

Preparo de caldo de cana-de-açúcar para utilização em meio de cultura de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Stefan Schwab¹
Kátia Regina dos Santos Teixeira¹
José Ivo Baldani¹

Introdução

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria aeróbica, Gram-negativa, originalmente isolada do interior de plantas de cana-de-açúcar (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988; GILLIS et al., 1989). Este microrganismo tem especial interesse como potencial biofertilizante porque é capaz de fixar N₂ na presença de nitrato e a baixos valores de pH (< 3,0), além de produzir hormônios de crescimento vegetal (STEPHAN et al., 1991; BASTIAN et al., 1998). Tem sido observado que a localização de *G. diazotrophicus* na planta da cana-de-açúcar é ampla. A bactéria já foi encontrada em raízes, caules e partes aéreas de diversas variedades do Brasil e da Austrália (LI e MACRAE, 1992; REIS et al., 1994). Além disso, seiva de xilema e espaços intercelulares de colmo de cana têm sido sugeridos como prováveis sítios de localização da bactéria, sítios estes adequados à expressão da enzima nitrogenase, devido à baixa pO₂ existente nesses nichos (JAMES et al., 1994, 2001; DONG et al., 1994). A genética da fixação biológica de nitrogênio nessa bactéria tem sido estudada extensivamente (SEVILLA et al. 1997; TEIXEIRA et al. 1999; LEE et al. 2000). De forma impactante, sua seqüência genômica completa foi recentemente publicada no banco de dados GenBank (BERTALAN et al., 2008), o que tem permitido a realização de estudos de genômica funcional. Estes estudos, que envolvem tecnologias como cDNA-AFLP e captura de promotores (“*promoter trapping*”) (GALIZA et al., SCHWAB et al., não publicado), buscam compreender quais os genes envolvidos, como ocorre sua regulação durante a interação com a planta hospedeira e, de modo mais importante, de

que forma estimula o crescimento vegetal durante essa associação.

A biologia das bactérias que colonizam a rizosfera de um modo geral tem sido estudada adotando-se estratégias *in vitro* como simplificação. Por exemplo, exudato de raízes de plantas tem sido amplamente utilizado em meios de cultura de microrganismos para identificar tanto moléculas sinalizadoras da planta hospedeira quanto genes do microrganismo que respondem a essas moléculas (FISCHER et al., 2003; MICHÉ et al., 2003; POTHIER et al., 2007). Porém, em relação aos estudos da biologia de bactérias endofíticas, isto é, aquelas que colonizam o interior dos tecidos vegetais, como a *G. diazotrophicus*, existe um vasto campo inexplorado no que se refere à sinalização que ocorre entre planta hospedeira e microrganismo. Neste caso específico, adotar estratégias *in vitro* também se mostra interessante para identificar tanto moléculas sinalizadoras da planta quanto genes do microrganismo que respondem a essas moléculas, utilizando, por exemplo, os fluidos do interior dos tecidos vegetais. No caso da cana-de-açúcar, o caldo obtido por moagem dos colmos tem sido utilizado em meio de cultura para *G. diazotrophicus* (“*diluted sugarcane juice medium*”, CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988). Desde o trabalho destes autores, na Embrapa Agrobiologia o caldo é rotineiramente adicionado a um meio de cultura específico, que então é esterilizado em autoclave para posterior uso com *G. diazotrophicus*, processo este que foi otimizado por Reis et al. (1994).

O controle microbiano em líquidos pode ser realizado por agentes físicos, como calor, radiação e filtração, e químicos, como anti-sépticos, desinfetantes, esterilizantes e antibióticos. A aplicação de calor e pressão, através da

¹ Pesquisadores da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, Caixa Postal 74505, CEP 23851-970, Seropédica-RJ. E-mail: sschwab@cnpab.embrapa.br; katia@cnpab.embrapa.br; ibaldani@cnpab.embrapa.br

autoclave, corresponde ao método mais amplamente utilizado para a esterilização (MADIGAN et al., 2004); porém, não se apresenta como um método adequado para esterilizar líquidos sensíveis ao calor, como aqueles que são constituídos por macromoléculas, que perdem sua atividade biológica por desnaturação. Neste caso, a filtração é o método recomendável para esterilizar líquidos como o caldo de cana-de-açúcar.

Este trabalho descreve um procedimento alternativo ao uso da autoclave para o preparo e esterilização de caldo de cana-de-açúcar com fins de utilização em meio de cultura, reduzindo a perda da atividade biológica e a derivatização (e.g., caramelização) dos compostos presentes no caldo.

