

Bactérias associadas às cactáceas da Caatinga: fixação assimbiótica de nitrogênio e colonização de raízes de plântulas

Kariane Vasconcelos Cavalcante², Clayton dos Santos Silva³, Yamina Coentro Montaldo⁴, João Manoel da Silva⁵, Crisea Cristina Nascimento de Cristo², Arthur Costa Pereira Santiago de Almeida², Matus da Silva Nascimento², Tania Marta Carvalho dos Santos⁴

¹Parte do Projeto do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica PIBIC da primeira autora e segundo autor.

²Academicx do Curso de Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Alagoas-UFAL. E-mail: karianevasconcelos@hotmail.com; criseacristina@hotmail.com

³Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente (PRODEMA)/ Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). E-mail: clayton@live.com.pt

⁴Professora, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas. E-mail: ycmzte11@gmail.com; taniamarta2@gmail.com

⁵Doutorando da Rede Nordeste de Biotecnologia/UFAL. jm.agro@hotmail.com

Resumo: Objetivou-se verificar capacidade de isolados de bactérias de solo e rizosfera de cactáceas da caatinga com habilidade de crescer em meio com reduzida atividade de água quanto a fixação assimbiótica de nitrogênio atmosférico e colonização de raízes de plântulas de alface e couve. Foram avaliados 42 isolados bacterianos oriundos de amostras coletadas ao longo da Caatinga Alagoana, nas cidades de Piranhas e Olho D'Água do Casado. Tubos de ensaio com 10 mL dos meio NFb e JMV foram inoculados em triplicata com 100 µL de inóculo bacteriano (10^8 UFC.mL⁻¹ (DO550=0,1)). Foram consideradas positivas aquelas que apresentaram uma película visível de crescimento abaixo da superfície do meio. Para observar a capacidade de colonização das bactérias as sementes desinfestadas de hortaliças (alface e couve) foram microbiolizadas e inoculadas em ágar-água 0,6% a avaliação foi realizada visualmente 15 dias após a semeadura. Nove isolados foram capazes de crescer em meio de cultura livre de N, enquanto que, todos os isolados colonizaram as raízes da plântulas.

Palavras-chave: tolerância ao estresse hídrico, promoção de crescimento, *Lactuca sativa*, *Brassica oleracea*

Cacti-associated bacteria from Caatinga: non-symbiotic nitrogen fixation and colonization of seedling roots

Abstract: The objective of this study was to verify the capacity of soil bacteria isolates and caatinga cactácea rhizosphere with the ability to grow in a medium with reduced water activity regarding the sobiotic fixation of atmospheric nitrogen and colonization of seedling roots of lettuce and cabbage. Forty-two bacterial isolates from samples collected along caatinga Alagoana were evaluated in the cities of Piranhas and Olho D'Água do Casado. Vials with 10 mL of the NFb and VMJ medium were inoculated in triplicate with 100 µL of bacterial inoculum (10^8 UFC.mL⁻¹ (DO550=0.1)). Those who presented a visible film of growth below the surface of the medium were considered positive. To observe the colonization capacity of bacteria, the seeds disinfested with vegetables (lettuce and cabbage) were microbiolyzed and inoculated in water agar 0.6% the evaluation was performed visually 15 days after sowing. Nine isolates were able to grow in n-free culture medium, while all isolates colonized the roots.

Keywords: water stress tolerance; plant growth promotion, *Lactuca sativa*, *Brassica oleracea*

INTRODUÇÃO

A água, solvente universal e imprescindível à manutenção da vida, é um bem comum e essencial para a manutenção do suprimento de alimento e ambiente produtivo de todos os organismos (PIMENTEL et al., 2004), entretanto, dentro de algumas décadas, devido às mudanças climáticas, o setor agrícola poderá sofrer consequências negativas. Em regiões áridas e semiáridas, a falta de água, juntamente com o aumento das áreas em processo de desertificação, reduz a produtividade agrícola.

