ISOLAMENTO E ANÁLISE BIOQUÍMICA DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL

Nathaly Cristine Telles (UEPG)[1], Rafael Mazer Etto[2], Fernanda Carolina da Silva (Co-orientadora)[3], Carolina Weigert Galvão (Orientadora)[4], e-mail: carolinawgalvao@hotmail.com.

[1]Universidade Estadual de Ponta Grossa/Graduanda em Farmácia.
[2]Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética.
[3]Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia.
[4] Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética.

Bioquímica - Bioquímica de Microrganismos

Palavras-chave: Fixação de nitrogênio, Celulose, Biofertilizantes**.**

Resumo

Bactérias que possuem capacidade como fixação biológica de nitrogênio, produção de celulase, protease e cianeto apresentam potencial de crescimento vegetal, sendo uma alternativa promissora como biofertilizante devido ao seu baixo custo e alto benefício. Aquelas que apresentaram capacidade de fixação de nitrogênio foram isoladas e identificadas. Realizaram-se testes a fim de identificar produção de metabólitos que possam colaborar com o crescimento vegetal, tendo como destaque, a celulase. Os resultados apresentados nesse trabalho demonstram a produção da enzima celulase em nove bactérias rizosfericas do milho.

Introdução

Um dos nutrientes de vil importância para o desenvolvimento vegetal no ambiente é o nitrogênio (POTAFOS, 2011). Apesar de sua abundância no ar atmosférico, animais e plantas são incapazes de assimilá-lo em sua forma molecular gasosa (N2) e retirá-lo diretamente do ar (COELHO, C. H. M. et al., 2003). Além disso, na maioria dos solos tropicais, a deficiência de N acaba afetando severamente a produção agrícola, fazendo então com que a utilização de adubos nitrogenados ou fontes nitrogenadas orgânicas sejam necessárias para o cultivo (ZILLI, J. E. et al., 2008).

A celulase possui a capacidade de contenção de patógenos que apresentam celulose na sua constituição, como no caso de alguns fungos. Como também a disponibilização de nutrientes ao vegetal e colaborando na fixação de nitrogênio em plantas leguminosas, facilitando a penetração dos rizóbios e de sua nodulação (BHAT, 2000). Esta enzima se encaixa dentro da classificação de enzimas relacionadas a degradação de carboidrato. Para que essa capacidade seja possível, elas possuem enzimas como Glicosil hidrolases que são responsáveis pela clivagem de ligações glicosídicas entre carboidratos (BERLEMONT e MARTINY, 2015)

Materiais e Métodos

O experimento foi realizado na casa de vegetação da Universidade Estadual de Ponta Grossa. A espécie escolhida para análise foi o milho *Zea mays*, cultivado

em casa de vegetação em vasos contendo solo do tipo Latossolo Háplico coletado em uma área de campo nativo presente na Fazenda Escola Capão da Onça.

Estes solos foram separados em 2: A primeira parte manteve-se sem adição de calcário, permanecendo com o pH na faixa de 4,1. Já a segunda parte recebeu uma dose de calcário para elevar o pH a faixa de 6,4. No total houve 9 tratamentos com quatro repetições cada, sendo: (I) sem nitrogênio e sem inoculação; (II) com nitrogênio em cobertura e sem inoculação; sem nitrogênio e inoculação de (III) Azospirillum brasilense AbV5/ AbV6; (IV) Rhizobium sp. B3D; (V) Pseudomonas sp. H2D; (VI) Enterobacter sp. 11V22; (VII) Acinetobacter sp. 10N4; (VIII) Burkholderia sp. 1P31 e (IX) “Coquetel”, inoculação simultânea dos isolados do laboratório em um mesmo tratamento (Rhizobium sp. B3D; Pseudomonas sp H2D; Enterobacter sp. 11V22; Acinetobacter sp. 10N4; Burkholderia sp. 1P31).

