



## Isolamento e caracterização de *Azospirillum* sp. indutor de crescimento vegetal no alho (*Allium sativum*)

**Mariane da Rosa Leoncio<sup>(1)</sup>; Glória Regina Botelho<sup>(2)</sup>; Marcielly Fleck Turatto<sup>(3)</sup>; Cláudio Roberto F. S. Soares<sup>(4)</sup>; Rafael Dutra de Armas<sup>(5)</sup>; Paulo Emílio Lovato<sup>(6)</sup>**

<sup>(1)</sup> Estudante na Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos SC; [mariane.rosa.leoncio@gmail.com](mailto:mariane.rosa.leoncio@gmail.com); <sup>(2)</sup> Professora na Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos SC; [gloria.botelho@ufsc.br](mailto:gloria.botelho@ufsc.br); <sup>(3)</sup> Estudante na Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos SC; [marcituratto@gmail.com](mailto:marcituratto@gmail.com); <sup>(4)</sup> Professor na Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis SC; [crfsoares@gmail.com](mailto:crfsoares@gmail.com); <sup>(5)</sup> Bolsista PDJ CNPq na Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis SC; [rafael.armas@ufsc.br](mailto:rafael.armas@ufsc.br); <sup>(6)</sup> Professor na Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis SC; [paulo.lovato@ufsc.br](mailto:paulo.lovato@ufsc.br).

**RESUMO:** - O alho possui grande importância econômica e social em Santa Catarina. O uso de fertilizantes químicos incrementa o custo de produção e pode causar danos ambientais. As Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCP) podem ser alternativas ao uso de insumos. Dentre as RPCP, o gênero *Azospirillum* tem demonstrado benefícios para o crescimento de várias espécies vegetais. Neste contexto, objetivou-se caracterizar, bioquímica, fenotípica e morfológicamente, isolados de *Azospirillum* obtidos da rizosfera de alho cultivados em casa-de-vegetação. Foram obtidos 27 isolados de *Azospirillum*. Os testes bioquímicos utilizados foram Vermelho de Metila (VM), fermentação de glicose e sacarose, produção de catalase e hidrólise da ureia. O potencial de indução do crescimento vegetal foi avaliado mediante avaliação da capacidade de produção de AIA (Ácido Indol-Acético) e de solubilização de fosfatos de cálcio *in vitro*. Os resultados obtidos por provas bioquímicas indicaram que a maior parte dos isolados de *Azospirillum* apresentou características semelhantes às do gênero. As características de morfologia de colônia observadas para *Azospirillum* mostraram similaridade aos padrões. Todos os isolados foram identificados como *A. amazonense* quando crescidos em meio NFB semi-sólido, tendo glicose como única fonte de carbono. Verificou-se que 81,5% e 66,6% dos isolados de *Azospirillum* apresentaram produção de AIA e capacidade solubilizadora de fosfato, respectivamente. A partir desses resultados e considerando a procedência dos isolados de *Azospirillum*, pode-se afirmar que estes microrganismos, apresentam potencial para a promoção do crescimento dessa cultura.

**Termos de indexação:** *Liliacea*, diazotróficas, rizobactérias.

### INTRODUÇÃO

O alho é a quarta hortaliça de maior relevância econômica do Brasil, sendo a mais importante socialmente, devido ao seu cultivo ser feito basicamente por pequenos produtores (Leonêz, 2008). No estado de Santa Catarina, a cultura foi inicialmente introduzida na região do planalto Catarinense, pois havia condições satisfatórias para seu desenvolvimento, como a quebra da dormência. Por vários anos, essa região foi considerada a capital do alho (Lucini, 2008). Entretanto, fatores econômicos e fitossanitários levaram à diminuição da produção. Atualmente, busca-se incrementá-la através de alternativas que promovam a diminuição de seus custos, como por exemplo, redução de insumos, especialmente de adubos nitrogenados.

As bactérias denominadas Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCP) beneficiam o crescimento de espécies vegetais e vivem na rizosfera. Estas podem atuar na promoção do crescimento de forma direta ou indireta. Dentre as RPCP, uma das mais estudadas é o gênero *Azospirillum* (Novakowski, 2011).

O gênero *Azospirillum* pode influenciar o desenvolvimento de plantas por efeito direto, como aumento da solubilização e entrada de nutrientes ou por produção de reguladores de crescimento vegetal. Estas bactérias também podem suprimir fitopatógenos, por mecanismos semelhantes aos das *Pseudomonas* do grupo fluorescente, também comuns em rizosfera de diversas plantas (Loper; Buyer, 1991; Voisard et al., 1994), como produção de sideróforos e antibióticos (Loper; Buyer, 1991; Voisard et al., 1994).

