

Prospecção de microrganismos rizosféricos promotores de crescimento em plantas

Prospecting for rhizosphere microorganisms that promote growth in plants

RESUMO

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

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

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

A prospecção é o conjunto de processos que envolve descoberta, análise, processamento e comercialização de genes ou biomoléculas de bactérias. O presente trabalho consiste em selecionar microrganismos isolados da rizosfera de *Aloe vera* e *Mentha* que apresentem características relacionadas ao potencial de promoção de crescimento vegetal, que futuramente possam fazer parte de um consórcio. Para tanto, microrganismos previamente obtidos e mantidos em estoque em glicerol foram reativados e purificados pela técnica de esgotamento, totalizando 46 isolados. Foram realizados testes bioquímicos, que indicaram que 91,3% dos microrganismos são capazes de solubilizar fosfato na forma inorgânica, sendo que destes 71,7% apresentaram índice de solubilização menor que 2, enquanto 19,6% apresentam índice maior igual a 2 e menor igual a 4. O teste de auxina foi realizado nas estirpes mais promissoras do teste de solubilização de fosfato, sendo verificada uma produção máxima de 63,5 µg/mL. As linhagens selecionadas ainda serão avaliadas em relação à fixação de nitrogênio atmosférico e identificadas por técnicas de biologia molecular e, seu potencial de uso como bioinoculante confirmado em testes *in vivo*.

PALAVRAS-CHAVE: Microbiologia agrícola. Agro Biotecnologia. Plantas.

ABSTRACT

Prospecting is the set of processes that involves discovery, analysis, processing and marketing of genes or biomolecules of bacteria. The objective of this work is to find a microbial consortium that promotes plant growth and acts in the control of phytopathogens. To this end, the rhizosphere of Babosa and Mint was carried out. The viability of the strains was verified and depletion techniques were used to obtain isolation of the 46 colonies. Phytochemical tests were performed, which indicated that 91.3% of microorganisms are capable of solubilizing Phosphate in the P-Ca form, and of these 71.7% presented solubilization index lower than 2, while 19.6% have a higher index equal to 2 and lower equal to 4. The auxin test was performed in the most promising solubilization strains, with a maximum production of 63.5 µg/mL. The next stage of the project will be to expand the repeatability of the tests already performed, and perform new tests such as atmospheric nitrogen fixation, protein quantification and biomolecular sequencing of promising species.

KEYWORDS: Agricultural Microbiology. Agro biotechnology. Plants.

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.



INTRODUÇÃO

Toda a planta para crescer e se desenvolver necessita de condições básicas como luz, temperatura e nutrientes, sendo o solo majoritariamente responsável por fornecer sais e minerais, abrigo e água propiciando o desenvolvimento vegetal.

A rizosfera, região do solo delimitada pela raiz de uma planta, apresenta elevado teor de matéria orgânica, característica que a torna ideal para o crescimento de diversos microrganismos, (CARDOSO, E.J.B.N; TSAI S.M; NEVES M.C.P, 1992) os quais em relações benéficas colaboram para o crescimento e desenvolvimento saudável da planta, oferecendo ações biopesticidas, biofertilizantes, rizorremediação e fitoestimulação (REIS V.M, 2005).

Assim, diante dos benefícios proporcionados pela relação entre microrganismos e plantas, surge o estudo de prospecção com intuito de identificar, avaliar e explorar a sistemática da diversidade genética em um determinado local de interesse, com objetivo de gerar um produto biotecnológico de valor comercial (ALMEIDA, J.R.M; COLLARES D.G; BARBOSA, P.F.D, 2015), neste caso em especial, um produto promotor do crescimento saudável e que atue no controle de fitopatógenos em plantas.

A *Aloe vera* ou babosa, como é popularmente conhecida, pertence à família *Aloaceae* que inclui cerca de 15 gêneros e 800 espécies. É uma planta bastante conhecida por suas inúmeras aplicações terapêuticas, tais como atividades cicatrizantes e anti-inflamatórias, e cosméticas, como hidratação de pele e cabelos. Apresenta folhas verdes, grossas e suculentas cujo tamanho variam de 30 a 60 centímetros de comprimento. As flores são vistosas em formato tubular com tonalidade branco amarelada. A planta herbácea pode crescer em qualquer tipo de solo e não exige água em abundância (FREITAS, V.S; RODRIGUES, R.A.F; GASPI, F.O.G, 2014).

A hortelã também é uma planta herbácea e pertence à família *Lamiaceae*. Muito conhecida e utilizada em temperos de pratos, aplicação em óleos essenciais e também como planta medicinal por infusão. Possui folhas pecioladas e pubescentes (isto é, coberta de pelos finos, curtos e macios). As flores são agrupadas em espigas nas axilas das folhas e apresentam coloração lilás ou branca. A planta suporta temperaturas baixas, mas adequa-se melhor a climas tropicais (JÚNIOR, H.P.L; LEMOS, A.L.A, 2014).

