https://eventos.utfpr.edu.br//sicite/sicite2020

Prospecção de bactérias promotoras de crescimento vegetal da rizosfera de urucum

Prospecting of bacteria promoting plant growth of the urucum rhizosphere

Gabriela Cristina da Silva Biet
gabrielabiet@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Taynara Cassia Seratti
taynaraseratti@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Letícia Beatriz Silva Aranha
leticia.2017@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Adson Ruan Gonçalves
adson@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Patricia Dayane Carvalho Schaker
patriciaschaker@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2020.
Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.

RESUMO

As rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCPs) são uma alternativa para reduzir o uso de fertilizantes químicos, pois permitem maior absorção e disponibilidade de nutrientes para a planta além de atuar na defesa contra fitopatógenos. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar bactérias da rizosfera de Urucum com potencial de promover crescimento vegetal, visando a aplicação em culturas agrícolas. Para isso, raízes sadias foram coletadas na região de Toledo PR, tendo o solo rizosférico processado e plaqueado nos meios de cultivo LB e BDA. As colônias morfologicamente distintas foram isoladas por esgotamento e avaliadas quanto a capacidade de solubilizar fosfato, fixar nitrogênio e produzir auxina. Em meio LB obteve-se maior número de colônias ($1{,}4.10^3$ UFC/mL), sendo que dos 40 isolados obtidos, cerca de 75% solubilizaram fosfato e 43% fixaram nitrogênio. Em meio BDA, dos 27 isolados avaliados, 70% solubilizaram fosfato e 63% fixaram nitrogênio. Quanto a produção de auxina os isolados LB 24 e LB 2 se destacaram com valores de 169,10 $\mu g.mL^{-1}$ e 168,47 $\mu g.mL^{-1}$, respectivamente.

PALAVRAS-CHAVE: Auxina. Fixação de nitrogênio. Microbiologia agrícola.

ABSTRACT

Plant growth promoting rhizobacteria (RPCPs) are an alternative to reduce the use of chemical fertilizers, as they allow greater absorption and availability of nutrients for the plant in addition to acting in defense against phytopathogens. The objective of this work was to isolate and characterize bacteria from the Urucum rhizosphere with the potential to promote plant growth, aiming at the application in agricultural crops. For this, healthy roots were collected in the Toledo PR region, with the rhizospheric soil processed and plated in the LB and BDA cultivation media. The morphologically distinct colonies were isolated by exhaustion and evaluated for the ability to solubilize phosphate, fix nitrogen and produce auxin. In LB medium, a higher number of colonies ($1.4{,}10^3$ CFU/mL) was obtained, and of the 40 isolates obtained about 75% solubilized phosphate and 43% fixed nitrogen. In BDA medium, of the 27 isolates evaluated, 70% solubilized phosphate and 63% fixed nitrogen. As for auxin production, isolates LB 24 and LB 2 stood out with values of 169.10 $\mu g.mL^{-1}$ and 168.47 $\mu g.mL^{-1}$, respectively.

KEYWORDS: Auxin. Nitrogen fixation. Agricultural microbiology.

INTRODUÇÃO

Atualmente, sabe-se que bactérias que habitam naturalmente o solo quando associadas à planta apresentam inúmeros benefícios ambientais além de contribuir com o desenvolvimento vegetal (JÚNIOR, *et al*. 2013). Nesse contexto, a utilização de Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas RPCPs (ou PGPR, do inglês *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), torna-se uma alternativa para a substituição e/ou redução do uso de fertilizantes químicos, uma vez que permite maior absorção e disponibilidade de nutrientes para a planta, além de poderem atuar na defesa contra fitopatógenos (CUNHA, 2017).

As rizobactérias são um conjunto de bactérias colonizadoras da região rizosférica, delimitada pelas raízes das plantas, sendo altamente rica em nutrientes, sais minerais e matéria orgânica, favorecendo o crescimento de uma vasta microbiota, em detrimento de solos não rizosféricos, cuja característica é a de escassez e limitação de nutrientes. (CARDOSO; TSAI; NEVES, 1992). As relações de cooperação entre microrganismos e plantas variam de acordo com o local, clima e necessidades, impulsionando novos estudos com interesses biotecnológicos.

