



# IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS CONTAMINANTES NO PROCESSO DE ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Eugenia stipitata* Mc Vaugh

## IDENTIFICATION OF CONTAMINATING BACTERIA IN THE *IN VITRO* ESTABLISHMENT PROCESS OF *Eugenia stipitata* Mc Vaugh

Deila Cristina Vieira da Silva<sup>1</sup>; Bruna da Silva Salvador<sup>2</sup>; Caroline Marques Silva<sup>3</sup>; Beatriz Emanuela Pereira da Cruz<sup>4</sup>; Hosana Carolina dos Santos Barreto<sup>5</sup>; Érica Catrine Queiroz Costa<sup>6</sup>; Lucas Ramon de Almeida Moraes<sup>7</sup>; Kerolaine Beserra Braga de Souza<sup>8</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Roraima (UFRR), Campus do Cauamé, BR-174, Km 12, Monte Cristo - Boa Vista - Roraima, CEP 69.301-970, Brasil. Bolsista CAPES/Brasil. [deilacris.16@gmail.com](mailto:deilacris.16@gmail.com). Apresentador do trabalho.; <sup>2</sup>Instituto de Educação e Inovação (IEDi), Av. Ville Roy, 1908 - Caçari, Boa Vista - RR, CEP 69307-725, Brasil. [bruna.s.salvador.12@gmail.com](mailto:bruna.s.salvador.12@gmail.com).; <sup>3</sup>Universidade Federal de Roraima (UFRR), Campus do Cauamé, BR-174, Km 12, Monte Cristo - Boa Vista - Roraima, CEP 69.301-970, Brasil. [carolinemarques169@gmail.com](mailto:carolinemarques169@gmail.com).; <sup>4</sup>Universidade Federal de Roraima (UFRR), Campus do Cauamé, BR-174, Km 12, Monte Cristo - Boa Vista - Roraima, CEP 69.301-970, Brasil. [beatriz.e.p.c@gmail.com](mailto:beatriz.e.p.c@gmail.com).; <sup>5</sup>Universidade Federal de Roraima (UFRR), Núcleo Insikiran, Av. Capitão Ene Garcez, 2413, Bairro Aeroporto-Boa Vista - Roraima, CEP 69.310-000, Brasil. [hosanacarolina@gmail.com](mailto:hosanacarolina@gmail.com).; <sup>6</sup>Universidade Federal de Roraima (UFRR), Campus do Cauamé, BR-174, Km 12, Monte Cristo - Boa Vista - Roraima, CEP 69.301-970, Brasil. [ericacatrine07@gmail.com](mailto:ericacatrine07@gmail.com).; <sup>7</sup>Instituto de Educação e Inovação (IEDi), Av. Ville Roy, 1908 - Caçari, Boa Vista - RR, CEP 69307-725, Brasil. [Lucas02ramon@gmail.com](mailto:Lucas02ramon@gmail.com).; <sup>8</sup>Instituto de Educação e Inovação (IEDi), Av. Ville Roy, 1908 - Caçari, Boa Vista - RR, CEP 69307-725, Brasil. [Kerolainebbs@gmail.com](mailto:Kerolainebbs@gmail.com).

## INTRODUÇÃO

O araçá-boi (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh), pertencente à família das Myrtaceas, é uma frutífera nativa da Amazônia que tem despertado interesse comercial devido seu excelente potencial econômico e industrial, por se desenvolver facilmente em qualquer tipo de solo de terra firme, apresentando frutos volumosos com elevada percentagem de polpa, teor de vitamina C e compostos antioxidantes, os quais podem ser utilizados na fabricação de sucos, sorvetes e doces (GARZON et al., 2012; MENEZES FILHO, 2021; SANTOS et al., 2017).

