

Seleção de linhagens de leveduras multicompetentes em produção de ácido indolacético e biossolubilização de fósforo

Eduardo Franco Brandalise¹, Lorena Costa Garcia Calsing², Livia Teixeira Duarte-Brandão³, João Ricardo Moreira de Almeida⁴

Resumo

O uso de fertilizantes químicos na agricultura brasileira se intensificou com a expansão da fronteira agrícola. Porém, a utilização desses insumos em culturas agrícolas gera danos ambientais. Assim, a substituição deles por biofertilizantes se torna essencial para um futuro sustentável. Este trabalho possui como objetivo a caracterização e a seleção de linhagens selvagens de leveduras multicompetentes para a produção de ácido indolacético (IAA) e para a biossolubilização de fósforo (P) em meios com $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 e AlPO_4 , a fim de buscar linhagens com potencial para biofertilização. Para a determinação da solubilização de P, setenta e duas linhagens de leveduras de diferentes espécies foram inoculadas em meio sólido NBRIP contendo $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 ou AlPO_4 . A avaliação foi realizada por meio do índice de solubilização (IS), calculado por meio da razão da média das medidas de halos formados por solubilização do meio pela média do diâmetro das quatro colônias, por placa. Para a quantificação de IAA, as leveduras foram inoculadas em meio líquido de YPD com L-triptofano (L-Trp) 0,1% e amostras foram retiradas após 120 horas para quantificação do fitormônio por método colorimétrico. Por fim, doze linhagens que demonstraram produção de IAA entre 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram selecionadas e avaliadas quanto à solubilização de P em meio líquido NBRIP com as fontes fosfóricas $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 e AlPO_4 . Os resultados revelaram que as leveduras estudadas somente apresentam capacidade de formação de halos de solubilização em meio sólido com $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. No entanto, houve solubilização de P em meio líquido com todas as fontes fosfóricas. Quanto à multicompetência, os dados apontam que, dentre as 72 linhagens avaliadas de 29 espécies diferentes, destacaram-se três linhagens de diferentes espécies. Desse modo, tais linhagens são candidatas promissoras para a biofertilização de culturas comerciais.

Termos para indexação: ácido indolacético, biofertilização, biossolubilização, fósforo, leveduras.

Introdução

O Brasil é um dos principais consumidores de fertilizantes químicos do mundo. No entanto, é dependente do mercado internacional para obtenção deles, uma vez que o País não figura como um grande produtor. Além disso, a eficiência da utilização de fertilizantes nitrogenados, fosfatados e potássicos é reduzida por frequentes perdas por volatilização, imobilização ou outros processos geoquímicos (Gomes et al, 2021). Dessa forma, os biofertilizantes surgem como uma alternativa sustentável aos fertilizantes convencionais, com impacto ambiental associado reduzido sem perda de produtividade.

¹ Graduando em Biotecnologia, Universidade de Brasília, eduardo.brandalise@colaborador.embrapa.br.

² Engenheira de alimentos, doutora em Engenharia de Alimentos, Embrapa Agroenergia, lorena.garcia@embrapa.br.

³ Farmacêutica, mestre em Ciências Farmacêuticas, Embrapa Agroenergia, livia.duarte@embrapa.br.

⁴ Biólogo, doutor em genética e biotecnologia microbiana, Embrapa Agroenergia, joao.almeida@embrapa.br.

Em meados da década de 1970, surgiu a utilização de microrganismos eficientes (EM) como biofertilizantes, que atuam como promotores do crescimento, ao disponibilizar formas inicialmente não assimiláveis de nutrientes ao metabolismo vegetal. Além disso, os EM são ainda capazes de produzir e disponibilizar hormônios fitoestimuladores, como auxinas, giberelinas, jasmonatos, dentre outros. Entretanto, o uso de biofertilizantes é ainda muito incipiente e há poucos estudos na literatura que tratam da utilização, dos mecanismos e da eficácia deles (Bonfim; Fontenele, 2017). Desse modo, apesar de promissores, os EM para biofertilização ainda necessitam de pesquisas para sua caracterização e possível aplicação no campo.