O plantio do milho foi realizado no dia 10/11/16. O primeiro desbaste foi realizado no dia 25/11/16 e o segundo no dia 21/12/16. Foram coletadas aleatoriamente 4 amostras (de raiz + solo) de cada repetição, totalizando em 72 amostras. Estas foram armazenadas em sacos de papel, na sombra e em contato com o ar, até se tornar terra fina seca ao ar (TFSA). Cada amostra de solo foi transferida para frascos de Erlenmeyer, contendo solução salina e mantidas sob agitação. Subsequente a agitação, a amostra foi submetida a uma diluição seriada (10^{-2} a 10^{-6}) em solução salina. Alíquotas foram inoculadas em triplicata em fracos contendo meio de cultura NFb juntamente com Biotina DOBEREINER et al. (1999). Os frascos permaneceram em incubação na estufa a 30ºC por 7 dias, sendo analisados diariamente segundo a formação de película, que caracteriza a propriedade de fixação biológica do nitrogênio (FBN). Em seguida foi realizada a contagem de microrganismos segundo a tabela de McCrady conforme Pochon & Tardieux (1957), pelo método do número mais provável (NMP). Quarenta amostras bacterianas que demonstraram formação de película, foram separadas e isoladas.As bactérias foram estocadas em glicerol 50% como descrito em Overmann (2013).

Para o teste da celulase, foi utilizada a metodologia descrita por Kasana et al. (2008), substituindo carboximetilcelulose (CMC) por celulose e usando como corante o iodo de gram. As placas foram inoculadas e após 2 dias de crescimento, reveladas com o corante Iodo de Gram. Aquelas que demonstraram halo de crescimento, foram classificadas positivas para degradação da celulose.

Resultados e Discussão

A produção de celulases, pode ser realizada por bactérias anaeróbicas (como *Clostridium* e *Rominococcus*) e aeróbicas (*Cellulomonas, Thermobifida*, etc), actinomicetos (*Streptomyces*), fungos filamentosos (*Trichoderma, Bulgaria, Helotium, Poria, Aspergillus,* etc), plantas (Fragaria) e até mesmo animais (moluscos e insetos) (LYND et al., 2002). Comparativamente, Ten e colaboradores (2004) realizaram, dentre estes microrganismos, estudos observando a capacidade de produção de celulase e hemicelulose com bactérias aeróbicas, anaeróbicas e actinomicetos. *Bacillus, Streptomyces*, *Cellulomonas* e outras, foram selecionadas como produtoras de celulase através do diâmetro do halo de degradação.

Em relação ao NMP, foram observados maiores crescimentos nas amostras do tipo B (pH maior), em relação aos do tipo A (pH menor). O segundo desbaste apresentou vantagem em relação ao primeiro, e houve maior crescimento nas amostras que tiveram tratamento 1 (controle). Comparando com a produção de celulase, apenas amostras do segundo desbaste (sendo todas do tipo B), obtiveram

resultados positivos. Principalmente as amostras de tratamento tipo 9 (coquetel) foram as que mais demonstraram produção de celulase. Foram obtidos 30 isolados bacterianos, 6 no primeiro desbaste e 24 no segundo, além de 10 com mais de um crescimento.

Dentre as 24 amostras do segundo desbaste, nove se apresentaram positivas (apresentaram formação de halo em pelo menos 2 placas da triplicata), foram estas: 9B4 -2 ll (+), 5B3 -2 (1) (+), 4B4-2 l (+), 1B1 -2 (1) (+++), 9B4 -2 II (2) (+), 4B3 -3 I (2) (+), 5B4 -2 I (2) (++), 9A4 -2 (+), 3B1 -2 (1) (++).

Legenda: Em relação a sua intensidade de degradação de celulose as bactérias foram classificadas: + (pouca degradação), ++ (média degradação) e +++ (alta degradação). O teste foi realizado em triplicata, para avaliar positividade, foram consideradas aquelas que demonstraram crescimento de halo em pelo menos 2 placas. A nomenclatura das bactérias indica o tratamento que foram isoladas como segue: 1 = Controle, 2 = Nitrogênio em cobertura; 3 = *Azospirillum brasilense*; 4 = Isolado B3D; 5 = Isolado H2D; 6 = Isolado 11V22; 7 = Isolado 10N4; 8 = Isolado 1P31; 9 = Coquetel com os isolados B3D, H2D, 11V22, 1P31; A = pH 4,1, B = pH 6,4; números entre parênteses = quantidade de colônias que cresceram numa mesma placa; números romanos = quando demonstrou crescimento em mais de um frasco na triplicata.

