilm formers in general and that one of the samples has the *nifH* gene in its genome, which reveals promising performance for possible agricultural applications, with the potential to stimulate plant growth.

Keyword: BNF, *nifH*, *quorum sensing*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivos gerais.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	4
3. METODOLOGIA.....	4
3.1. Coleta das plantas.....	4
3.2. Preparo das amostras.....	5
3.3. Isolamento de bactérias.....	6
3.4. Caracterização das colônias de bactérias.....	7
3.5. Forma, arranjo e coloração de gram.....	8
3.6. Produção de biofilme.....	9
3.7. Extração e quantificação do DNA.....	11
3.8. Detecção do gene <i>nifH</i>	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1. Contagem das colônias de bactérias.....	14
4.2. Caracterização das colônias de bactérias.....	15
4.3. Formação de biofilme.....	19
4.4. Quantificação do DNA.....	21
4.5. Detecção do gene <i>nifH</i>	22
5. CONCLUSÃO	23
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

1. INTRODUÇÃO

A filosfera corresponde a um espaço limitado sob a influência da parte aérea das plantas, principalmente das folhas. Este habitat abriga uma grande diversidade e abundância de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, arqueas e cianobactérias. Foi por muito tempo vista como um lugar inóspito para a vida microbiana, visto que a escassez de nutrientes, oscilações bruscas de temperatura e umidade, o estresse salino e a radiação ultravioleta (UV) severa pareciam criar um cenário desafiador para a sobrevivência de qualquer ser vivo (VORHOLT, 2012). Entretanto, vários estudos têm demonstrado que esse habitat microbiano abriga uma enorme diversidade, principalmente em plantas de ambientes naturais (NUNES, 2015). Nos diferentes tecidos das plantas, os microrganismos podem colonizar o interior (endofíticos) ou a superfície (epifíticos). A cutícula, uma camada cerosa que reveste as folhas, oferece pontos de ancoragem para os microrganismos e os exsudatos das folhas ajudam na adesão dos mesmos à superfície. Os aminoácidos, a glicose e a sacarose, presentes nos exsudatos das folhas impulsionam o crescimento e a proliferação da comunidade microbiana e a água liberada pelas folhas no processo de transpiração fornece a umidade necessária para o desenvolvimento dos microrganismos. (BASHIR et al., 2021, CARVALHO et al., 2020, STONE et al., 2018).

A comparação entre as comunidades bacterianas de plantas em ambientes naturais e sistemas agrícolas é crucial para entendermos os impactos da expansão agrícola sobre a biodiversidade microbiana. As matas nativas, com sua enorme diversidade vegetal, abrigam um universo rico e complexo de microrganismos que desempenham funções essenciais para o ecossistema. No entanto, essa riqueza natural vem sendo substituída aceleradamente pela agricultura, trazendo consigo consequências preocupantes. O crescimento exponencial da agricultura brasileira, impulsionado pela demanda por alimentos e biocombustíveis, resulta em perda significativa de habitats naturais. O

Cerrado e a Mata Atlântica, biomas de extrema importância para a biodiversidade do país, estão cedendo espaço para monoculturas, gerando um cenário de degradação ambiental severa, onde o maior impacto do processo de fragmentação florestal é a drástica redução da diversidade biológica. A eliminação de grandes trechos de floresta gera mudanças no microclima, dentre outras características, afetando as comunidades animais e vegetais e suas relações ecológicas (RANKIN-DE-MERONA; ACKERLY, 1987).

Os microrganismos da filosfera desempenham um papel muito importante no crescimento das plantas. Através de diversas estratégias, eles contribuem para o desenvolvimento vegetal de maneira significativa, uma vez que promovem o crescimento de várias formas, como através da fixação do nitrogênio atmosférico e a produção de biofilme nessa região das plantas, preferencialmente daquelas que apresentam uma maior diversidade metabólica, como as plantas infestantes, também conhecidas como plantas daninhas. Essas plantas coevoluíram com uma ampla variedade de microrganismos e são encontradas em diversos habitats, principalmente naturais ou semi-naturais. Essa ampla distribuição geográfica expõe as plantas infestantes à diversas condições ambientais, favorecendo o crescimento de uma comunidade microbiana mais diversa e adaptada a diferentes nichos ecológicos. A *Brachiaria ruziziensis* e *Amaranthus spinosus* são exemplos de espécies mais comumente encontradas nesses ambientes. (DEBIE, 2021).

Muitos microrganismos são capazes de formar biofilme, que consiste em comunidades envoltas a uma matriz extracelular composta principalmente de carboidratos, proteínas e exopolissacarídeos. Sob condições de estresse, o biofilme desempenha um papel muito importante para auxiliar na sobrevivência dos microrganismos, conferindo resistência à antibióticos, proteção contra fitopatógenos, dessecação, temperaturas extremas e produtos químicos (PANDIT et al.,2020). Além disso, permite que as bactérias se comuniquem através de um mecanismo chamado de

quorum sensing, importante para a coordenação de atividades como a divisão celular e a produção de substâncias antimicrobianas (MAJDURA et al., 2023).

