

Seleção de Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas de Milho

Cássia Naiara Soares Almeida⁽¹⁾; Vitoria Palhares Ribeiro⁽²⁾; Christiane Abreu de Oliveira⁽³⁾; Eliane Aparecida Gomes⁽³⁾; Simone da Silva Santos⁽⁴⁾; Ivanildo Evódio Marriel⁽³⁾.

⁽¹⁾ Graduanda em Engenharia Ambiental; Centro Universitário de Sete Lagoas; cassianajarasoares71@gmail.com; ⁽²⁾ Graduanda em Ciências Biológicas; Centro Universitário de Sete Lagoas; ⁽³⁾ Pesquisador; ⁽⁴⁾ Bolsista FAPEMIG.

RESUMO: A utilização de Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (BPCPs), para o aumento da produção agrícola, será provavelmente umas das táticas mais importantes para se atingir a sustentabilidade. Isso se deve à demanda emergente de diminuição da dependência de fertilizantes químicos, custos de produção e impactos ambientais. Como estratégia para avaliar o potencial de bactérias provenientes de habitats específicos como os afloramentos rochosos e o interior e a rizosfera de plantas de milho, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de bactérias solubilizadoras de fósforo como promotoras de crescimento em milho. Para avaliação do potencial de promoção de crescimento, foi analisada a atividade de produção de enzimas do ciclo do carbono (amilases, celulasas e pectinases) e a produção de sideróforos, substância responsável pela biodisponibilização de fósforo ligado a ferro e bioproteção. Para este fim, foram utilizadas 29 estirpes de bactérias, sendo 5 isoladas de afloramentos de rocha fosfática, 20 endofíticas isoladas de seiva, raiz e folha de milho e 4 bactérias isoladas da rizosfera de milho. Das bactérias avaliadas, 100% produziram enzimas celulasas e 62%, sideróforos. No entanto, apenas duas bactérias produziram pectinases e oito, a enzima amilase. Este estudo preliminar indicou o potencial destas bactérias de produzirem substâncias consideradas como promotoras de crescimento de plantas, além da capacidade de solubilizar o fósforo do solo já constatado. Neste caso, estas se tornam opções para a seleção de estirpes promissoras como inoculantes em milho.

Termos de indexação: atividade enzimática, sideróforos, microrganismos.

INTRODUÇÃO

A importância econômica do milho é caracterizada pelas diversas formas de sua utilização, que vai desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia. Embora seja versátil em seu uso, a produção de milho tem acompanhado basicamente o crescimento da produção de suínos e aves, tanto no Brasil como no mundo (DUARTE, 2006). Ao analisar o grande potencial da produção e

seu alto consumo por insumos, verifica-se que é fundamental o investimento em novas tecnologias capazes de aumentar a produtividade e reduzir os custos. Uma das alternativas propostas é a utilização de microrganismos com capacidade de produzir enzimas e substâncias que auxiliam no crescimento das plantas. Os microrganismos que habitam o solo e plantas estão em constante disputa por água, nutrientes, fontes de carbono e de energia. Para sobreviver, produzem e excretam substâncias, como os sideróforos, que adsorvem o ferro do solo e enzimas que catalisam a hidrólise de macromoléculas para a sua absorção, como as celulasas, amilases e pectinases (FIGUEIREDO, et al, 2010). Estas substâncias, quando produzidas pelos microrganismos, são consideradas como agentes de promoção do crescimento de plantas e os microrganismos, denominados como promotores de crescimento, ou BPCPs, bactérias promotoras de crescimento de plantas.

A utilização de BPCPs, para o aumento da produção agrícola, será provavelmente umas das táticas mais importantes para a agricultura (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Pesquisas relacionadas às aplicações práticas de BPCPs têm se destacado na medida em que já existem produtos comerciais à base dessas bactérias nos Estados Unidos, na China, Austrália, no País de Gales e na Nova Zelândia (LUZ, 1996). Na China, BPCPs são chamadas Yield increasing bacteria (YIB), sendo aplicadas extensivamente no campo, chegando a induzir aumentos médios de 21% em produtividade. Entretanto, no Brasil, apenas alguns grupos específicos de microrganismos fixadores de N₂ tem sido utilizados na agricultura.