A propagação por meio do cultivo *in vitro* tem se tornado uma boa alternativa para essa espécie, devido sua produção massal de mudas, uniformes e livres de patógenos, tudo isso em um espaço físico pequeno. Porém, um fator muito importante a ser considerado é a descontaminação fúngica e bacteriana, que são fatores que podem ser limitantes nesse processo, pois essas contaminações comprometem o desenvolvimento do cultivo se estabelecendo no meio de cultura e competindo com o explante por nutrientes e vitaminas, além de produzirem metabólitos fitotóxico (SANTOS et al., 2015). Para conter e/ou reduzir o aparecimento destes microrganismos é necessário saber exatamente quais são os contaminantes, para buscar a melhor alternativa de controle a fim de evitar perdas dos materiais vegetais, garantindo de forma eficiente o sucesso dessa técnica para a espécie. Dessa forma, o objetivo do estudo foi identificar as bactérias presentes na contaminação *in vitro* de explantes de plantas de araçá-boi.

## MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal de araçá-boi foi coletado na Área experimental Campus Cauamé da Universidade Federal de Roraima, no município de Boa Vista - RR (2° 52' 20,7" N e 60° 42' 44,2" W e altitude de 90 m). Após a coleta, os explantes foram levados ao laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Roraima onde passaram por um processo de desinfestação em câmara de fluxo laminar,



utilizando álcool 70% por 1 minuto, seguindo da imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1,5% com 2 gotas de detergente neutro por 10 minutos, seguido de triplice enxágue com água destilada, deionizada e autoclavada (DDA) para retirada total dos produtos da superfície dos tecidos.

Após a assepsia, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio WPM suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico, solidificado com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado para 5,6 antes da autoclavagem a 120 °C por 20 minutos. Posteriormente, foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 16 h de 35-40 μmol m<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. Foi observada a contaminação por bactérias e realizada uma seleção visual dos tipos de contaminantes que ocorrem com maior frequência nos explantes. Esses explantes que foram separados e levados ao Laboratório de Microbiologia do Solo (LMS), da Embrapa Roraima para o isolamento de microrganismos da cultura de tecidos do araçazeiro-boi, que se deu por detecção dependente da cultura.

As amostras foram coletadas com uma alça de repicagem e inoculadas em placa de petri contendo meio de cultura DYGS (*Dextrose Yeast Glucose Sucrose*) e incubadas a 28 °C por 24 horas. Em seguida, foram isoladas pelo método de esgotamento por estrias em placas de petri contendo meio de cultura DYGS e/ou Ágar nutriente com alça de platina. Após a obtenção das colônias puras, foi realizado o microcultivo dos isolados selecionados, que facilita a observação das principais características, utilizadas para identificar tais microrganismos. Posteriormente, as bactérias isoladas foram caracterizadas morfológicamente por meio de observações diárias da placa contendo os isolados e de comparações com descrições disponíveis na literatura. Os isolados bacterianos foram cultivados em ágar nutrientes para caracterização morfológica (tamanho, borda, superfície, elevação, cor, formato, brilho) a fim de separá-los em grupos primários segundo protocolo 005.POP.005.LMS da Embrapa Roraima que descreve o Procedimento Operacional Padrão Técnico para Caracterização de Culturas Bacterianas.

Foi realizado o teste da reação ao hidróxido de potássio (KOH), para identificação das bactérias Gram-positiva ou Gram-negativa, onde foi colocada uma gota de KOH 3% em uma lâmina para microscopia, previamente identificada, e com o auxílio de uma alça calibrada, devidamente flambada e fria, coletou-se parte de uma colônia presente em cultura na placa de Ágar e a colocou em contato com a gota de KOH. Foram realizados movimentos circulares constantes para dissolver a alíquota e foi observado se ocorria a mudança na viscosidade do material por aproximadamente 30 segundos, levantando seguidas vezes a alça calibrada para evidenciar se houve formação de um “fio” viscoso. Para identificar as bactérias Gram-negativas é formado um fio viscoso, sendo consideradas positivas no teste. As bactérias Gram-positivas não formam o fio viscoso e são consideradas negativas no teste.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio do isolamento e do microcultivo foi possível identificar e selecionar cinco isolados, que foram nomeados como: AR1, AR2, AR3, AR6 e AR7. De acordo com o teste morfológico e o teste



da reação ao hidróxido de potássio (KOH) foi possível caracterizar as cinco bactérias selecionadas e suas informações foram dispostas na tabela 1.

**TABELA 1** - Identificação e características morfológicas de bactérias contaminantes do cultivo *in vitro* de arará-boi.

