

RESUMO EXPANDIDO

RIZOBACTÉRIAS DO SEMIÁRIDO NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE MILHO (*Zea mays* L.)

CERQUEIRA, Wilza Fagundes¹; MORAIS, Jildemar Santos de¹; MIRANDA, Jean Santana²; MACÊDO, Erika Dantas de²; SANTOS, Adailson Feitoza de Jesus Santos³

¹Discentes do Curso Engenharia Agrônoma da Universidade do Estado da Bahia – UNEB – Campus XXII – Departamento de Ciências Humanas e Tecnologias – DCHT – R. Enock Canário de Araújo, s/n – Jeremias, CEP 48500-000.

²Discentes do Curso Engenharia Agrônoma da Universidade do Estado da Bahia – UNEB – Campus III - Departamento de Tecnologias e Ciências Sociais – DTCS - R. Edgar Chastinet, s/n - São Geraldo, CEP: 48905-680.

³Professor do Curso Engenharia de Biotecnologia e Biotecnologia da Universidade do Estado da Bahia – UNEB – Campus III – Departamento de Tecnologias e Ciências Sociais – DTCS - R. Edgar Chastinet, s/n - São Geraldo, CEP: 48905-680. adailsonmicrobiologia@gmail.com.

RESUMO: A atual busca pela redução da utilização de fertilizantes químicos tem levado ao estudo de alternativas que possam atender a esta demanda. A utilização de bactérias com potencial para produção de biofertilizantes tem sido estudada durante muito tempo e os resultados são concretos para algumas culturas e promissores para outras. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de rizobactérias associadas ao sisal na região semiárida inoculadas em plantas de milho. Foram escolhidos 5 isolados selecionados a partir de testes prévios para promoção de crescimento vegetal e tolerância a condições de seca in vitro. Foi preparada uma suspensão bacteriana na concentração de 10^9 UFC mL⁻¹, em seguida foram inoculadas em plantas de milho em vasos contendo solo e mantidas em condições de casa de vegetação. Após 45 dias de cultivo as plantas foram avaliadas quanto: comprimento da parte aérea e raiz, diâmetro do caule, massa fresca da parte aérea e raiz e massa seca da parte aérea e raiz. Os isolados *Leifsonia* sp. (S1.10), *Bacillus* sp. (S3.6), *Leifsonia* sp. (S1.5) e *Bacillus* sp. (S3.5), contribuíram no incremento da massa fresca e seca da parte aérea e diâmetro do caule. O isolado *Leifsonia* sp. (S1.5) apresentou também incremento para a massa seca da raiz. A interação entre micro-organismos e plantas tem evidenciado a importância estabelecida por essas associações nos processos adaptativos das plantas sob diferentes condições ambientais e tem revelado a importância dos estudos para seleção de bactérias com o objetivo de produção de bionoculantes.

Palavras – chaves: sisal, rizosfera. *Bacillus* sp., promoção de crescimento.

INTRODUÇÃO

A implantação de uma agricultura sustentável, que vise à preservação do meio ambiente e que favoreça a segurança alimentar no futuro, é um fator essencial para o desenvolvimento da humanidade ante as mudanças climáticas e redução das matrizes energéticas não renováveis. E diante das estimativas de crescimento da população mundial, alcançando nove bilhões de habitantes até 2050, existe um desafio desenvolver e estimular novos métodos que sejam eficientes para aumentar a

produção agrícola, sobretudo ao que se refere ao setor alimentício, sem que isso, no entanto, venha esgotar os recursos naturais (CARRER et al., 2010).

Quando considerada a cultura do milho, neste cenário, sua importância econômica pode ser caracterizada pelas mais variadas formas de sua utilização, que abrange desde a indústria de alta tecnologia até o uso do grão na alimentação animal (EMPRAPA, 2011). A importância desta gramínea ainda está atrelada ao aspecto social, uma vez que a produção, de grande parte dos produtores, alcança baixos rendimentos, os quais têm sido atribuídos à falta de aplicações tecnológicas, ao baixo grau de capitalização desses agricultores, além das condições climáticas adversas, fatores limitantes, uma vez que estes necessitam dessa produção como fonte de sobrevivência (EMPRAPA, 2011).