Material e métodos

A Figura 1 esquematiza as etapas de purificação e esterilização a frio das amostras de caldo de cana-de-açúcar. Para o preparo de um litro de caldo de cana estéril, foram utilizados aproximadamente 1,5 kg de colmo da variedade de cana-de-açúcar SP70-1143, ou 4 kg de colmo da variedade Chune, coletadas do Campo Experimental da Embrapa Agrobiologia. As plantas foram raspadas para a remoção do excesso de casca e palha, e prensadas em moenda para a obtenção do caldo de cana. O caldo foi centrifugado duas vezes a $30.000 \times g$, 0°C , 30 min. O sobrenadante foi coletado e submetido a uma série de etapas de filtração a vácuo, utilizando um funil de Buchner e um Kitassato, sempre em banho de gelo, em papel de filtro com limites decrescentes de retenção: 28, 14, 8, 3, 2, 0,45 e $0,22 \mu\text{m}$. Após a última etapa de filtração, o caldo, com coloração intermediária entre castanha e verde oliva, foi transferido para tubos do tipo Falcon em alíquotas de 50 mL e estocado a -80°C .

A estirpe de *G. diazotrophicus* utilizada neste trabalho para cultivo na presença do caldo de cana foi a do tipo selvagem PAL5, isolada originalmente de raízes de cana-de-açúcar cultivada em Alagoas (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988; GILLIS et al., 1989). Os caldos de ambas as variedades de cana-de-açúcar foram diluídos 1:1 em meio LGI-P sólido (açúcar comum cristal 100 g/L, K_2HPO_4 0,2 g/L, KH_2PO_4 0,6 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 20 mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 mg/L, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/L, biotina 0,1 mg/L, piridoxal-HCl 0,2 mg/L, azul de bromotimol 25 mg/L, extrato de levedura 50 mg/L, pH 5,5, ágar 25 g/L) conforme descrito (“diluted sugarcane juice medium”, CAVALCANTE

e DÖBEREINER, 1988), e o meio resultante foi transferido para placa de Petri. Células de *G. diazotrophicus* foram cultivadas sobre o meio de caldo de cana diluído sólido por até 13 dias, a 30°C , avaliando-se a formação de colônias típicas, em comparação com controles não inoculados.

