

## Obtenção de bactérias produtoras de ácido indol-3-acético<sup>(1)</sup>

**Elaine Aparecida Mota<sup>(2)</sup>; João Frederico Mangrich dos Passos<sup>(3)</sup>; Silmar Primieri<sup>(4)</sup>; Bruno Dalazem Machado<sup>(4)</sup>; Luiza Pigozzi<sup>(2)</sup>; Evanise Chibilski<sup>(2)</sup>; Doreane Schweitzer<sup>(2)</sup>; Murilo Dalla Costa<sup>(3)</sup>; Marcos Roberto Dobler Stroschein<sup>(4)</sup>;**

### Resumo Expandido

<sup>(1)</sup> Trabalho executado com recursos do Edital n°12/2013, da Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação do Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC). <sup>(2)</sup> Estudante do curso técnico de Biotecnologia, Instituto Federal de Santa Catarina, campus Lages/SC. <sup>(3)</sup> Pesquisador da EPAGRI, Estação Experimental de Lages/SC. <sup>(4)</sup> Professor do Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC), campus Urupema/SC. E-mail: [marcos.stroschein@ifsc.edu.br](mailto:marcos.stroschein@ifsc.edu.br);

**RESUMO:** A cultura da aveia (*Avena* sp.) vem sendo amplamente utilizada com uma alternativa para cultivo de pastagens durante as estações frias no Sul do país. Entretanto, poucos trabalhos de bioprospecção de bactérias produtoras de ácido indol-acético em coleções de oficiais de rizóbios vem sendo realizados. Assim, o objetivo deste trabalho foi selecionar microrganismos produtores de ácido indol-3-acético (AIA). As bactérias foram inoculadas em meio Levedura Manitol (LM) enriquecido com triptofano, utilizando-se o método descrito por Asghar et al. (2002) modificado a 28°C por 72 horas. Após este período de crescimento, as culturas foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 min a 4°C e 150 µL do sobrenadante foi coletado e acondicionado em microplacas de poliestireno, onde em cada poço foi adicionado a 100 µL mL da solução de Salkowski. e armazenadas por 30 minutos em local escuro. Ao término deste período se realizou a leitura do AIA em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 593 nm. Os isolados bacterianos POA 127, POA 14, POA 12, EEL06284 e EEL 11499 apresentaram produção de AIA superior a 20,1µg. mL<sup>-1</sup> de AIA, sendo potenciais micro-organismos para testes em plantas.

**Palavra Chave:** Bactérias promotoras de crescimento vegetal; *Avena* sp.; auxinas.

### INTRODUÇÃO

Com a redução da oferta de alimento volumoso para os animais nas estações mais frias do ano, devido ao baixo desenvolvimento das pastagens no inverno, os produtores da região do Planalto Sul Catarinense fazem uso de pastagens cultivadas mais adaptadas para esta época do ano (BALBINOT JUNIOR *et al.* 2009).

No entanto, uma estratégia que vem sendo estudada para auxiliar a manutenção destas espécies durante este período de inverno é pelo aumento da eficiência no uso de fertilizantes em espécies forrageiras pelo uso de bactérias promotoras de crescimento.

As bactérias presentes na rizosfera são capazes de contribuir para o aumento da produtividade de algumas lavouras devido à colonização das raízes e estímulo ao crescimento das plantas. Esses micro-organismos são conhecidos como rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (Plant growth-promoting rhizobacteria - PGPR) (BISWAS *et al.*, 2000), ou como bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB) (BROCK *et al.*, 2013; TAPIAS *et al.*, 2012; LIU *et al.* 2011).

Diversos micro-organismos vêm sendo relatados como promotores de crescimento em plantas, que incluem os gêneros *Acetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Zoogloea*, os quais são exclusivamente micro-organismos não simbióticos (VARGAS *et al.*, 2009) e tem sido isolados dessas culturas e de outras espécies de gramíneas (MIRZA *et al.*, 2001; MASCIARELLI *et al.*, 2013).

