

Seleção de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio e Produtoras de Fito-Hormônios Associadas às Plantas de Milho Sob Condições de Campo

Bianca Gonçalves Camilo⁽¹⁾; Tábata Cristina Campos Abreu⁽²⁾; Simone da Silva Santos⁽³⁾; Bianca Braz Mattos⁽⁴⁾; Christiane Abreu de Oliveira⁽⁵⁾; Ivanildo Evódio Marriel⁽⁶⁾.

⁽¹⁾ Graduanda de Engenharia Ambiental, Centro Universitário de Sete Lagoas; Sete Lagoas, Minas Gerais; bianca.g.camilo@hotmail.com; ⁽²⁾ Bolsista de Apoio Técnico FAPEMIG; ⁽³⁾ Graduanda de Engenharia Ambiental; ⁽⁴⁾ Analista, Embrapa Milho e Sorgo; ^(5,6) Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo.

RESUMO: Os custos econômicos e ambientais relacionados aos fertilizantes nitrogenados tem aumentado a demanda pelo desenvolvimento de métodos de adubação que permitam a redução do uso de adubos químicos sem que haja prejuízo à produção. Uma destas alternativas é a exploração da associação entre plantas e bactérias fixadoras de nitrogênio(N), através da utilização de inoculantes. Além de seu papel importante na fixação de nitrogênio, as bactérias diazotróficas são descritas como bactérias promotoras de crescimento por apresentarem diversos efeitos benéficos no crescimento das plantas como inibição de patógenos e produção de fitohormônios. O objetivo deste trabalho foi selecionar bactérias diazotróficas e produtoras de ácido indol acético (AIA) do gênero *Azospirillum* sp. isoladas de colmo, solo e raiz de milho, com potencial para o desenvolvimento de inoculantes. Para isso, foi avaliado o acúmulo de AIA *in vitro* por 56 estirpes, conforme o método colorimétrico de Tange Bonner (1947). A produção de AIA variou significativamente ($P < 0,05$) entre os isolados, com destaque para os isolados (10, 12, 35, 38, 43 e 53) que apresentaram maior produção de AIA (176 a 239 $\mu\text{g mL}^{-1}$) após sete dias de incubação. Conclui-se que a produção de AIA varia de acordo com as espécies estudadas e estudos posteriores serão realizados para avaliar o potencial dessas estirpes no desenvolvimento de inoculantes para uso sob condições de alta disponibilidade de nitrogênio.

Termos de indexação: AIA, Fixação de Nitrogênio, Bactérias Promotoras de Crescimento.

INTRODUÇÃO

As bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, diazotróficas, podem viver livre no solo, associadas a espécies vegetais, tanto na rizosfera quanto endofiticamente, bem como formar simbioses, como ocorre em muitas leguminosas. As bactérias diazotróficas associativas são encontradas em diferentes espécies vegetais não leguminosas, incluindo o milho (BHATTACHARJEE et al., 2008; BALDANI & BALDANI, 2005; HUNGRIA, 2011).

Além de fixar o nitrogênio atmosférico, estas bactérias são descritas por serem capazes de

produzir hormônios vegetais, podendo influenciar o metabolismo nitrogenado da planta, sendo classificadas como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (BALDANI & BALDANI, 2005; MOREIRA et al., 2010, HUNGRIA, 2011; JAMES & BALDANI, 2012;). Dentre os hormônios vegetais produzidos, destaca-se o ácido indol acético (BHATTACHARYYA & JHA, 2012) que induz um maior desenvolvimento das raízes e pelos radiculares, proporcionando uma maior absorção de nutrientes pela planta.

Plantas de milho são frequentemente colonizadas por diversas bactérias diazotróficas formando associações onde a contribuição em termos de fixação biológica de nitrogênio é pequena quando comparada ao fornecido pelo rizóbio às plantas leguminosas. No entanto, estudos com balanço de nitrogênio demonstram que a contribuição da FBN em gramíneas de arroz varia de 0 a 30%, dependendo do genótipo da planta de milho. BODDEY et al. (1995).

O presente trabalho teve como objetivo selecionar bactérias diazotróficas e produtoras de ácido indol acético (AIA) do gênero *Azospirillum* sp. isoladas de colmo, solo e raiz de milho, com potencial para o desenvolvimento de inoculantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram isoladas e analisadas 56 estirpes de bactérias diazotróficas provenientes de raiz, solo e colmo de milho da Embrapa Milho e Sorgo.