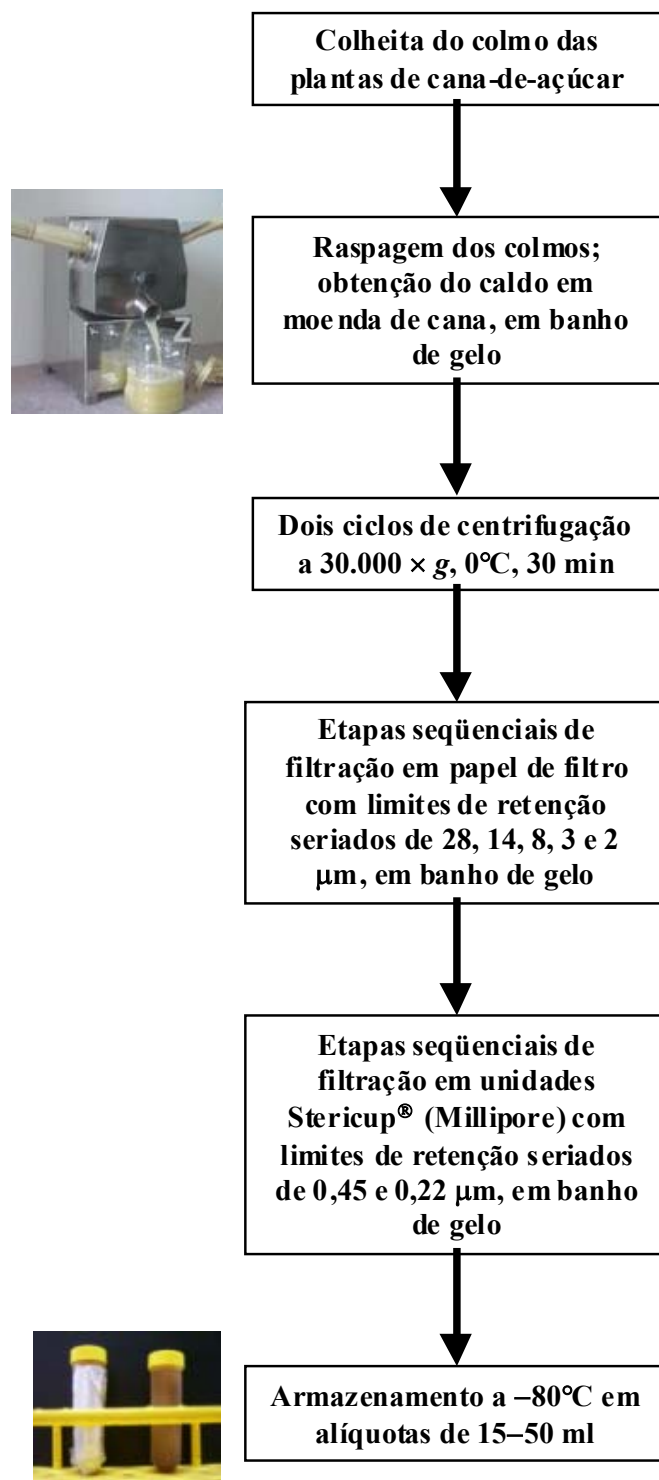


Figura 1: Fluxograma do procedimento de esterilização a frio de caldo de cana-de-açúcar.

Resultados e discussão

A Figura 2 mostra placas de Petri com culturas de *G. diazotrophicus* no meio LGI-P contendo caldo de cana diluído, após 13 dias de cultivo. Para os três meios testados, pode-se verificar a presença de colônias alaranjadas, mostrando acidificação do meio pelo indicador de pH azul de bromotimol, típico do crescimento de *G. diazotrophicus*. Quando não foi inoculada qualquer bactéria, não ocorreu surgimento de colônias de microrganismos por até 13 dias de incubação, indicando que o procedimento de esterilização do caldo de cana foi eficaz.

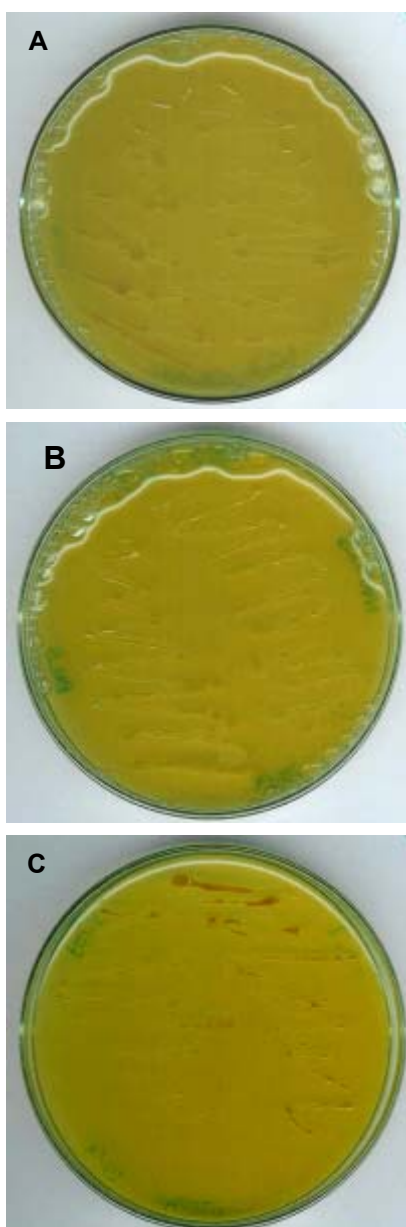


Figura 2. *Gluconacetobacter diazotrophicus* cultivada em meio LGI-P contendo caldo de cana diluído das variedades comercial SP70-1143 e Chune de cana-de-açúcar. A = meio contendo caldo de cana diluído da variedade comercial SP70-1143; B = meio contendo caldo de cana diluído da variedade selvagem Chune; C = meio LGI-P (controle) sem adição de caldo de cana.

Atualmente, os caldos das variedades de cana-de-açúcar esterilizados a frio estão sendo utilizados para caracterizar promotores de transcrição de *G. diazotrophicus*. Uma biblioteca de promotores da bactéria, construída em um vetor com o gene repórter *lacZ* sem promotor, e utilizando células hospedeiras da própria *G. diazotrophicus*, é cultivada na presença do caldo da variedade específica de cana-de-açúcar; a atividade de β -galactosidase dos clones da biblioteca cultivados nessas condições é monitorada utilizando-se o indicador X-GAL. Esta estratégia tem permitido identificar clones da biblioteca responsivos que terão seus promotores caracterizados por seqüenciamento de DNA. Os ensaios de expressão de *lacZ* são realizados em uma variação de meio DYGS na presença de caldo esterilizado a frio, o que mostra que os caldos de cana podem ser utilizados em diferentes tipos de meio de cultura.