Algumas bactérias que formam biofilme são capazes de fixar nitrogênio atmosférico, que é um nutriente essencial para o crescimento das plantas. Essas bactérias são chamadas de diazotróficas. Nesse processo, ocorre a transformação do nitrogênio gasoso (N_2), presente em abundância na atmosfera, em compostos nitrogenados que podem ser utilizados pelas plantas. Esta transformação bioquímica de fixação biológica de nitrogênio (FBN) é realizada somente pelas bactérias, em especial às que produzem nitrogenase, a enzima responsável pela redução do nitrogênio gasoso em amônia (NH_3). A síntese da nitrogenase resulta da expressão de um complexo gênico multicomponente, formando duas proteínas principais: a Fe-proteína (proteína de ferro) e a FeMo-proteína (proteína de ferro-molibdênio). Essas duas proteínas estão bioquimicamente associadas para promover as reações de transferência de elétrons, hidrólise de ATP e a conversão de nitrogênio gasoso (N_2) em amônia (NH_3) (NUNES; RAIMONDI; NIEDWIESKI, 2003; PI et al., 2022). Um desses complexos gênicos envolvidos na síntese da nitrogenase é o operon *nif*, responsável pela FBN. Muitos estudos utilizam o gene *nifH* como marcador para selecionar bactérias diazotróficas, por meio da técnica de PCR (polymerase chain reaction) (DESLIPPE; EGGER, 2006). Esse gene codifica uma subunidade alfa da FeMo-proteína e apresenta um alto grau de conservação evolutiva entre diferentes espécies de bactérias diazotróficas, o que demonstra sua importância fundamental para a fixação biológica de nitrogênio (ABDERRAHIM AASFAR et al., 2024).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho teve o objetivo de isolar e caracterizar bactérias presentes na filosfera de plantas infestantes e analisar o potencial de produção de biofilme e a presença do gene nifH.

2.2. Objetivos específicos



- Isolar bactérias presentes na filosfera de plantas infestantes utilizando o método de diluição seriada e processo de crescimento em placas de Petri contendo dois diferentes meios de cultura;
- Caracterizar as bactérias isoladas quanto aos seus caracteres macroscópicos (tamanho, forma, borda, transparência, brilho, coloração, textura, elevação e consistência), quanto à sua morfologia microscópica (forma e arranjo) e sua coloração de gram;
- Induzir a produção de biofilme pelas bactérias isoladas e analisar quais possuem maior potencial de formação do mesmo;
- Detectar a presença do gene nifH nas bactérias isoladas através de técnica de PCR e visualização em gel de eletroforese.

3. METODOLOGIA

3.1. Coleta das plantas

Amostras da parte aéreas das plantas foram coletadas de duas espécies plantas infestantes na área do Campus Glória da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), representada pelas seguintes coordenadas: 18°56'35"S 48°12'49"W. As plantas foram coletadas com auxílio de uma tesoura, transferidas e levadas para o laboratório da Microbiologia Agrícola e Ambiental da UFU. A Tabela 1 mostra a identificação, as quantidades e fotos das plantas coletadas.

Tabela 1: Identificação das plantas infestantes coletadas.

Espécies	Nome comum	Quantidade de plantas coletadas	
<i>Amaranthus spinosus</i>	Caruru de espinho	2	
<i>Brachiaria ruzizienses</i>	Gramma do congo	3	

Fonte: Elaboração própria.

3.2. Preparo das amostras

As folhas foram cortadas em pedaços de aproximadamente 5 cm com auxílio de uma tesoura desinfetada com álcool. Uma porção de 5 gramas de cada amostra das folhas preparadas foi colocada separadamente em potes de vidro contendo 90 ml de solução salina 0,85% para remover superficialmente os microrganismos das folhas. Os potes com as amostras foram agitados a uma rotação de 150 rpm por 1 hora. A figura 1 mostra o processo de preparação das amostras de *Brachiaria ruziziensis*

Figura 1. Preparação das amostras de *Brachiaria ruziziensis*.



Fonte: Elaboração própria

3.3. Isolamento de bactérias

Diluições seriadas das amostras foram preparadas em tubo Falcon (15 mL) contendo 9 ml de solução salina (0,85% NaCl). As diluições foram preparadas na câmara de fluxo laminar, sendo usado 1 mL de transferência nas diluições até a diluição 10^{-8} . Cada diluição foi agitada no Vortex para homogeneização da suspensão. Alíquotas de 0,1 mL das suspensões foram semeadas em meio nutritivo suplementado com extrato de levedura, peptona e triptona (Tabela 2) e meio semi-seletivo NFb (Tabela 3) (Dobereiner et al., 1995). Após a semeadura, as placas com os meios de culturas foram incubadas à 30 °C para o crescimento das bactérias. As contagens do número de colônias foram realizadas a cada 24 horas por 7 dias. Durante incubação, observações das colônias foram realizadas e isoladas. As culturas puras de bactéria foram obtidas pelo cultivo em meio nutritivo enriquecido de extratos proteicos (Tabela 2).

Tabela 2: Composição do meio nutritivo enriquecido de extratos proteicos

Componente	Quantidade
Glicose	2,0 g
NaCl	5,0 g
MgSO ₄	0,2 g
Triptona	2,0 g
Extrato de levedura	1,0 g
Peptona	1,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Ágar	18 g

Tabela 3: Composição do meio semi-seletivo NFb

Componente	Quantidade
Ácido málico	5,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g

CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02 g
Solução micronutrientes (Tabela 4)	2 ml
Azul de bromotimol	2 ml
FeEDTA	4 ml
Solução de vitaminas (Tabela 5)	1 ml
KOH	4,5 g
Ágar	18 g

Tabela 4: Componentes e concentrações da solução de micronutrientes

Componente	Quantidade
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,04 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,20 g
H ₃ BO ₃	1,40 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1,00 g
MnSO ₄ .H ₂ O	1,175 g

Tabela 5: Componentes e concentrações da solução de vitaminas

Componente	Quantidade
Biotina	10 mg
Piridoxol-HCl	100 mg

3.4. Caracterização das colônias de bactérias

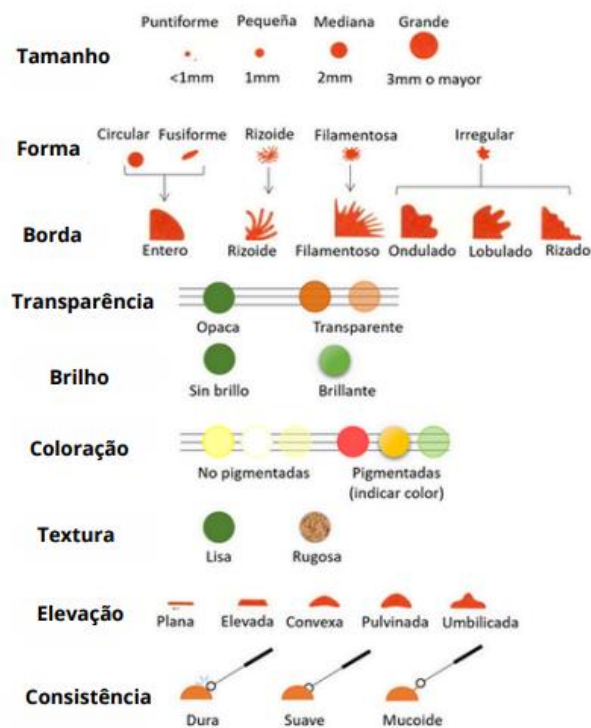
Para a identificação morfológica de colônias são utilizados alguns critérios como:

- **Tamanho:** grande ($\geq 3\text{mm}$), mediano (2mm) e pequeno (1mm) e puntiforme ($< 1\text{mm}$);
- **Forma:** circular, fusiforme, rizoide, filamentosa e irregular;
- **Borda:** entero, rizoide, filamentosa, ondulado, lobulado e rizado;
- **Transparência:** opaca ou transparente;
- **Brilho:** brilhante ou sem brilho;

- **Coloração:** não pigmentadas ou pigmentadas (indicar a cor);
- **Textura:** lisa ou rugosa;
- **Elevação:** plana, elevada, convexa, pulvinada e umbilicada;
- **Consistência:** dura, suave e mucoide.

Os critérios para caracterização e a representação das variantes de cada característica são mostrados na figura 2, logo abaixo.

Figura 2. Critérios para caracterização de colônias bacterianas.



Fonte: NEPITA,2020.

3.5. Forma, arranjo e coloração de gram

Para caracterizar a forma e arranjo das bactérias, as células foram coradas por coloração simples com fucsina após o esfregamento de suspensão de células sobre lâminas de vidro. A coloração de Gram foi realizada em cultura fresca (24 horas) cultivada em meio nutritivo enriquecido de extratos proteicos. Foi utilizada a técnica de Gram, descrito por

Albini et al., com algumas modificações. O método iniciou-se com a preparação da amostra de bactéria, que foi fixada em uma lâmina de vidro e posteriormente, submetida a aplicação sequencial de quatro reagentes, sendo eles: cristal violeta, lugol, álcool 95% e fucsina.

3.6. Produção de Biofilme

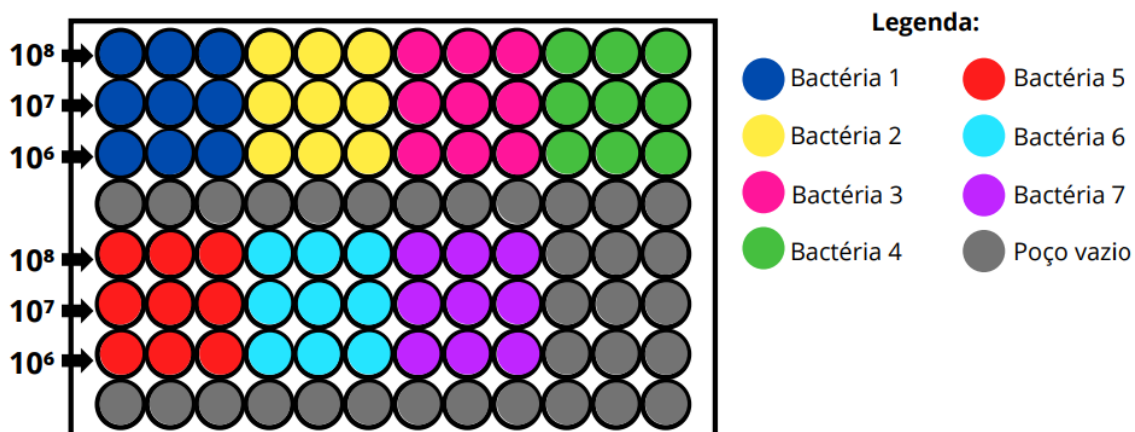
Para testar a produção de biofilme das bactérias isoladas, foi utilizado o método do Cristal Violeta em placas de microdiluição de poliestireno, descrito por Stepanovic et al., com algumas modificações.

Foi preparado 940 ml do caldo nutriente suplementado, descrito na Tabela 6. Após a autoclavação do caldo nutriente, foram adicionados 50 ml de glicose a 10% e 10 ml de solução de sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) a 2,5%, ambos esterilizados em membrana de filtração, completando assim, 1 litro de solução.

Para cada microrganismo isolado, foram preparados tubos falcon em triplicata contendo diferentes concentrações do caldo nutriente suplementado, sendo que no primeiro tubo foi adicionado 5 ml do caldo e nos demais, 4,5 ml. A turbidez da suspensão bacteriana foi ajustada para corresponder à escala 0,5 do padrão McFarland 10^8 UFC/ml. Foram feitas diluições nas concentrações 10^8 , 10^7 , 10^6 .

