

SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS

Karina Maria Lima Milani, Paula Cerezini, Elcio Libório Balota

Resumo - O objetivo deste trabalho foi selecionar bactérias diazotróficas, provenientes de várias espécies de plantas sob diferentes tipos de manejos, pela sua capacidade de produzir ácido indol acético, acumular N em meio isento deste e promover o crescimento das plantas. Primeiramente foram obtidos 72 isolados a partir de amostras de solo rizosférico e de tecido vegetal (raízes e folhas) de (canola, cana-de-açúcar, girassol e samambaia). Após a purificação dos isolados foi feita avaliação de sua capacidade de produzir AIA e acumular N *in vitro*. Os isolados de *Azospirillum spp* testados produziram maior quantidade de AIA que as estirpes padrões, enquanto que os de *Gluconacetobacter* apresentaram menor capacidade que o padrão. Com relação à capacidade de acumular N-total *in vitro* os isolados testados foram similares aos padrões utilizados.

Palavras-Chave: *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, ácido indol acético.

SELECTION OF DIAZOTROPHIC MICROORGANISMS

Abstract- The objective of this study was to select diazotrophic bacteria, from several species of plants under different types of soil management by its ability to produce indole acetic acid, accumulate N in N-free medium and promote the plant growth. Initially 72 isolates were obtained from samples of rhizospheric soil and plant tissue (leaves and roots) of (canola, sugar cane, sunflower, fern). After purification of the isolates it was evaluated the ability to produce IAA and to accumulate N *in vitro*. All *Azospirillum* isolates produced higher amount of AIA than reference strain used, while the *Gluconacetobacter* isolates presented smaller capacity than reference strain. The capacity to accumulate N-total *in vitro* all isolates studied were similar to reference strain used.

KeyWord: *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, indole acetic acid.

1. INTRODUÇÃO

Muitos estudos têm evidenciado a ocorrência e a importância das bactérias diazotróficas em diversas culturas. Existe a ocorrência generalizada de vários microrganismos com capacidade de FBN associados às culturas tanto na região da rizosfera, como endofiticamente em várias partes da planta. Das bactérias rizosféricas o gênero mais estudado é o *Azospirillum*, enquanto que com relação às endofíticas, uma das mais estudadas pertence ao gênero *Gluconacetobacter* com ocorrência na cana-de-açúcar.

Tem sido sugerido que a contribuição da FBN na cultura de cana-de-açúcar é de cerca de 70% (URQUIAGA et al. 1992). Entretanto, várias revisões evidenciam que a promoção do crescimento de plantas pela inoculação de bactérias diazotróficas se devem não somente à FBN, mas a outros efeitos como produção de fito-hormônios, por exemplo, o ácido indol acético (AIA), que pode ser sintetizado

pelas bactérias diazotróficas a partir do triptofano, que é utilizado como fonte de N (FALLIK et al., 1989).

O objetivo deste trabalho foi o de isolar e selecionar bactérias diazotróficas pela sua capacidade de produzir ácido indol acético, acumular N em meio isento de N e promover o crescimento das plantas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram isolados microrganismos diazotróficos a partir de amostras de solo da rizosfera, raízes e folhas das plantas: canola, cana-de-açúcar, girassol e samambaia; submetidas a diferentes manejos no estado do Paraná. As amostras foram diluídas e inoculadas em meios semi-sólido seletivo LGI-P para *Gluconacetobacter* (CAVALCANTE & DOBEREINER, 1988) e Nfb para *Azospirillum* (DOBEREINER, 1980). Após a formação de película característica, as culturas foram repicadas objetivando sua purificação.

Para avaliar a capacidade dos isolados em produzir AIA *in vitro*, o inóculo foi transferido para tubos contendo meio Tris-YMRT na ausência ou presença de L-triptofano e cultivadas sob agitação a 28°C no escuro, pois a luz oxida o AIA. Foram realizadas avaliações da produção de AIA em 6, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a inoculação. A quantificação de AIA foi feita pelo método colorimétrico segundo GORDON & WEBER (1951), modificado por MINAMISAWA et al. (1992). Após 25 minutos em ambiente escuro, foram feitas as leituras da absorbância a 530 nm e calculado segundo curva padrão obtida com concentrações de 0 a 500 µM.

Quanto à capacidade de acumular N em meio isento deste, ou FBN *in vitro*, os isolados foram crescidos em meio DYGS, padronizados pela densidade ótica (DO) em 0,5 Abs em comprimento de onda de 600 nm. Em seguida a amostra foi inoculada em meio NFB e LGI-P semi-sólido e incubados por cinco dias. Após a formação da película característica, evidenciado pelo crescimento das bactérias diazotróficas em meio semi-sólido, procedeu-se a ruptura das células para liberação do conteúdo celular aquecendo-os em microondas. Da solução resultante (meio de cultura + conteúdo celular) foi feita a digestão e analisado o nitrogênio total segundo método Kjeldhal (TEDESCO et al., 1995). O teor de proteína foi determinado na mesma solução, utilizando solução de *Comassie Blue G-250* e avaliado segundo método de BRADFORD (1976).

