

## Identificação de bactérias diazotróficas produtoras de indol isoladas de raízes e folhas de *Cymbidium* sp.<sup>(1)</sup>.

**Lílian Estrela Borges Baldotto<sup>(2)</sup>; Juliana Barroca de Barros<sup>(3)</sup>; Marihus Altoé Baldotto<sup>(4)</sup>; Hermínia Emília Prieto Martinez<sup>(5)</sup>; Wagner Campos Otoni<sup>(5)</sup>; Víctor Hugo Alvarez V.<sup>(5)</sup>.**

<sup>(1)</sup> Trabalho executado com recursos do CNPq, da FAPEMIG e da FUNARBE.

<sup>(2)</sup> Professora, Universidade Federal de Viçosa, *Campus* Florestal, Rodovia LMG 818, Km 06, CEP 35690-000, Florestal, MG, [lilian.estrela@ufv.br](mailto:lilian.estrela@ufv.br); <sup>(3)</sup> Estudante, Universidade Federal de Viçosa, *Campus* Florestal, bolsista BIC-Júnior; <sup>(4)</sup> Professor, Universidade Federal de Viçosa, *Campus* Florestal; <sup>(5)</sup> Professores, Universidade Federal de Viçosa, *Campus* Viçosa.

**RESUMO:** Bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico habitam naturalmente o interior e a superfície das plantas. Essas bactérias também podem possuir a capacidade de sintetizar auxinas, hormônios que atuam no crescimento e desenvolvimento das plantas. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade *in vitro* de bactérias diazotróficas, isoladas de raízes e folhas de orquídea do gênero *Cymbidium*, em sintetizar indol, substância precursora das auxinas. Bactérias diazotróficas foram isoladas previamente de raízes e folhas de *Cymbidium* sp. nos meios de cultivo JMV, JMVL, NFB, JNFB, LGI e LGI-P. Posteriormente, foi avaliada a capacidade desses isolados em sintetizar indol em ensaio qualitativo *in vitro*. As bactérias foram crescidas em meio líquido DYGS por 24 h, a temperatura de 30 °C e agitação de 120 rpm. Em seguida, 10 µL da cultura bacteriana foram transferidos para placas contendo 1/10 do meio TSA. Após a transferência, o meio foi coberto com membrana de nitrocelulose e incubado a 28°C por 24h. Em seguida, a membrana foi transferida para outra placa e saturada com a solução de Salkowski e incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. A formação de halo avermelhado na membrana indicou a presença de indol sintetizado pelas bactérias. Foram realizadas três repetições para cada estirpe bacteriana. Dos 17 isolados avaliados 4 apresentaram a capacidade de sintetizar indol. Os resultados indicam que essas bactérias além de fixarem o nitrogênio atmosférico, também sintetizam fitohormônio da classe das auxinas, tendo potencial para uso na formulação de inoculantes e ou biofertilizantes.

**Termos de indexação:** auxinas, fixação biológica de nitrogênio, inoculantes.

### INTRODUÇÃO

Diversos trabalhos têm demonstrado que as bactérias epifíticas, que habitam a superfície vegetal (Baldotto & Olivares, 2008), e as bactérias endofíticas, que habitam o interior dos tecidos

vegetais (Halmann et al., 1997), podem promover o crescimento da planta hospedeira.

Os primeiros relatos da associação entre orquídeas com bactérias endofíticas e epifíticas foram realizados por cientistas australianos que isolaram bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Xanthomonas*, *Arthrobacter* e *Kurthia* com potencial de síntese de fitohormônio da classe das auxinas (Wilkinson et al., 1989; Wilkinson et al., 1994).

Posteriormente, Tsavleikova et al. (2001; 2002; 2004) isolaram das orquídeas *Acampe papillosa* e *Dendrobium moschatum* bactérias dos gêneros *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Flavobacterium*, *Gluconobacter*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*.