Neste trabalho, realizou-se prospecção microbiana na rizosfera das plantas *Aloe vera* e *Mentha*, escolhidas por apresentarem diversas aplicações e produção de metabólitos secundários que podem recrutar um microbioma exclusivo que cresce associado as suas raízes. Para a realização do estudo, testes bioquímicos como solubilização de fosfato (P-Ca), produção de auxina, fixação de nitrogênio atmosférico e testes biomoleculares são necessários a fim de realizar uma triagem para obter uma coleção de microrganismos com potencial em promover o crescimento vegetal e atuar no controle de fitopatógenos.

MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, verificou-se a efetividade do isolamento e viabilidade das estirpes das plantas *Aloe vera* e Hortelã estocadas em glicerol. Para isso, utilizou-se de meio de cultivo sólido (LB, composto de 20 g.L⁻¹ de LB, 20 g.L⁻¹ de Ágar e 1000 mL de água destilada q.s.p). Após o esgotamento dos microrganismos, as placas de

Petri foram levadas para a incubadora BOD, a 37°C por 24 horas. Então, prosseguiu-se com os microrganismos viáveis e devidamente isolados.

Para garantir novos estoques de estirpes em glicerol 60%, cultivou-se em meio líquido (LB, 20 g.L⁻¹ de LB e 1000 mL de água destilada q.s.p) alíquotas dos microrganismos crescidos no meio sólido. Para tal, utilizou-se tubos de 50 mL contendo 5 mL de meio líquido LB, deixados no shaker com agitação de 150 rpm a 37°C, até verificar-se turbidez do meio, indicando efetividade do crescimento celular. Para o estoque de glicerol retirou-se 500 µL de células do meio líquido, as quais foram armazenadas em microtubos estéreis, contendo 500 µL de glicerol 60%.

Do meio restante contendo inóculo, retirou-se amostras para extração de DNA. Retirou-se 1 mL de células, as quais foram armazenadas em microtubos de 1,5 mL e centrifugadas por 5 minutos a 8.000 rpm. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e os pellets contendo as células foram armazenados em refrigeração. Entretanto, a extração de DNA não fora realizada.

Para realizar o teste de solubilização de fosfato, preparou-se um meio sendo adicionado em um frasco 30 g.L⁻¹ de ágar, 10 g.L⁻¹ de glicose, 0,5 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0,3 g.L⁻¹ de NaCl, 0,3 g.L⁻¹ de KCl, 0,3 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,03 g.L⁻¹ FeSO₄ e 1 g.L⁻¹ MnSO₄.10 g.L⁻¹ e 1000 mL de água destilada q.s.p. Em outro frasco schott adicionou-se 100 mL de K₂HPO₄ 5% e 100 mL de CaCl₂ 10%. Então, ajustou-se o pH para 6,5, com intuito de obter fosfato de cálcio precipitado. Em seguida, autoclavou-se os dois frascos contendo as soluções e misturou-se os conteúdos, posteriormente vertidos em placas de Petri. Gotejou-se 10 µL de cada inóculo previamente preparado em meio de cultivo LB líquido, já mencionado, ao meio de cultivo de teste (P-Ca). As placas foram deixadas na BOD por 24 horas a 35 °C. Após o crescimento, os isolados foram avaliados quanto aos halos de degradação desenvolvidos ao longo do período de incubação.

As medidas do diâmetro (Φ) dos halos de solubilização, podem ser percebidos como uma área translúcida ao redor da colônia. A partir dessas medidas, foram obtidos os índices de solubilização de cada isolado por meio da fórmula: IS = Halo (mm)/ Colônia (mm) (HARA, F.A.S.; OLIVEIRA, L. A., 2004).

O teste de produção de auxina dá-se pela identificação colorimétrica do ácido indolacético (AIA) (RADWAN, T.E.E; MOHAMED, Z.K; REIS, V.M., 2005). O teste fora realizado nas 10 estirpes que se mostraram mais promissoras na solubilização de fosfato. Cultivou-se os inóculos em 3 mL de meio líquido LB, em tubos de 50 mL, crescidos a 37°C por 24 horas a 200 rpm. Após o crescimento, retirou-se 100 µL de cada inóculo os quais foram transferidos para outros tubos de 50 mL, contendo 5 mL de meio LB suplementado com L-triptofano 1 mg.mL⁻¹. O meio de cultura após inoculação foi mantido no escuro a 28°C, sob agitação constante de 150 rpm por 72 horas. Após esse período, foram coletados 1 mL da suspensão microbiológica e realizou-se a centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos, para obtenção de sobrenadante.