Conclusões

Quarenta isolados da rizosfera do trigo fixam nitrogênio e nove produziram a enzima celulase. Dentro das atividades apresentadas pelas bactérias fixadoras, a capacidade de contenção de patógenos ofertada pela celulase, faz com que ela seja um componente de grande importância para a promoção do crescimento vegetal.

Agradecimentos

Agradeço a PROPESP, a Fundação Araucária e a CNPq.

Referências

ADESEMOYE, a O., Torbert, H. a, & Kloepper. J. W. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial ecology*, v. 58, n. 4, p. 921, 2009.

BHAT, M. K. *Cellulases and related enzymes in biotechnology*. Biotechnology advances. 2000, v. 18, n. 5, p. 375.

BHAT, M. K.; BHAT, S. *Cellulose degrading enzymes and their potencial industrial applications*. Biotechnology Advances, New York, v. 15, n. 3-4, p. 583-620, 1997.

CASTRO, Aline Machado de, PEREIRA JR, Nei. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Quím. Nova* [online]. 2010, vol.33, n.1

COSTA, Pedro Beschoren da. *Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento vegetal de lavouras experimentais de arroz sob diferentes níveis de fertilização*, 50 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

DIAS, Mariana. *Diversidade e produção de celulases por bactérias epifíticas de frutos típicos do Cerrado mineiro*, 2012. 110 p., Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras 2012.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. O.; BALDANI, V. L. D. *Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia.* Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 1999. 38p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 110).

FLORENCIO, Camila. Microrganismos *produtores de celulases: seleção de isolados de Trichoderma spp.* Camila Florencio. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

LIMA, Francisco José da Conceição. *INSETICIDA ORGANOFOSFORADO METAMIDOFÓS: ASPECTOS TOXICOLÓGICOS E ANALÍTICOS*, Curitiba, v. 11, jan./dez. 2001

LUVIZZOTO, Danice Mazzer. *Caracterização fisiológica e molecular de Burkholderia spp. associadas às raízes de cana-de-açúcar.* 94 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. 2008.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; ZYL, W.H van; PRETORIUS, I.S.. *Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. v. 66, 2002.
MOREIRA, Josino C. et al. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. *Ciênc. saúde coletiva*, Rio de Janeiro, v. 7, n. 2, p. 299-311, jan. 2002.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. O.; BALDANI, V. L. D. *Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 1999. 38p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 110).

PERES, Frederico et al. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. *Ciênc. saúde coletiva*, Rio de Janeiro, v. 10, supl. p. 27-37, Dec. 2005.

SILVA, Fernanda Carolina da. *Estudo bioquímico, molecular e genético de atividades promotoras do crescimento vegetal em bactérias*, 31 p. Trablho de Conclusão de Curso - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2015.

SOLOKOVA, M. G., Akimova, G. P., & Vaishlya, O.B. *Effect of phytohormones synthesized by rhizosphere bacteria on plants*. Applied Biochemistry and Microbiology, v. 47, n. 3, p. 274, 2011.

SOUZA, Angélica Cristina de. *Utilização de celulases de leveduras para produção de bioetanol de segunda geração*, 89 p. Dissertação (Mestrado) 2011 – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

TEN, L.N.; IM, W.T.; KIM, M.K.; KANG, M.S.; LEE, S.T. *Development of a plate technique for screening polysaccharide-degrading microorganisms by using of insoluble chromogenic substrates*. Journal of Microbiological Methods. v.56, 2004.
VERMELHO, Alane Beatriz. *Microbial Celullases and Their Industrial Applications*, v. 2011, 10 p., - University of Delhi South Campus, New Delhi, India, 2011.