Isolamento de estirpes na fixação de nitrogênio

Para o isolamento das bactérias diazotróficas, o meio NFb Semi-Sólido (Dobereiner et al.) foi inoculado com 0,1ml de suspensão de solo, fragmentos de colmo ou de raízes e incubado a 30°C por um período de quatro a sete dias. Quando a película fina atingiu a superfície do meio, foi realizada a transferência da cultura para novo meio NFb Semi-Sólido. As novas culturas foram incubadas a 30°C, até que um novo véu fosse formado. Nessa fase, as culturas foram riscadas em placas contendo meio NFb Sólido acrescido de 20mg de extrato de levedura. Após a incubação por três a cinco dias, foram selecionadas as colônias pequenas, secas e brancas, que têm uma maior

probabilidade de serem fixadoras de nitrogênio. Para a purificação final, essas colônias foram transferidas para novo meio NFB Semi-Sólido, e, após a formação do véu, foram riscadas em placas de meio Batata. Neste meio, as colônias das bactérias diazotróficas caracterizam-se por serem, inicialmente, branco-amareladas, tornando-se róseas, pequenas e estruturadas após uma semana de incubação a 30°C. Uma colônia de cada placa foi novamente repicada em NFB Semi-Sólido para a caracterização e estocagem da bactéria, segundo o método utilizado por Doberiner et al., 1995.

Seleção de bactérias produtoras de ácido indol acético (AIA)

Com a finalidade de avaliar a produção de auxina, as bactérias foram crescidas em meio de cultura TSB, suplementado com 500µg mL⁻¹ de triptofano, conforme descrito por Patten e Glick, 1996. Após a inoculação, as bactérias foram incubadas a 30°C, sob agitação e na ausência de luz, por uma semana. Posteriormente, as células foram removidas por centrifugação (6000 rpm por 10 minutos) e a produção de auxina foi determinada colorimetricamente utilizando reagente de Salkowski (TANG & BONNER, 1947). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram submetidos à análise estatística através do teste de ANOVA e as médias foram comparadas utilizando o teste de Scott-Knott (P<0,05).

Delineamento e análises estatística

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com três repetições. Os dados obtidos foram submetidos a análises de variância em nível de 5 % de significância com auxílio do aplicativo SISVAR (Ferreira 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do método colorimétrico de análise utilizando o reagente de Salkowsky foi possível observar que todos os isolados testados foram capazes de acumular AIA em meio de cultura suplementado com L-triptofano. A produção de AIA variou significativamente entre os isolados (p<0,05), sendo que os valores encontrados para os 56 isolados variaram de 72,52 a 239,29 µg ml⁻¹ (Figura 1).

Os 56 isolados foram originados de diferentes origens, sendo 9% do colmo, 36% da raiz e 55% do solo (Figura 2).

Destes isolados analisados, seis destacaram-se dos demais produzindo AIA na faixa de 176 a 239 µg mL⁻¹ (Figura 1), encontrados no solo e raiz.

O isolado 10 foi o mais eficiente na produção de AIA, chegando a produzir aproximadamente 239 µg mL⁻¹, ao final dos sete dias de incubação. Dos 56 isolados, 49 (87,5%) apresentaram concentrações de AIA entre 76 - 150 µg mL⁻¹ (Figura 3). Resultados semelhantes foram documentados por

Hameed et al. (2004) e Schindwein et al. (2008) para isolados de rizóbio crescidos em meio de cultura suplementado com L-triptofano. A produção relativamente alta de AIA pelos isolados avaliados sugere o uso potencial dessas bactérias como promotoras de crescimento radicular de espécies leguminosas e não leguminosas, conforme documentado por Ahmad et al. (2005) e Sottero et al. (2006).

Figura 2: Distribuição dos isolados das estirpes.