Os potenciais de ação das RPCPs diferem-se em duas formas, direta e indireta. Basicamente, na forma direta os agentes microbianos auxiliam no crescimento vegetal através da solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio atmosférico, produção de fitohormônios (giberelinas, citocininas, auxinas, entre outros) enquanto que, na forma indireta tem-se a produção de antibiótico, antifúngicos, enzimas e também atuando na supressão de patógenos (CUNHA, 2017; GRAÇAS, *et al*. 2015).

O Urucuzeiro é uma planta arbórea de nome científico *Bixa orellana L.* nativo da América Tropical. Suas sementes são popularmente conhecidas no Brasil como colorau, um corante natural de tom avermelhado e de elevada importância econômica e industrial. O colorau corresponde a 90% dos corantes naturais o que o torna atrativo, pois as restrições do uso de corantes artificiais estão cada vez mais presentes nas indústrias alimentícias e cosméticos em virtude dos danos causados à saúde como, por exemplo alergias e intoxicações (CASTRO, *et al*. 2009). Com elevada produtividade e baixo custo, os pigmentos podem ser utilizados na indústria de cosméticos, indústria farmacêutica, fabricação de tintas e indústria alimentícia (CASTRO, *et al*. 2009).

Nesse sentido, o presente trabalho objetivou isolar e caracterizar bactérias da rizosfera da planta Urucum com potencial de promover o crescimento vegetal, visando a aplicação em culturas agrícolas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Raízes sadias e frescas de Urucum contendo solo rizosférico foram coletadas a 15 cm de profundidade na região de Toledo – Paraná (-24.743521, -53.745899) e submetidas a diluição seriada com solução salina NaCl 0,85% até 10^{-2}. Em seguida alíquotas de 100 µL das amostras diluídas foram plaqueadas em dois meios de cultivo distintos, meio Luria Bertani (LB) e meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) ambos contendo antifúngico fluconazol (150 $mg.L^{-1}$) e as placas de Petri mantidas na temperatura de 37º e 28ºC respectivamente, por 24 horas. Mediante a contagem de UFC/mL selecionou-se 40 colônias de diferentes morfotipos de cada meio de

cultivo da diluição 10^{-1} para obtenção de colônias puras, as quais foram mantidas em temperatura controlada, como citado anteriormente. Posteriormente, a coleção de microrganismos puros fora mantida em glicerol 60% no freezer a -20ºC no laboratório de Biologia Molecular da UTFPR-TD.

Para avaliação da produção de auxina os agentes microbianos isolados em ambos os meios de cultivo foram crescidos a 37ºC em meio LB líquido por 24 horas a 200 rpm. Após crescimento das culturas, transferiu-se 100 µL do inóculo para tubos contendo 5 mL de meio LB suplementado com L-triptofano (1 $mg.mL^{-1}$) e protegidos da luz, os quais foram mantidos em shaker por 72 horas a 30ºC. Para quantificação de auxina, aliquotou-se em um novo microtubo 900 µL do sobrenadante, obtido após centrifugação a 12.000 rpm por 5 min em seguida adicionou-se 400 µL do reagente de Salkowski e deixou-se no escuro por 30 min. Os microtubos contendo os pellets foram armazenados em freezer para posterior quantificação de Proteínas. Todas as amostras foram quantificadas através do espectrofotômetro UV_{vis} no comprimento de onda de 520 nm juntamente com os padrões de auxina puros em concentrações distintas (5 $\mu g.mL^{-1}$; 10 $\mu g.mL^{-1}$; 25 $\mu g.mL^{-1}$; 50 $\mu g.mL^{-1}$ e 100 $\mu g.mL^{-1}$). O branco fora realizado com água destilada.