Atualmente, já foram também relatadas a ocorrência de bactérias endofíticas e epifíticas em orquídeas das espécies *Laelia purpurata*, *Oncidium varicosum*, *Miltonia flavecens*, *Vanda tricolor*, *Laelia flava brasil*, *Dendrobium fimbriatum*, *Epidendrum* sp., *Dendrobium nobilis* e *Coelogyne lawrenceana* (Lange e Moreira, 2002).

A inoculação de bactérias diazotróficas em plântulas semeadas *in vitro* poderia ser uma estratégia viável na aclimatização das mudas de orquídeas, pois poderia reduzir os custos de produção com base na maior eficiência de crescimento e nutricional (Baldotto et al., 2009). Para desenvolver esses inoculantes são necessários estudos prévios de isolamento, caracterização, seleção e testes de eficiência.

Além da fixação biológica de nitrogênio atmosférico, essas bactérias também podem possuir a capacidade de sintetizarem auxinas, fitohormônios que atuam no crescimento das plantas. Uma maneira indireta de verificar essa habilidade é a identificação de estirpes que sintetizam indol, substância precursora das auxinas, em ensaios colorimétricos *in vitro* (Bric et al., 1991).

O trabalho teve como objetivo caracterizar as estirpes bacterianas diazotróficas isoladas de folhas e raízes de *Cymbidium* sp. quanto ao potencial de síntese de compostos indólicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Setor de Floricultura da Universidade Federal de Viçosa *Campus Florestal*, Município de Florestal, MG.

Bactérias diazotróficas foram isoladas previamente de folhas e raízes de *Cymbidium* sp. utilizando-se os meios semi-sólidos JMV, JMVL, NFb, JNFb, LGI e LGI-P, todos sem adição de nitrogênio (Döbereiner et al., 1999). Em todos os meios, o volume foi aferido para 1000 mL utilizando-se água destilada e o pH ajustado utilizando-se KOH (sol. 10%) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (sol. 5%). A composição do meio JMV foi de 5g de manitol, 6 mL de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (sol. 10%), 18 mL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (sol. 10%), 2 mL de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (sol. 10%), 1 mL de NaCl (sol. 10%), 2 mL de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (sol. 1%), 4 mL de FeEDTA (sol. 1,64%), 2 mL de solução de micronutrientes para meio de cultura, 1 mL de vitamina para meio de cultura, 2 mL de azul de bromotimol (sol. 0,5% em 0,2N de KOH) e pH entre 4,2 e 4,5. O meio JMVL se difere do JMV devido ao acréscimo de 20 mg L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e pH entre 5,0 e 5,4. O meio NFb foi composto por 5g de ácido málico, 5 mL de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (sol. 10%), 2 mL de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (sol. 10%), 1 mL de NaCl (sol. 10%), 2 mL de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (sol. 1%), 4 mL de FeEDTA (sol. 1,64%), 4,5 mL de KOH (sol. 10%), 2 mL de solução de micronutrientes para meio de cultura, 1 mL de vitamina para meio de cultura, 2 mL de azul de bromotimol (sol. 0,5% em 0,2N de KOH) e pH 6,5. O meio JNFb foi composto por 5g de ácido málico, 6 mL de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (sol. 10%), 18 mL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (sol. 10%), 2 mL de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (sol. 10%), 1 mL de NaCl (sol. 10%), 2 mL de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (sol. 1%), 4 mL de FeEDTA (sol. 1,64%), 4,5 mL de KOH (sol. 10%), 2 mL de solução de micronutrientes para meio de cultura, 1 mL de vitamina para meio de cultura, 4 mL de azul de bromotimol (sol. 0,5% em 0,2N de KOH) e pH 5,8. O meio LGI foi composto por 5g de açúcar cristal, 2 mL de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (sol. 10%), 6 mL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (sol. 10%), 2 mL de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (sol. 10%), 2 mL de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (sol. 1%), 4 mL de FeEDTA (sol. 1,64%), 2 mL de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (sol. 0,1%), 1 mL de vitamina para meio de cultura, 5 mL de azul de bromotimol (sol. 0,5% em 0,2N de KOH) e pH entre 6,0 e 6,2. Os dezessete isolados foram estocados em água destilada autoclavada.