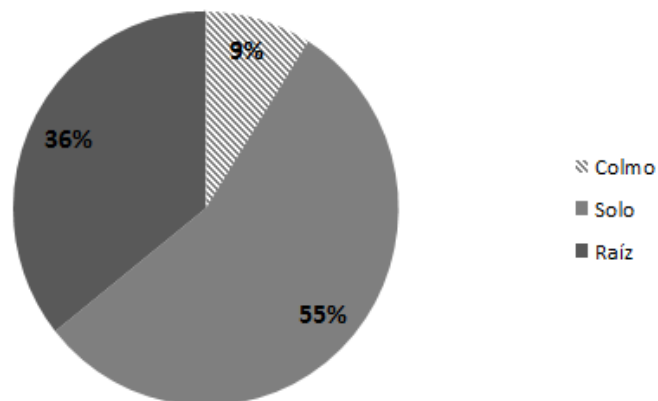
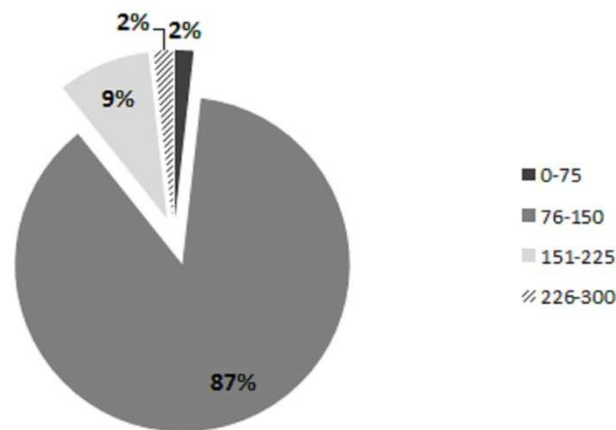


Figura 3: Distribuição dos isolados em faixas de produção de AIA.



CONCLUSÕES

As estirpes de bactérias diazotróficas testadas são capazes de acumular AIA *in vitro* quando crescidas em meio suplementado com triptofano.

Há variabilidade genética entre bactérias diazotróficas associadas às plantas de milho para produção de fitohormônio.

Pode-se selecionar estirpes com produção de AIA acima de 170 µg mL⁻¹ com potencial para o desenvolvimento de inoculantes, para uso sob condições de alta disponibilidade de nitrogênio.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG, EMBRAPA Milho e Sorgo e a UNIFEMM, pela infra-estrutura e recursos financeiros para execução do trabalho.

REFERÊNCIAS

AHMAD F.; Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turkish Journal of Biology*, 29:29-34, 2005.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 77, n.3, 2005.

BHATTACHARJEE, R.B; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S.N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 2, p.199-209, 2008.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n.4, p.1327–1350, 2012.

BODDEY, R.M; OLIVEIRA, O. C; URQUIAGA S., REIS, V.M.; OLIVARES, E.L.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil, ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p. 2 3 4 4 2012 v.174, n.1, p.195–209, 1995.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. – Brasília: EMBRAPA – SPI: Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60p.

FERREIRA, DF Sisvar:. Um sistema de análise estatística computador Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, nov / dez.. 2011.

HAMEED, S.Y.; MALIK, A.K.; ZAFAR, Y.; HAFEEZ, F.Y. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strain isolated from cultivated legumes. *Biology Fertility Soils*, 39:179-185, 2004.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Documentos n. 325, Londrina: Embrapa Soja, 2011.

JAMES, E.K.; BALDANI, J.I. The role of biological nitrogen fixation by non-legumes in the sustainable production of food and biofuels. **Plant and Soil**, v. 356, n.1, p. 1 -3, 2012.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n.2, p.74-99, 2010.

PATTEN, C. L.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole -3-acetic acid. **Canadian Journal Microbiology**, v.42, p. 207-220, 1996.

SCHLINDWEIN, G.; VARGAS, L.K.; LISBOA, B.B.; AZAMBUJA, A.C.; GRANADA, C.E.; GABIATTI, N.C.; STUMPF, R. Influencia da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. *Ciência Rural*, 38:658-664, 2008.

SOTTERO, N.A.; FREITAS, S.S.; MELO, A.M.T.; TRANI, P.E. Rizobactéria e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 30:225-234, 2006.

TANG, Y. W.; BONNER, J. The enzymatic inactivation of indole-acetic, acid. **Arch Biochem**. 13: 11-25, 1947.

Figura 1. Acúmulo de AIA em meio de cultura por bactérias diazotróficas isoladas de milho após sete dias de incubação.

