



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

INTERFERÊNCIA DE RIZOBACTÉRIAS SELECIONADAS COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO NA ABUNDÂNCIA DE BACTÉRIAS DO SOLO

Daniel Parreira **Muniz**¹; Marta Cristina Corsi de **Filippi**²; Bernardo de Almeida **Halfeld-Vieira**³

Nº 16402

RESUMO – O presente estudo teve como objetivo definir o potencial de rizobactérias selecionadas para controle biológico da brusone do arroz de causar efeito deletério às bactérias nativas da rizosfera. Com este fim, foi avaliada a capacidade de dois isolados do gênero *Bacillus*, dois do gênero *Pseudomonas*, um do gênero *Serratia* e um do gênero *Burkholderia* em alterar a densidade de bactérias cultiváveis nativas do solo. Sementes de *Oryza sativa* foram colonizadas com mutantes de cada rizobactéria resistente à concentração de 200 mg.L⁻¹ de rifampicina. Após a germinação e desenvolvimento das plântulas, coletaram-se porções das radículas com solo da rizosfera aderido, seguindo-se a diluições seriadas e quantificação da densidade de bactérias não resistentes ao antibiótico na amostra. O experimento foi repetido duas vezes. As densidades populacionais das bactérias cultiváveis nativas de solo foram comparadas por meio do teste Dunnett e por contraste de médias. Os resultados demonstram que as rizobactérias selecionadas não alteram a abundância de bactérias cultiváveis nativas do solo.

Palavras-chave: Rizosfera, arroz, microbiota do solo.

1 Autor: Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária, PUCC, Campinas-SP; daniel.bioetecap@hotmail.com

2 Pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão, Goiânia-GO; cristina.filippi@embrapa.br

3 Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; bernardo.halfeld@embrapa.br



ABSTRACT – *This study aims at elucidating the potential of rhizobacteria, selected to be used as biocontrol agent of rice blast, to cause deleterious effect on indigenous rhizosphere bacteria. To this purpose, the capability to modify the density of indigenous culturable bacteria was evaluated for two Bacillus strains, two Pseudomonas strains, one Serratia strain, and one Burkholderia strain. Seeds of Oryza sativa were colonized with 200 mg.L⁻¹ rifampicin-resistant strain of each rhizobacteria. After germination and plantlets development, radicle portions were collected with attached soil, followed by serial dilutions and quantification of the density of non-resistant rifampicin bacteria. The experiment was repeated twice. Populational densities of soil culturable bacteria were compared by Dunnett and average contrast statement. Results demonstrated that selected rhizobacteria do not change the abundance of culturable indigenous soil bacteria.*

Keywords: Rhizosphere, Rice, soil microbiota.

1 INTRODUÇÃO

Constituída pela região do solo sob influência das raízes e com alta atividade microbiana, a rizosfera tem sido um nicho considerado importante na proteção de plantas em relação a patógenos.

Dentre os microrganismos que habitam a rizosfera, as diferentes comunidades bacterianas existentes no solo têm o seu desenvolvimento estimulado neste ambiente devido à liberação de exsudatos do sistema radicular da planta (HARTMANN *et al.*, 2008). Apesar das comunidades compreenderem espécies deletérias além das benéficas (TIMMUSK, 2003), rizobactérias podem atuar como promotoras de crescimento e influenciar o desenvolvimento de plantas de forma indireta ou direta (PERSELLO CARTIEAUX *et al.*, 2003), podendo-se portanto, utilizar os isolados capazes de trazer benefícios à cultura.

Os mecanismos indiretos são aqueles que promovem o crescimento da planta (GLICK *et al.*, 1999) através de substâncias antagônicas ou por indução de resistência (GLICK, 1995), reduzindo os danos ocasionados por um patógeno, enquanto a promoção direta ocorre quando uma rizobactéria produz metabólitos que estimulam diretamente o crescimento vegetal (ASGHAR *et al.*, 2002).

Porém, considerando a capacidade de atuar de modo indireto, pela produção de substâncias antagônicas, além das interações entre microrganismos da comunidade bacteriana, se faz relevante definir o potencial de rizobactérias selecionadas para controle biológico em



interferirem negativamente em populações nativas do solo (BERG, 2009; MALAVOLTA *et al.*, 2008). Uma das formas para tal é avaliar quantitativamente, em meio de cultura, as populações cultiváveis de bactérias nativas que habitam a rizosfera (AZZIZ *et al.*, 2012) quando sob influência das rizobactérias.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi determinar o potencial de seis isolados de rizobactérias selecionadas para o controle da brusone em arroz de causarem efeito deletério às bactérias nativas do solo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção de mutantes espontâneos das rizobactérias resistentes a rifampicina e ciclohexamida

Os isolados de rizobactérias foram mantidos em meio de cultura 523 de Kado e Heskett (1970), atribuindo-se a codificação apresentada na tabela 1.

Tabela 1. Bactérias utilizadas no trabalho e suas respectivas codificações.

