ISOLAMENTO E ANÁLISE DE ATIVIVADE PROTEOLÍTICA DE NOVAS BACTÉRIAS PRMOTORAS DO CRESCIMENTO

Laís Priscila Karas[1] (BIC/CNPq/UEPG), Carolina Weigert Galvão[2], Silvia Aparecida Ferreira Albuquerque[3], Rafael Mazer Etto[4] (Orientador), e-mail: mazeretto@hotmail.com

[1]Universidade Estadual de Ponta Grossa/Graduanda em Farmácia
[2]Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Química
[3]Universidade Federal do Paraná/Doutoranda em Ciências-Bioquímica
[4]Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética

Ciências Biológicas
Bioquímica dos Microorganismos

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio, Avaliação bioquímica de protease, Biofertilizantes.

Resumo

Frente ao crescimento populacional e maior demanda de alimentos o uso de fertilizantes químicos vem aumentando com o intuito de elevar a produtividade e suprir a demanda de mercado. Diante dessa situação Bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) vem sendo empregadas como estratégia para reduzir o consumo desses agroquímicos. Esse trabalho propôs ações de pesquisa com o objetivo de avaliar e selecionar microrganismos com elevado potencial para promoção do crescimento vegetal. A seleção e classificação desses isolados com resultados promissores permitirá a sua utilização como biofertertilizantes

Introdução

Um dos grandes dilemas do século XXI será alimentar aproximadamente 10 bilhões de pessoas em 2050 e ao mesmo tempo reduzir o impacto ambiental e os custos da produção agrícola (FOLEY et al., 2011). Uma alternativa que visa à diminuição do uso de fertilizantes e uma agricultura mais sustentável é o uso de Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal (BPCV). As BPCV são colonizadoras epifíticas ou endofíticas e apresentam uma relação harmônica com a planta, proporcionando o crescimento direto do vegetal ou indiretamente atuando como controle biológico de doenças (MARIANO et al., 2004).

O solo é peça chave para tal inovação, pois comporta uma grande diversidade microbiológica, onde podemos encontrar uma gama de bactérias que apresentam grande potencial para a exploração biotecnológica (TORSVIK e ØVREÅS, 2002; MARON et al., 2011). O emprego desses microrganismos no desenvolvimento de biofertilizantes é uma ferramenta altamente promissora, já que estes são responsáveis por diversos mecanismos do crescimento vegetal. (ISLAM, 2013). O presente trabalho teve por objetivo avaliar e selecionar novas bactérias promissoras quanto à fixação biológica do nitrogênio e produção de protease para o desenvolvimento de biofertilizantes.

Materiais e Métodos

O solo utilizado no experimento é proveniente de área de campo nativo, localizada na Fazenda Escola Capão da Onça (FESCON), e corresponde a Latossolo Háplico. O solo coletado foi acondicionado em casa de vegetação na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), para secagem parcial. Na sequência foi peneirado e separado em duas partes: solo com e sem correção de pH. Para correção de pH, realizou-se aplicação de 1,27g de calcário por quilograma de solo. Obteve-se assim pHs 4,1 e 6,4 para solo não corrigido e corrigido, respectivamente.

Em seguida, realizou-se experimento em casa de vegetação, utilizando cultivar de milho (*Zea mays*) em desenvolvimento pela UEPG. O plantio das sementes foi realizado em vasos (5 dm^3) aplicando sistema de blocos. Nove tratamentos foram realizados em quadruplicata sob dois diferentes pHs. O bloco A refere-se ao plantio de milho em solo com pH 4,1 enquanto o bloco B plantio em solo com pH 6,4. Cada bloco consistiu nos seguintes tratamentos: (1) tratamento controle, (sem aplicação de adubo e sementes sem inoculação), (2) nitrogênio em cobertura, (3) inoculação de *Azospirillum brasilense* Abv5/Abv6, (4) inoculação de isolado B3D, (5) inoculação de isolado H2D, (6) inoculação de isolado 11V22, (7) inoculação de isolado 10N4, (8) inoculação de isolado 1P31 e (9) tratamento com coquetel de isolados B3D, H2D, 11V22, 10N4 e 1P31.

A coleta de solo da rizosfera de milho foi realizada em dois tempos de desenvolvimento da planta: 1ª amostra coletada 15 dias após o plantio; 2ª amostra 55 dias. Ambas foram coletadas em sacos estéreis e alocadas em estufa a 29 °C para eliminação da umidade.

Após a eliminação da umidade deu-se início a seleção das bactérias rizosféricas que apresentam a capacidade de fixar nitrogênio. Pesou-se 10 g de solo da rizosfera e transferiu-se para erlenmeyer contendo 90 mL de solução salina a 0,85%. Cada Erlenmeyer foi colocado sob agitação em shaker por 20 min para homogeinização, em seguida realizou-se diluição seriada (10^{-2} a 10^{-6}). As amostras foram consecutivamente agitadas por 20 segundos em vórtex antes de cada diluição. Cem microlitros de cada diluição foram inoculados em 3 mL de meio seletivo para diazotrofo (NFb semi-sólido), em triplicata. Após, as amostras foram incubadas a 29 °C e acompanhadas por sete dias consecutivos para avaliação quanto à formação de película (indicativo da fixação biológica de nitrogênio). Os frascos que apresentaram película foram vedados com tampa de borracha e armazenados ao abrigo da luz. Na sequência realizou-se segundo processo de repicagem a fim de isolar as bactérias que realmente têm a capacidade de fixar nitrogênio.

Para contagem, utilizou-se a metodologia do Número Mais Provável (NMP) utilizando as tabelas de McCrady descrita por BALDANI et al. (2014).