Entretanto pesquisadores identificaram que os rizóbios também são capazes de promover o crescimento de plantas não-leguminosas, por meio de outros mecanismos, entre os quais se destaca a produção de fito-hormônios (STROSCHEIN *et al.*, 2011).

A síntese de auxinas, particularmente o ácido indol-acético (AIA), é um regulador do crescimento das raízes e caules através do alongamento celular, e o aumento do número de pelos radiculares, melhorando a absorção de água e nutrientes do solo, e conseqüentemente, a produção de auxinas também pode ser realizada por bactérias; que, quando em associação com as plantas, podem promover o crescimento vegetal (PEREIRA *et*

al.,2012). Desta forma, o objetivo do experimento foi selecionar microrganismos produtores de ácido indol-3-acético (AIA) da coleção de culturas da Epagri-Lages/SC.

## METODOLOGIA

Os micro-organismos utilizados neste trabalho foram oriundos da coleção de bactérias da Estação Experimental de Lages, EPAGRI – SC, os quais foram isolados de nódulos de leguminosas e de solo rizosférico coletados de diversas culturas vegetais como: *Acacia sp.*, *Adesmia sp.*, *Cicer sp.*, *Lens sp.*, *Lotus sp.*, *Lupinus sp.*, *Medicago sp.*, *Malus sp.*, *Vicia sp.* entre outras espécies. Desta coleção, foram testados quanto a produção de ácido indolacético 314 isolados bacterianos em meio de cultura levedura manitol sólido (LM).

Das culturas originais, fez-se um cultivo em batelada, os isolados que estavam em meio LM sólido foram inoculados para meio caldo LM (Figura 1). Os meios de cultura foram resfriados a temperatura ambiente e enriquecidos com triptofano, obtendo uma concentração final no meio de cultura de 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Depois destes procedimentos as bactérias foram inoculadas para os erlenmeyer em câmara de fluxo laminar.

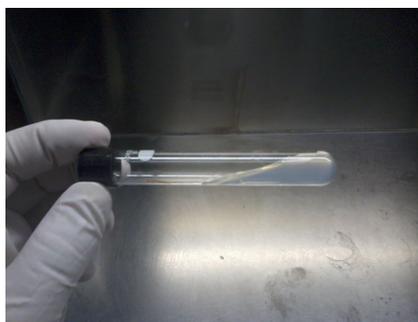


Figura 1 – Bactérias em meio sólido, na câmara de fluxo laminar.

Os caldos inoculados com as bactérias ficaram sob agitação constante a 120 rpm com temperatura de 28°C por 72 horas. Após este período de crescimento, as culturas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C.

Após este período, foram coletados 150  $\mu\text{L mL}^{-1}$  do sobrenadante, e colocadas em microplacas de 96 poços. Em seguida, colocou-se 100  $\mu\text{L mL}^{-1}$  da solução de Salkowski (1,2 g de  $\text{FeCl}_3$  + 42,1 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  + 57,89 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada). Para quantificação dos teores equivalentes de AIA, montou-se uma curva padrão com AIA sintético nas

seguintes concentrações: 0, 1, 5, 10, 20, 50, 100 e 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Deixou-se a microplaca no escuro por 30 minutos, tempo adequado para a reação de oxidação, e realizou-se a leitura do AIA (em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 593 nm). Os poços que produz uma cor rosada, cuja intensidade é proporcional à quantidade de AIA na amostra, como mostra na (Figura 2).