Para a quantificação de proteína preparou-se a solução A composta por 1 mL do reativo B (1 g $CuSO_4$ para 100 mL de água destilada), 1 mL do reativo C (2 g de Tartarato de sódio e Potássio para 100 mL de água destilada) e completou-se o volume de 100 mL com reativo A (20 g Na_2CO_3; 4 g de NaOH para volume de 1000 mL). Preparou-se também a solução B composta pelo reagente Folin-Ciocalteu diluído 1:1 (v/v) com água ultra pura. Os pellets foram homogeneizados com 1 mL da solução NaOH (0,1 M) e posteriormente incubados em banho maria (90ºC) por 10 min, seguido de banho de gelo (4ºC) por 15 min. Aliquotou-se 200 µL do sobrenadante após centrifugação a 10.000 g para um novo microtubo. Acrescentou-se 1 mL da solução A e deixou-se descansar por 10 min à temperatura ambiente. Posteriormente, acrescentou-se 100 µL da solução B e deixou-se à 30 min a temperatura ambiente. Com a curva padrão de Albumina Bovina (1 $\mu g.\mu L^{-1}$) preparou-se as concentrações de 0,2 $\mu g.\mu L^{-1}$, 0,4 $\mu g.\mu L^{-1}$, 0,6 $\mu g.\mu L^{-1}$, 0,8 $\mu g.\mu L^{-1}$ e 1 $\mu g.\mu L^{-1}$ para quantificação de proteína por espectrometria UV_{vis} no comprimento de onda de 660 nm.

Para detecção qualitativa de fixação de nitrogênio pelos isolados microbianos, utilizou-se o meio de cultura NFb modificado pela substituição de FeEDTA 1,64% por solução de EDTA 1,64%. Para tanto, transferiu-se a massa de células dos isolados para tubos de vidro contendo o meio NFb semi sólido, os quais foram armazenados em BOD a 28ºC ao longo de 20 dias, avaliando-se a mudança de coloração e formação de filme de crescimento microbiano, indicativos do potencial de fixação de nitrogênio.

Para avaliação do potencial de solubilização de fosfato, preparou-se meio de cultivo contendo (30 $g.L^{-1}$ de ágar; 10 $g.L^{-1}$ $CaHPO_4$; 10 $g.L^{-1}$ de glicose; 0,5 $g.L^{-1}$ $(NH_4)_2SO_4$; 0,3 $g.L^{-1}$ de NaCl; 0,3 $g.L^{-1}$ de KCl; 0,3 $g.L^{-1}$ $MgSO_4.7H_2O$; 0,03 $g.L^{-1}$ $FeSO_4$; 1 $g.L^{-1}$ $MnSO_4$; 1000 mL de água destilada q.s.p) com pH ajustado para 7,0 com solução NaOH 1 M. Gotejou-se 10 µL de cada inóculo em placas de Petri e armazenou-se em BOD a 37 ºC até o desenvolvimento de halos de degradação. A capacidade de solubilização de fosfato foi quantificada por meio do cálculo do Índice de Solubilização (IS) dado pela razão entre o diâmetro total do halo degradado e o diâmetro da colônia bacteriana.

Os isolados selecionados com maior potencial de promoção do crescimento vegetal foram caracterizados por microscopia através do método de coloração Gram. Para tanto, as culturas foram crescidas em placas de Petri por 24 horas a 35 ºC nos seus respectivos meios de cultivo. As culturas cujo resultado apresentou-se de coloração azul admitiu-se como bactérias Gram positivas, enquanto resultados obtidos de coloração vermelho rósea como Gram negativas.