Posteriormente, as bactérias foram crescidas previamente em meio líquido DYGS por 24 h, a temperatura de 30 °C e agitação de 120 rpm.

Para avaliação da síntese de compostos indólicos, 10 µL da cultura bacteriana foram transferidos para placas contendo 1/ 10 do meio

TSA (Bric et al., 1991). Após a transferência, o meio foi coberto com membrana de nitrocelulose e incubado a 28°C por 24h. Em seguida, a membrana foi transferida para outra placa e saturada com a solução de Salkowski (1 mL de tricloreto de ferro hexahidratado (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O), 0,5 mol L<sup>-1</sup>, em 50 mL de ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>), 35 % em água) conforme Gordon & Weber (1951) e incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. A formação de halo avermelhado na membrana indicou a presença de indol sintetizado pelas bactérias. Foram realizadas três repetições para cada estirpe bacteriana.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho foi verificado que bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico isoladas de folhas e raízes de *Cymbidium* sp. apresentaram a habilidade de síntese de indol, como pode ser visualizado na **figura 1**, por meio da formação do halo róseo que se forma no local das colônias.

Esse método colorimétrico apresenta como vantagem a rapidez e simplicidade e foi descrito por Bric et al. (1990) estudando a produção de ácido indol-acético (AIA) por *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*.

Dos 17 isolados diazotróficos avaliados, 4 apresentaram a capacidade de síntese de indol (**Tabela 1**), substância precursora das auxinas. As bactérias sintetizam auxinas por diferentes rotas metabólicas (Spaepen et al., 2007), a mais comum é a rota de indol-3-acetamida (IAM), mas também já foram descritas as rotas indol-3-piruvato (IPyA), triptamida (TAM) e indol-acetonitrilo (IAN). As auxinas atuam diretamente no alongamento das células vegetais, resultando na promoção de crescimento de plantas.

Além da síntese de auxinas e da fixação biológica de nitrogênio atmosférico, as bactérias epifíticas e endofíticas podem também promover o crescimento e desenvolvimento das plantas por diferentes ações que incluem a solubilização de fosfatos, biossíntese de fitohormônios, influência na atividade enzimática da 1-aminociclopropano 1-carboxilato (ACC) deaminase, controle biológico, síntese de sideróforos e a indução de resistência sistêmica a patógenos na planta hospedeira (Halmann et al., 1997).

A possibilidade de agregar valor em propágulos de orquídeas ao inoculá-los com estirpes selecionadas, supostamente dotará o setor de floricultura e plantas ornamentais de maior competitividade na produção e comercialização de seus produtos agrícolas. Para



isso, estudos como esse, de caracterização dos isolados bacterianos são necessários.

### CONCLUSÕES

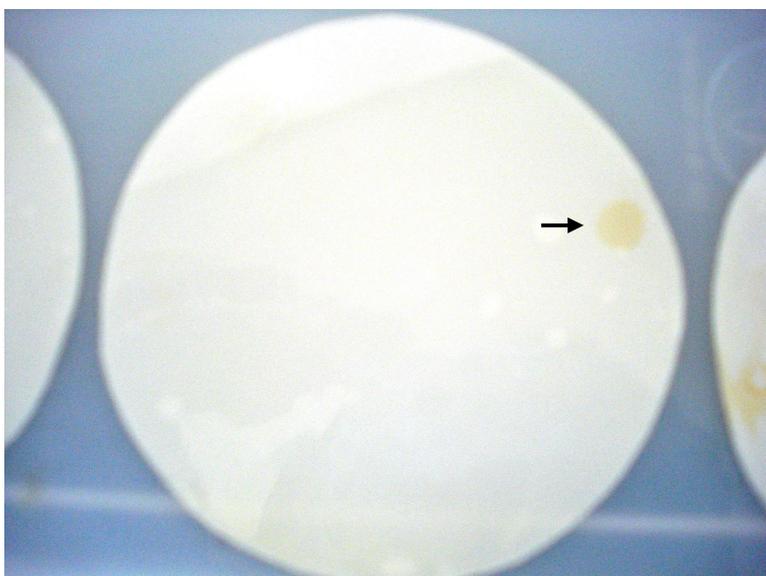
Bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico isoladas de folhas e raízes de *Cymbidium* sp. possuem a capacidade de sintetizarem compostos indólicos.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, APQ 03929-10), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo 470567/2011-2) e à Fundação Arthur Bernardes (FUNARBE, Funarpeq 2011-12) pelos auxílios financeiros e bolsas concedidas.