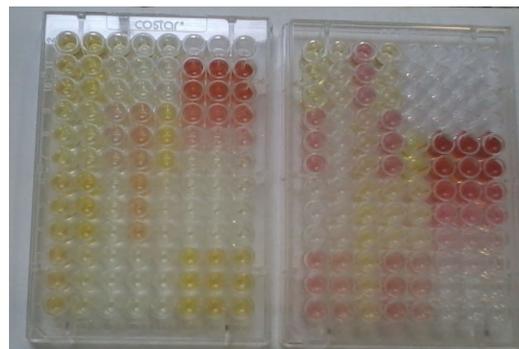


Figura 2 – Determinação de ácido indolacético pelo método de Asghar et al. (2002).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 314 isolados avaliados, ocorreu uma variação de 0 a 75  $\text{mg mL}^{-1}$  de AIA, sendo que 78,98% dos isolados bacterianos estudados produziram até 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de equivalentes ao AIA. Ademais, 19,42% dos isolados testados produziram quantidades equivalentes de AIA acima de 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  até 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 03).

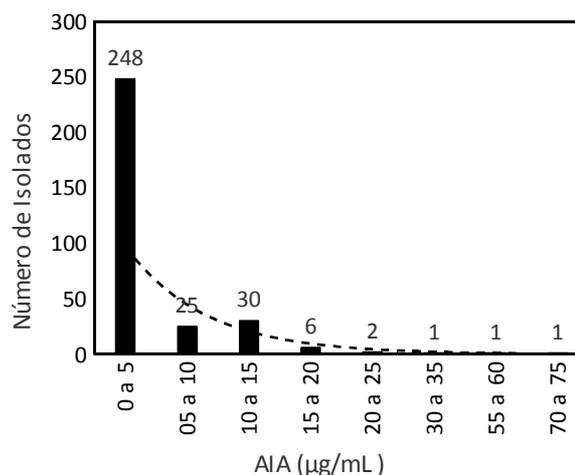
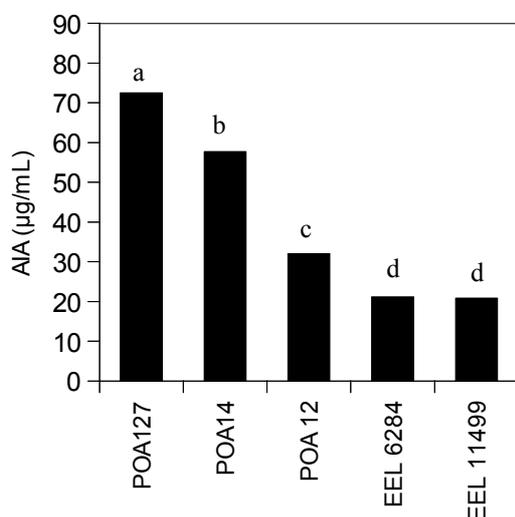


Figura 3 – Número de isolados produtores de equivalentes ao AIA.

O isolado POA 127 se destacou pela maior produção de ácido indolacético, apresentando

quantidades de  $72,49 \mu\text{g mL}^{-1}$ , seguido dos isolados, POA 14, POA 12, EEL 6284 e EEL 11499, que produziram respectivamente,  $57,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $32,24 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $21,24 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $20,85 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 4).



**Figura 4 – Produção de AIA por isolados bacterianos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.**

Os dados obtidos neste trabalho foram superiores aos encontrados por Costa et al.(2013), o qual avaliou 26 isolados bacterianos e apenas um produziu  $14,24 \text{ mg mL}^{-1}$  AIA, sendo o controle positivo e o restante produziram menos de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Ademais, estes isolados bacterianos tiveram crescimento de 72 horas e foram enriquecidos com  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de triptofano.

Estando, então, os dados obtidos como os isolados POA 127 e POA 14 de acordo com o encontrado em trabalho de pesquisa recente. No trabalho de Costa et al.(2013), as 26 estipes avaliadas, 5 não produziram AIA, apenas 1 isolado bacteriano produziu  $14,24 \text{ mg mL}^{-1}$  AIA, sendo o controle positivo (BR 11001), e o restante produziram menos de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , as stirpes tiveram crescimento de 72 horas e foram enriquecidos com  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de triptofano.