O milho é uma cultura altamente exigente em nutrientes e geralmente demanda grandes dosagens de adubos (SANTOS, 2012). Segundo a CTIA – MAPA (2014), o mercado brasileiro consumiu 32,2 milhões de toneladas de fertilizantes em 2014, sendo que o consumo de N, P, K atingiu 13.878 mil toneladas, caracterizando-os como os fertilizantes mais demandados pelas culturas, incluindo o milho. O elevado consumo de agroquímicos, seja ele na forma de fertilizante ou para o controle de pragas, vem sendo bastante questionado pelos impactos socioambientais que vem causando às populações ao longo dos anos (ANVISA, 2007). Além disto, o cultivo em áreas com reduzida índice pluviométrico e que não conta com técnicas de irrigação, também acabam limitando a produtividade da cultura, diferente de culturas adaptadas a tais condições.

Segundo Suinaga et al., (2006) por ser caracterizada como uma planta semi xerófila, o sisal (*Agave sisalana* Perrine) pode se desenvolver muito bem em regiões de clima tropical e subtropical, podendo tolerar estiagens prolongadas e também temperaturas elevadas. Pesquisas sobre a interação entre micro-organismos e plantas com características semelhantes ao sisal tem evidenciado a importância estabelecida por essas associações nos processos adaptativos das plantas às mais diferentes condições de estresses bióticos e abióticos (NETO et al., 2008).

Estes micro-organismos podem atuar através de mecânicos que afetam diretamente o metabolismo das plantas, seja pela fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de sideróforos, e a produção de fitohormônios tais como, o ácido indol acético, citocininas, giberelinas e etileno (SARAF et al., 2011; KAVAMURA, 2012). Podem ainda atuar através de mecanismos indiretos como antibiose, competição, redução de fitotoxidez por metais pesados e indução de resistência, garantindo o desenvolvimento do vegetal mesmo em condições desfavoráveis.

Desta forma as possibilidades de utilização de bioinoculantes são amplas, abrangendo a biofertilização, fitoestimulação e ainda o biocontrole, em diversas áreas da agricultura (PODILE & KISHORE, 2007; BURD et al., 2000; BLOEMBERG & LUGTEMBERG, 2001; LUCY et al., 2014).

De acordo com a FAO (2010), a previsão de crescimento para o setor agrícola até 2019 é de 40%. Diante disso, a biotecnologia ocupa papel fundamental na busca por alternativas que possam reduzir os impactos causados pela ação antrópica ao ambiente. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal utilizando como planta modelo o milho.

METODOLOGIA

1. Teste de Promoção de crescimento

1.1 Obtenção e caracterização dos isolados

Os isolados testados neste experimento foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, os quais compõem um banco de isolados bacterianos fixadores de nitrogênio e com atestada capacidade de promoção de crescimento *in vitro*. Nas tabelas 1 e 2 são apresentadas as características fisiológicas dos isolados testados. As características estão diretamente relacionadas com promoção de crescimento e tolerância a estresses abióticos.

Tabela 1: Características de promoção de crescimento, *in vitro*, por isolados bacterianos.

Isolados	AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	ARA	ACCDeaminase	(SF)	EPS
S5.1	0,97818 A	-	+	-	+
S1.10	0,29988 A	+	+	-	+
S3.6	0,94962 A	+	+	+	+
S1.5	4,49106 C	+	+	+	+
S3.5	0,83538 A	+	+	-	+

Ácido indol acético (AIA), Atividade de redução de acetileno (ARA), Solubilização de fosfato inorgânico (SF), Exopolissacarídeo (EPS). Letras iguais na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott–Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 2: Tolerância a estresse abiótico entre os isolados da coleção bacteriana obtida a partir das diferentes frações do sisal.

ISOLADOS	TEMP. (°C)				SALIN. (%NaCl)				D. HÍDRICO A_w			
	28	37	42	50	0	2,4	5,0	10	0,995	0,963	0,912	0,859
S5.1	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
S1.10	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
S3.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Resumos do II Simpósio de Agroecologia – Euclides da Cunha – BA – 27 a 29 de outubro de 2015

Cadernos Macambira, v.1, n.2, (2016) ISSN 2525-6580

Laboratório de Políticas Públicas, Ruralidades e Desenvolvimento Territorial – LaPPRuDes
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano.

