

## BIOPROSPECÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO EM ALFACE

Eduardo A. Santos<sup>(1)</sup>; Ana Ligia L. Moreira<sup>(1)</sup>; Arleto T. Santos<sup>(1)</sup>; Edna A. T. Agostini<sup>(1)</sup>; Willian A. Higaki<sup>(1)</sup>; Fabricio Loureiro de Almeida<sup>(1)</sup>, Fabio F. Araujo<sup>(2)</sup>; Luciana M. Guaberto<sup>(2)</sup>

(1)Mestrandos do Curso de Pós-Graduação em Agronomia Universidade do Oeste Paulista (2)Professor da Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade do Oeste Paulista, Rod Raposo Tavares Km 572, P. Prudente, SP, CEP: 19067-175 P. Prudente, SP, CEP: 19067-175

### RESUMO

Objetivou-se com este estudo o isolamento de bactérias da rizosfera do alface e a caracterização quanto ao antagonismo a fungo fitopatogênico, produção de auxinas e fosfatases como também analisou-se a correlação desses parâmetros com a promoção de crescimento de alface. Foram conduzidas análises bioquímicas em laboratório e experimento de promoção de crescimento de alface em casa de vegetação com quarenta isolados da rizosfera de alface. Nas condições deste trabalho, o critério de avaliação do antagonismo a fungos nos diferentes isolados bacterianos da rizosfera mostrou-se importante para ser utilizado nos programas de seleção de rizobactérias promotoras de crescimento de alface

**Palavras-chave:** *Bacillus*, *Lactuca sativa*, auxinas.

### BIOPROSPECTING FOR PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA IN LETTUCE

#### ABSTRACT

The objective of this study was isolate bacteria from rhizosphere of lettuce and the characterization of antagonism against phytopathogenic fungus, production of auxin and phosphatases also analyzed the correlation of these parameters and growth promotion of lettuce. Biochemical analysis were conducted in a laboratory experiment and growth promotion of lettuce in a greenhouse with forty isolated from the rhizosphere of lettuce. In the present conditions, the antagonism to fungi in different bacterial isolates from the rhizosphere was considered important for use in breeding programs for promoting growth rhizobacteria in lettuce.

**Key words:** *Bacillus*, *Lactuca sativa*, auxins

## INTRODUÇÃO

A rizosfera é a região do solo sob influência direta das raízes, onde ocorre a interação da planta com microrganismos, sendo este habitat influenciado pela presença de diversas moléculas exsudadas pelas plantas permitindo formar uma comunidade microbiana complexa que é afetada pelas condições abióticas e bióticas, estabelecendo uma relação de neutralidade, mutualismo ou mesmo patogênica com o vegetal (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). A rizosfera consiste no habitat para rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP), estas bactérias colonizam inúmeras plantas, podendo com a interação causar mudanças fisiológicas, proporcionar benefícios como aumento da absorção de nutrientes, controle de fitopatógenos, entre outros (COELHO et al. 2007).

Os trabalhos de pesquisas com o gênero *Bacillus* tem dado bastante importância à área de controle biológico de doenças onde se tem avaliado determinadas espécies deste gênero, como *B. subtilis* (ARAUJO, 2008). A avaliação de espécies de *Bacillus* sp. como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas tem assumido grande importância nos últimos anos com a realização de vários estudos, entretanto em alguns casos tem sido utilizados isolados bacterianos que não foram selecionados para esta atividade em culturas agrícolas específicas (ARAUJO, 2008). Torna-se então necessário a realização de trabalhos com seleção de rizobactérias com uso de critérios de simples execução e que possam ser úteis para uso em projetos de pesquisas com culturas regionais.

Gomes et. al. 2003 isolaram 114 bactérias epifíticas e endofíticas de alface que foram avaliadas para promoção de crescimento de plantas em estufa e em condições de campo, destacando no campo o isolado C25 identificado como *Bacillus turingiensis* subvar. *Kenya*e e C116

*Bacillus pumilus*. Os metabólitos estudados foram ácido indol acético, ácido cianídrico, solubilização de fosfatos e alterações de macronutrientes N, P, K, Ca, e Mg. De acordo com Freitas et al. (2003) entre os modos de ação mais aventados para as RPCPs estão a produção de reguladores de crescimento de plantas, e o aumento do acesso a nutrientes.