A produção de auxinas importantes para o crescimento vegetal, como o ácido indolacético (IAA), e a capacidade de biossolubilização de fósforo (P) em diferentes substratos, por microrganismo, têm sido amplamente estudadas. O ácido indol-3-acético (IAA) estimula o rápido crescimento e desenvolvimento vegetal, e há avanços em estudos recentes do seu papel em interações planta-microrganismo, principalmente com bactérias.

Deste modo, outros microrganismos, como fungos filamentosos e leveduras, também presentes no solo, estão ganhando destaque como EM para o crescimento vegetal. A levedura *Meyerozyma guilliermondii* CC1 foi avaliada como agente indutor de crescimento de milho e couve-chinesa, e demonstrou um potencial de elevar o índice de vigor das sementes (Nakayan et al., 2013). Por sua vez, *Candida tropicalis* CtHY inoculada em sementes de arroz elevou em 35% o peso seco da planta em detrimento das sementes controle sem inóculo (Amprayn et al., 2012). Nesse contexto, percebe-se o grande potencial de linhagens selvagens de leveduras como microrganismos promotoras de crescimento vegetal, e, subsequentemente, como biofertilizantes eficazes e sustentáveis.

Este trabalho possui como objetivo a identificação e a caracterização de linhagens selvagens de leveduras competentes na produção de IAA e na biossolubilização de P em $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 e AlPO_4 . Para realização do trabalho, setenta e duas linhagens de leveduras, provenientes da coleção interna da Embrapa, foram caracterizadas quanto à produção de ácido indolacético e à biossolubilização de P.

Materiais e métodos

Potencial de solubilização de P em meios sólido e líquido por leveduras

As 72 leveduras foram plaqueadas em meio sólido de YPD e incubadas por 24 horas, a 28 °C. Em seguida, pré-inóculos foram preparados em meio líquido YNB + 20 g/L de glicose e incubados em shaker a 28 °C e 200 rpm por 24 horas. Por fim, quatro inóculos de 10 µL de cada uma das 72 linhagens foram aplicados em placas contendo meio NBRIP (Murphy e Riley, 1962) com as seguintes fontes de fosfato: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 e FePO_4 .

As amostras em placas foram incubadas em estufa a 28 °C e a avaliação de crescimento de halos de solubilização foi realizada após 24 horas, 72 horas e 144 horas de incubação. Para determinação do índice de solubilização (IS) de P em meio sólido NBRIP de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 e AlPO_4 , os halos de solubilização visíveis nas placas, após 144 horas de incubação, foram mensurados com a utilização de paquímetros. O IS foi calculado da seguinte forma:

$$\text{IS} = \text{Média diâmetro halo} / \text{Média diâmetro colônia}$$

Para cada amostra, foram obtidos quatro valores de IS, e, portanto, uma média desses quatro valores foi calculada.

Para determinação da capacidade de biossolubilização de P em meios líquidos NBRIP de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 e FePO_4 , utilizou-se o protocolo de Murphy e Riley (1962) para 12 linhagens pré-selecionadas a partir da competência em produzir IAA. Em resumo, as linhagens foram crescidas

conforme previamente descrito em meio NBRIP por cinco dias. Ao final, amostras foram retiradas e o P foi quantificado por método colorimétrico.

Potencial de produção de IAA por leveduras

Para quantificação de IAA produzido por cada levedura, cada linhagem foi cultivada em meio líquido YPD e em YPD + Triptofano 0,1%, a 28 °C e 200 rpm por 120 horas. Ao final, amostras foram retiradas e o IAA foi quantificado por método colorimétrico de Sun et al. (2014).