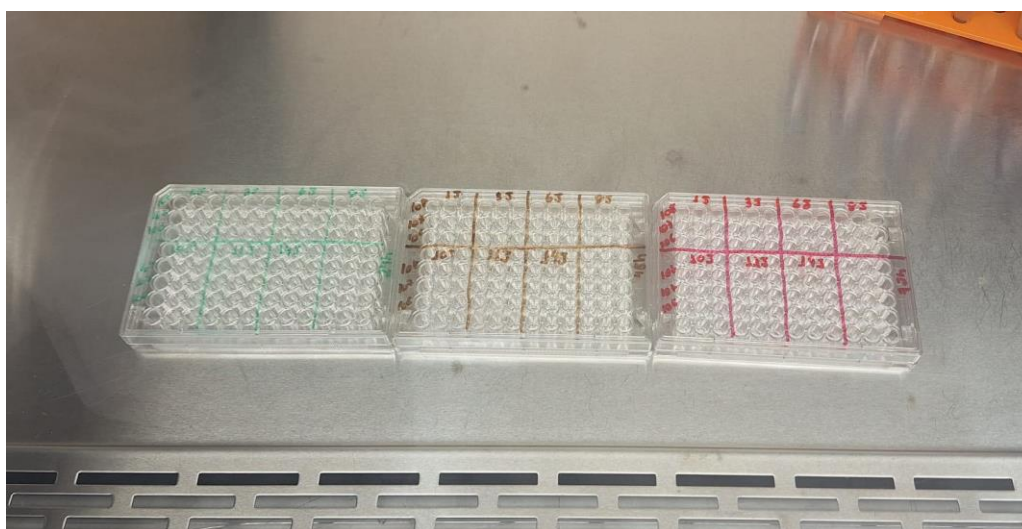
As diluições foram submetidas a agitação e os poços da placa de microdiluição foram preenchidos sequencialmente com alíquotas de 200 μ L da solução de cada tubo contendo o inóculo bacteriano. O modelo utilizado para o preenchimento dos poços das placas de microtitulação está representado na figura 3. As amostras foram incubadas a 35°C por diferentes períodos de tempo: 24, 48 e 72 horas. A figura 4 mostra as três placas utilizadas no experimento.

Figura 3. Modelo da placa utilizado para leitura da placa de microdiluição.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 4. Placas de microtitulação preenchidas com a solução de cada tubo contendo o inóculo bacteriano para posterior incubação por 24, 48 e 72 horas.



Fonte: Elaboração própria.

Tabela 6: Composição do caldo nutriente suplementado

Componente	Quantidade
Caldo nutriente	8,0 g
Extrato de levedura	2,0 g
K ₂ HPO ₄ dibásico	2,0 g
K ₂ HPO ₄ monobásico	0,5 g
Peptona	5,0 g
Água	940 ml

Após o período de incubação, retirou-se 200 µl do sobrenadante com o auxílio de uma pipeta e a placa foi deixada no fluxo laminar por 15 minutos para secagem do conteúdo que restou nos poços.

Posteriormente, foi realizada a fixação com 200 µl de metanol colocado em conta gotas, que foi mantido por 15 minutos na placa fechada para evitar evaporação. Depois, o metanol é retirado e a placa é aberta para secagem do conteúdo dos poços.

O cristal violeta a 2% foi preparado com álcool etílico e após a secagem da placa, adicionou-se 200 µl em cada poço, mantendo o corante na placa por 15 minutos. Após esse tempo, a placa foi lavada em água corrente, colocada para secar no fluxo laminar e depois, envolvidas em papel alumínio para serem armazenadas em local seco até o momento da leitura em espectrofotômetro.

Foram adicionados 200 µl de ácido acético a 33% por 30 minutos antes da leitura da absorbância, para ressuspender o conteúdo dos poços. A leitura foi realizada no espectrofotômetro de microplacas no comprimento de onda de 560 nm.

3.7. Extração e quantificação do DNA

O preparo das amostras para a extração do DNA iniciou-se com seu cultivo em meio nutritivo diazotrófico líquido enriquecido de extrato proteico, que possui a mesma composição indicada na tabela 2, com exceção do ágar. Foram preparados 7 tubos Falcon (50 ml) contendo 10 ml do meio de cultura e as colônias bacterianas foram inseridas com uma alça de inoculação. Os tubos foram submetidos à agitação constante e mantidos à temperatura de 30°C por 72 horas, onde foi observada a turbidez do meio, indicando o crescimento bacteriano.

Foi feita a extração de DNA das amostras de bactérias por meio do kit Wizard Genomic DNA Purification da Promega (Figura 5), seguindo o protocolo fornecido pelo

fabricante. A quantificação do DNA extraído foi realizada por meio do equipamento Qubit (fluorômetro da Invitrogen - Thermo Fisher Scientific), utilizando o kit Qubit™ 1x dsDNA HS Assay (alta sensibilidade) (Figura 6) e seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante, onde a quantidade utilizada de cada amostra para a quantificação foi de 5 µL.

Figura 5. Kit utilizado para a extração do DNA.



Fonte: Elaboração própria

Figura 6. Kit utilizado para a quantificação do DNA.



Fonte: Elaboração própria

3.8. Detecção do gene *NifH*

A detecção do gene *nifH* nas bactérias isoladas foi feita através da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), onde é realizada a amplificação do gene de forma mais específica. Para isso, foi utilizado o DNA extraído das 7 amostras bacterianas.

Para o PCR foi utilizado um programa de 35 ciclos, descritos na tabela 7. Além disso, foi preparado um mix contendo vários reagentes descritos na Tabela 8, contendo dois primers, sendo estes:

- *nifH* F (3'AAAGGYGGWATCGGYAARTCCACCAC-5')
- *nifH* R (3'TTGTTSGCSGCRTACATSGCCATCAT 5')

A análise dos fragmentos obtidos pela PCR foi realizada através da eletroforese em gel de agarose a 1%. Preparou-se uma mistura utilizando 4 µL das amostras de DNA amplificadas, 4 µL do corante azul de metileno e 2 µL do corante SYBR green. Foi utilizado o marcador de peso molecular 100bp-DNA Ladder da Invitrogen para estimar o tamanho dos produtos amplificados na PCR. A visualização do gel foi realizada em um transluminador sob luz UV.

Tabela 7: Condições das etapas e processamento das reações de PCR para o gene *nifH*

Concentração de primers	Pré-incubação	Desnaturação	Anelamento	Elongamento	Ciclos
1x	94°C – 3 min	94°C – 1 min	58°C – 1 min	72°C – 2 min	35

Tabela 8: Reagentes e concentrações utilizadas na preparação das amostras submetidas à PCR.