O presente trabalho teve como principais objetivos formar uma coleção de rizobactérias, a partir do isolamento da rizosfera do alface, e realizar uma caracterização quanto ao antagonismo a fungos, produção de auxinas e fosfatases e correlação desses parâmetros com a promoção de crescimento de alface em casa de vegetação.

## MÉTODOS

O experimento foi conduzido na casa de vegetação e laboratório de microbiologia agrícola da Unoeste, P. Prudente, SP durante os meses de fevereiro a junho de 2010. Foram coletadas amostras de plantas adultas de alface dos seguintes municípios: P. Prudente, Ipororó do Paranapanema, Santo Anastácio, no Estado de São Paulo, e Fênix no Estado do Paraná.

No laboratório, 20g de raiz de cada planta foram coletadas e lavadas levemente em água corrente para desprender o solo que estava mais frouxamente aderido e posteriormente a mesma foi fracionada e colocada em frasco erlenmeyer com solução salina esterilizada (solução de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,01M). O conjunto raiz-solo que permaneceu aderido foi denominado ambiente rizosférico. Esse conjunto, dentro do frasco foi submetido a 30 minutos de agitação em agitador orbital mecânico. Amostras de 1 mL retiradas do frasco foram submetidos a diluições seriadas em tubos com 10 mL de água destilada estéril. Antes do plaqueamento foram submetidas a um choque térmico (80°C/20 min) visando selecionar rizobactérias do gênero *Bacillus*. O plaqueamento

foi realizado com alíquotas de 0,1 mL, coletadas nos tubos após o choque térmico e distribuídas em meio AN (ágar nutritivo) com incubação por 48 horas, em estufa a 28°C. As bactérias formadoras de colônias nas placas foram, então, isoladas em tubos com Agar nutriente. Nesta etapa foram separados 40 isolados de rizobactérias do gênero *Bacillus*.

Para caracterizar os isolados quanto ao antagonismo a fungos foi utilizado o método de pareamento em placas de Petri contendo BDA [batata(250g/l):dextrose(10g L<sup>-1</sup>):agar(15g L<sup>-1</sup>)] segundo metodologia descrito por Araujo et al (2005). Foi utilizada a espécie de fungo fitopatogênico *Aspergillus spp.* Para caracterizar os isolados quanto à produção de fosfatase os mesmos foram inoculados em 25 ml de caldo nutriente e ficaram sob agitação durante 24 horas, foi retirado 1,5 ml para centrifugação (10.000 rpm por 20 minutos), repetindo-se duas vezes o processo descartando o precipitado. Foi retirado 0,5 ml do sobrenadante e adicionado 2,0 ml de p-nitrofenilfosfato (0,0005M) em tubo de ensaio. O material foi mantido em banho Maria a 37 °C por 3 horas, e em seguida foi adicionado 2,5 mL de NaOH 1M. A atividade da fosfatase foi quantificada pela leitura de absorbância a 410 nm. Para avaliação dos isolados quanto ao potencial de produção de AIA foi conduzido bioensaio onde as bactérias foram cultivadas em 50 mL de meio líquido TSB (Trypticase Soy Brooth) suplementado com 10 g L<sup>-1</sup> de dextrose, 5g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 5 mM de L-triptófano (1000 ug mL<sup>-1</sup>). Os isolados foram mantidos a 28 °C, no escuro sob agitação constante, durante 24 horas. Após este período, foi centrifugado a 10000 x g durante 10 minutos, para a obtenção do sobrenadante. A quantidade de AIA por mL de cultura foi estimada através da mistura de 5 mL de reagente de Salkowski (EHMANN, 1977) com 1 mL do sobrenadante da

cultura, seguido da leitura da absorbância em 500 nm, após 30 minutos.