Na cultura do alho existem poucos estudos sobre associação com rizobactérias benéficas. Por este motivo, objetivou-se isolar e caracterizar o gênero *Azospirillum* para avaliar o seu potencial de eficiência na promoção do crescimento do alho *in vitro*.



## MATERIAL E MÉTODOS

Foi coletado solo da fazenda Dias, na localidade da Horizolândia, no município de Curitiba-SC. Com o solo do tipo Cambissolo associado à Nitossolo Bruno (Embrapa, 1998) e a coleta de solo realizada seguindo os procedimentos descritos pela Comissão de Química e Fertilidade de Solo (2004). Este foi utilizado para o plantio de bulbilhos de alho, em dois vasos de 5L, em casa-de-vegetação, sendo semeados quatro bulbilhos por vaso, irrigados quatro vezes por semana, com 50mL de água por vaso.

### Isolamento de *Azospirillum*

Para o isolamento foram separadas amostras de solo e raízes. Para iniciar o procedimento com solo, este foi homogeneizado e pesada uma amostra de 10g. Essa foi transferida para 90mL de solução salina 0,9% e agitada por 30 min a 150 rpm.

Para o isolamento de *Azospirillum*, após a diluição seriada, retirou-se 0,1 mL das diluições de  $10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$  que foram transferidos para frascos de penicilina contendo cinco ml de meio NFB semi-sólido (Döbereiner et al., 1995). Para cada diluição foram utilizados três frascos que foram incubados a 28°C por sete dias. Após este período, foi observado o desenvolvimento de película na região superficial do meio. Em seguida, as colônias foram purificadas.

Para isolamento deste gênero também se utilizou a raiz, da qual foram coletados 10 g, que foram desinfetados com hipoclorito de sódio 1% por 10 min, depois lavadas três vezes com água destilada estéril. As amostras foram maceradas, em cadinho e transferidas para frasco contendo 90mL de solução salina 0,9%, seguindo o mesmo tempo e rotação descritos anteriormente. Em seguida, processou-se a diluição seriada e de cada tubo, retirou-se 0,1 mL da suspensão, segundo Döbereiner et al. (1995). Para cada diluição foram utilizados três frascos, incubados a 28°C por sete dias. Apenas ocorreu desenvolvimento nos frascos com suspensão proveniente da maceração das raízes. Em seguida, as 27 colônias que desenvolveram película foram purificadas e estocadas a -20°C em criotubos contendo glicerol 40%.

### Caracterização morfológica e fenotípicas dos isolados e potencial de promoção de crescimento.

A caracterização morfológica foi realizada a partir do crescimento das colônias em meio Luria Bertani (LB) em BOD a 30°C. As características observadas foram: tempo de desenvolvimento das colônias (muito rápido: um dia; rápido: 2 a 3 dias; intermediário: 4 a 5 dias; lento: 6 a 9 dias; muito

lento: superior a 10 dias), diâmetro, borda, forma, elevação e transparência das colônias.

Segundo Holt et al (1994), algumas espécies do gênero *Azospirillum*, desenvolvem-se em diferentes fontes de carbono. *A. amazonense* é descrito como a única espécie capaz de metabolizar glicose e sacarose.

Os testes bioquímicos realizados para os isolados de *Azospirillum* foram fermentação de glicose e de sacarose e vermelho de metila. As bactérias foram crescidas em meio LB líquido durante 24 horas a 30°C. Transferiu-se uma alíquota para os tubos contendo meios específicos para cada teste, em três repetições. Estes foram incubados a 30 °C durante 48 horas.

Para os testes de potencial de indução de crescimento de plantas, determinou-se a análise de solubilização de fosfato. Foi utilizado meio contendo fosfato de cálcio tribásico (10g/L glicose; 5g/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 1 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 4 g/L de  $\text{CaHPO}_4$ ; 15 g/L de Agar; pH6,5). Os isolados foram previamente crescidos em meio LB líquido a 30°C por 24 horas. Em seguida, foi transferido 0,1 mL da suspensão bacteriana para placas contendo meio LB líquido, estabelecendo-se quatro isolados por placa, dispostos em pontos equidistantes. A avaliação foi conduzida com cinco repetições. Após incubação a 30 °C durante sete dias avaliou-se a capacidade solubilizadora de fosfato, mediante presença de halo incolor ao redor das colônias.