Morfotipo	Gênero/Espécie	Forma	Elevação	Cor	Transparência	Gram (+ -)
AR1	<i>Sphingomonas sp.</i>	Circular	Lenticular	Amarela	Translúcida	+
AR2	<i>Methylobacterium sp.</i>	Circular	Plana	Rosa	Translúcida	+
AR3	<i>Burkholderia sp.</i>	Circular	Convexa	Creme	Translúcida	-
AR6	<i>Achromobacter sp.</i>	Puntiforme	Plana	Creme	Transparente	-
AR7	<i>Não Identificado</i>	Puntiforme	Plana	Branca	Opaca	+

O isolado AR1 apresentou um crescimento muito rápido, sua forma sendo circular com elevação lenticular, suas bordas e superfície lisa, com coloração amarela brilhante, sua transparência translúcida e sua consistência viscosa, tamanho inicial de < 2 mm e final de < 2-4 mm, sendo ela gram-positiva, pertencente ao gênero *Sphingomonas sp.* As bactérias desse gênero são endofíticas promotoras de crescimento e estão presentes em uma diversidade de ambientes, elas possuem versatilidade no seu metabolismo, pois utilizam diferentes compostos naturais, incluindo alguns contaminantes ambientais, contém genes que degradam metabólitos persistentes e carbazol, além de regular alguns pesticidas e diminuir a concentração de metais pesados (ASAF et al., 2017; KHAN et al., 2017).

O isolado AR2 apresentou um crescimento rápido, sua forma sendo circular com elevação plana, suas bordas e superfície lisa, com coloração rosa brilhante, sua transparência translúcida e sua consistência viscosa, tamanho inicial de <2mm e final de < 2 mm, sendo ela gram positiva, pertencente ao gênero *Methylobacterium sp.* As bactérias desse gênero também são conhecidas como bactérias metilotróficas facultativas de pigmentação rosa (PPFM), conhecidas por usarem compostos de carbono único e substratos multicarbonos sem ligações carbono-carbono, além disso, estão presentes de modo geral na filosfera e na rizosfera e possuem grande influência na fertilidade do solo, no crescimento e na produtividade das plantas e induzem alterações fisiológicas nas plantas, conferindo resistências a estresse biótico e abiótico (NYSANTH et al., 2023). Ainda, podem fornecer composto/nutrientes promotores de crescimento vegetal com grande potencial bioinoculante e biofertilizante (SENTHILKUMAR et al., 2021) e, algumas bactérias, possuem atividade antagônica contra diversos fitopatógenos (NYSANTH et al., 2023).

O isolado AR3 apresentou um crescimento muito rápido, sua forma sendo circular com elevação convexa, suas bordas e superfície lisa, com coloração creme fosca, sua transparência translúcida e sua consistência viscosa, tamanho inicial de < 2 mm e final de < 2-4mm, sendo ela gram negativa, pertencente ao gênero *Burkholderia sp.* As bactérias desse gênero são descritas como endofíticas que possuem função benéfica para as plantas já que elas competem com fitopatógenos e promovem o crescimento das culturas, pois elas tem capacidade de fixar nitrogênio, fosfato solubilizante e compostos



xenobióticos degradantes, além do potencial como biorremediadoras e a utilização de herbicidas e hidrocarbônios como fontes de energia e carbono (DOURADO et al., 2013)

O isolado AR6 apresentou um crescimento muito rápido, sua forma sendo puntiforme com elevação convexa, suas bordas e superfície lisa, com coloração creme brilhante, transparente e sua consistência viscosa (figura 3), tamanho inicial de < 2 mm e final de < 2 mm, sendo ela gram-negativa, pertencente ao gênero *Achromobacter sp.* As bactérias desse gênero são classificadas como promotoras de crescimento (PGPR) e produzem diferentes fitohormônios, auxiliando no crescimento das plantas. Além disso, elas são endofíticas diazotróficas, fixando o nitrogênio com maior eficiência, podendo atuar como biofertilizantes e biorremediador (ABDEL-RAHMAN et al., 2017).

O isolado AR7 apresentou um crescimento muito rápido, sua forma sendo puntiforme com elevação plana, suas bordas e superfície lisa, com coloração branca brilhante, opaca, e sua consistência seca, (figura 4), tamanho inicial de < 2 mm e final de < 2 mm, sendo ela gram-positiva, seu gênero no atual momento não foi identificado por meio do método morfológico, necessitando de estudos moleculares para sua identificação.