O potencial biotecnológico de microrganismos está relacionado com a liberação de substâncias que de alguma forma, contribuem para o aumento

do crescimento das plantas, como as enzimas e os sideróforos. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de bactérias solubilizadoras de fósforo como promotoras de crescimento em milho.

MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliação da produção de enzimas e sideróforos, foram analisadas 29 estirpes de bactérias pertencentes à coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo classificadas previamente como eficientes na solubilização de fosfato. Destas, 20 são bactérias endofíticas isoladas de folhas, raízes e seiva de milho, 4 são isoladas da rizosfera de milho e 5 são isoladas de áreas de afloramentos de rocha fosfatada.

Pectinase

Para a medição da atividade da enzima pectinase, as bactérias foram inoculadas em meio TSA (ágar soja triplicaseína) suplementado com 1% de pectina Cítrica (FIGUEIREDO, et al., 2010). Após sete dias de incubação a 37 °C, foi adicionado Cloreto de cálcio (CaCl₂) 1M, quando ocorreu a revelação de halos indicativos da atividade pectinolítica.

Amilase

Utilizando-se amido como substrato e baseando-se na variação da intensidade da cor do complexo iodo-amido (FUWA, 1954), avaliou-se a produção da enzima amilase em pH 7. As placas contendo meio de cultura com amido (1g amido; 5g peptona; 3g extrato de carne; 0,5g NaCl) foram divididas em quatro quadrantes onde cada isolado foi inoculado em replicata. Após 7 dias de incubação a 37 °C, 200 µL de lugol (5g de KI; 1g de iodo; 100 mL de água destilada) foram adicionados sobre a superfície do meio de cultura, sobre as colônias.

A formação de uma zona clara em torno da colônia foi considerada positiva para o teste do amido. A avaliação dos resultados foi realizada por meio da mensuração de diâmetros perpendiculares da colônia e diâmetro do halo decorrente da atividade enzimática mais o da colônia, obtendo-se as respectivas áreas. A área do halo de degradação oriundo da atividade da enzima foi obtida subtraindo a área da colônia.

Celulase

Para atividade celulolítica, os microrganismos foram cultivados em ágar contendo carboximetilcelulose (CMC) como fonte de carbono. O meio de cultura utilizado foi proposto por ARIFFIN et al. (2006). Ao final da incubação, cobriu-se o meio com solução de vermelho do congo (1,4 g/l) em tampão Tris-HCl 0,1M, com pH 8, 0, durante 30

minutos. Posteriormente, foi descartada esta solução e adicionado NaCl 0,5M

por 30 minutos, para visualização dos halos indicativos da atividade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 29 bactérias analisadas, apresentaram variação quanto à produção de enzimas e sideróforos (**Tabela 1**). Todas as estirpes produziram celulase e apenas duas, provenientes de rizosfera de milho, foram produtoras de pectinases. As pectinases são responsáveis pela degradação das substâncias pécticas para fins nutricionais e são produzidas principalmente por fungos filamentosos, leveduras, bactérias e plantas superiores, (PARDO et al., 1991). A celulase é uma enzima que catalisa a hidrólise da célula em unidades de cenobiose, que é um dissacarídeo formado por unidades de glicose em ligações glicosídica que atuam como fonte de carbono e energia para os processos de decomposição da matéria orgânica do solo, liberando nutrientes para a planta.

Com relação à produção de amilases, 8 estirpes foram caracterizadas como produtoras desta enzima. Amilases degradam a molécula do amido encontrado na natureza e no solo. Sob a ação destas enzimas, as ligações glicosídicas da molécula de amido são hidrolisadas, liberando unidades de maltose e, no estágio final de hidrólise, moléculas de glicose que servirão como fonte de energia para os processos catalíticos das plantas e solo.