Os testes bioquímicos realizados em triplicatas para as rizobactérias destacadas como mais promissores foram analisados estatisticamente através do teste de Tukey a 5% de significância utilizando-se do software Statistic StatSoft versão 8.0. Os gráficos foram montados com auxílio do software Excel.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as diluições e meios de cultivo permitiram o desenvolvimento de rizobactérias, sendo a diluição 10^{-1} com maior crescimento e diversidade morfológica apresentando $1{,}4.10^{3}$ UFC/mL em meio LB e $8{,}2.10^{2}$ UFC/mL em meio BDA. Com a técnica de isolamento foram obtidos 40 rizobactérias puras em meio LB e um total de 27 para o meio BDA. Do total de isolados em meio LB cerca de 75% solubilizaram fosfato e 43% fixaram nitrogênio e no meio BDA 70% solubilizaram fosfato e 63% fixaram nitrogênio. Os testes bioquímicos realizados com todos os isolados bacterianos da rizosfera do urucum, tais como solubilização de fosfato, produção de auxina normalizado por proteína e fixação de nitrogênio (FN) permitiu a seleção de dez microrganismos mais promissores, sendo 5 isolados de cada meio de cultivo. A Tabela 1 apresenta as rizobactérias com potencial em promover o crescimento vegetal de acordo com os testes bioquímicos.

Tabela 1 – Isolados mais promissores segundo os testes bioquímicos

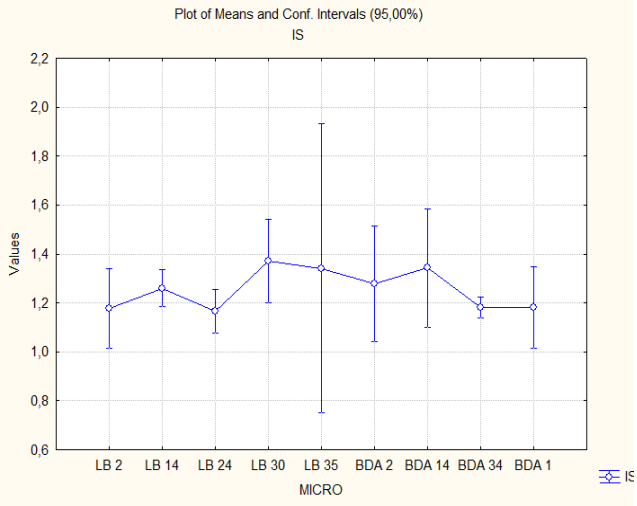
Rizobactérias	Auxina/Proteína (µg/µl)	IS	FN
LB 2	1,254	1,8	Positivo
LB 14	0,989	2,0	Positivo
LB 24	0,722	1,8	Positivo
LB 30	0,754	2,0	Positivo
LB 35	1,922	2,2	Positivo
BDA 1	1,916	2,0	Positivo
BDA 2	2,025	0,2	Positivo
BDA 13	1,713	1,6	Positivo
BDA 14	2,629	2,0	Positivo
BDA 34	2,864	1,5	Positivo

Fonte: Autoria própria (2020).

Após o screening inicial, os isolados microbianos mais promissores foram novamente avaliados em triplicata quanto a capacidade de solubilização de fosfato e de produzir auxina ao longo de 24, 48 e 72 horas de incubação. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância. A capacidade de solubilização de fosfato para todas as rizobactérias mais promissoras, segundo a análise de variância não apresentou diferenças significativas ($p > 0{,}05$) entre as médias analisadas. Contudo, constatou-se conforme a Figura 1 apresenta, que o maior IS considerando o desvio padrão corresponde ao isolado LB 30 (IS =1,4) seguido do BDA 14 (IS=1,3) e LB 35 (IS=1,3). Tendo em vista que LB 35 apresentou o maior

desvio padrão, portanto pode manifestar 0,8 < IS > 1,9 sendo capaz, também, de se destacar como maior agente solubilizador de fosfato uma vez que, apresentou baixa variabilidade dos dados (CV = 0,05) em relação à média, ou seja, dados mais homogêneos.