### REFERÊNCIAS

- BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; OLIVARES, F. L.; VIANA, A. P. & BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) cultivar Vitória durante a aclimatização. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 34:349-360, 2010.
- BALDOTTO, L. E. B. & OLIVARES, F. L. Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system. *Canadian Journal of Microbiology*, 54:918-931, 2008.
- 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*, 57:535-538, 1991.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D. & BALDANI, J. I. (1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. *Embrapa Agrobiologia, Seropédica*. 66p.
- FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K. & CARVALHO, J. F. R. P. *Produção de orquídeas em laboratório*. 1.ed. Londrina, PR: Editora Mecenaz, 2012.
- GORDON, S. A. & WEBWER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*, 26:192-195, 1951.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F. & KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43:895-914, 1997.
- LANGE, A. & MOREIRA, F. M. A. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de Orchidaceae e de outras famílias vegetais. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 26:535-543, 2002.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. & REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *Federation of European Microbiological*, 31:425-448, 2007.
- TSAVKELOVA, E. A.; CHERDYNTSEVA, T. A.; LOBAKOVA, E. S.; KOLOMEITSEVA, G. & NETRUSOV, A. I. Microbiota of the orchid rhizoplane. *Mikrobiologiya*, 70:567-573, 2001.
- TSAVKELOVA; E. A.; LOBAKOVA, E. S.; KOLOMEITSEVA, G. L.; CHERDYNTSEVA, T. A. & NETRUSOV, A. I. Localization of associative cyanobacteria on the roots of epiphytic orchids. *Mikrobiologiya*, 72:99-104, 2003.
- TSAVKELOVA; E. A.; CHERDYNTSEVA, T. A. & NETRUSOV, A. I. Bacteria associate with the roots of epiphytic orchids. *Mikrobiologiya*, 73:825-831, 2004.
- WILKINSON, K. G.; DIXON, K. W. & SIVASITHAMPARAM, K. Interaction of soil bacteria, mycorrhizal fungi and orchid seed in relation to germination of australian orchids. *New Phytology*, 112:429-435, 1989.
- WILKINSON, K. G.; DIXON, K. W.; SIVASITHAMPARAM, K. & GHISALBERTI, E. Effect of IAA on symbiotic germination of an australian orchid and its production by orchid-associated bacteria. *Plant Soil*, 159:291-295, 1994.



**Figura 1** – Visualização da circunferência de cor rosa (seta) formado pela detecção de indol sintetizado por bactérias diazotróficas isoladas de *Cymbidium* sp.

**Tabela 1** – Identificação das estirpes bacterianas diazotróficas capazes de sintetizarem indol isoladas de folhas e raízes de *Cymbidium* sp em diferentes meios de cultura.

Identificação dos isolados bacterianos <sup>1</sup>	Síntese de indol
UFV 11161	-
UFV 11151	-
UFV 12141	-
UFV 11261	+
UFV 11251	-
UFV 12261	-
UFV 12251	-
UFV 12262	-
UFV 12252	-
UFV 11361	-
UFV 11362	+
UFV 12321	-
UFV 11441	-
UFV 12421	-
UFV 11442	-
UFV 11521	+
UFV 11541	+

<sup>1</sup> Identificação dos isolados bacterianos: nome UFV seguido dos números que indicam: nome científico da planta hospedeira (1 – *Cymbidium*), tecido vegetal usado no isolamento (1 – Raiz, 2 – Folha), meio de cultura usado no isolamento (1 – JMV, 2 – JMV L, 3 – NFb, 4 – JNFb, 5 – LGI, 6 – LGI-P), diluição e número de ordem do isolado na coleção.