Espécie	Código
<i>Pseudomonas</i> sp.	20.7
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R55
<i>Bacillus</i> sp.	82R
<i>Bacillus cereus</i>	138.7
<i>Burkholderia pyrrocina</i>	R46
<i>Serratia</i> sp.	235

Para permitir estimar a densidade populacional somente das rizobactérias adicionadas por microbiolização às sementes de arroz e reprimir o crescimento de fungos, foram selecionados mutantes espontâneos de cada rizobactéria resistente a rifampicina e ciclohexamida. Inicialmente, cada um dos seis isolados de rizobactérias selecionados foram semeados em meio 523 contendo rifampicina e ciclohexamida na concentração de 20 mg.L⁻¹ e espalhados sobre a superfície do meio. Após incubação por até 7 dias, uma colônia de cada bactéria resistente espontânea a estas substâncias foi repicada para o mesmo meio contendo uma concentração maior dos mesmos. O procedimento foi sucessivamente efetuado em meio com concentrações crescentes, até que se atingisse 200 mg.L⁻¹ de rifampicina (JACQUES *et al.*, 2005) e 80 mg.L⁻¹ de ciclohexamida. As



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

culturas foram mantidas no meio com ambas as substâncias, nas respectivas concentrações, sendo repicadas a cada 25 dias.

2.2 Estabelecimento da microbiota nativa da rizosfera do arroz no solo

Durante o período em que as bactérias foram submetidas ao processo de seleção de mutantes espontâneos, realizou-se o plantio de sementes de *Oryza sativa* cultivar BRS Primavera para estimular o aumento da microbiota nativa do solo cultivado com esta espécie. O plantio foi feito adicionando solo a 27 bandejas diferentes, a serem usadas nos experimentos, semeando-se 24 sementes em cada bandeja de 20 cm x 14 cm, na disposição de 4 fileiras de 6 sementes, com uma distância de 3 cm entre elas. As plantas foram mantidas até atingirem 21 dias do semeio, quando então foram retiradas para o segundo plantio (item 2.5).

2.3 Determinação prévia do método de isolamento e contagem das bactérias nativas do solo

Aproveitando o cultivo do arroz, foi realizada uma amostragem de raízes de plântulas para determinação da diluição ideal para a visualização das colônias de rizobactérias e bactérias nativas do solo em placa. Essa diluição considerou a diluição capaz de promover a visualização de um número de colônias isoladas capazes de serem contadas a olho nu, de forma a se obter confiabilidade nas contagens.

A determinação foi realizada da seguinte maneira: pesou-se 3 g de raízes e solo de rizosfera de plantas de arroz, após 21 dias de plantio. Em seguida foram adicionados 100 ml de solução salina a 0,85%, levando-se a agitador orbital a 180 rpm por 30 minutos. Após este procedimento, foram pipetados 500 µl da solução, adicionando-se esta alíquota à 4,5 ml de solução salina 0,85% em um tubo de ensaio. O processo foi submetido à diluição seriada até se obter uma diluição de 10^{-7} .

Após a realização das diluições, foi preparado meio de cultura sem e com antibiótico na concentração de 200 ppm de rifampicina e 80 ppm de ciclohexamida para plaqueamento das diluições de 10^{-4} à 10^{-7} . A contagem das colônias foram iniciadas após 2 dias. Como não houve crescimento bacteriano, o ensaio foi repetido realizando-se diluições menores que 10^{-1} à 10^{-4} . Após o período de incubação de 2 dias, as diluições de 10^{-2} e 10^{-3} permitiram o crescimento de colônias isoladas e contagem em ordens de grandeza adequadas, definindo-se então este procedimento para o prosseguimento dos ensaios.



2.4 Microbiolização das sementes de arroz

Culturas dos isolados de rizobactérias resistentes a rifampicina e ciclohexamida foram crescidas em meio 523 de Kado e Heskett (1970) por 48 h e suspensões de cada rizobactéria foram ajustadas a 0,2 de absorvância em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 540 nm. Após o ajuste, sementes de *Oryza sativa* cultivar BRS Primavera foram mantidas em imersão em cada suspensão por 4 horas para microbiolização das sementes. Para o tratamento controle, sementes foram imersas em água destilada.