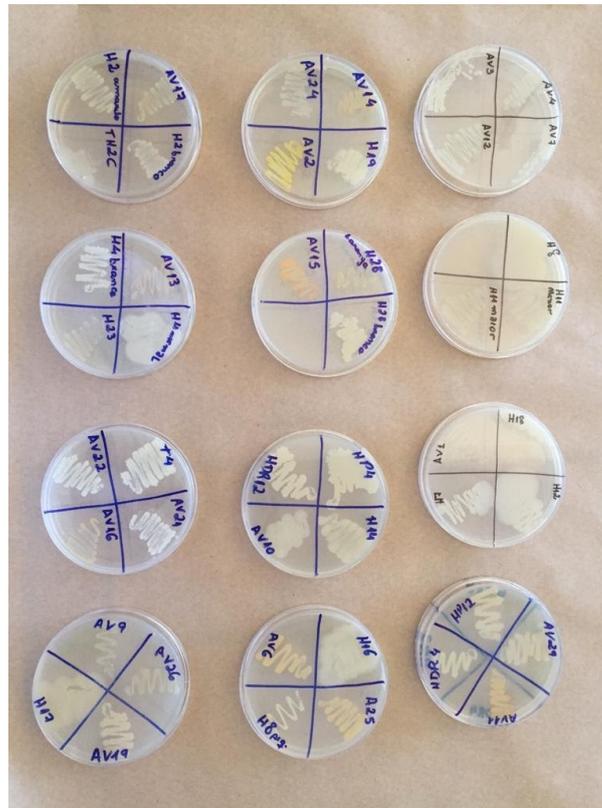
Em um microtubo adicionou-se 900 µL do sobrenadante e 400 µL do reagente de Salkowski (EHMANN, A., 1977). Após 30 minutos de reação no escuro foi realizada a leitura da absorbância em 500 nm. Para determinar a concentração final de AIA no meio utilizou-se de uma curva padrão. Os pellets contendo células

foram armazenados para posterior quantificação de proteínas. Entretanto, não fora realizada a quantificação das mesmas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolamento efetivo e a viabilidade dos microrganismos são passos fundamentais antes de iniciar trabalhos de pesquisa na área microbiológica. Na Figura 1, pode-se observar a morfologia dos microrganismos após verificada a viabilidade e o efetivo isolamento.

Figura 1 – Microrganismos isolados da rizosfera de Babosa e Hortelã.



Fonte: autoria própria, 2019.

Verificou-se no estudo que dos 46 isolados, 42 (91,3%) são capazes de solubilizar P-Ca. É possível classificar as estirpes de acordo com os índices de potencial de solubilidade, Tabela 1, podendo ser: baixa ($IS < 2$), média ($2 \leq IS \leq 4$) e alta solubilização ($IS > 4$) (HARA, F.A.S.; OLIVEIRA, L. A., 2004). A classificação da produção dos microrganismos foi realizada considerando seus valores médios obtidos nos testes de solubilização de fosfato.

Tabela 1 – Classificação quanto ao IS (Índice de solubilização de fosfato)

IS dos Microrganismos	Percentual(%)
Ausente	8,7
$IS < 2$	71,7
$2 \leq IS \leq 4$	19,6
$IS > 4$	--

Fonte: autoria própria, 2020.

As auxinas têm função de promover o crescimento e controlar a proliferação de patógenos, uma vez que são responsáveis por ativar diretamente genes alvos ou proteínas (MÜLLER J.L., 2015). Entretanto, a planta não consegue garantir a homeostase de sua maquinaria bioquímica e por vezes, utiliza toda sua maquinaria de auxinas para controle de patógenos, comprometendo seu crescimento. Nesse sentido, a ação de micróbios benéficos produtores de auxina na rizosfera da planta torna-se de extrema importância.

Dada essa importância o teste de produção de auxina foi realizado para oito microrganismos mais promissores em relação ao teste de solubilização de fosfato. A Figura 2 mostra a curva de padrão obtida com diferentes concentrações de auxina, em µg/mL.

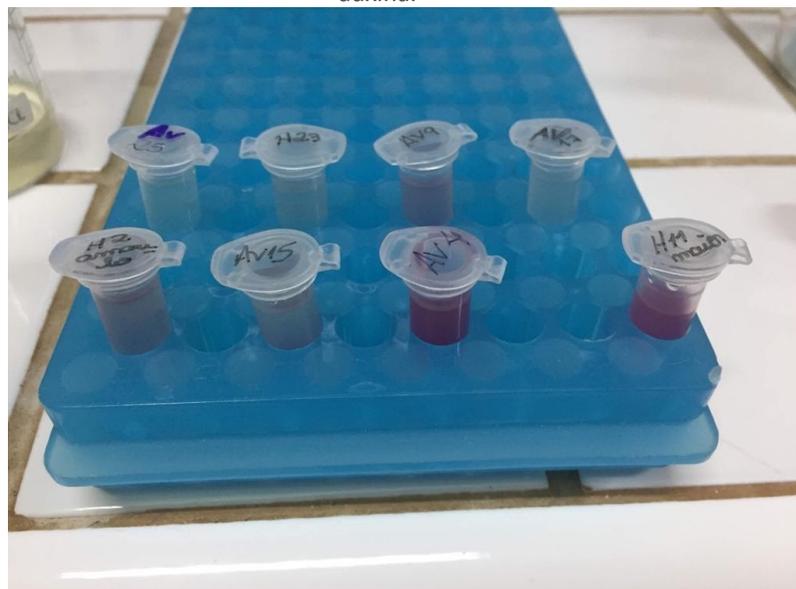
Figura 2 - Curva Padrão para a concentração de auxina.