Reagente (concentração)	Volume na reação
DNA	10,0 µL
Tampão da enzima (10X)	2,5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µL
DNTPs (10 mM)	0,5 µL
Taq DNA polimerase (5U/µL)	0,2 µL

Primer Forward NifH	0,5 µL
Primer Reverse NifH	0,5 µL
Água MilliQ	10,05 µL

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Contagem das colônias de bactérias

A Tabela 9 mostra os resultados da contagem das colônias isoladas no último dia de observação durante a incubação, na diluição de 10^{-2} . A contagem representada em UFC/ml nos dois meios de cultura utilizados está descrita na Tabela 10. Foram selecionadas 7 colônias de bactérias, onde suas respectivas espécies e meios de cultura de origem estão representados na Tabela 11.

Tabela 9. Contagem de colônias bacterianas no dia 7 na diluição 10^{-2} .

	Brachiaria	Brachiaria	Brachiaria	Amaranthus	Amaranthus
	P1	P2	P3	P4	P5
Meio nutritivo enriquecido de extratos proteicos	94	69	83	79	65
Meio NFb	43	67	51	41	58

Tabela 10. Contagem de colônias bacterianas em diferentes meios de cultura (UFC/ml).

	Brachiaria	Brachiaria	Brachiaria	Amaranthus	Amaranthus
	P1	P2	P3	P4	P5
Meio nutritivo enriquecido de extratos proteicos	$9,4 \times 10^4$	$6,9 \times 10^4$	$8,3 \times 10^4$	$7,9 \times 10^4$	$6,5 \times 10^4$
Meio NFb	$4,3 \times 10^4$	$6,7 \times 10^4$	$5,1 \times 10^4$	$4,1 \times 10^4$	$5,8 \times 10^4$

Tabela 11. Colônias bacterianas selecionadas e suas respectivas espécies e meios de cultura de origem

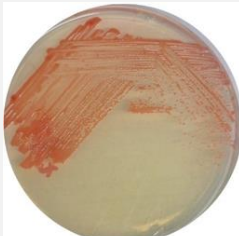


Colônia	Espécie de planta de origem	Meio de cultura de origem
----------------	------------------------------------	----------------------------------

1	<i>Brachiaria ruzizensis</i>	Meio nutritivo enriquecido
2	<i>Brachiaria ruzizensis</i>	Meio NFb
3	<i>Amaranthus spinozus</i>	Meio nutritivo enriquecido
4	<i>Brachiaria ruzizensis</i>	Meio nutritivo enriquecido
5	<i>Amaranthus spinozus</i>	Meio NFb
6	<i>Brachiaria ruzizensis</i>	Meio nutritivo enriquecido
7	<i>Amaranthus spinozus</i>	Meio NFb

4.2. Caracterização das colônias de bactérias

As características macroscópicas das bactérias isoladas estão descritas na Tabela 12. Já as características microscópicas, como forma, arranjo e os resultados da coloração de gram estão descritas na Tabela 13.

Tabela 12: Características macroscópicas das bactérias isoladas

Bactéria	Características	Cultivo bacteriano
1	Pequena, circular, entero, opaca, brilhante, rosada, lisa, elevada e suave.	
2	Mediana, circular, entero, opaca, brilhante, amarelo-claro, lisa, convexa e suave.	
3	Mediana, circular, entero, opaca, brilhante, branca, lisa, plana e mucoide.	





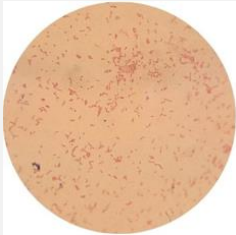
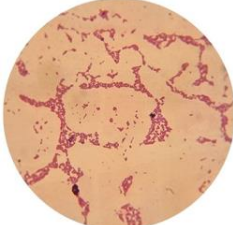
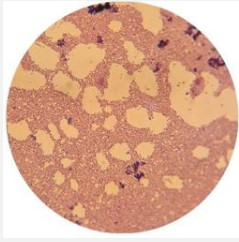
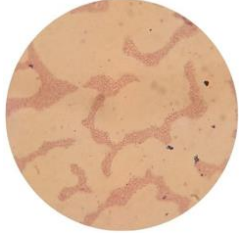

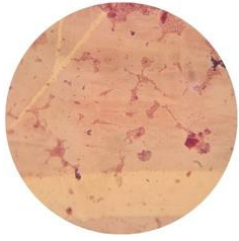
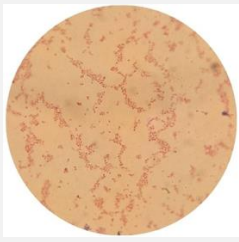
4	Grande, circular, entero, opaca, brilhante, branca, lisa, elevada e mucoide.	
5	Mediana, circular, entero, opaca, brilhante, rosada, lisa, elevada e suave.	
6	Mediana, circular, entero, transparente, brilhante, não pigmentada, lisa, elevada e suave.	
7	Mediana, circular, entero, opaca, brilhante, alaranjada, lisa, elevada e suave.	

Tabela 13: Características microscópicas das bactérias isoladas (forma, arranjo e coloração de gram)

Bactéria	Forma	Arranjo	Coloração de gram	Microscopia
1	Bacilos	Diplobacilos	Gram-negativa	
2	Bacilos	Paliçada	Gram-positiva	

3	Bacilos	Paliçada	Gram-positiva	
4	Bacilos	Diplobacilos	Gram-negativa	
5	Bacilos	Estreptobacilos	Gram-negativa	
6	Bacilos	Paliçada	Gram-negativa	
7	Cocobacilos	Isolado	Gram-negativa	

Os resultados da caracterização macroscópica das bactérias isoladas mostram que há diversidade entre as amostras, principalmente em relação ao tamanho, coloração, elevação e consistência. O aspecto das colônias bacterianas pode sofrer alterações de acordo com o meio de cultura no qual foram isoladas, a taxa de crescimento, a densidade das colônias nas placas e a formação de biofilme, visto que o fenótipo resulta da relação do genótipo com o meio (SOUSA et al., 2013). No entanto, a caracterização deve sempre

ser complementada com outros testes para obter uma identificação precisa do microrganismo.