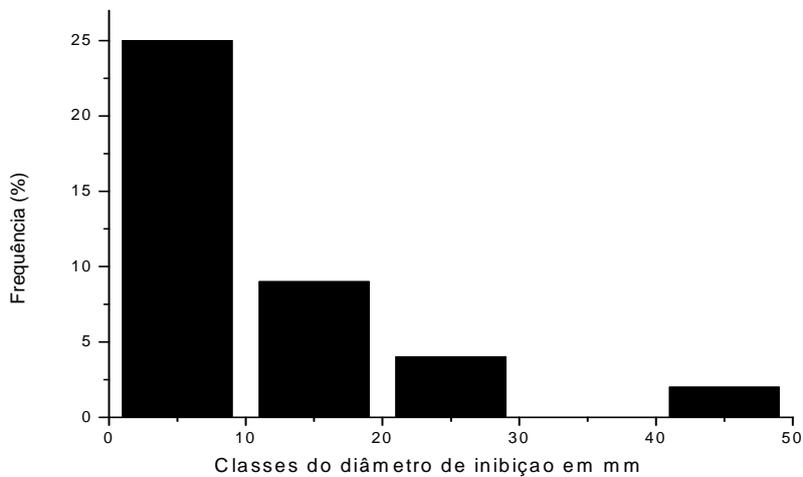
Para avaliação dos isolados quanto a promoção de crescimento de plantas foi conduzido um experimento com o cultivo de alface do tipo crespa em vasos com 3 Kg de solo coletado em horta comercial. O solo apresentava os seguintes atributos de fertilidade: pH (CaCl<sub>2</sub> 1 mol L<sup>-1</sup>) de 6,2; 85 g dm<sup>-3</sup> de MO; 65 mg dm<sup>-3</sup> de P<sub>resina</sub>; 17,5 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de K; 68 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de Ca e 14 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de Mg. O experimento foi conduzido em blocos casualizados com 3 repetições. As rizobactérias caracterizadas anteriormente foram multiplicadas em meio sólido de onde foram raspadas e diluídas em água estéril (concentração final de 1,0.10<sup>8</sup> ufc.mL<sup>-1</sup>) e em seguida inoculadas (1 mL por planta) na região próxima a raiz da muda de alface no momento do transplante. Os vasos foram irrigadas diariamente e, após 38 dias, foi realizada a colheita. As variáveis biométricas analisadas foram massa seca da raiz e da parte aérea e medição do diâmetro do caule.

Os dados foram analisados estatisticamente pelo programa sigmaplot onde foram realizadas as análises de correlação de Pearson e de frequência.

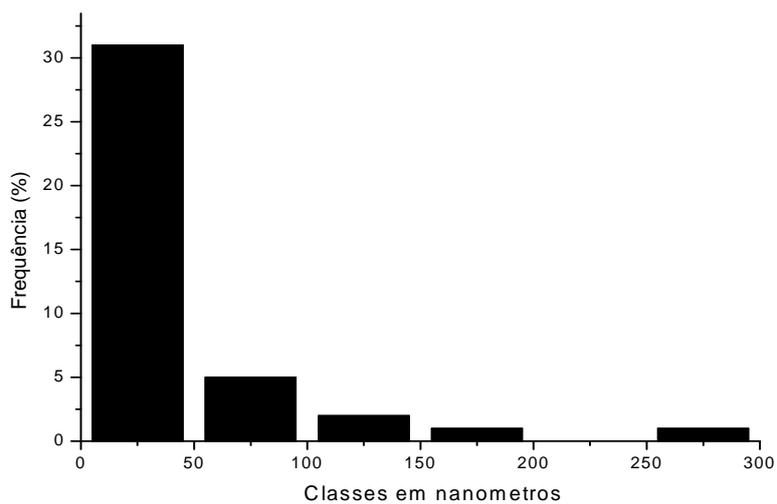
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização dos 40 isolados quanto ao antagonismo mostrou que aproximadamente 25% das bactérias avaliadas posicionaram-se dentro da menor faixa de inibição ao *Aspergillus* e que menos de 10% ocupou as classes de maior inibição do fungo (Fig. 1). Este padrão de classificação dos isolados também ocorreu de forma semelhante na avaliação da produção de fosfatase, onde cerca de 30% dos isolados foram classificados na faixa mais baixa de detecção da enzima pela coloração no espectrofotômetro (Fig. 2). A avaliação da produção de auxina revelou uma distribuição próxima a normal com a maioria

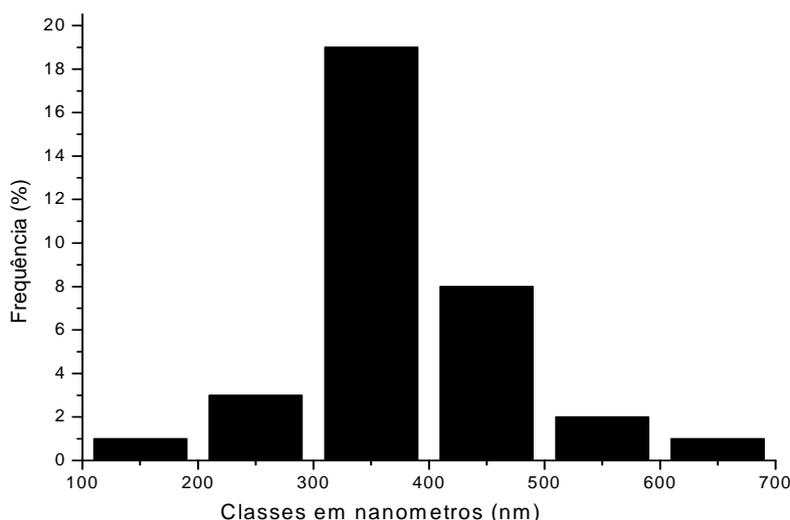
dos isolados produtores do regulador de crescimento de plantas classificados no centro das classes (Fig. 3).