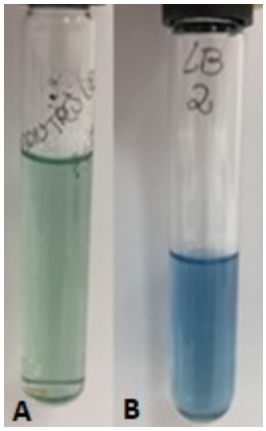
Figura 1 – Gráfico de interação para solubilização de fosfato dos isolados mais promissores.



Fonte: Autoria própria (2020)

O potencial de fixação de nitrogênio atmosférico foi analisado com base na mudança da cor do meio NFb de verde para azul intenso (Figura 2) e formação de película de crescimento próxima a superfície do meio, sendo classificado como positivo para mudança de cor/crescimento e negativo sem alteração na cor/sem crescimento ao longo do período de incubação em ambiente controlado. Dentre todos os isolados obtidos tanto em meio LB quando em meio de cultivo BDA, o potencial de fixação de nitrogênio foi confirmado para 17 rizobactérias.

Figura 2 – Representação do teste de fixação de nitrogênio das rizobactérias isoladas do urucum. (A) Controle negativo. (B) Mudança de coloração indicativo da fixação de N_2.

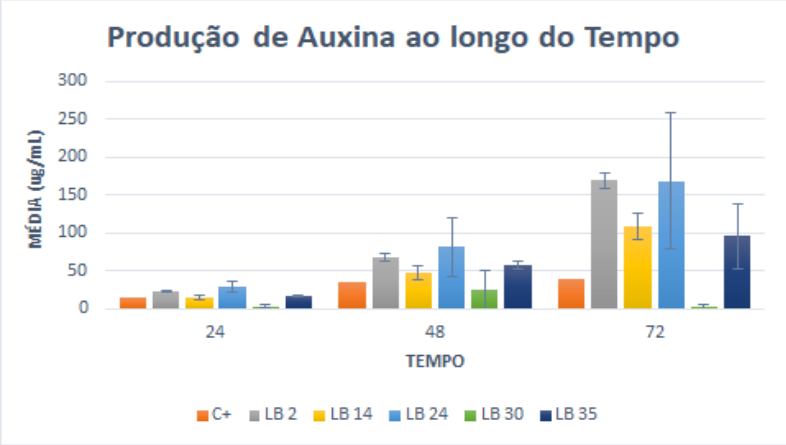


Fonte: Autoria própria (2020)

A produção de auxina avaliada em triplicata ao longo do tempo de 24, 48 e 72 horas de incubação para os selecionados mais promissores do meio LB, permitiu determinar o melhor tempo para produção desse fitohormônio. A Figura 3 apresenta a produção de auxina ao longo do tempo, onde observa-se que o tempo

de 72 horas de incubação propiciou uma maior produção de auxina e os microrganismos LB 24 e LB 2 se destacam dentre todos outros isolados quanto a produção desse fitohormônio.

Figura 3 – Produção de auxinaao longo do tempo dos cinco isolados em meio LB mais promissores. "C+": Bactéria *Pantoea agglomerans,* controle positivo para produção de auxina.



Fonte: Autoria própria (2020)

A análise de variância sobre o tempo de produção de auxina demonstrou haver diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias analisadas. Por meio do teste de Tukey a 95% de confiança pode-se afirmar que o tempo de 72 horas permitiu uma maior produção de auxina dentre os outros tempos avaliados conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Teste de Tukey a 5% de significância sobre o tempo de produção de auxina

Tempo (Horas)	Médias
72	109,16 [a]
48	55,943 [ab]
24	17,663 [b]

Fonte: Autoria própria (2020).

Além do tempo, os microrganismos também se diferenciam em relação ao potencial de produção de auxina. Mediante o teste de Tukey a 5% de significância fora obtido que para o tempo de 24 horas, conforme a Tabela 3 apresenta, o microrganismo LB 24 se destaca como o maior produtor de auxina ($p < 0,05$) dentre os outros analisados.