A técnica de coloração de gram realizada mostrou que as bactérias 2 e 3 são gram-positivas, o que demonstra que sua parede celular é espessa e composta de muitas camadas de peptidoglicanos, formando uma estrutura espessa e rígida. Essas bactérias são geralmente mais resistentes a condições adversas, como seca e salinidade, devido à sua parede celular robusta e são frequentemente associadas a interações benéficas, como por exemplo, a promoção do crescimento vegetal através da produção de fitohormônios. Entretanto, algumas bactérias gram-positivas são capazes de causar doenças em plantas (ex.: *Clavibacter michiganensis*) (SCHIMMEL; BALSER; WALLENSTEIN, 2007).

Em contrapartida, as bactérias 1, 4, 5, 6 e 7 são gram-negativas, uma classe que inclui tanto patógenos (ex.: *Pseudomonas syringae*) quanto espécies benéficas (ex.: *Rhizobium*), sendo capazes de causar doenças em plantas, mas também de promover interações positivas. Essas bactérias possuem parede celular mais fina, composta de uma camada de peptidoglicano mais externa e uma membrana externa, que possui um glicolípido conhecido como lipopolissacarídeo (LPS). O LPS desempenha papéis cruciais na estrutura da célula, na proteção contra agentes externos e na interação com o sistema imune do hospedeiro (TORTORA, 2017). O lipopolissacarídeo (LPS) nas bactérias gram-negativas que interagem com plantas desempenha várias funções importantes, como:

- **Indução de respostas imunes:** o LPS atua como um sinal que pode ser reconhecido pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) nas plantas. Essa interação pode ativar vias de defesa, levando à produção de fitoalexinas e outras substâncias antimicrobianas;

- **Patogenicidade:** em algumas bactérias fitopatogênicas, o LPS pode contribuir para a virulência, ajudando as bactérias a se estabelecerem em plantas, provocando doenças;
- **Adesão e formação de biofilme:** o LPS facilita a adesão das bactérias à superfície das plantas e contribui para a formação de biofilmes, protegendo as bactérias de estresses ambientais e aumentando sua capacidade de colonização;
- **Interação simbiótica:** em bactérias benéficas, o LPS pode promover interações simbióticas com as plantas, favorecendo a colonização e o desenvolvimento de associações que podem melhorar a saúde e o crescimento das plantas (KUTSCHERA; RANF, 2019).

4.3. Formação de Biofilme

Os resultados da formação de biofilme pelas 7 bactérias isoladas nos diferentes períodos de tempo estão descritos nos gráficos abaixo. O Gráfico 1 representa a formação de biofilme em 24 horas, o Gráfico 2 em 48 horas e o Gráfico 3 em 72 horas de incubação.

Gráfico 1. Formação de biofilme em 24 horas.

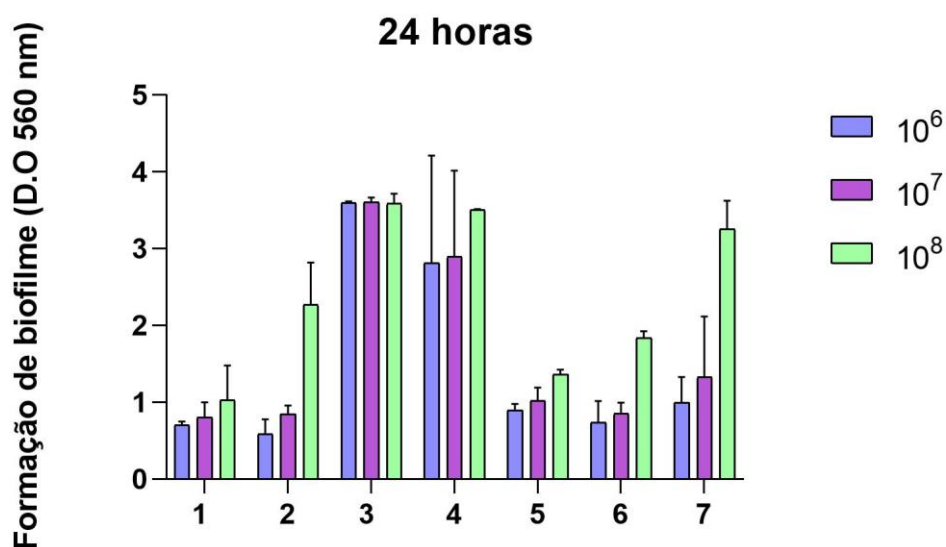


Gráfico 2. Formação de biofilme em 48 horas.