**FIGURA 1-** Classes de frequência do antagonismo a *Aspergillus niger* nos 40 isolados avaliados



**FIGURA 2-** Classes de frequência da produção da fosfatase espectrofotometricamente nos 40 isolados



**FIGURA 3-** Classes de frequência da produção da auxinas em avaliação espectrofotométrica nos 40 isolados

Em consonância com os resultados obtidos, os critérios de caracterização adotados revelaram relativa diversidade dentro das classes de frequência avaliadas. Contudo a presença de rizobactérias antagonistas ao fungo na rizosfera do alface foi a característica de menor prevalência dentro dos isolados avaliados.

Pela correlação empregada com os diferentes critérios utilizados na caracterização dos isolados bacterianos pode-se constatar que apenas a avaliação de antagonismo a *Aspergillus* apresentou correlação significativa com a maioria dos parâmetros avaliados (Tabela 1). Isto pode indicar este critério como de grande valor nos programas de seleção rizobactérias promotoras do crescimento de plantas.

**TABELA 1** - Correlação de Pearson dos parâmetros biométricos em alface com atributos bioquímicos encontrados nos 40 isolados de rizobactérias

Variváveis	Fosfatase	Auxina	Antagonismo
Massa seca total	0,016	0,015	0,475*
M. seca P. aérea	0,029	0,046	0,450*
Massa seca raiz	-0,026	-0,069	0,219
Diâmetro do caule	-0,101	-0,016	0,330*

\*Estatisticamente Significativo (P<0,05)

Conforme relatado por Freitas et al. (2003) o desempenho das rizobactérias em alface tem sido influenciado pelas condições ambientais, onde dependendo da limitação encontrada na condução do experimento alguns isolados podem se destacar ou não na promoção do crescimento de plantas. A maioria dos trabalhos com a utilização de isolados do gênero *Bacillus* na agricultura tem sido relacionado ao controle biológico de fitopatógenos (BETTIOL, 1991) o qual tem sido atribuído com frequência a produção de antibióticos (PHAE; SHODA, 1991; ARAUJO et al., 2005). Dentro das condições deste estudo as rizobactérias com potencial de antagonismo a fungo (*Aspergillus*) apresentaram correlação significativa com a promoção do crescimento da alface.

Nas condições deste trabalho concluiu-se que o critério de avaliação do antagonismo a fungos nos diferentes isolados bacterianos da rizosfera mostrou-se importante para utilização nos programas de seleção de rizobactérias promotoras de crescimento de alface.

## REFERÊNCIAS

ARAUJO, F. F. et al. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 1639-1645, 2005. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-005-3621-x>

ARAUJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostra e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 2, p. 456-462, 2008.

BETTIOL W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1991. 452 p.

COELHO, L. F. et al. Interação de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* e de *Bacillus* spp. com a rizosfera de diferentes plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 1413-1420, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832007000600018>

EHMANN, A. The van urk – salkowski reagent- a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. **Journal of Chromatography**, v. 132, p. 267-276, 1977. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)89300-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)89300-0)

FREITAS, S. S. et al. Promoção do crescimento de alface por rizobactérias. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 61-70, 2003.

GOMES, A. M. A. et al. Isolamento, seleção de bactérias e efeito da utilização de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. **Horticultura Brasileira**, v. 21, p. 699-703, 2003.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362003000400026>

MOREIRA, F. M. de S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. Cap. 8. p. 361-397.

PHAE, C.; SHODA, M. Investigation of optimal conditions for separation of iturin an antifungal peptide produced by *Bacillus subtilis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 71, p. 118-121, 1991. [http://dx.doi.org/10.1016/0922-338X\(91\)90235-9](http://dx.doi.org/10.1016/0922-338X(91)90235-9)