



Redução de Nitrato por Rizobactérias Isoladas de Raízes de Bananeira

Fabiola de Jesus Silva, Regina Cássia Ferreira Ribeiro, Gleika Larisse Oliveira Dorasio de Souza, Adelica Aparecida Xavier, Cláudia Maria da Silva, Lidiane Magalhães Madureira, Paulo Victor Magalhães Pacheco

Introdução

Os microrganismos são responsáveis por diversos processos bioquímicos que controlam as transformações dos elementos químicos e as transferências de energia e nutrientes no sistema solo-planta-atmosfera [1]. Dentre os microrganismos que estão envolvidos nestas transformações, destacam-se as rizobactérias. Estas bactérias vivem na rizosfera das plantas e são capazes de colonizar diversos tecidos vegetais, beneficiando o desenvolvimento vegetal através de mecanismos de promoção de crescimento [2].

O nitrogênio (N) é um dos elementos que mais limitam o crescimento de vegetação e a produção agrícola. Contudo, por possuir um ciclo aberto na natureza, o N está sujeito a constantes perdas. Entender as principais formas e processos que regulam a adição e perdas de N do solo é de fundamental importância para seu manejo racional [1].

A principal forma de remoção do excesso de nitrogênio do ambiente é a ação de bactérias desnitrificantes que reduzem nitrato a nitrito e óxidos de nitrogênio (NO e N₂O) [3]. No meio ambiente, a desnitrificação é também responsável pela liberação de N na atmosfera sob a forma de N₂. Isso faz com que grandes quantidades de N aplicados em solos, sob a forma de fertilizantes agrícolas, sejam perdidas. Além dos processos redutivos de N culminarem com a produção de gases, em especial o N₂O, que contribuem para o aquecimento global [1]. Portanto, a redução de nitrato tornou-se um foco importante para a pesquisa nos últimos anos.

As enzimas responsáveis pela redução de nitrato a nitrito pelos microrganismos são as nitrato redutases, podendo o nitrato ser metabolizado de diferentes formas dependendo do tipo de nitrato redutase que cada espécie possui. Entre os mecanismos de redução do nitrato, pode-se citar a redução assimilatória que tem a função de utilização de nitrato como fonte de nitrogênio para o crescimento, e a geração de energia metabólica utilizando o nitrato como receptor final de elétrons (redução do nitrato) [4].

O entendimento do metabolismo bacteriano do nitrogênio, pode auxiliar na otimização do uso desses microrganismos *in vivo*, quando utilizados como bioinoculantes. Diante disso, objetivou-se com este trabalho avaliar a capacidade de redução do nitrato por rizobactérias isoladas de raízes de bananeira.

Material e métodos

Este trabalho foi realizado no laboratório de Fitopatologia e Microbiologia da Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes), Campus de Janaúba-MG.

A. Seleção de rizobactérias

Foram utilizados dez isolados de rizobactérias, provenientes da rizosfera de bananeira 'Prata-Anã' dos municípios do Norte de Minas Gerais (Tabela 1). A identificação dos gêneros e espécies foi realizada pelo teste de perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa no laboratório da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA/CNPMA) descrito por Sanhueza e Melo [5]. As rizobactérias foram repicadas e mantidas em meio sólido Tryptic Soy Agar (TSA), e armazenadas em freezer.

B. Teste bioquímico de redução do nitrato

Para avaliar a capacidade dos isolados em reduzir o nitrato a nitrito, empregou-se o meio de cultura constituído de peptona (5,0 g), extrato de carne (3,0 g), KNO₃ (1,0 g), ágar (12,0 g) e água destilada (1000 mL) [6]. Após o ajuste do pH para 6,8, o meio de cultura foi transferido para tubos de ensaio (10 mL de meio por tubo) e autoclavado (120°C por 20 minutos). Posteriormente procedeu-se a repicagem das bactérias e incubou-as em temperatura ambiente, por um período de 48 horas. Foram utilizadas três repetições por isolado, e três tubos de ensaio contendo o meio de cultura sem bactéria como tratamento testemunha.



Após a incubação, foram adicionadas, em cada tubo, duas gotas da solução A (ácido sulfanílico e ácido acético) e duas gotas da solução B (α -naftilamina e ácido acético). O desenvolvimento da cor marrom-avermelhado indica reação positiva.

Resultados e Discussão

Sete dos isolados avaliados não foram capazes de reduzir o nitrato a nitrito *in vitro*. Dentre os isolados não redutores de nitrato, seis são do gênero *Bacillus*, sendo cinco pertencentes à espécie *Bacillus pumilus*. Este resultado difere dos encontrados por Ikeda *et al.* [7]. Estes autores trabalhando com bactérias isoladas de raízes de milho, encontraram reação positiva, ou seja, capacidade em reduzir nitrato a nitrito, em 81% dos seus isolados. Apenas os isolados 17 e 24 da espécie de *Paenibacillus lentimorbus*, e o isolado 34 de *Bacillus subtilis*, que corresponde a 30% dos isolados, apresentaram a capacidade de reduzir o nitrato neste ensaio, o que indica a presença da enzima nitrato redutase nestes isolados. Harish *et al.* [8] também obteve respostas positivas para redução de nitrato ao trabalhar com bactérias isoladas a partir de bananeiras.