S1.5	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
S3.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

1.2 Plantio das sementes

O experimento foi montado em condições de casa de vegetação no Departamento de Ciências Humanas e Tecnologias Campus XXII – UNEB. O solo foi coletado, seco, peneirado e distribuído em vasos com capacidade para 5 Kg. Foram semeadas cerca de 5 sementes de milho em cada vaso e mantidas regas diárias até a germinação. Após a germinação, foram mantidas apenas duas plantas em cada vaso, mantendo-se o máximo possível de homogeneidade na altura das plantas.

1.3 Preparo do Inoculo

Os isolados S5.1 (*Enterobacter sp.*), S1.10 e S1.5 (*Leifsonia sp.*), S3.6 e, S3.5 (*Bacillus sp.*) foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura TSA e incubados a $28 \pm 2^\circ \text{C}$ por 48 horas. Após o crescimento foram repicados em placas de Petri contendo o meio TSA e incubados nas mesmas condições descritas acima. Para preparo da suspensão bacteriana cerca de 10 mL de solução salina (0,85%) esterilizada foi distribuída em cada placa de Petri e feita a raspagem das colônias com auxílio de alça de Drigalsk. A suspensão bacteriana teve a densidade ótica (OD) ajustada para 0.5 (600 nm) em espectrofotômetro. Para estes isolados esta concentração equivale a aproximadamente 109 UFC.mL-1.

1.4 Inoculação

A inoculação foi realizada com 10 mL da suspensão bacteriana de cada um dos isolados logo após o desbaste das plantas. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação e a umidade do solo foi mantida com regas diárias. Para o tratamento controle, as plantas receberam apenas água destilada esterilizada no lugar do inóculo bacteriano. O experimento foi montando com 10 repetições em delineamento inteiramente casualizado e mantido em casa de vegetação durante 45 dias contados após a germinação.

1.5 Avaliação

Após os 45 dias o experimento foi desmontando e as avaliações foram feitas nas seguintes variáveis: comprimento da parte aérea e raiz, diâmetro do caule, massa fresca da parte aérea e raiz e massa seca da parte aérea e raiz. Para determinação da massa seca, as plantas foram mantidas em

estufa de circulação forçada de ar a 50° C até atingir massa seca constante. Foi realizado o teste de médias Scott-Knott a 5% de significância utilizando o software SISVAR (5.3).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação de promoção de crescimento em plantas de milho, foi possível observar que os isolados SI.10, S3.6, S1.5 e S3.5, contribuíram no incremento da massa fresca e seca da parte aérea e diâmetro do caule (Tabela 3). Como mencionado por (VESSEY, 2003), esse aumento na biomassa vegetal, pode ocorrer pela produção AIA, e conseqüentemente melhor acesso aos nutrientes do solo, uma vez que este hormônio, produzido pelos microrganismos avaliados podem estimular o desenvolvimento de raízes laterais e divisões apicais do meristema, conduzindo um maior crescimento radicular. Já para massa seca da raiz, apenas o isolado S1.10 conseguiu o incremento para essa variável (Tabela 3).

Tabela 3: Efeito do tratamento de plantas de milho inoculadas com bactérias promotoras de crescimento.

TRAT.	CPA	CR	DC	MFPA	MFR	MSPA	MSR
CONT.	65.0 a1	97.7 a1	0.63 a1	11.6 a1	14.4 a2	3.1 a1	2.9 a1
S5.1	62.1 a1	87.1 a1	0.60 a1	11.1 a1	14.5 a2	3.3 a1	2.8 a1
S1.10	63.8 a1	100.7 a1	0.73 a2	13.3 a2	14.8 a2	6.5 a3	5.3 a2
S3.6	73.8 a1	108.9 a1	0.68 a2	14.7 a2	14.9 a2	5.1 a2	2.5 a1
S1.5	71.5 a1	90.0 a1	0.67 a2	14.6 a2	10.7 a1	5.0 a2	1.9 a1
S3.5	71.8 a1	99.8 a1	0.70 a2	14.5 a2	11.0 a1	6.6 a3	3.6 a1

Comprimento da parte aérea (CPA), Comprimento da raiz (CR), Diâmetro do caule (DC), Massa fresca da parte aérea (MFPA), Massa fresca da raiz (MFR), Massa seca da parte aérea (MSPA), Massa seca da raiz (MSR). Letras iguais na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott–Knott a 5% de probabilidade.