Após a segunda repicagem as bactérias foram plaqueadas no meio sólido correspondente à inoculação (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999). Após o crescimento, as colônias bacterianas isoladas foram selecionadas e estocadas em tubos de micro centrífuga contendo 500 microlitros de glicerol 50% e armazenadas a -20ºC.

Após a seleção e estocagem, as bactérias foram testadas quanto a capacidade de produzir protease. O ensaio foi conduzido como descrito por Smibert

e Krieg (1994) utilizando ágar e leite desnatado. A protease produzida pelas bactérias degrada as proteínas do leite o que leva a formação de halo claro ao redor da colônia. A classificação das bactérias quanto a produção de protease foi realizada com base na metodologia empregada para a análise de solubilização de minerais. A identificação realizou-se com observação da formação de um halo claro ao redor da colônia. O diâmetro do halo e o diâmetro da colônia foram medidos e a razão entre eles utilizada para indicar o Índice de produção de protease. Os isolados foram classificados como não produtor, quando não ocorre a formação de halo ao redor da colônia, baixo produtor quando apresentou valor menor que 2, médio produtor quando a razão era entre 2 e 4, e alto produtor quando o valor obtido era maior que 4.

Resultados e Discussão

Um total de 144 amostras de solo da rizosfera coletadas nos dois diferentes tempos de desenvolvimento da planta (tempo 1 e 2) foram analisadas.

Ao final das diluições foram contabilizados 47 frascos com formação de película provenientes da amostragem de solo rizosférico no tempo 1 e 48 frascos referentes à amostragem no tempo 2. Em seguida realizou-se um segundo processo de repicagem a fim de isolar as bactérias que realmente têm a capacidade de fixar nitrogênio (bactérias diazotróficas). Nessa etapa foram obtidos 6 frascos com formação de película referentes ao tempo 1 e 24 frascos referentes ao tempo 2, totalizando 30 frascos com formação de película na segunda repicagem. Os dados da estimativa populacional de células em cada tratamento são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Número Mais Provável de bactérias diazotróficas da rizosfera do milho (nº de células/mL).

Trat.	Descrição	Tempo 1 (15 d.a.p.)		Tempo 2 (55 d.a.p.)	
		pH 4,1	pH 6,4	pH 4,1	pH 6,4
T1	Controle	3.000	1.250	0	2.575
T2	Nitrogênio em cobertura	625	0	0	0
T3	*Azospirillum brasilense*	0	175	0	700
T4	Isolado B3D	0	100	0	875
T5	Isolado H2D	0	0	0	725
T6	Isolado 11V22	0	675	0	1.225
T7	Isolado 10N4	0	1.075	0	1.110
T8	Isolado 1P31	0	225	0	200
T9	Coquetel de isolados	0	200	200	200
	Total	**3.625**	**3.700**	**200**	**7.610**

Análise de NMP realizada pela tabela de McCrady. Os valores tabelados correspondem a média das replicatas de um mesmo tratamento. A abreviação d.a.p corresponde a dias após o plantio. Coquetel de isolados refere-se à inoculação com os isolados: B3D, H2D, 11V22, 10N4 e 1P31.

Os 30 frascos obtidos após a segunda repicagem foram plaqueados em meio NFb sólido com a finalidade de se obter colônias isoladas. Após o crescimento das colônias no meio sólido, 10 placas apresentavam dois tipos diferentes de colônias

bacterianas. Um novo plaqueamento foi realizado com essas 10 variantes com a finalidade de se obter duas colônias diferentes isoladas, o que totalizou 40 bactérias isoladas, sendo 6 isolados provenientes do tempo 1 e 34 isolados do tempo 2. Esses isolados foram estocados em glicerol para posterior avaliação e caracterização quanto à produção de protease.

Quanto a capacidade da produção de protease, todos os 6 isolados obtidos da amostra de solos do tempo 1, foram capazes de produzir protease, sendo 4 deles considerados com média produção e 2 com baixa produção. Já em relação ao tempo 2 foram obtidos 34 isolados, dentre as quais 12 foram classificados como não produtores de protease, 4 com produção média e 18 com produção baixa.

Conclusões

A partir dos dados de NMP (Tabela 1) é possível verificar que todos os tratamentos do bloco B, cujo solo apresenta valor de pH 6,4, possuem um maior número de células, comparado aos tratamentos do bloco A que apresenta pH 4,1. O valor de pH pode ser uma interferência direta quando se leva em consideração o tempo, pois a média dos valores de NMP referente ao período de 15 dias totalizou 3.625 células, em contrapartida o período de 55 dias revelou um menor número de células (200). Contudo, no tempo de 55 dias (tempo 2) foi obtido maior número de isolados. Ao total foram selecionados 8 isolados com média produção de protease, promissores para testes subsequentes.

Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa. À Fundação Araucária, CNPq e Petrobrás pelo suporte financeiro.

Referências

BALDANI, J. I. et al. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and Soil**, v. 384, n. 1-2, p. 413–431. 2014.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. DE O.; BALDANI, V. L. D. Protocolos para preparo de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia. - Portal Embrapa. **Embrapa Agrobiologia**, 1999.

FOLEY J.A, et al. Solutions for a cultivated planet. **Nature**, v.478, p. 337-342, out. 2011

ISLAM, Md et al. Nitrogen-fixing bacteria with multiple plant growth-promoting activities enhance growth of tomato and red pepper. **Journal of basic microbiology**, v. 53, n. 12, p. 1004-1015, 2013.

MARIANO, R. L. R. et al. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 1, p. 89-111, 2004.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems, **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 240–245, 2002.

WARD, O. P. Proteinases. In: FOGARTY, W. M. (Ed.). Microbial enzymes and biotechnology. London: **Applied Science Publishers**, 1983. p. 251- 305.