A produção de AIA foi avaliada empregando-se método colorimétrico descrito por Bric et al. (1991), com modificações. Para isso cada isolado foi inoculado em tubos de ensaio contendo 2mL do meio de cultivo (LB). Os tubos foram incubados por 24h a 30°C. Após esse período foram agitados a 150 rpm, por um período de cinco minutos. Em seguida, acrescentou-se em cada tubo, solução de Salkowski (Cattelan, 1999), sendo incubados a temperatura ambiente, no escuro, por 2 horas. Verificou-se a mudança da coloração da colônia, que quando positivo, tornava-se rósea.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado que dos 27 isolados obtidos, 23 (81%) apresentaram diâmetro menor ou igual a 1 mm, 1 (3,7%) com 2mm, 2 (7,4%) com 3 mm e 1 (3,7%) com 4 mm. Com bordo liso foram 23 (81%) e 4 (19%) ondulado. Forma das colônias 25 (92,6%) apresentou-se circular e 2 (7,4%) rizoidal. Na análise de elevação, 15 (55,5%) foram convexa e 12 (44,5%) plana. Na coloração das colônias, 15 (55,5%) foram branco opaco e 44,5% branco translúcido. Como descrito em Cardoso (2008), as características morfológicas se enquadram com as do gênero *Azospirillum*.

Todos os isolados apresentaram-se Gram-



negativos. Para o teste de fermentação de glicose e da sacarose obteve-se 21 (78%) e 26 (97%) dos isolados positivos, respectivamente, indicando que o perfil de utilização de C dos isolados testados, é semelhante ao do gênero de interesse (Silva, 2010; Hauer, 2012). A espécie *Azospirillum* amazonense é descrita como capaz de fermentar glicose e sacarose (Holt et al., 1994), indicando que o perfil de utilização de C dos isolados testados, é semelhante ao da espécie, ao utilizar a glicose, no meio de cultura NFB-semi-sólido. Para o teste de vermelho de metila, que verifica a capacidade de produção de diversos ácidos orgânicos, a partir da fermentação da glicose, todos os isolados obtiveram reação positiva, indicando a liberação de acetoina como principal produto final (Ribeiro, 2011). Ainda não há registro sobre esse teste para *Azospirillum*, na literatura.

Segundo Eckert *et al.* (2001), *Azospirillum* são positivos para teste de urease, comprovando a semelhança entre os isolados e o gênero, pois todos foram positivos.

Todos os isolados obtidos encontram-se em fase de caracterização genética por BOX-PCR, visando a comparação com espécies de *Azospirillum* já descritas na literatura.

As análises de potencial de indução de crescimento vegetal indicaram que dois terços dos isolados foram capazes de solubilizar o fosfato (tabela 1). Este resultado sugere como um mecanismo de indução ao desenvolvimento de plantas.

Como demonstrado na tabela 1, o teste de AIA indicou que 22 (81,5%) dos isolados foram positivos. Kuss (2007) descreve que *Azospirillum*, auxilia as plantas não apenas com a fixação de N<sub>2</sub>, mas também por outros mecanismos, entre eles a produção deste fitohormônio que beneficia o crescimento radicular das plantas, com consequente favorecimento na absorção de água e nutrientes (Bonilla, 2011).

Considerando a procedência dos isolados de *Azospirillum* e a produção de substâncias promotoras do crescimento vegetal, aqui descritos, pode-se afirmar que essas bactérias apresentam potencial de favorecer o crescimento do alho. Desta forma, os efeitos da inoculação controlada nesta cultura precisam ser investigados.

## Figuras e Tabelas

Tabela 1- Testes *in vitro*, para potencial de indução de crescimento de plantas.

| Isolado | Solubilização de |     |
|---------|------------------|-----|
|         | fosfato          | AIA |
| 5E22    | +                | +   |
| 5E31    | +                | -   |
| 3E32    | +                | +   |

|       |   |   |
|-------|---|---|
| 4E12  | + | + |
| 4E22  | + | + |
| 3E13  | + | - |
| 4E21  | - | + |
| 3E14  | + | + |
| 4E23  | - | + |
| 4E13  | + | + |
| 4E212 | - | - |
| 4E32  | - | + |
| 5E32  | + | + |
| 3E31  | + | + |
| 5E21  | - | - |
| 5E34  | + | + |
| 3E21  | + | + |
| 3E11  | - | + |
| 5E331 | + | + |
| 4E33  | - | + |
| 5E23  | - | + |
| 4E211 | + | + |
| 3E13  | + | + |
| 5E332 | + | + |
| 4E11  | + | + |
| 4E332 | + | + |
| 4E333 | + | + |

Positivo (+), negativo (-)

## CONCLUSÕES

Os isolados apresentaram características fenotípicas semelhantes àquelas do gênero *Azospirillum*, com características que indicam pertencer à espécie *A. amazonense*. Os isolados apresentaram potencial de indução de crescimento de planta *in vitro*, visto que dois terços deles tem capacidade de solubilização de fosfatos, e 82% produzem Ácido indol-Acético (AIA).

## AGRADECIMENTOS

À pesquisadora Verônica Massenas Reis da Embrapa Agrobiologia pelo treinamento da autora. À CooperAlho, Cultivar Distribuidora de Insumos Agrícolas Ltda e Cocom pela cessão de sementes, insumos e solo. Aos técnicos e amigos de laboratório da UFSC, pelas ajudas diárias.