## CONCLUSÃO

O resultado das avaliações realizadas nos isolados bacterianos provenientes da contaminação *in vitro* de arcaçá-boi, obteve-se como identificação dos microrganismos os isolados AR1 do gênero *Sphingomonas sp.*, o isolado AR2 do *Methylobacterium sp.*, o AR3 do gênero *Burkholderia sp.*, o AR6 do *Achromobacter sp.* e a AR7 onde seu gênero não foi indentificado.

## AGRADECIMENTO

À Capes pelo auxílio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHMAN, H. M.; SALEM, A. A.; MUSTAFA, M. M. A.; EL GARHY, H. A. S. A novice *Achromobacter sp.* EMCC1936 strain acts as a plant-growth-promoting agent. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 61, 2017. DOI 10.1007/s11738-017-2360-6
- ASAF, S.; KHAN, M. A.; KHAN, A. L.; WAQAS, M.; SHAHZAD, R.; KIM, A. Y.; KANG, S. M.; LEE, I. J. Bacterial endophytes from arid land plants regulate endogenous hormone content and promote growth in crop plants: an example of *Sphingomonas sp.* and *Serratia marcescens*. **Journal of Plant Interactions**, v. 12, n. 1, p. 31-38, 2017.
- DOURADO, M. N.; MARTINS, P. F.; QUECINE, M. C.; PIOTTO, F. A.; SOUZA, L. A.; FRANCO, M. R.; TEZOTTO, T.; AZEVEDO, R. A. *Burkholderia sp.* SCMS54 reduces cadmium toxicity and promotes growth in tomato. **Annals of Applied Biology**, v. 163, n. 3, p. 494-507, 2013.
- GARZON, G. A.; NARVÁEZ-CUENCA, C. E.; KOPEC, R. E.; BARRY, A. M.; RIEDL, K. M.; SCHWART, S. J. Determination of carotenoids, total phenolic content, and antioxidant activity of araza (*Eugenia stipitata* McVaugh), an Amazonian fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 18, p. 4709-4717, 2012.



KHAN, A. L.; WAQAS, M.; ASAF, S.; KAMRAN, M.; SHAHZAD, R.; BILAL, S.; KHAN, A. M.; KANG, S.M.; KIM, Y. H.; YUN, B. W.; AL-RAWAHI, A.; AL-HARRASI, A.; LEE, I. J. Plant growth-promoting endophyte *Sphingomonas sp.* LK11 alleviates salinity stress in *Solanum pimpinellifolium*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 133, n. único, p. 58-69, 2017.

MENEZES FILHO, A. C. P. *Myrciaria glazioviana*, *Myrciaria strigipese* *Myrciaria trunciflora*: análise sistemática, reprodução, fitoquímica e farmacologia. **Scientific Eletrochinc Archives**, v. 14, n. 8, p. 49-56, 2021.

NYSANTH N.S.; RAJAN S.A.; SIVAPRIYA S.L.; ANITH K.N. Pink Pigmented Facultative *Methylotrrophs* (PPFMs): Potential Bioinoculants for Sustainable Crop Production. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 660-681, 2023.

SANTOS, V. A.; RAMOS, J. D.; TOSTES, N. V.; SILVA, F. O. R.; ALMEIRDA, L. G. F. Caracterização física e química de frutos de araçá-boi (*Eugenia stipitata*) em Lavras –MG. **Enciclopédia Biosfera**, v. 14, n. 26, p. 167-176, 2017.

SANTOS, M. R. A. DOS; CHAGAS, S. E. DA S.; GUIMARÃES, M. DE C. M. Estabelecimento de protocolo para descontaminação de explantes foliares de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.). **Saber Científico**, v. 4, n. 2, p. 15-23, 2015.

SENTHILKUMAR, M., PUSHPAKANTH, P., ARUL JOSE, P., KRISHNAMOORTHY, R., & ANANDHAM, R. Diversity and functional characterization of endophytic *Methylobacterium* isolated from banana cultivars of South India and its impact on early growth of tissue culture banana plantlets. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 5, p. 2448-2465, 2021.