Desse modo, a utilização de micro-organismos tolerantes à seca e que sejam capazes de proteger plantas e promover seu crescimento sob estresse hídrico, poderá ser uma alternativa a esse problema (KAVAMURA et al., 2013).

A interação entre plantas e bactérias promotoras de crescimento vegetal é bastante conhecida. As rizobactérias podem influenciar diretamente o metabolismo das plantas, fornecendo substâncias que normalmente estariam em menor quantidade, pela absorção de nutrientes ou ainda pelo biocontrole de patógenos. O crescimento das plantas é influenciado pela interação da parte aérea e raízes das mesmas com o ambiente rizosférico: solo ou substrato de plantio, que proporciona o suporte físico e fornece água e nutrientes para a planta (OLIVEIRA, 2004), interagindo com um complexo de microrganismos, destacando-se as rizobactérias, que são estimuladas pelos exudatos radiculares, colonizando o sistema radicular e promovendo o crescimento das plantas, tornando-as mais vigorosa, produtiva e saudável (OLIVEIRA, 2004).

O nitrogênio atmosférico, embora abundante, precisa ser transformado em formas disponíveis à absorção pelas plantas, como a amônia, por meio da fixação de nitrogênio por micro-organismos. A fixação pode ocorrer de dois jeitos, de modo simbiótico e assimbiótico (REED et al., 2011). A busca por micro-organismos capazes de realizar a fixação de nitrogênio de modo assimbiótico é interessante, tendo em vista a substituição dos fertilizantes químicos que podem ser facilmente lixiviados, aumentando a poluição aquática causada pela eutrofização (FRANCHE et al., 2009). Diante do exposto, objetivou-se isolar bactérias de solo e rizosfera de cactáceas da caatinga com habilidade de crescer sob estresse quanto a fixação assimbiótica de nitrogênio e colonização de raízes de couve e alface.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas coletas de solo e raízes de xerófitas (plantas que se adequaram e desenvolveram mecanismos ao longo de sua

evolução natural, que permitiram viver em ambientes secos e quentes), nas cidades de Piranhas e Olho D'Água do Casado, ambas localizadas no sertão do estado de Alagoas. Após a coleta, os mesmos foram armazenados em sacos de papel apropriados para a melhor conservação do material.

Para o isolamento de bactérias de solo e rizosfera, cerca de 1 g de solo foi transferido para Erlenmeyers contendo com 10 mL de tampão (0,8% NaCl; 0,02% KCl; 0,14% Na₂HPO₄; 0,024% KH₂PO₄). solução foi submetida a agitação por 1 hora. Após agitação, foram realizadas diluições seriadas de 10⁻² a 10⁻⁵ seguida de retirada de alíquotas de 100 L das diluições adequadas que foram semeadas em meio Tryptone Soya Agar (TSA) (10%), e o número de unidades formadoras de colônias estimadas. Para isolamento das bactérias do período de seca, após obtenção dos isolados em TSA (10%), estes foram semeados em meio com três concentrações diferentes de sorbitol (285 g.L⁻¹, 520 g.L⁻¹ e 780 g.L⁻¹) produzindo valores de Aw correspondentes a 0,957, 0,897 e 0,807, e incubados a 40°C. Para as bactérias do período chuvoso, foi adicionado 285 g.L⁻¹, produzindo valor de 0,963 Aw (28°C). O ensaio foi em delineamento experimental inteiramente casualizado em desenho fatorial com 3 repetições.

Os isolados bacterianos foram purificados pela técnica de estria composta, armazenados em meio TSA (10%) em frascos de penicilina inclinados e em tubos criogênicos de 2,0 mL contendo glicerol 50% em freezer.

Para fixação assimbiótica do nitrogênio tubos de ensaio com 10 mL dos meio Nfb e JMV foram inoculados em triplicata com 100 µL de inóculo bacteriano (10⁸ UFC.mL⁻¹ (DO550=0,1)). Sete dias após a incubação, os frascos que apresentaram uma película de crescimento característica de bactérias diazotróficas, foram estriados em placas de Petri com os respectivos meios Nfb e JMV sólidos. Após crescimento, as colônias foram transferidas novamente para novos meios para garantir o processo.