## REFERÊNCIAS

### a. Periódicos:

CATTELAN, A. J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa soja, 1999. 36p. (Embrapa soja. Documentos 139).

### b. Livro:

BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S.E. **Rapid**



**in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane.** *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.57, p.535-538, 1991.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - CQFSRS/SC. Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. 10.ed. Porto Alegre, SBCS - Núcleo Regional Sul/UFRGS, 2004. 400p.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L.; BALDANI, J. I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Seropédica: Embrapa Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia, 1995. 60 p.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas.** Seropédica: Embrapa Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia, 1995. 60 p.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology. 9. ed.** Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

LOPER, J. E., BUYER, J. S. **Siderophores in microbial interactions on plant surfaces.** *Molecular plant-microbe interaction*, St Paul, v. 4, p. 5-13, 1991.

RIBEIRO, M. C. STELATO, M. M.; **Microbiologia prática: aplicações de aprendizagem de microbiologia básica-bactérias, fungos e vírus.** 2º edição. São Paulo; Editora Atheneu, 2011. 224 p.

VOISARD, C. et al. **Biocontrol of root disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: current concepts and experimental approaches.** In: O'GARA, F., DOWLING, D. N., BOESTEN, B. (eds). **Molecular ecology of rhizosphere microorganisms.** Germany: VCH, 1994. p. 67-89.

#### c. Internet:

BONILLA, German Andres Estrada. **Seleção de Bactérias Diazotróficas Solubilizadoras de Fósforo e seu Efeito no Desenvolvimento de Plantas de Arroz.** 2011. Disponível em: <<http://cursos.ufrj.br/posgraduacao/ppgf/files/2013/08/Dissertação-PPGF-German-Andrés-Estrada-Bonilla.pdf>>. Acesso em: 05 maio 2015.

CARDOSO, Isabel Cristina Mendonça. OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO GÊNERO *Azospirillum* NA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO EM SANTA CATARINA. 2008. Disponível em: <[http://rca.cav.udesc.br/rca\\_2010\\_2/7Cardoso.pdf](http://rca.cav.udesc.br/rca_2010_2/7Cardoso.pdf)>. Acesso em: 02 abr. 2015.

ECKERT, B. et al. ***Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*.** 2001. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 17-26. Disponível em:

<<http://ijs.sgmjournals.org/content/51/1/17.full.pdf>>. Acesso em: 12 ago. 2014.

EMBRAPA. Levantamento de reconhecimento dos solos de Santa Catarina. Rio de Janeiro: Embrapa - CNPS, 1998. Disponível em: <<http://home.furb.br/tfenilli/materiais/solos/descricao.pdf>>. Acesso em 07 mai. 2015.

HAUER, V. Universidade federal do paraná departamento de genética vanessa hauer sequenciamento do gene gln A da S estirpe S mutantes hm14, hm26, hm 0 53 e hm210 de *Azospirillum* brasileiro. 2012. Disponível em: <[http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/30659/Monografia\\_Vanessa\\_Hauer.pdf?sequence=1](http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/30659/Monografia_Vanessa_Hauer.pdf?sequence=1)>. Acesso em: 10 abr. 2015.

KUSS, A. V. et al. **Fixao de nitrogênio e produo de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas: Nitrogen fixation and in vitro production of indolacetic acid by endophytic diazotrophic bacteria.** 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-204X2007001000013](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2007001000013)>. Acesso em: 10 abr. 2015.

LEONS, Ana Claudia. **Alho: Alimento e Saúde.** 2008. Disponível em: <[http://bdm.unb.br/bitstream/10483/327/1/2008\\_AnaClaudiaLeonez.pdf](http://bdm.unb.br/bitstream/10483/327/1/2008_AnaClaudiaLeonez.pdf)>. Acesso em: 27 set. 2014.

NOVAKOWISKI, Jaqueline Huzar et al. **Efeito residual da adubao nitrogenada e inoculao de *Azospirillum* brasileiro na cultura do milho.** 2011. V. 32, n. 4. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/4400>>. Acesso em: 30 abr. 2014.

LUCINI, M. A. O alho no Brasil: um pouco da história dos números do nobre roxo. Curitiba: EPAGRI, 2008.

SILVA, M. F. **Isolamento e Caracterizao Bioquímica e Molecular de Bactérias do Gnero *Azospirillum* de Raízes de Plantas de Milho (*Zea mays*).** 2010. Disponível em: <[http://www.prp.ueg.br/sic2010/apresentacao/trabalhos/pdf/biologicas/seminario/caracterizacao\\_bioquimica.pdf](http://www.prp.ueg.br/sic2010/apresentacao/trabalhos/pdf/biologicas/seminario/caracterizacao_bioquimica.pdf)>. Acesso em: 30 ago. 2014.