Fonte: autoria própria, 2020.

O resultado do teste colorimétrico para os oito microrganismos pode ser observado na Figura 3.

Figura 3 – Teste colorimétrico para identificação e quantificação da produção de auxina.



Fonte: autoria própria, 2020.

Dada a curva padrão e considerando a tendência linear, com R^2 aceitável determinou-se a concentração de auxina para os 8 microrganismos AV25, H23, AV9, AV17, H2, AV15, AV4 e H11, obtendo-se respectivamente: -1.27, 10.54, 23.22, 14.56, 14.08, 24.43, 62.09 e 63.50.

Uma das absorvâncias ficou fora dos limites do padrão, resultando na concentração negativa. Sendo, portanto, um valor desconsiderado. Para melhor avaliação das estirpes é interessante aliar a quantificação de proteínas para normalização dos valores.

CONCLUSÃO

Com base no que foi exposto, percebe-se o quão vasto e rico em cultura de microrganismos é o solo rizosférico assim como seu potencial biotecnológico na área do agronegócio.

A princípio seguia-se com intuito de encontrar microrganismos promissores em diversas funções, entretanto, com o estudo verificou-se mais vantagem em realizar uma triagem de 5 a 10 microrganismos, potenciais para uma única função.

Deste modo, é possível montar um consórcio microbiano composto de microrganismos com diversas propriedades que permitem maior absorção e disponibilidade de nutrientes, estimulando o crescimento de plantas e controle de fitopatógenos, corroborando com a redução e até mesmo mitigação do uso de fertilizantes químicos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, que forneceu espaço e infraestrutura para o desenvolvimento do trabalho. À minha orientadora por todo auxílio e ensinamentos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. R. M; COLLARES, D.G.; BARBOSA, P. F. D. Bioprospecção Microbiana Embrapa, 2015. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/137596/1/bioprospeccao-microbiana-web.pdf>. Acesso em: 17/07/2020.

CARDOSO, Elke; TSAI S.M.; NEVES M.C.P. Sociedade Brasileira de ciências do solo - Microbiologia do Solo, 1992. Cap.4 p.41-43. Disponível em: http://www.esalq.usp.br/departamentos/iso/arquivos_aula/LSO_400%20LIVRO%20-%20MICROBIOLOGIA%20DO%20SOLO%20Cap%204.pdf. Acesso em 17/07/2020.

FREITAS, V.S.; RODRIGUES, R.A.F.; GASPI, F.O.G. Propriedades farmacológicas da Aloe vera (L.) Burm. f., Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.16, n.2, p.299-307, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbpm/v16n2/20.pdf>. Acesso em: 17/07/2020.

HARA, F.A.S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álidos de Presidente Figueiredo, Amazonas. Acta Amazônica, v. 34, n. 3, p. 343-357, 2004.

JÚNIOR, H.P.L.; LEMOS, A. L. A. Hortelã. Diagn Tratamento. 2012;17(3):115-7.
FREITAS, V.S.; RODRIGUES, R.A.F.; GASPI, F.O.G. Propriedades farmacológicas da Aloe vera (L.) Burm. f., Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.16, n.2, p.299-307, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbpm/v16n2/20.pdf>. Acesso em: 17/07/2020.

MÜLLER J.L. Bacteria and fungi controlling plant growth by manipulating auxin: Balance between development and defense. Journal of Plant Physiology, vol. 172, January 2015, p.4-12. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0176161714000182>. Acesso em: 12/02/2020.

RADWAN, T.E.E; MOHAMED, Z.K; REIS, V.M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.40, p.997-1004, 2005. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/228805951_Aeracao_e_adicao_de_sais_na_producao_de_acido_indol_acetico_por_bacterias_diazotroficas. Acesso em: 24/07/2020.

REIS, V. M. Interações entre Plantas e microrganismos. Documento digital 194, ISSN 1517-8498 maio/2005, p. 7 e 8. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/628358/interacoes-entre-plantas-e-microrganismos>. Acesso em: 18/07/2020.