De acordo com Patil et al. (2011), vários fatores, como concentração de triptofano, pH e fontes de nutrientes, podem interferir tanto na capacidade de síntese, como na quantidade de AIA produzido em meio de cultura. Assim, é importante a utilização de meios de cultura com diferentes composições para se obter informações mais concretas sobre a capacidade de síntese do AIA. Porém, não existe uma faixa de concentração benéfica ou tóxica

comum a todas as espécies vegetais. Desta forma, as concentrações de AIA sintetizadas foram bastante variáveis entre as estirpes avaliadas, o que pode beneficiar culturas com diferentes exigências.

## CONCLUSÕES

Os isolados bacterianos POA 127, POA 14, POA 12, EEL06284 e EEL 11499 apresentaram produção de AIA superior a  $20,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AIA, sendo potenciais micro-organismos para testes em plantas.

Como perspectivas futuras serão elaborados dois experimentos, um sob condições controladas e posteriori a campo, para medir a eficiência dos melhores inóculos bacterianos selecionados, para futura indicação de recomendação de uso de inoculantes para sementes de *Avena sativa* e *A. strigosa*.

## REFERÊNCIAS

ASGHAR, H.N. et al. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.35, n.4, p.231-237, 2002.

BALBINOT JUNIOR, A.A.; VEIGA, A.M.M.; DIECKOW, A.P.J. Integração lavoura-pecuária: intensificação de uso de áreas agrícolas. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.6, p.1925-1933, set, 2009.

BISWAS, J. et al. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, Madison, v.92, n.5, p.880-886, 2000.

BROCK, A. K.; BERGER, B.; MEWIS, I. and RUPPEL, S. 2013. Impact of the PGPB *Enterobacter radicincitans* DSM 16656 on growth, glucosinolate profile, and immune responses of *Arabidopsis thaliana*. **Microbial Ecology**, 65: 661-670. DOI:10.1007/s00248-012-0146-3.

COSTA, Elaine Martins da et al. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 48, n. 9, Sept 2013.

LIU, Y.; WANG, H.; SUN, X.; YANG, H.; WANG, Y. and SONG, W. 2011. Study on mechanisms of colonization of nitrogen-fixing PGPB, *Klebsiella pneumoniae* NG14 on the root surface of rice and



the formation of biofilm. **Current Microbiology**, 62: 1113-1122. DOI: 10.1007/s00284-010-9835-7.

MASCIARELLI, O.; URBANI, L.; REINOSO, H. and LUNA, V. 2013. Alternative mechanism for the evaluation of Indole-3-Acetic Acid (IAA) production by *Azospirillum brasilense* strains and its effects on the germination and growth of maize seedlings. **Journal of Microbiology**, 51: 590-597. DOI: 10.1007/s12275-013-3136-3.

MIRZA, M. S.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P. and MALIK, K. A. 2001. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. **Plant and Soil**, 237: 47-54. DOI: 10.1023/A:1013388619231.

PATIL, N.B.; GAJBHIYE, M.; AHIWALE, S.S.; GUNJAL, A.B.; KAPADNIS, B.P. Optimization of indole 3-acetic acid (IAA) production by *Acetobacter diazotrophicus*L1 isolated from sugarcane. **International Journal of Environmental Sciences**, v.2, p.295-302, 2011.

PEREIRA et al. Influencia da salinidade sobre o crescimento e a produção de ácido indol acético de *Burkholderia spp.* Endofíticas de cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, Supplement 1, p. 112-121, Mar. 2012..

STROSCHEIN, et al. Caracterização e influência de rizóbios isolados de alfafa na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de arroz. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.10, p.1738-1743, out, 2011.

TAPIAS, D. R.-; GALVÁN, A. M.-; DÍAZ, S. P.-; OBANDO, M.; RIVERA, D. and BONILLA, R. 2012. Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). **Applied Soil Ecology**, 61: 264-272. DOI: 10.1016/j.apsoil.2012.01.006.

VARGAS, L.K. et al. Occurrence of plant growth-promoting traits in clover-nodulating rhizobia strains isolated from different soils in Rio Grande do Sul state. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Piracicaba, v.33, n.5, p.1227-1235, 2009.