

Seleção de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio e Produtoras de Fito-Hormônios Associadas às Plantas de Milho Sob Condições de Campo¹

Bianca Gonçalves Camilo², Christiane Abreu de Oliveira Paiva³ e Ivanildo Evódio Marriel³

¹Trabalho financiado pelo CNPq/Fapemig

² Estudante do Curso de Engenharia Ambiental do Centro Universitário de Sete Lagoas - UNIFEMM
Bolsista PIBIC do Convênio Fapemig/CNPq/Embrapa/ FAPED

³ Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

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.

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 do gênero *Azospirillum* sp e produtoras de ácido indol acético (AIA) associadas à cultura de milho, com potencial para o desenvolvimento de inoculantes, como substituto de adubação nitrogenada.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 56 estirpes de bactérias diazotróficas isoladas a partir de amostras de raiz, solo e colmo de plantas de milho cultivadas em solo de cerrado na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo.

Isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Azospirillum*

Para o isolamento das bactérias diazotróficas, o meio NFb semi-sólido (DOBEREINER et al., 1995) foi inoculado com 0,1ml de suspensão de solo, ou pedaços 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. Estas culturas foram incubadas a 30°C, até a formação de nova película. Em seguida, 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, típicas do gênero *Azospirillum*. 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-malato. 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 é novamente repicada em NFb semi-sólido para a caracterização e estocagem da bactéria, segundo o método utilizado por Dobereiner 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 a 6000 rpm por 10 minutos e a produção de auxina foi determinada no sobrenadante utilizando-se o método colorimétrico via reagente de Salkowski. 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 análise 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**), obtidos a partir de amostras de solo e de raízes. Dos 56 isolados, 49 (87,5%) apresentaram concentrações de AIA entre 76 - 150 µg mL⁻¹ (**Figura 3**). O isolado 10 foi o mais eficiente na produção de AIA, com valores de 239 µg mL⁻¹ de sobrenadante, ao final dos sete dias de incubação. Resultados semelhantes foram documentados por Hameed et al. (2004) e Schlindwein 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

Figura 2: Distribuição dos isolados das estirpes.

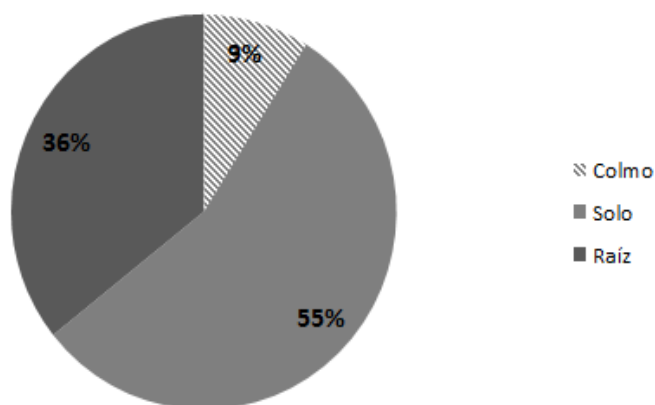
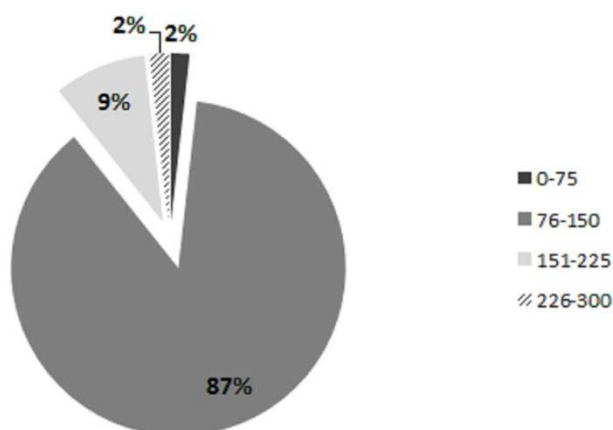


Figura 3: Distribuição dos isolados em faixas de produção de AIA.



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 a base *Azospirillum* promotores de crescimento, mesmo sob condições de alta disponibilidade de nitrogênio.

REFERÊNCIAS

- AHMAD F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. **Turkish Journal of Biology**, v. 29, p. 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 Ciências**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 3, p. 549-579, 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**, Berlin, 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**, The Hague, v. 174, n. 1, p. 195-209, 1995.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI; Itaguaí: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60
- FERREIRA, D. F. 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 and Fertility of Soils**, Berlin, v. 39, p. 179-185, 2004.
- HUNGRIA, M. **Inoculação com Azospirillum brasilense: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36 p. (Embrapa Soja. Documentos, 325).
- 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**, The Hague, 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 índole -3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, 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**, Santa Maria, v. 38, p. 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**, Campinas, v. 30, p. 225-234, 2006.

TANG, Y. W.; BONNER, J. The enzymatic inactivation of indoleacetic acid; some characteristics of the enzyme contained in pea seedlings. **Archives of Biochemistry**, New York, v. 13, n. 1, p. 11-25, 1947.