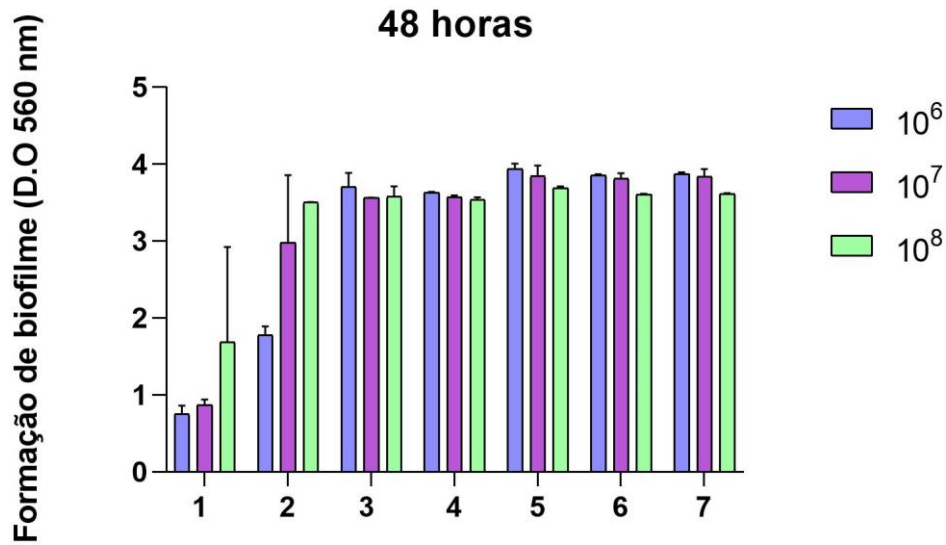
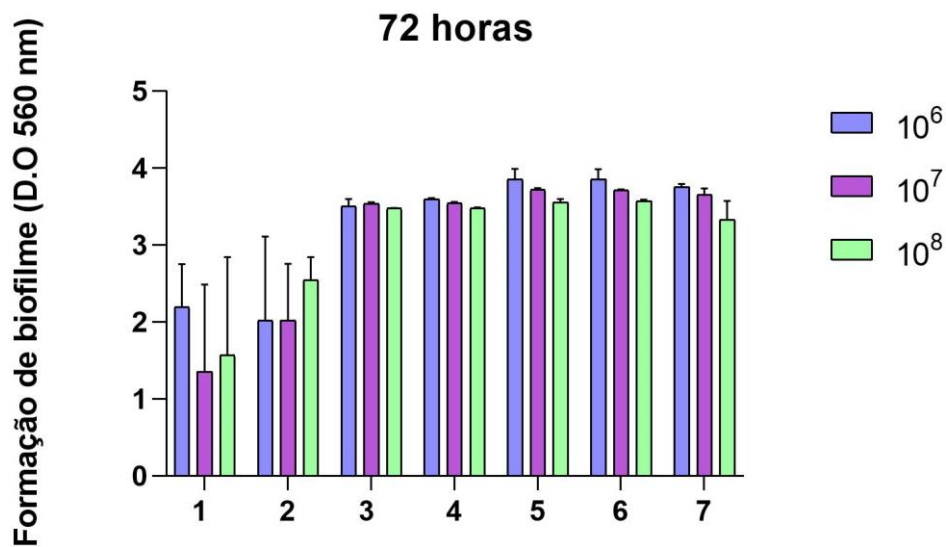


Gráfico 3. Formação de biofilme em 72 horas.



A característica de consistência mucoide em bactérias está associada à uma maior produção de biofilme, visto que é resultado da produção excessiva de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), componente essencial dos biofilmes. Essas substâncias formam uma matriz viscosa e gelatinosa ao redor das células bacterianas. Outras bactérias

conhecidas pela produção de biofilme, como a *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* geralmente apresentam essa consistência quando cultivadas em meio de cultura (THI; WIBOWO; REHM, 2020; RIQUELME; AHN; PRINCE, 2018). Nesse contexto, as bactérias que apresentaram maior e constante formação de biofilme nos três períodos de tempo e em todas as concentrações foram 3 e 4, ambas com consistência mucoide. Já as que apresentaram menor formação de biofilme nos três períodos de tempo e em todas as concentrações foram as bactérias 1 e 2. Houve um aumento da formação de biofilme nas bactérias 5, 6, 7 em 48 e 72 horas de incubação, especialmente na concentração 10^6 , demonstrando que não necessariamente a maior concentração bacteriana irá garantir uma maior produção de biomassa de biofilme, o que pode ocorrer devido à competição por espaço e recursos, o que pode favorecer o crescimento bacteriano.

4.4. Quantificação do DNA

Os resultados da quantificação do DNA extraído das 7 amostras estão descritos na Tabela 14. Ao final do processo de extração de DNA, o pellet foi reidratado em 100 μL da solução de reidratação do kit, assim, essa era a quantidade final nos tubos de cada amostra.

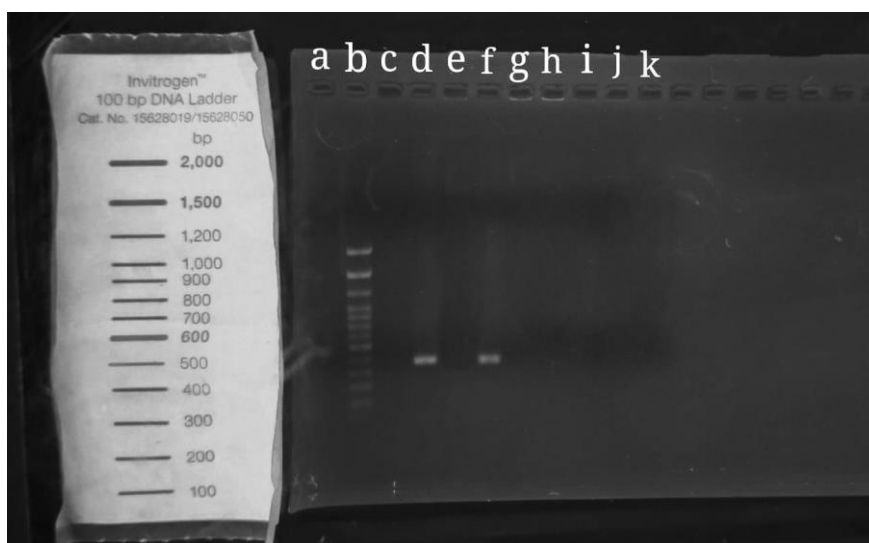
Tabela 14: Resultados da quantificação do DNA extraído das 7 amostras bacterianas.

Bactéria	DNA (ng/ μL)
1	7,12
2	9,17
3	13,36
4	10,43
5	12,54
6	16,5
7	8,58

4.5. Detecção do gene *nifH*

A figura 7 apresenta a imagem da eletroforese em gel de agarose para analisar os produtos da reação de PCR realizada nas amostras. A eletroforese separa fragmentos de DNA com base em seu tamanho e carga elétrica, e através da visualização em gel de agarose é possível verificar se a PCR foi bem-sucedida e se o produto tem o tamanho esperado. Foi utilizado o marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder da Invitrogen para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados e a bactéria Abv6 (*Azospirillum brasiliense*) como controle positivo. O resultado da eletroforese foi observada através de um transiluminador de luz UV. Pode-se observar na figura que houve amplificação do fragmento de DNA nas amostras representadas pelas letras d e f, que correspondem à Abv6 e bactéria 2, respectivamente, indicando a presença do gene *nifH*. Comparando a migração das bandas com o marcador de peso molecular, os fragmentos correspondentes à Abv6 (controle positivo) e bactéria 2 apresentaram aproximadamente 500 pb (pares de bases nitrogenadas). Estudos mostram que a quantidade de pares de base do gene *nifH* pode variar entre diferentes espécies de organismos (LAGUERRE et al., 2001; (DEISE CRISTIANE FRIEDRICH; PEREIRA, 2004).