Diante dos resultados obtidos, o fato da maioria das rizobactérias avaliadas não possuírem habilidade de redução do nitrato, indica que elas podem ser alternativas promissoras para utilização como bioinoculantes. Diversos trabalhos na literatura relatam ação positiva das rizobactérias no desenvolvimento de plantas, tanto através da microbiolização de sementes e mudas, quanto da aplicação destas diretamente no solo [2, 9, 10].

Conclusão

Dos 10 isolados de rizobactérias, sete não reduzem nitrato a nitrito.

Agradecimentos

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e à FAPEMIG pela bolsa de incentivo à pesquisa e ao desenvolvimento tecnológico (BIPDT).

Referências

- [1] MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ª Ed. UFLA, Lavras, Brasil, 2006. 729 p.
- [2] PERBONI, A. T. Desempenho de plantas de canola originadas se sementes microbiolizadas com bactérias promotoras de crescimento. 2014. 99 p. (Curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal) – UFP, Pelotas, 2014.
- [3] RICHARDSON, D. J.; WATMOUGH, N. J. Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. **Current opinion in chemical biology**, v. 3, n. 2, p. 207-219, 1999.
- [4] MORENO-VÍVIAN, C. *et al.* Prokaryotic nitrate reduction: Molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 21, p. 6573-6584, 1999.
- [5] SANHUEZA, R. M. V. B.; MELO, I. S. Identificação de bactérias por análise dos ácidos graxos. In: _____. **Métodos utilizados no biocontrole de fitopatógenos**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2007, p. 59-65.
- [6] ARAÚJO, W. L. *et al.* **Manual: isolamento de microrganismos endofíticos**. ESALQ, 2002.
- [7] IKEDA, A. C. *et al.* Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. **Microbial Ecology**, v. 51, p. 151-160, 2013.
- [8] HARISH, S. *et al.* Biohardening with plant growth promoting rhizosphere and endophytic bacteria induces systemic resistences against banana bunchy top virus. **Applied Soil Ecology**, v. 39, n. 2, p. 187-200, 2008.
- [9] LOPES, P. S. **Aplicação de rizobactérias em explantes e plântulas de bananeira ‘Prata-Anã’ no controle de *Meloidogyne javanica* e no desenvolvimento de mudas**. 2011. 124 p. (Curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido) – Unimontes, Janaína, 2011.
- [10] ARAÚJO, F. F.; MARCHESI, G. V. P. Uso de *Bacillus subtilis* no controle de meloidoginose e na promoção de crescimento de tomateiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1558-1561, 2009.

Tabela 1. Caracterização dos isolados de rizobactérias isoladas de raízes de bananeira ‘Prata-Anã’ quanto à redução do nitrato.

Isolados	Redução do Nitrato
<i>Bacillus pumilus</i> - 1	-
<i>Bacillus pumilus</i> - 3	-
<i>Bacillus pumilus</i> -10	-
<i>Paenibacillus lentimorbus</i> - 17	+
<i>Paenibacillus lentimorbus</i> - 24	+
<i>Bacillus subtilis</i> - 34	+
<i>Bacillus. sp</i> - 36	-
<i>Bacillus pumilus</i> -60	-
<i>Paenibacillus lentimorbus</i> - 69	-
<i>Bacillus pumilus</i> -76	-
Testemunha	-

+ capacidade de redução;
- incapacidade de redução.

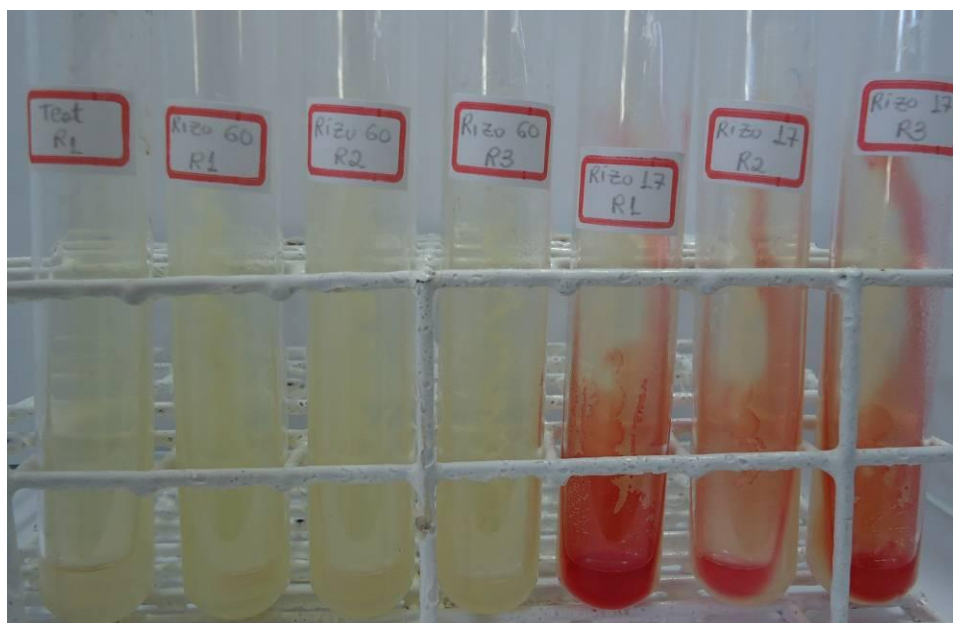


Figura 1. Teste de redução do nitrato por rizobactérias, mostrando a inversão ou não da cor do meio de cultura quando o teste apresenta resultado positivo ou negativo respectivamente.