O fato dos isolados testados terem incrementado a massa fresca e seca da parte aérea é um resultado muito satisfatório, uma vez que o aumento da biomassa vegetal pode ser muito vantajoso para um sistema agrícola onde os resíduos das culturas podem ser incorporados inclusive na dieta animal das propriedades. Além disto, uma maior área foliar, representar maior área fotossintética o que pode estar relacionado diretamente com a produção de biomassa e grãos.

Trabalhos recentes têm mostrado que isolados dos rizosféricos dos gêneros *Bacillus*, *Enterobacter* e *Leifsonia*, possuem potencial em promover o crescimento vegetal de plantas de milho (SANTOS et al., 2014). Estes dados reforçam os dados da literatura, pois mesmo em condições ambientais e cultivares distintos, os isolados provenientes da rizosfera do sisal foram capazes de incrementar a cultura do milho em algumas variáveis testadas.

As bactérias podem atuar estimulando o crescimento das plantas através da redução dos níveis de etileno por meio da enzima ACCDesaminase, assim sua atividade diminuiria a ação desse hormônio nas raízes de plantas hospedeiros resultando em seu crescimento, mesmo em condições estressantes (PRIGENT-COMBARET et al., 2008). Aliado a este mecanismo existe a ação de fitohormônio como auxinas em especial o ácido idol acético, o qual pode auxiliar no crescimento celular e consequente expansão dos tecidos radiculares. Apesar de todas as bactérias testadas produzirem este composto, não foi verificado diferença significativa para comprimento da parte aérea e raiz para nenhum dos isolados (Tabela 3).

Os exopolissacarídeos também podem contribuir na colonização e aderência das bactérias nas superfícies onde se acumulam os nutrientes, auxiliando na fixação destes e outros minerais próximos, além de proteger as membranas celulares contra o dessecamento e outros estresses ambientais (BARRETO et al., 2011; LIU et al., 2013).

O fósforo é limitante para o crescimento de plantas de milho, e visando emprego de biofertilizantes, tem sido proposto a inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal e tolerantes a seca. Algumas bactérias são capazes de solubilizar formas de P por meio da acidificação, quelação ou via enzimática (RICHARDSON et al. 2009; HAMEEDA et al. 2008), facilitando desta forma sua captação e absorção pelo sistema radicular das plantas.

Outro nutriente essencial é o nitrogênio, e embora sua concentração na atmosfera seja de aproximadamente 80%, as plantas não possuem a capacidade de absorvê-lo, caracterizando-o como um fator limitante para as culturas agrícolas (DÖBEREINER, 1997; DALLA SANTA et al., 2004). O fornecimento de N às plantas, nas formas absorvíveis, é realizado principalmente pela aplicação de fertilizantes químicos, obtidos industrialmente (DALLA SANTA et al., 2004). O fato dos isolados serem positivos para ARA é um forte indicativo para fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN), realizada por procariotos denominados diazotróficos (DALLA SANTA et al., 2004). Tais características e resultados encontrados para estes isolados sugere um indicativo do seu potencial emprego como inoculantes para culturas como o milho.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As estirpes bacterianas testadas apresentam potencial de crescimento in vivo;

- Apenas o isolado S5.1 (*Enterobacter sp.*) não apresentou potencial na promoção de crescimento vegetal de milho;
- O isolado S1.10 (*Leifsonia sp.*) obteve melhores resultados nos testes in vivo, sendo positivos para 4 das 7 variáveis analisadas;
- Novos testes devem ser conduzidos afim de explorar ao máximo o potencial destes isolados, inclusive com testes em condições de campo e com novas abordagens de inoculação.