Para avaliação da multicompetência das leveduras, doze amostras foram selecionadas, as melhores linhagens na produção de IAA, para repetição do ensaio de biossolubilização de P em meio líquido. Os dados foram plotados em planilha e convertidos em gráficos.

Resultados e discussão

Para avaliar a capacidade de leveduras solubilizarem fosfato em meio sólido, setenta e duas linhagens de leveduras de 29 espécies diferentes foram selecionadas a partir da coleção da Embrapa e inoculadas em meio NBRIP contendo diferentes fontes de P. Dentre as placas de meio NBRIP $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 e AlPO_4 , foi observada a formação de halos em placas com $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ com 38 leveduras distintas. Os dados de IS foram calculados e 15 leveduras demonstraram valores de IS superiores ao valor médio (Figura 1).

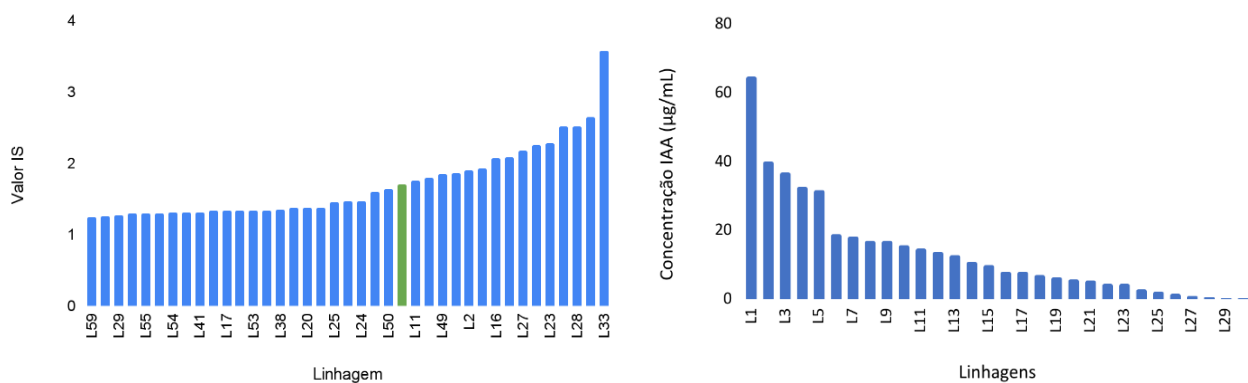


Figura 1. À esquerda, índice de biossolubilização de P em meio NBRIP $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ por leveduras. A média de IS obtida para essas amostras é de 1,70. À direita, produção de IAA, em µg/mL, por linhagem.

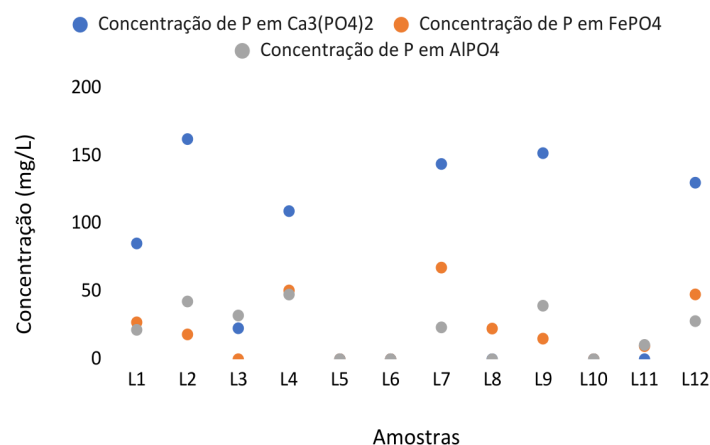


Figura 2. Biossolubilização de P em meio líquido NBRIP $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 e AlPO_4 por diferentes leveduras. Apenas as 12 amostras selecionadas pelo *screening* estão representadas no gráfico.

De forma complementar, a solubilização de fosfato pelas 72 leveduras também foi avaliada em meio líquido NBRIP $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 e AlPO_4 . Os resultados demonstraram que as leveduras são mais competentes na solubilização $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Figuras 1 e 2). Quanto à solubilização em meio com FePO_4 e AlPO_4 , houve pouca variação para cada amostra, com exceção de uma linhagem L7, que demonstrou maior competência no meio com Fe.

A produção de IAA foi avaliada em meio YPD-trip, uma vez que as leveduras se mostraram mais competentes na produção do fitormônio no meio com o aminoácido. Das 72 linhagens, doze foram capazes de produzir entre 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IAA (Figura 1). Finalmente, buscou-se identificar linhagens com capacidade de solubilizar P e produzir IAA. Para tanto, os dados gerados foram analisados em conjunto (Figuras 3, 4, 5). É possível observar a predominância de algumas linhagens na multicompetência para todos os meios: as linhagens L1, L2 e L4.

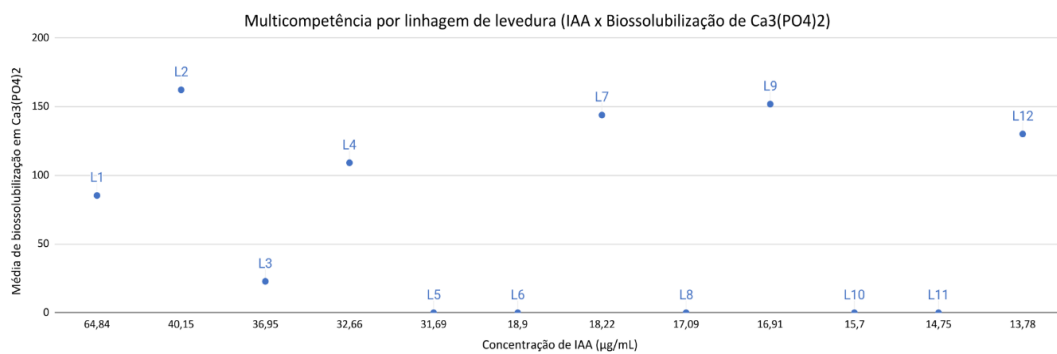


Figura 3. Gráfico de dispersão com os valores de concentração, em mg/L, de P biossolubilizado em meio líquido NBRIP $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, no eixo Y, e os dados de produção de IAA, em $\mu\text{g}/\text{mL}$, no eixo X.

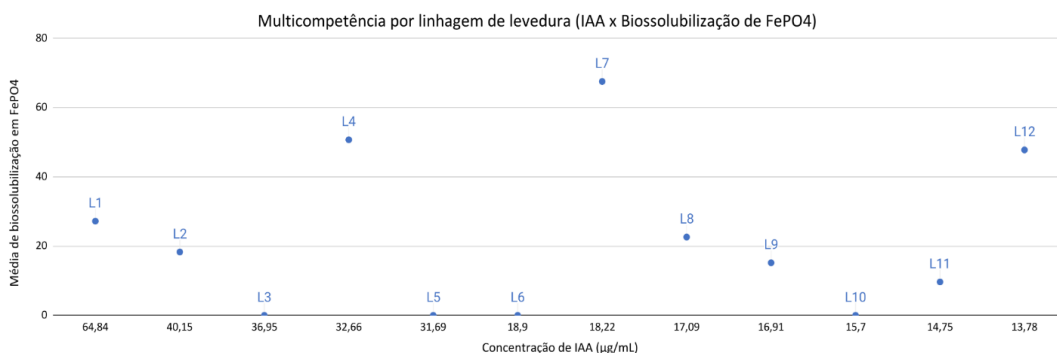


Figura 4. Gráfico de dispersão dos valores de concentração, em mg/L, de P biossolubilizado em meio líquido NBRIP FePO_4 , no eixo Y, e os dados de produção de IAA, em $\mu\text{g}/\text{mL}$, no eixo X.

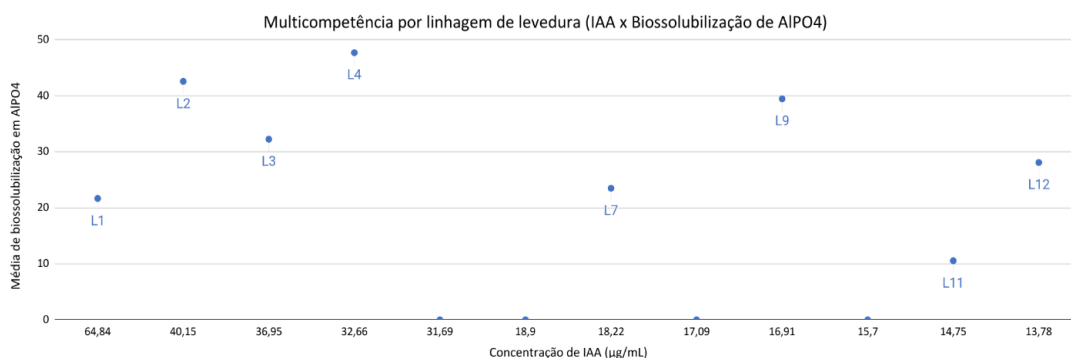


Figura 5. Gráfico de dispersão dos valores de concentração, em mg/L, de P biossolubilizado em meio líquido NBRIP AlPO_4 , no eixo Y, e os dados de produção de IAA, em $\mu\text{g}/\text{mL}$, no eixo X.

Conclusão

A avaliação da multicompetência das 72 linhagens de leveduras utilizadas neste trabalho, para a produção de IAA e para a biossolubilização de P em meios com $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 e AlPO_4 , concomitantemente, permitiu a identificação de três linhagens promissoras para utilização como biofertilizantes.

Referências bibliográficas

- AMPRAYN, K.-O.; ROSE, M. T.; KECSKÉS, M.; PEREG, L.; NGUYEN, H. T.; KENNEDY, I. R. Plant growth promoting characteristics of soil yeast and its effectiveness for promoting rice growth. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 295-299, 2012.
- BONFIM, C. A.; FONTENELLE, M. R. Microrganismos benéficos em biofertilizantes. **Hortaliças em Revista**, ano 6, n. 21, p. 10-11, abr. 2017. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/171456/1/digitalizar0248.pdf>. Acesso em: jul. 2023.
- GOMES, J. P. A.; SOUZA, M. N.; SANTOS JUNIOR, A. C.; MOULIN, M. M. Uso de microrganismos eficientes como alternativa para agricultura sustentável: um referencial teórico. In: SOUSA, C. da S.; SABIONI, S. C.; LIMA, F. de S. (Org.). **Agroecologia: métodos e técnicas para uma agricultura sustentável**. Guarujá, SP: Científica Digital, 2021. v. 5. p. 340-355.
- FERNANDEZ-SAN MILLAN, A.; FARRAN, I.; LARRAYA, L.; ANCIN, M.; ARREGUI, L. M.; VERAMENDI, J. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from Spanish vineyards: benefits for seedling development. **Microbiological Research**, v. 237, 2020. 126480.
- MURPHY, J.; RILEY, J. P.; A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 27, p. 31-36, 1962.
- NAKAYAN, P.; HAMEED, A.; SINGH, S.; YOUNG, L.-S.; YOUNG, C.-C. Phosphate-solubilizing soil yeast *Meyerozyma guilliermondii* CC1 improves maize (*Zea mays* L.) productivity and minimizes requisite chemical fertilization. **Plant Soil**, v. 373, p. 301-315, 2013.
- SUN, P.-F.; FANG, W.-T.; SHIN, L.-Y.; WEI, J.-J.; FU, S.-F.; CHOU, J.-Y. Indole-3-acetic acid-producing yeasts in the phyllosphere of the carnivorous plant *Drosera indica* L. **Plos One**, v. 9, n. 12, 2014.