Para observar a capacidade de colonização das bactérias as sementes desinfestadas de hortaliças (alface, e couve) foram microbiolizadas e inoculadas em ágar-água 0,6% a avaliação foi realizada visualmente 15 dias após a semeadura, considerando-se a presença de colônia turva de aspecto esbranquiçado ao longo e em volta da raiz, demonstra a formação de colônia das bactérias. O ensaio foi em delineamento experimental inteiramente casualizado em desenho fatorial com 3 repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados bacterianos obtidos foram depositados coleção de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia Agrícola do Centro de Ciências Agrárias/UFAL, totalizando 42 bactérias. Obteve-se maior quantidade de bactérias de solo rizosférico, 59,52%, do que bactérias endofíticas, com 40,43% do total dos isolados. Cerca de 42,82% dos isolados foram oriundos do município de Olho d'Água do Casado, enquanto que, 57,15% das foram obtidas de amostras coletadas no município de Piranhas. Em relação crescimento em meio de cultura, obteve-se a maior quantidade de isolados no meio com concentração de Manitol de 285g/L, sendo esse, das três concentrações analisadas, o que possui maior atividade de água (Wa).

Silva et al. (2018) afirmam que o crescimento bacteriano em meio com reduzida atividade de água (Wa), é dependente de vários fatores como, por exemplo, as espécies estudadas, pH e fonte de carbono utilizada. Assim, o Manitol é mais eficiente no screening de bactérias com capacidade de crescimento quando submetidas a redução da atividade hídrica em meio de cultura (SILVA et al., 2018).

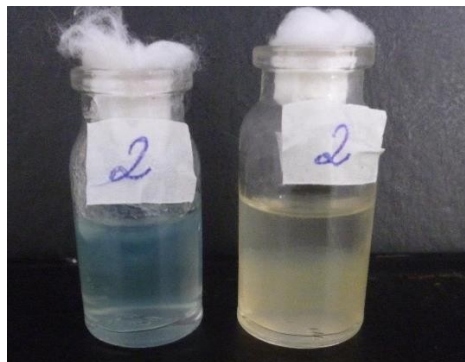
O nitrogênio é considerado um dos maiores limitantes ao crescimento vegetal. O nitrogênio atmosférico, embora abundante, precisa ser transformado em formas disponíveis à absorção pelas plantas, como a amônia, por meio da fixação de nitrogênio por micro-organismos. A fixação pode ocorrer de duas formas, de modo simbiótico e assimbiótico (REED et al., 2011). A busca por micro-organismos capazes de realizar a fixação de nitrogênio de modo assimbiótico é interessante, tendo em vista a substituição dos fertilizantes químicos que podem ser facilmente lixiviados, aumentando a poluição aquática causada pela eutrofização (FRANCHE et al., 2009).

O uso de meio livre de nitrogênio busca simular um ambiente que possibilita isolar espécies de bactérias que são potencialmente capazes de fixar nitrogênio atmosférico. Para que haja crescimento bacteriano neste meio, as bactérias necessitam de mecanismos específicos que garantam o suprimento de N, como a produção de enzima nitrogenase (DÖBEREINER et al., 1995).. A capacidade dos micro-organismos em crescerem em meio livre de nitrogênio é um método fácil de comprovar sua capacidade de fixar nitrogênio, verificou-se 21% dos isolados foram positivos para fixação no em meio NFb enquanto 35% no meio JMV.

Os isolados foram capazes de crescer por três cultivos consecutivos, necessários para eliminar a possibilidade dos mesmos estarem crescendo utilizando o residual de nitrogênio contidos em suas células, provenientes de cultivos anteriores.