Neste estudo, 18 estirpes (62%) foram positivas com relação à produção de sideróforos. Os sideróforos desempenham a função de solubilizar especificamente ferro, em presença de outros íons metálicos, e incorporá-lo ao metabolismo celular. A biodisponibilidade de ferro microbiano é, em grande parte, determinada pela química de coordenação associada ao sideróforo (BENITE, et al., 2002). O mecanismo para produção de sideróforos é operável somente sob condições de baixa disponibilidade de ferro. Sua concentração na solução do solo está relacionada com os níveis de pH. À medida que o pH do solo abaixa, a disponibilidade de ferro aumenta e os sideróforos se tornam menos efetivos. Estudos posteriores para verificar o tipo de sideróforo produzido e a quantidade serão necessários para validação desta característica nas estirpes estudadas.

CONCLUSÕES

As bactérias avaliadas apresentam potencial na promoção de crescimento de plantas principalmente com relação à produção de enzimas celulase (100%) e sideróforos (62%).

AGRADECIMENTOS

A FAPEMIG, CNPq, Embrapa Milho e Sorgo e a UNIFEMM, pela infraestrutura e recursos financeiros para a execução do trabalho.

REFERÊNCIAS

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P.; MACHADO, B. C. Sideróforos: uma resposta dos microrganismos. **Quím. Nova**. 2002, vol.25, n.6b, pp. 1155-1164.

DUARTE, J. O. Introdução e importância econômica do milho. In: CRUZ, J. C.; VERSIANI, R. P.; FERREIRA, M. T. R. (Ed.). Cultivo do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2000. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de Produção, 1) Disponível em:
<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/importancia.htm>. Acesso em: 28 jul. 2006.

FIGUEIREDO, M. V. P.; SOBRAL, J. K.; STAMFORD, T. L. M.; ARAUJO, J. M. **Biotecnologia aplicada à agricultura**: textos de apoio protocolos experimentais. 1ª ed. Brasília, DF, 2010.733p.

FUWA, H., 1954. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **The Journal of Biochemistry**, v. 41, p. 583-603, 1954.

LUZ, W.C. da. **Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção**. In: W.C. da Luz, J.M.C. Fernandes, A.M. Prestes & E.C. Picinini (Eds.). Revisão Anual de Patologia de Plantas. 1996.

MOREIRA, F. M. S., SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

PARDO, C.; LAPENA, M. A; GACTO, M. Purification and characterization of an extracellular exopolysaccharidase from *Geotrichum lactis*. **Canadian Journal of Technology**, Ottawa, CA, v. 37, n. 12, p. 974-977, 1991.

Tabela 1 - Resultado da produção de enzimas celulase, pectinase e amilase e sideróforos por bactérias endofíticas de rizosfera, raiz, folha e seiva de milho e provenientes de afloramentos de rocha fosfatada (rocha)¹.

ESTIRPES	ORIGEM	CELULASE	PECTINASE	AMILASE	SIDERÓFOROS
B1	rocha	+	-	-	-
B2	rocha	+	-	+	-
B3	rocha	+	-	-	+
B4	rocha	+	-	+	-
B5	rocha	+	-	+	-
B32	rizobactérias	+	+	-	+
B70	rizobactérias	+	-	+	+
B116	rizobactérias	+	-	+	+
B119	rizobactérias	+	+	-	+
1925(BS14)	seiva	+	-	-	-
1912(BS1)	seiva	+	-	-	-
1961(BES 16-1.3)	raiz	+	-	-	+
1988(BES42-16.1)	raiz	+	-	-	+
1937(BF7)	folha	+	-	-	+
1923(BS12)	seiva	+	-	-	+
1935(BF 5)	folha	+	-	+	+
2010(BSS12)	seiva	+	-	+	+
1934(BF 4)	folha	+	-	-	+
1960(BES21-3.20)	raiz	+	-	-	+
1936(BF 6)	folha	+	-	-	-
1967(BES21-3.2)	raiz	+	-	-	+
2009(BESS11)	seiva	+	-	-	-
1979(BES33-10.1)	raiz	+	-	+	+
1932(BF 2)	folha	+	-	-	-
1981(BES35-11.2)	raiz	+	-	-	-
1931(BF 1)	folha	+	-	-	+
1970(BES24-5.1)	raiz	+	-	-	+
2012(BESS23)	seiva	+	-	-	+
1985(BES39-14.1)	raiz	+	-	-	-

¹ Valores positivos indicam produção de halo indicativo de atividade da substância analisada .