Figura 7. Eletroforese em gel observada no transiluminador.



Nota: a-controle negativo do gel; b-marcador de peso molecular; c-controle negativo da pcr; d-Abv6; e-bactéria 1; f-bactéria 2; g-bactéria 3; h-bactéria 4; i-bactéria 5; j-bactéria 6; k-bactéria 7.

5. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, é possível concluir que as bactérias que apresentaram uma maior produção de biofilme foram 3 e 4 e foi detectada a presença do gene *nifH* na bactéria 2, indicando que podem ser microrganismos promissores para serem utilizados separadamente ou em conjunto em aplicações agrícolas, como por exemplo na composição de insumos agrícolas, pois podem auxiliar na promoção do crescimento de plantas. Ademais, são necessários estudos genéticos mais aprofundados, como o sequenciamento do gene do RNA ribossomal 16S, para determinar a classificação taxonômica dos microrganismos isolados e posteriormente, ensaios em campo para observar a eficiência da utilização dos mesmos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDERRAHIM AASFAR et al. Agronomic advantage of bacterial biological nitrogen fixation on wheat plant growth under contrasting nitrogen and phosphorus regimes. *Frontiers in plant science*, v. 15, 8 maio 2024.

ALBINI, C. A.; SOUZA, H. A. P. H. M.; STINGHEN, A. E. M. Coloração de Gram – Como fazer, interpretar e padronizar, Curitiba: Microscience, 2002. p. 07.

BASHIR, I., Assad, R., War, A. F., Rafiq, I., Sofi, I. A., Reshi, Z. A., & Rashid, I. (2021). Application of Phyllosphere Microbiota as Biofertilizers. In *Microbiota and Biofertilizers*, Vol 2 (pp. 311-327). Springer, Cham.

CARVALHO, C. R., Dias, A. C., Homma, S. K., & Cardoso, E. J. (2020). Phyllosphere bacterial assembly in citrus crop under conventional and ecological management. *PeerJ*, 8, e9152.

DEBIE RIZQOH et al. Exploration of Phyllosphere Bacteria From Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.). *Advances in biological sciences research*, 1 jan. 2021.

DEISE CRISTIANE FRIEDRICH; PEREIRA, M. Avaliação da possibilidade de ocorrência de transformação natural de *Azospirillum brasilense* com DNA de plantas contendo o gene de resistência à canamicina. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 2, n. 3, p. 151–158, 1 jan. 2004.

DESLIPPE, J.; EGGER, K. Molecular diversity of *nifH* genes from bacteria associated with high arctic dwarf shrubs. *Microbial Ecology*, New York, v.51, p. 516-525, 2006.

DESTRO, J. et al. Expanding agricultural potential through biological nitrogen fixation: Recent advances and diversity of diazotrophic bacteria. *Australian Journal of Crop Science*, n. 18(06):2024, p. 324–333, 19 jun. 2024.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. & BALDANI, V.L.D. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas nãoleguminosas. Brasília, Embrapa-SPI. Itaguaí, EmbrapaCNPAB, 1995. 60p.

KUTSCHERA, A.; RANF, S. The multifaceted functions of lipopolysaccharide in plant-bacteria interactions. *Biochimie*, v. 159, p. 93–98, abr. 2019.

LAGUERRE, G.; NOUR, S. M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROUIN, P.; AMARGER, N. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals

a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* v. 147, p. 981-993, 2001.

MAJDURA, J. et al. The Role of Quorum Sensing Molecules in Bacterial–Plant Interactions. *Metabolites*, v. 13, n. 1, p. 114, 10 jan. 2023.

NEPITA, Ana Laura Guillen. Ding! *Microbiologia*, 2020. Morfologia Colonial. Disponível em: <https://dingmicrolab.wordpress.com/2020/10/12/morfologia-colonial/>. Acesso em: 28 set. 2024.

NUNES, F. S.; RAIMONDI, A. C.; NIEDWIESKI, A. C. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. *Química Nova*, v. 26, n. 6, p. 872–879, dez. 2003.

NUNES, G. Diversidade e estrutura de comunidades bacterianas na filosfera e suas relações com a espécie vegetal e compostos orgânicos voláteis. 12 nov. 2015.

PANDIT, A. et al. Microbial biofilms in nature: unlocking their potential for agricultural applications. *Journal of Applied Microbiology*, v. 129, n. 2, p. 199–211, 20 fev. 2020.

PI, H.-W. et al. Origin and Evolution of Nitrogen Fixation in Prokaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, v. 39, n. 9, 22 ago. 2022.

RIQUELME, SEBASTIAN A.; AHN, D.; PRINCE, A. *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* Adaptation to Innate Immune Clearance Mechanisms in the Lung. *Journal of Innate Immunity*, v. 10, n. 5-6, p. 442–454, 2018.

SCHIMEL, J.; BALSER, T. C.; WALLENSTEIN, M. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology*, v. 88, n. 6, p. 1386–1394, jun. 2007.

SOUSA, A. M.; MACHADO, I.; NICOLAU, A.; PEREIRA, M.O. Improvements on colony morphology identification towards bacterial profiling. *Journal Microbiological Methods*, v.95, p. 327-335. 2013.

STEPANOVIĆ, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, v. 115, n. 8, p. 891–899, ago. 2007.

STONE, B. W., Weingarten, E. A., & Jackson, C. R. (2018). The role of the phyllosphere microbiome in plant health and function. *Annual Plant Reviews online*, 533-556.

THI, M. T. T.; WIBOWO, D.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 22, p. 8671, 17 nov. 2020.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

VORHOLT, J. A. Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*, v. 10, n. 12, p. 828–840, 16 nov. 2012.