Conforme descrito por Baldani et al. (2014), após as repicagens em meio sólido os isolados foram repicados para meios semissólidos

livres de nitrogênio. Esta etapa foi realizada como método de verificação da capacidade em fixar nitrogênio atmosférico, através da presença de uma película característica para organismo diazotróficos (Figura 1). O uso de meio semissólidos para a identificação de bactérias fixadoras de nitrogênio está correlacionado à sensibilidade do complexo enzimático nitrogenase, responsável pela redução do gás N₂ atmosférico, ao contato com oxigênio. Tendo em vista que o meio semissólido, é capaz de proporcionar tanto um ambiente aeróbico e anaeróbico, este meio, permite que as bactérias se desenvolvam no ambiente mais adequado às suas



exigências (BALDANI et al., 2014).

Figura 1. Crescimento bacteriano em meio de cultura NFb e JMV. Formação de película evidenciando a capacidade fixadora de N.

Todos os isolados foram capazes de colonizar as raízes de couve e alface (Figura 2). Sottero (2003) observou resultados semelhantes ao avaliar a capacidade de rizobactérias isoladas de diferentes culturas, na colonização das raízes de plântulas de alface. Sendo assim, é possível observar que dentre os isolados testados, existem diferentes preferências de colonização, ou seja, alguns isolados colonizaram preferencialmente a região do colo, e outros colonizaram tanto a região do colo como o sistema radicular.



Figura 2. Colonização de plântulas de alface por rizobactérias isoladas associadas com cactáceas do Semiárido Alagoano.

É importante salientar que a colonização das raízes e o estabelecimento do micro-organismo na rizosfera é fundamental para que possa ocorrer interação entre o mesmo e a planta. A colonização radicular por rizobactérias é capaz de beneficiar as plantas de diversas formas, principalmente, devido a ação direta no sítio de infecção de possíveis patógenos, especialmente pela íntima relação que esses micro-organismos possuem para com o sistema radicular das plantas (LUCON, 2008; SILVA et al., 2018).

CONCLUSÕES

As avaliações *in vitro* realizadas, apontam que os isolados bacterianos utilizados no presente estudo possuem potencial promissor como agentes de promoção de crescimento de plantas. O crescimento dos isolados em meio livre de nitrogênio, em condições microaerófilas sugere a ocorrência da capacidade de fixação biológica de nitrogênio

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo financiamento do projeto.

REFERÊNCIAS

BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; VIDEIRA, S. S.; BODDEY, L. H.; BALDANI, V. L. D. 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, p. 413-431, 2014.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, 1.1. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. - Brasília: EMBRAPA - SPI : Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 1995.

FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, v. 321, p. 35-59, 2009.

LUCON, C.M.M.; AKAMATSU, M.A.; HARAKAVA, R. Promoção de crescimento e controle de tombamento de plântulas de pepino por rizobactérias. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v.43, n.6, p.691-697, 2008.

KAVAMURA, V. N.; SANTOS, S. N.; DA SILVA, J. L.; PARMA, M. M.; ÁVILA, L. A.; VISCONTI, A.; DE MELO, I. S. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiological research*, v.168, p.183-191, 2013.

PIMENTEL, D.; BERGER, B.; FILIBERTO, D.; NEWTON, M.; WOLFE, B.; KARABINAKIS, E.; CLARK, S.; POON, E.; ABBETT, E.; NANDAGOPAL,

S. Water resources: Agricultural and Environmental Issues. *BioScience*, v. 54, p. 909-918, 2004.

REED, S.C.; CLEVELAND, C.C.; TOWNSEND, A.R. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, v. 42, p. 489-512, 2011.

SILVA, J. M.; SILVA, R. V. C.; OLIVEIRA, J. U. L.; SANTOS, T. M. C. Endophytic bacteria isolated from sugarcane: water deficiency tolerance and biofilm production. *Global Science and Technology*, v. 11, n. 1, p. 01-08, 2018.

SOTTERO, N.A. et al. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 30, p.225-234. 2006.