Tabela 3 – Produção de auxina após 24 horas de incubação

Rizobactérias	Médias
LB 24	29,617 [a]
LB 2	22,959 [ab]
LB 35	16,860 [b]
LB 14	14,997 [b]
LB 30	3,8830 [c]

Fonte: Autoria própria (2020).

Para o tempo de 48 horas, não houve diferenças estatísticas ($p > 0,05$) dentre as médias avaliadas, sendo LB 24 o maior produtor de auxina (81,7) seguido do LB

2 com média de 67,5. Para o tempo de 72 horas, as produções de auxina apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), variando de 169,10 a 3,07 conforme a Tabela 4 apresenta.

Tabela 4 – Produção de auxina após 72 horas de incubação

Rizobactérias	Médias
LB 2	169,10 [a]
LB 24	168,47 [a]
LB 14	109,48 [ab]
LB 35	95,665 [ab]
LB 30	3,0763 [b]

Fonte: Autoria própria (2020).

Portanto, a produção de auxina para o tempo de 72 horas para LB 2 e LB 24 é muito superior em comparação aos outros tempos e as outras rizobactérias, nesse sentido, ambos os microrganismos são muito promissores e capazes de contribuir para o crescimento vegetal de forma isolada ou como parte de um consórcio microbiano. O ácido indolacético (AIA) é um hormônio vegetal que contribui para o desenvolvimento da parte radicular das plantas mesmo sob baixas concentrações, permitindo uma melhor absorção de nutrientes. Grande parte das rizobactérias isoladas do solo são capazes de produzir este fitohormônio (GRAÇAS, *et al*. 2015). A produção de auxina para os selecionados em meio BDA não foi avaliada em triplicata após seleção dos mais promissores.

A análise morfológica através da coloração Gram demonstrou que dos isolados mais promissores obtidos em meio LB, um total de 60% possui formato de bacilo, dos quais 40% gram-negativos e 20% gram-positivos, 20% diplobacilos gram-negativos e 20% estreptobacilos gram-negativos. Enquanto para o meio BDA, 60% bacilos gram-positivos e 40% diplobacilos, destes sendo 20% gram-positivos.

CONCLUSÃO

A diversidade microbiana que coloniza a rizosfera de plantas torna-se cada vez mais atrativa para pesquisadores e cientistas, sendo uma alternativa de substituição de insumos. Com os testes bioquímicos foi possível identificar microrganismos com potencial de crescimento vegetal que podem, futuramente, fazer parte de consórcios microbianos. Em trabalhos futuros pretende-se avaliar o crescimento e desenvolvimento vegetal por meio de teste *in vitro*, além de realizar a identificação molecular de todos os isolados promissores para estabelecer perfis genéticos desses bioinoculantes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Tecnológica Federal do Paraná que forneceu espaço e infraestrutura e a bolsa para o desenvolvimento deste projeto e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro. A minha orientadora por todos os ensinamentos e assistência.

REFERÊNCIAS

CARDOSO, Elke. J. B. N. TSAI, Siu. M. NEVES, Maria C.P. **Microbiologia do Solo:** A Rizosfera. Campinas SP, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo.1992. p.40-42.

CASTRO, Cleómenes B. de. et al. **A Cultura do Urucum.** Coleção Plantar (2009), Brasília DF, ed.2, n.64, p.66, jun. 2020.

CUNHA, Thammi, Q. G. da. **Promoção de Crescimento de Plantas de Tomate Mediada Por Isolados Bacterianos**. 2017.43f. Dissertação (Mestrado em olericultura) - Instituto Federal Goiano, GO, 2017.

GRAÇAS, Jonathas P. et al. **Microrganismos Estimulantes na Agricultura**. Série Produtor Rural. Série Produtor Rural, Piracicaba. n. 59, p.56, 2015. jun. 2020.

JÚNIOR, José R. V. et al. **Rizobactérias Como Agente de Controle Biológico e Promotores de Crescimento de Plantas**. Porto Velho RO: Embrapa Rondônia, 2013. p.15.