Referências Bibliográficas

- BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically defined culture media. **Plant Growth Regul.**, v. 24, p. 7–11, 1998.
- BERTALAN, M.; BALDANI, J.I.; FERREIRA, P.; AND RIOGENE CONSORTIUM. *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 complete genome. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genomemaprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=377. Acesso em: 25 nov. 2008.
- CAVALCANTE, V.A.; DÖBEREINER, J.. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 108, p. 23–31, 1988.
- DONG, Z.; CANNY, M.J.; McCULLY, M.; REBOREDO, M.R.; FERNÁNDEZ, C.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems: a new role for the apoplast. **Plant Physiol.**, v. 105, p. 1139–1147, 1994.
- FISCHER, S.E.; MIGUEL, M.J.; MORI, G.B. Effect of root exudates on the exopolysaccharide composition and the lipopolysaccharide profile of *Azospirillum brasilense* Cd under saline stress. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 219, p. 53–62, 2003.

GILLIS, K.; KERSTERS, K.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KROPPESTEDT, R.M.; STEPHAN, M.P.; TEIXEIRA, K.R.S.; DÖBEREINER, J.; DE LEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 39, p. 361-364, 1989.

JAMES, E.K.; REIS, V.M. OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **J. Exp. Bot.**, v. 45, p. 757-766, 1994.

JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L.; OLIVEIRA, A.L.M.; REIS-JR., F.B.; SILVA, L.G.; REIS, V.M. Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. **J. Exp. Bot.**, v. 52, p. 747-760, 2001.

LEE, S.; RETH, A.; MELETZUS, D.; SEVILLA, M.; KENNEDY, C. Characterization of a major cluster of *nif*, *fix* and associated genes in a sugarcane endophyte, *Acetobacter diazotrophicus*. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 7088-7091, 2000.

LI, R.P.; MACRAE, I.C. Specific identification and enumeration of *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane. **Soil Biol. Biochem.**, v. 24, p. 413-419, 1992.

MICHÉ, L.; BELKIN, S.; ROZEN, R.; BALANDREAU J. Rice seedling whole exudates and extracted alkylresorcinols induce stress-response in *Escherichia coli* biosensors. **Environ. Microbiol.**, v. 5, p. 403-411, 2003.

POTHIER, J.F.; WISNIEWSKI-DYÉ, F.; WEISS-GAYET, M.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; PRIGENT-COMBARET, C. Promoter-trap identification of wheat seed extract-induced genes in the plant-growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245. **Microbiology**, v. 153, p. 3608-3622, 2007.

REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; DÖBEREINER, J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 10, p. 101-104, 1994.

SEVILLA, M.; MELETZUS, D.; TEIXEIRA, K.R.S.; LEE, S.; NUTAKKI, A.; BALDANI, J.I.; KENNEDY, C. Analysis of *nif* and regulatory genes in *Acetobacter diazotrophicus*. **Soil Biol. Biochem.**, v. 29, p. 871-874, 1997.

STEPHAN, M.P.; OLIVIERA, M.; TEIXEIRA, K.R.S.; MARTINEZ-DRETS, G.; DÖBEREINER, J. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 77, p. 67-72, 1991.

TEIXEIRA, K.R.S.; WULLING, M.; MORGAN, T.; GALLER, R.; ZELLERMAN, E.M.; BALDANI, J.I.; KENNEDY, C.; MELETZUS, D. Molecular analysis of the chromosomal region encoding the *nifA* and *nifB* genes of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 71, p. 521-530, 1999.

Comunicado Técnico, 114

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia

BR465 – km 7

Caixa Postal 74505

23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil

Telefone: (0xx21) 2682-1500

Fax: (0xx21) 2682-1230

Home page: www.cnpab.embrapa.br

e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

1ª impressão (2008): 50 exemplares



Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Comitê de publicações

Eduardo F. C. Campello (Presidente)
José Guilherme Marinho Guerra
Maria Cristina Prata Neves
Veronica Massena Reis
Robert Michael Boddey
Maria Elizabeth Fernandes Correia
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente

Revisor e/ou ad hoc: Orivaldo José Saggin Jr. e Luc Felicianus Marie Rouws
Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix.
Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia.