

ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS À PALMA E PROSPECÇÃO DO POTENCIAL DE SOLUBILIZAR FOSFATO E FIXAR NITROGÊNIO

¹Francisco Eduardo C. Costa, ²Itamar Soares de Melo

¹Departamento de Biologia, Universidade do Vale do Sapucaí, Pouso Alegre - Minas Gerais, Brasil. ²Embrapa Meio Ambiente, Caixa Postal 69; 13820-000, Jaguariúna, São Paulo, Brasil. E-mail: Itamar@cnpma.embrapa.br

Bactérias associadas às cactáceas, adaptadas ao estresse hídrico e a altas temperaturas, podem ser usadas como inoculantes visando aumento de produtividade e recuperação de solos em processos de desertificação. Nesse sentido, visou-se selecionar bactérias endofíticas e rizobactérias de palma (*Opuntia ficus-indica*) quanto aos atributos de fixar N₂ e solubilizar fosfato. Sessenta e nove linhagens de bactérias, isoladas em meio livre de nitrogênio (meio NFb) foram avaliadas quanto à presença dos genes *nifH* e *nifD* e à capacidade de solubilizar fosfato. Ficou evidenciado a presença do gene *nifH* em dez bactérias, sendo os gêneros identificados como *Citrobacter*, *Sphingomonas*, *Ochrobactrum*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas* e *Enterobacter*. Vinte dos isolados bacterianos avaliados foram capazes de solubilizar *in vitro* fosfato de rocha, sobressaindo-se o gênero *Bacillus* como hiperprodutor. As espécies *B. megaterium* e *Enterobacter agglomerans* apresentaram os maiores níveis de solubilização de fosfato. Estas bactérias, aliadas a outras características benéficas, podem ser usadas para inoculação de plântulas de cacto visando assegurar maior índice de desenvolvimento em solos com déficit hídrico.

Palavras-chave: *Opuntia ficus-indica*, bactérias endofíticas, rizobactérias

Isolation of bacteria associated to forrage palm and study of their potential to solubilize fosfates and fix nitrogen. Bacteria associated to cacti, adapted to hydric stress and high temperatures, may be used as inoculants aiming to increase productivity and recovery of soil in desertification processes. Thus, this work had the objective to evaluate the potential of endophytic and rhizospheric bacteria of *Opuntia ficus-indica* in relation to solubilizing phosphate and nitrogen fixing attributes. Sixty-nine bacteria, isolated in nitrogen free media (NFb media) were evaluated in relation to the presence of the *nifH* and *nifD* genes and the capacity to solubilize phosphate. By the results obtained, it was verified the presence of the *nifH* gene in 10 bacterial isolates belonging to the genus *Citrobacter*, *Sphingomonas*, *Ochrobactrum*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas* and *Enterobacter*. Twenty of the bacterial isolates evaluated were able to solubilize *in vitro* rock phosphate with the genus *Bacillus* and *Enterobacter* presenting the greater halos of degradation. These bacteria, together with other beneficial characteristic, may be used to inoculate cacti plants aiming to assure the promotion of plant growth in soils with high hydric deficit.

Key words: *Opuntia ficus-indica*, endophytic bacteria, rhizospheric bacteria

Introdução

A palma (*Opuntia ficus-indica* Mill.), originária do México, foi disseminada pelo mundo pelos colonizadores europeus para fins de produção comercial de frutos, ricos em vitamina C, a fim de combater o escorbuto. Atualmente é cultivada como forragem animal, e para consumo humano de seus artigos e recuperação de áreas impactadas por processos erosivos. O seu cultivo como forragem se dá com frequência em áreas sujeitas a longos períodos de estiagem, onde normalmente é consorciada com outras culturas como o feijão-de-corda e milho.

Aproximadamente 50 milhões de quilômetros quadrados das terras emersas do globo são caracterizados como zonas áridas, onde vive 15% da humanidade. No Brasil isso corresponde a cerca de 12% de sua superfície.

Trabalhos experimentais demonstram a aplicabilidade de cactáceas associadas à bactérias promotoras de crescimento de plantas para a recuperação de áreas degradadas. Nas áreas desertificadas, a fixação biológica de nitrogênio é a principal via de entrada do elemento nitrogênio na cadeia trófica (Young, 1992). Todos os microrganismos fixadores de nitrogênio carregam o gene *nifH*, que codifica a ferro-proteína da nitrogenase. O resultado obtido nestes estudos foi de consolidação do solo (red deposição e formação de aglomerados estáveis em água), e melhoria da qualidade do solo (incremento na taxa de nitrogênio assimilável, matéria orgânica).

As bactérias promotoras de crescimento em plantas englobam as espécies de vida livres, as rizobactérias e as endofíticas. Os mecanismos de ação desses microrganismos são muito similares, atuando de formas diversas, desde a ciclagem rápida de nutrientes, a fim de evitar a lixiviação dos mesmos pelas chuvas, a fixação biológica de nitrogênio e a solubilização de fosfato, etc. O fosfato, por sua vez, é escasso nos solos, fazendo com que o estoque deste mineral seja repostado continuamente nos sistemas agrícolas. O uso crescente do fosfato de rocha nos agroecossistemas vem sendo proposto como uma alternativa às fórmulas fosfatadas industrializadas; quando utilizado, observa-se um melhor aproveitamento do elemento P (fósforo) pelas culturas vegetais se for realizada a introdução no solo/rizosfera de microrganismos solubilizadores de fosfato (Zapata & Axmann, 1995).

Diversos estudos têm demonstrado a eficiência e praticabilidade da associação entre plantas e bactérias solubilizadoras de fosfato de rocha em aumentar a disponibilidade do P, tornando-o solúvel à planta hospedeira (Barea & Jeffries, 1995).

Devido a importância do uso de inoculantes bacterianos e da associação destes com plantas xerofílicas visando à recuperação de solos em processo de desertificação é que este trabalho visou avaliar o potencial de bactérias isoladas de palma quanto a sua habilidade em fixar nitrogênio e solubilizar fosfato.

Material e Métodos

Deteção dos genes *nif* em bactérias associadas a *Opuntia ficus-indica*.

Sessenta e nove bactérias endofíticas e rizoféricas isoladas de palma em meio NFb (Dobereiner *et al.*, 1995) foram avaliadas quanto à presença dos genes *nifH* e *nifD*. A deteção foi feita utilizando-se “primers” específicos (Tabela 1). As reações de PCR foram realizadas num volume final de 25µL., contendo 0,5 - 10ng de DNA molde; 1µM de cada “primer”; 0,2mM de cada dNTPs; 1,5mM de MgCl₂; 2,5µL do tampão da enzima (10X); 0,5 U/µL da Taq DNA polimerase (Life Technologies). Em todas as reações foram utilizados sete controles positivos, com o DNA molde de linhagens bacterianas pertencentes à Coleção de Bactérias Diazotróficas da EMBRAPA Agrobiologia, e um controle negativo sem o DNA molde. As espécies tipo que contém os genes *nif* usadas como controles positivos são: *Azoarcus indigenis*, *Azospirillum amazonense*, *Azospirillum irakense*, *Azospirillum lipoferum*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*.

A reação de amplificação foi realizada em um termociclador Peltier PTC200 programado para realizar uma desnaturação inicial de 5 min a 94 °C, 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 1 min. a 59 °C, e mais 30 s a 72 °C e uma extensão final de 5 min. a 72 °C. Dez microlitros da reação de PCR foram observados em gel de agarose 1,2%, juntamente com o marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb (Life Technologies) para visualização de um fragmento de aproximadamente 400pb.

Tabela 1. “Primers” utilizados para a deteção dos genes *nif*.

Gene	“Primer”	Seqüência	Referência
<i>NifH</i>	19F	5'-GCIWTYTAYGGIAARGGIGG-3'	Ueda <i>et al.</i> , 1995
	407R	5'-AAICCRCCRCACIACIACRTC-3'	
<i>NifD</i>	FdB261	5'-TGGGGICCIRTIAARGAYATG-3'	Stoltfus <i>et al.</i> , 1997
	FdB260	5'-TCRTTIGCIATRTGRTGNCC-3'	

Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato *in vitro*

A seleção de linhagens de bactérias associadas a *Opuntia ficus-indica* Mill., isoladas em meio NFB, capazes de solubilizar fosfato *in vitro* foi realizada repicando-as em placas com os meios Pikovskaya (PVK) (Pikovskaya, 1948), meio National Botanical Research Institute phosphate growth medium devoid of Yeast extract (NBRIY) (Nautiyal, 1999) e meio National Botanical Research Institute Phosphate growth (NBRIP) (Nautiyal, 1999). Decorridos 14 dias, foi efetuada a medição do diâmetro da colônia e o diâmetro do halo de solubilização de fosfato. O tamanho do halo de solubilização é resultante da subtração do valor do diâmetro da colônia do diâmetro total do halo de solubilização (Nautiyal, 1999).

Resultados e Discussão

Detecção de genes *nifH* e *nifD* em bactérias associadas a *Opuntia ficus-indica*, isoladas em meio NFB

Dos 69 isolados bacterianos, 10 apresentaram amplificação do fragmento do gene *nifH* (Tabela 2). Nenhum dos isolados amplificou o segmento equivalente ao gene *nifD*. Todos os controles positivos amplificaram os segmentos dos genes *nifH* e *nifD*. Dos 10 microrganismos que apresentaram amplificação do segmento de 400 pb do gene *nifH*, 6 foram isolados da rizosfera, 1 endofítico de raiz e 2 endofíticos dos artículos. A identificação destas, feita pelo perfil de ácidos graxos da membrana celular, coloca-as taxonomicamente dentro das seguintes espécies: *Citrobacter freundii*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Enterobacter agglomerans*, *Ochrobactrum anthropi*, *Rhodococcus erythropolis* e *Stenotrophomonas maltophilia*.

O pequeno número de isolados que apresentaram amplificação do fragmento relativo ao gene *nifH* deve-se

ao fato de existir uma grande divergência nas suas seqüências, necessitando-se de um maior número de variações nas posições das seqüências degeneradas (Zehr & McReynolds, 1989). São muitos os trabalhos de detecção do gene *nifH* utilizando-se de PCR (Ohkuma *et al.*, 1999; Poly *et al.*, 2001; Ueda *et al.*, 1995; Widmer *et al.*, 1999; Laguerre *et al.*, 1996), no entanto, com raras exceções, estes partem de microrganismos em cultura. A base para estes trabalhos é a de efetuar a extração de DNA diretamente do solo e/ou da planta e procurar amplificar os genes de interesse para gerar filogenias baseadas nos mesmos, nem sempre nomeando os isolados em questão.

Rösch *et al.* (2002) descrevem a presença dos genes *nirK* e *nosZ*, que codificam, respectivamente, a redutase do nitrito contendo Cu e a redutase do óxido nitroso, em *Ochrobactrum anthropi* LMG3331, também nomeado *Achromobacter antropi*, não detectando por PCR a presença do gene *nifH*. Neste mesmo trabalho ocorre a amplificação do gene *nifH* em *A. ruhlandii* DSM653, portanto, devido à proximidade evolutiva e ao pequeno número de isolados testados é plenamente aceitável que ocorra o gene *nifH* em *A. antropi*.

No caso dos isolados de *Stenotrophomonas maltophilia*, trabalhos desenvolvidos recentemente (no prelo) relatam a ocorrência de gene *nifH* nesta espécie bacteriana, assim como a presença do mesmo nesta bactéria pode ser embasado na transferência horizontal do gene *nifH* (Hirsch *et al.*, 1995).

A fixação biológica de nitrogênio já foi descrita para o gênero *Enterobacter*, com o estudo do gene *nifH* em *E. agglomerans* (Siddavattam *et al.*, 1995; Kreutzer *et al.*, 1989) e *E. cloaceae* (Rösch *et al.*, 2002)

Solubilização de fosfato por bactérias associadas a *Opuntia ficus-indica*, isoladas em meio NFB

Cerca de 29% dos isolados bacterianos, associados a

Tabela 2 - Linhagens bacterianas portadoras do gene *nifH* associadas a *Opuntia ficus-indica* Mill., isoladas em NFB.

Isolado	Local de coleta	Microhabitat	Identificação *
NCOL27'B	Queimadas – PB	Raiz	<i>Citrobacter freundii</i>
NFCA1C	São José do Tapera – AL	Artículo	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
NFCA1F	São José do Tapera – AL	Artículo	<i>Enterobacter agglomerans</i>
RINFA1A	São José do Tapera – AL	Rizosfera	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
RINFA1B	São José do Tapera – AL	Rizosfera	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
RINFA2A	São José do Tapera – AL	Rizosfera	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
RINFA2I	São José do Tapera – AL	Rizosfera	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
RINFA2K	São José do Tapera – AL	Rizosfera	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
RINFA2N	São José do Tapera – AL	Rizosfera	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
NCOL113	Valinhos – SP	Rizosfera	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

* A identificação das bactérias se baseou na análise do perfil dos ácidos graxos da membrana celular obtido por um detector de ionização de chamas (FID) e identificado usando o software de Identificação Microbiana desenvolvido por MIDI Inc. (Newark, USA).

Opuntia ficus-indica Mill. isolados em meio NFb, apresentaram a capacidade de solubilizar fosfato, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, totalizando 20 bactérias: 5 rizosféricas, 11 endófitas de raiz e 4 endófitas de caule (Tabela 3).

Confirmando os resultados da literatura (Nautiyal, 1999), o meio NBRIP foi o que apresentou um maior

número de isolados solubilizando fosfato ($n = 14$). No entanto, a sua aplicabilidade como único meio para a seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, é questionável visto que outros 6 isolados apresentaram esta capacidade nos outros meios utilizados e não no NBRIP.

Tabela 3 – Linhagens isoladas em meio NFb associadas a *Opuntia ficus-indica* Mill, que solubilizaram fosfato, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, *in vitro*. São expressas as medidas do raio da colônia e do halo de solubilização.

Linhagem	Meio PVK		Meio NBR1Y		Meio NBRIP	
	Colônia	Halo	Colônia	Halo	Colônia	Halo
Não identificada (NCol12')	0	-	0	-	3,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
Não identificada (NCol2R17)	0	-	6,33 ± 0,57	2,0 ± 0,0	8,66 ± 1,15	1,33 ± 0,57
<i>Agrobacterium radiobacter</i> (NCol15)	0	-	0	-	2,33 ± 0,57	5,33 ± 0,57
<i>Bacillus coagulans</i> (NCol2R17)	8,33 ± 0,57	2,0 ± 0,0	6,0 ± 1,0	2,0 ± 0,0	6,0 ± 1,0	2,33 ± 0,57
<i>Bacillus megaterium</i> - GC subgrupo A (NFCT3D)	20,33 ± 0,57	0,5 ± 0,0	0	-	13,33 ± 0,57	1,0 ± 0,0
<i>Bacillus megaterium</i> - GC subgrupo A (NFRP3B)	12,0 ± 1,0	1,0 ± 0,0	10,0 ± 1,0	1,0 ± 0,0	8,33 ± 0,57	1,0 ± 0,0
<i>Bacillus megaterium</i> - GC subgrupo A (NFRP3C)	14,0 ± 1,0	1,0 ± 0,0	0	-	0	-
<i>Bacillus megaterium</i> - GC subgrupo A (NFRP3D)	0	-	0	-	9,66 ± 0,57	1,0 ± 0,0
<i>Enterobacter agglomerans</i> GC subgrupo I (NFCA2')	0	-	14,0 ± 1,0	2,0 ± 0,0	0	-
<i>Enterobacter agglomerans</i> GC subgrupo II (NFRT3A)	5,33 ± 0,57	0,5 ± 0,0	3,0 ± 1,0	1,0 ± 0,0	2,66 ± 0,55	1,66 ± 0,57
<i>Enterobacter agglomerans</i> GC subgrupo III (NFCA1F)	13,33 ± 0,57	8,0 ± 2,0	10,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	14,0 ± 1,0	5,0 ± 0,0
<i>Enterobacter agglomerans</i> GC subgrupo IV (NCol117)	0	-	0	-	3,33 ± 0,57	3,33 ± 0,57
<i>Escherichia coli</i> GC subgrupo C (NFRT3E)	10,66 ± 1,52	7,0 ± 1,0	6,33 ± 1,15	5,33 ± 0,57	4,0 ± 0,0	5,0 ± 1,73
<i>Klebsiella trevisanii</i> (NFRP3C)	6,66 ± 1,15	1,0 ± 0,0	2,33 ± 0,57	4,33 ± 0,57	4,33 ± 0,57	1,0 ± 0,0
Não identificada (NFRP2C)	0	-	0	-	8,66 ± 0,57	1,0 ± 0,0
<i>Ochrobactrum anthropi</i> (RINFA1B)	7,66 ± 0,57	9,66 ± 0,57	0	-	0	-
<i>Paenibacillus pabuli</i> (NCol210)	0	-	0	-	1,0 ± 0,0	4,0 ± 1,73
Não identificada (RINFA2L)	0	-	8,66 ± 1,15	1,66 ± 0,57	0	-
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (NFCA1C)	0	-	3,66 ± 0,57	1,0 ± 0,0	0	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (RINFA2K)	15,66 ± 0,57	17,66 ± 0,57	0	-	0	-

Literatura Citada

- DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. 1995. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília, EMBRAPA - SPI, Itaguaí. RJ: EMBRAPA-CNPAB. 60p.
- HIRSCH, A. M. et al. 1995. Assessing horizontal transfer of *nif*HDK genes in eubacteria: nucleotide sequence of *nifK* from *Frankia* strain HFPCc13. *Molecular Biology Evolution* 12 (1): 16-27.
- KREUTZER, R.; SINGH, M.; KLINGMULLER, W. 1989. Identification and characterization of the *nifH* and *nifJ* promoter regions located on the *nif*-plasmid pEA3 of *Enterobacter agglomerans* 333. *Gene* 78(1):101-109.
- LAGUERRE, G. P. et al. 1995. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Applied Environmental Microbiology* 62: 2029-2036.
- NAUTIYAL, C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170: 265-270.
- OHKUMA, M.; NODA, S.; KUDO, T. 1999. Phylogenetic diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic microbial community in the gut of diverse termites. *Applied Environmental Microbiology* 65: 4926 - 4934.
- PIKOVSKAYA, R. I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 17: 362-370.
- POLY, F. et al. 2001. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. *Applied Environmental Microbiology* 67 (5) : 2255-2262.
- RÖSCH, R.; MERGEL, A.; BOTHE, H. 2002. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Applied Environmental Microbiology* 68: 3818-3829.
- SIDDAVATTAM, D. 1995. Regulation of *nif* gene expression in *Enterobacter agglomerans*: nucleotide sequence of the *nifLA* operon and influence of temperature and ammonium on its transcription. *Molecular General Genetics* 20 (6): 629-636.
- STOLTFSUS, J. R. et al. 1997. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant and Soil* 194: 25-36.
- UEDA, T. et al. 1995. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *Journal Bacteriology* 177: 1414-1417.
- WIDMER, F. et al. 1999. Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon Cascade mountain range. *Applied Environmental Microbiology* 65: 374-380.
- YOUNG, J. P. W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In G. Stacey, R. H. Burris; H. J. Evans (ed.), *Biological nitrogen fixation*. Chapman and Hall, New York, N.Y. pp. 43-86.
- ZAPATA, F.; AXMANN, H. 1995. 32P isotopic techniques for evaluating the agronomic effectiveness of rock phosphate materials. *Fertilizer Research* 41: 189-195.
- ZEHR, J. P.; MCREYNOLDS, L. A. 1989. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. *Applied Environmental Microbiology* 55: 2522-2526. ●