REFERÊNCIAS

- ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). "Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. **Relatório de Atividades de 2001-2006.**"Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/rel_anual_2001-2006.pdf>.
- RICHARDSON, A. E.; BAREA, J.M.; MCNEILL, A.M. Prigent-Combaret Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant Soil**, **321 pp.** 305–339, 2009.
- HAMEEDA, B.; HARINI, G.; RUPELA, O.P.; WANI; S.P. Reddy Growth promotion of maize by phosphate solubilizing bacteria isolated from compost and microfauna. **Microbiol Res**, **163**, pp. 234–242, 2008.
- BARRETO, M. C. S; FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; SILVA, M. L. R. B.; LIMA, F. J. L. Produção e comportamento reológico de biopolímeros produzidos por rizóbios e caracterização genética. **Revista Brasileira Agrociência**, v.17, n.2-4, p.221-227, 2011.
- BLOEMBERG, G.V.; LUGTEMBER, B. J. J. Molecular basis of plant- growth promotion and biocontrol by *rhizobacteria*. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 343- 350, 2001.
- BURD, G. I.; DIXON, D. G.;GLICK, B.R. Plant growth- promoting bactéria that decrease heavy metal toxicity in plants. **Canadian Journal of Microbiology**, ottawa, v. 46, n. 3, p. 237- 245, 2000.
- CARRER, H.; BARBOSA, A. L.; RAMIRO, D. A. **Biotecnologia na agricultura**. Estud. av. vol. 24 no.70 São Paulo 2010.
- CTIA – MAPA. **Fertilizantes (Associação nacional para a difusão de adubos)**. ANDA. Brasília, 23 de Fevereiro de 2014.
- DALLA SANTA, O.R.; HERNÁNDEZ, R.F.; ALVAREZ, G.L.M.; RONZELLI JUNIOR, P. & SOCCOL, C.R. *Azospirillum* sp. inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, (2004) ,47:843-850 .
- DÖBEREINER, J. A importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** – Encarte especial, 1: 2-3,(1997),.
- EMBRAPA, **Produção de Milho na Agricultura Familiar**, Circular Técnica. Sete Lagoas, MG Setembro, 2011.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). **Perspectivas Agrícolas 2010-2019**. 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org>>.

- NETO, P.C.S.P.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L, Microrganismos endofíticos: interações com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 29, p 62-76, 2008.
- KAVAMURA, V. N.; SANTOS, S. N.; SILVA, J. L.; PARMA, M. M.; AVILA, L.A.; VISCONTI, A.; ZUCCHI, T. D.; TAKETANI, R. G.; ANDREOTE, F. D.; MELO, I. S. Screening of Brazilian Cacti Rhizobacteria for Plant Growth Promotion Under Drought. **Microbiological Research**, 2012.
- LIU, S.; CHEN, X.; HE, H.; ZHANG, X.; XIE, B.; YU, Y.; CHEN, B.; ZHOU, B.; ZHANG, Y. **Structure and ecological roles of a novel exopolysaccharide from the arctic sea ice bacterium pseudolateromonas sp.** Strain SM20310. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013.
- LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B.R. **Applications of free living plant growth- promoting rhizobacteria.** Antonie Van Leeuwenhoek, Wageningen, 2014.
- PODILE, A. R.; KISHORE, A. K. Plant Growth- Promoting Rhizobacteria. In: GNANAMANICKAM, S.S. (Ed.) **Plant- Associated Bacteria.** Netherlands: Springer-Verlag, 2007. Pt 2, p. 195- 230.
- PRIGENT-COMBARET, C.; BLAHA, D.; POTHIER, J. F.; VIAL, L.; POIRIER, M. A.; WISNIEWSKI, D. F.; MOËNNE, L. Y. **Physical organization and phylogenetic analysis of *acdR* as leucineresponsive regulator of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene *acdS* in phytobeneficial *Azospirillum lipoferum* 4B and other Proteobacteria.** FEMS Microbiology Ecology, 2008.
- SANTOS, A. F. J.; MARTINS, C. Y. S.; SANTOS, P. O.; CORRÊA, E. B.; BARBOSA, H. R.; SANDOVAL, A. P. S.; OLIVEIRA, L. M.; SOUZA, J. T.; SOARES, A. C. F. Diazotrophic bacteria associated with sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm): potential for plant growth promotion. **Plant and Soil**, 385:37-48, 2014.
- SANTOS, P. R. **Desempenho de genótipos de milho submetidos a dois tipos de adubação no município de Rio Largo Alagoas.** Rio Largo Estado de Alagoas 2012.
- SARAF, M.; RAJKUMAR, S.; SAHA, T. Perspectives of pgrp in Agri- Ecosystems. In: Maheshwari, D.K. K. (Ed.). **Bacteria in Agrobiolgy: Crop Systems.** Heidelberg: Springer-Verlag, 2011. Cap. 13, p. 361- 385. Setembro, 2011.
- SUINAGA, F. A; SILVA, O. R. R. F; COUTINHO, W. M. **Cultivo do sisal.** Campina Grande, PB: EMBRAPA Algodão, 2006. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Sisal/CultivodoSisal/index.html>>
- VESSEY, J. K. **Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers.** Plant and Soil, 2003.