2.5 Estimativa da densidade populacional das bactérias cultiváveis nativas do solo

O ensaio foi feito utilizando-se o solo contido nas 27 bandejas plásticas conforme descrito no item 2.2. As bandejas foram alinhadas em 9 fileiras, cada uma delas contendo 3 bandejas, no qual cada uma representou uma repetição. Deste modo, determinou-se que 6 filas pertenceriam aos 6 diferentes isolados de rizobactérias, e as outras 3 filas às testemunhas do experimento. O semeio foi realizado de forma que foram dispostas em cada bandeja 24 sementes na disposição de 4 fileiras de 6 plantas cada, respeitando-se a distância de 3 cm entre elas. O início da germinação foi observado 6 dias após o plantio. Após 14 dias, as plantas atingiram a massa ideal para realização das análises, dando-se início a coleta das amostras. As amostras foram analisadas como descrito no ensaio 2.3. Com a finalidade de estimar somente a densidade das rizobactérias adicionadas por meio da microbiolização, foi utilizado o meio de cultura com ciclohexamida e rifampicina. Para estimar a densidade populacional das rizobactérias somada à das bactérias cultiváveis nativas do solo, as mesmas suspensões foram também semeadas em meio sem a adição de rifampicina. A estimativa da densidade populacional das bactérias nativas do solo não expostas às rizobactérias foi obtida pela contagem de colônias do tratamento controle, onde as amostras foram semeadas no meio sem a presença de rifampicina. Cada amostra de cada diluição foi semeada em triplicata, e sua média constituiu uma de 3 repetições. A estimativa da densidade populacional de bactérias cultiváveis nativas do solo e expostas às rizobactérias foi obtida pela subtração das densidades obtidas em meio sem adição de rifampicina pelas densidades de cada rizobactéria quantificada em meio com a adição desta substância. O experimento foi repetido duas vezes.



2.6 Análise de dados

As densidades populacionais das bactérias cultiváveis nativas de solo provenientes da rizosfera de plantas de arroz microbiolizadas e não microbiolizadas foram comparadas por meio do teste Dunnett a 5% por meio do comando proc glm e por contraste de médias pelo comando contrast, utilizando-se o pacote estatístico SAS 9.1.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram que nenhuma rizobactéria selecionada para controle biológico da brusone do arroz foi capaz de alterar a abundância de bactérias nativas do solo (Tabela 2).

Tabela 2. Densidades populacionais das bactérias cultiváveis nativas do solo em rizosfera colonizada por seis diferentes rizobactérias selecionadas para controle da brusone do arroz.

Tratamentos	1º ensaio	2º ensaio
20.7	15,42	15,07
235	15,22	15,39
138.7	15,61	15,35
R46	15,82	15,45
82R	15,75	14,52
R55	15,67	15,03
Controle	15,54	15,32

As densidades populacionais das bactérias nativas do solo não diferiram significativamente da testemunha para cada ensaio, segundo o contraste de médias e teste Dunnett ($p < 0,05$). Os dados numéricos se referem a $\text{Ln}(\text{ufc.g}^{-1}$ raiz e solo da rizosfera).

Portanto, não foi detectado indicativo de potencial efeito deletério destes organismos sobre as demais bactérias que estejam expostas aos isolados selecionados.

Este resultado traz uma perspectiva positiva ao uso destas rizobactérias na cultura do arroz, uma vez que a adição de elementos ao solo visando uma finalidade específica poderia trazer modificações não desejáveis ao sistema produtivo, dependendo dos organismos que são afetados (WANG *et al.*, 2015). Apesar deste estudo não contemplar as alterações na estrutura das comunidades microbianas, este é um primeiro passo na determinação da segurança de uso destas rizobactérias em campo como agentes de controle biológico da brusone do arroz.



4 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que as rizobactérias selecionadas não alteram a abundância de bactérias cultiváveis nativas do solo, não havendo indicativo que causem potenciais efeitos deletérios à microbiota do solo.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica concedida. O bolsista agradece também ao seu orientador pela oportunidade e conhecimento adquiridos, bem como aos técnicos de laboratório.

6 REFERÊNCIAS

- ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M. & KHALIK, A. **Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L.** Biol. Fertil. 2002.
- AZZIZ, G.; BAJSA, N.; HAGHJOU, T.; TAULÉ, C.; VALVERDE, Á.; IGUAL, J.M.; ARIAS, A. **Abundance, diversity and prospecting of culturable phosphate solubilizing bacteria on soils under crop-pasture rotations in a no-tillage regime in Uruguay.** Applied Soil Ecology. v.61, p.320-326, 2012.
- BERG, G. **Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 84, p.11-18, 2009.
- KADO, C.I.; HESKETT M.G. **Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*.** Phytopathology, v.60, p.969-979, 1970.
- GLICK, B. R.; PATTEN, C.L.; HOLGUIN, G.; PENROSE, G. M. **Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria.** Imperial College Press, London (1999)
- HARTMANN A.; ROTHBALLER M.; SCHMID M. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Springer Science + Business Media B.V.* (2007)
- JACQUES, R.J.S. et al. **Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. isolated from a petrochemical sludge landfarming.** International Biodeterioration and Biodegradation, London, v.56, n.3, p.150-156, 2005b.
- PERSELLO-CARTIEAUX, F.; NUSSAUME, L.; ROBAGLIA, C. **Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions.** Plant Cell Environ 26: 189-199 (2003)



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

TIMMUSK, S. *Mechanism of action of the plant growth promoting bacterium Paenibacillus polymyxa*. PhD Thesis. Uppsala University, Uppsala. (2003)

WANG, Z; ZONG, H.; ZHENG,H.; LIU, G.; CHEN, L.; XING, B. **Reduced nitrification and abundance of ammonia-oxidizing bacteria in acidic soil amended with biochar**. Chemosphere, v.138, p.576-583, 2015.