Todos os resultados foram submetidos à análise de variância, e comparação das médias pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade utilizando do pacote estatístico SAS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação ao *Azospirillum*, verificou-se que todos os isolados foram capazes de produzir AIA. No meio sem triptofano IPRA-13 e 21 apresentaram maior acúmulo de AIA (incremento de 62%) comparado aos padrões, enquanto que no meio com triptofano os três isolados testados produziram maior quantidade de AIA que os padrões utilizados (BR 11001, *A. brasilense*; BR 11080, *A. lipoferum*), com acréscimo de até 36% (IPRA-21) (Tabela 1).

Entre as estirpes de *Gluconacetobacter*, os quatro isolados testados produziram menor quantidade de AIA que a padrão BR11281 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) utilizada. Não houve diferenças entre os isolados testados no meio sem triptofano, enquanto que com adição de triptofano ocorreu variação de até 78%. Quando é comparada a produção de AIA devido à adição de triptofano, observa-se que o isolado IPRG-44 aumentou em 25% a concentração de AIA na presença do triptofano, enquanto que IPRG-69 e 70 produziram, respectivamente, 29 e 50% mais AIA na ausência do triptofano.

Quanto à produção de N total (Tabela 2) o isolado de *Azospirillum*, IPRA-13 apresentou maior valor que outros isolados e 58% superior ao padrão BR11001, entretanto com relação ao teor de proteína os maiores valores, entre os isolados, foram produzidos pela IPRA-21 que foi 58% superior a BR11001 e 70% inferior a BR11080. Entre as estirpes *Gluconacetobacter diazotrophicus* não houve diferenças significativas no acúmulo de N total apesar de ocorrer variações em torno de 81%. Com relação ao teor de proteína, o isolado IPRG-62 apresentou os maiores valores, sendo 120% superior, em relação ao padrão BR 11281.

Tabela 1. Produção de ácido indol-ácetico por bactérias diazotróficas na ausência e presença de triptofano.

Estirpe	<i>Azospirillum</i>		<i>Gluconacetobacter</i>		
	Sem	Com	Sem	Com	
	Triptofano		Triptofano		
	----- µM -----		----- µM -----		
BR 11001*	289 aB	321 aB	BR 11281*	538 bA	601 aA
BR 11080*	312 aB	322 aB	IPRG-44	340 bB	426 aB
IPRA-6	309 bB	411 aA	IPRG-62	312 aB	278 aC
IPRA-13	481 aA	409 bA	IPRG-69	365 aB	284 bC
IPRA-21	487 aA	441 bA	IPRG-70	357 aB	239 bC

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e letra maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Estirpes padrões cedidas pela Embrapa Agrobiologia.

Tabela 2. Acúmulo de N-total e proteína produzida por bactérias diazotróficas isoladas de diferentes culturas após 5 dias de crescimento em meio semi-sólido específico.

Isolado	N-total µg mL ⁻¹	Proteína µg mL ⁻¹
----- <i>Azospirillum lipoferum</i> -----		
BR 11001*	6,43 b	92,33 c
BR 11080*	9,78 ab	487,66 a
IPRA-6	8,04 ab	79,00 c
IPRA-13	10,21 a	96,00 c
IPRA-21	9,35 ab	146,5 b
----- <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> -----		
BR 11281*	7,88 a	78,33 b
IPRG-44	7,61 a	36,00 b
IPRG-62	10,74 a	172,00 a
IPRG-69	9,49 a	54,16 b
IPRG-70	5,92 a	67,50 b

Letras iguais na coluna dentro de cada gênero não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Estirpes padrões cedidas pela Embrapa Agrobiologia.

4. CONCLUSÃO

Todos os isolados testados produziram AIA em meio com e sem triptofano.

Os isolados de *Azospirillum* IPRA-13 e IPRA-21 produziram maior quantidade de AIA que os padrões utilizados.

Os isolados de *Gluconacetobacter* testados não produziram AIA nos níveis apresentados pela estirpe

padrão utilizada.

O acúmulo de N total *in vitro* pelos isolados de *Azospirillum* e *Gluconacetobacter* foram similares aos apresentados pelas estirpes padrões utilizadas.

REFERÊNCIAS

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976

CAVALCANTE, V.A.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v.108, p.23-31, 1988.

DOBEREINER, J. Forage Fixation. Bergensen, F.J., ed. **New York, John Wiley & Sons**, 1980. p.535-555.

FALLIK, E.; OKON, Y.; EPSTEIN, E.; GOLDMAN, A. & FISCHER,

M. Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilense* inoculated maize roots. **Soil Biol Biochem.**, 21: 147-153, 1989.

GORDON, S.A.; WEBER, P.R. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v.26, p.192-195, 1951.

MINAMISAWA, K.; SEKI, T.; ONODERA, S.; KUBOTA, M.; ASAMI, T. Genetic relatedness of *Bradyrhizobium japonicum* field isolates as revealed by repeated sequences and various other characteristics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2832-2839, 1992.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. Análises de solo, plantas e outros materiais. Boletim Técnico nº 5, Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, UFRGS. Porto Alegre, 1995. 174 p

URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.; BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen 15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, v.56, p.105-114, 1992.