



Isolamento de rizobactérias do gênero *Bacillus* spp.: explorando a diversidade biológica em horta agroecológica

Isolation of rhizobacteria of the genus Bacillus spp.: exploring biological diversity in agroecological vegetable garden

MELO, Gabrielle Custódio¹; CORRÊA, Élide Barbosa²; FERNANDES, Josely Dantas³; GAIÃO, Amanda de Melo Gonçalves; PEREIRA, João Vitor da Silva⁵; DUARTE, Sayonara Medeiros⁶.

¹ UEPB, gabrielleemello@gmail.com; ² UEPB, elida@servidor.uepb.edu.br; ³ UEPB, joselysolo@yahoo.com.br; ⁴ UEPB, amandademelogoncalves@gmail.com; ⁵ UEPB, vitorpereira.vp644@gmail.com; ⁶ UEPB, sduarteagro@gmail.com.

RESUMO EXPANDIDO

Eixo Temático: Manejo de Agroecossistemas

Resumo: As práticas utilizadas em sistemas agroecológicos de produção promovem a diversidade e a saúde do solo. A vida biológica preservada gera diversos benefícios, incluindo a disponibilização de nutrientes para as plantas, com destaque para o papel das rizobactérias. O objetivo do trabalho foi isolar bactérias do gênero *Bacillus* spp. a partir de solo rizosférico de couve-folha, crotalária e margaridão, cultivados em horta mandala conduzida em sistema agroecológico. O isolamento foi feito em meio de cultura nutriente ágar, após as subamostras (A e B) serem submetidas a tratamentos térmicos. Como resultado, para cada subamostra A e B na região rizosférica da couve-folha, foram obtidas $2,7 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ e $13,8 \times 10^6$ UFC mL⁻¹, para a crotalária $6,4 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ e $1,8 \times 10^6$ UFC mL⁻¹, e para o margaridão $2,7 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ e $1,4 \times 10^6$ UFC mL⁻¹, respectivamente. Ao fim, foram isoladas 17 bactérias de colônias características do gênero, sendo essas indicadoras biológicas da qualidade do solo.

Palavras-chave: bactérias; diversidade biológica; manejo agroecológico; rizosfera.

Introdução

O manejo dos agroecossistemas adotados na agroecologia inclui a adoção de práticas como: cobertura vegetal para conservação do solo e da água, incorporação de matéria orgânica, rotação de culturas, consórcios e adoção de sistemas biodiversos; além do controle de pragas realizado principalmente pela promoção dos inimigos naturais (ALTIERI, 2004). Essas práticas utilizadas são importantes para favorecer a diversidade da vida e a saúde do solo, responsáveis por diversos serviços ecossistêmicos, como a ciclagem de nutrientes, a promoção do crescimento das plantas e a fixação biológica de nitrogênio. Essa interação benéfica promovida é essencial não somente para um solo vivo e sadio, mas também para plantas saudáveis (PRIMAVESI, 2016).



Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) são responsáveis por diversos efeitos benéficos por meio de mecanismos diretos, como o fornecimento de nutrientes (SUYAL et al., 2016), e indiretos, como a indução da resistência sistêmica (ISR) (SAXENA et al., 2020). A relação com a rizosfera é propiciada pela alta capacidade de adaptação a diversos ambientes, rápida taxa de crescimento e ampla capacidade de metabolização de compostos realizada por esses micro-organismos (BHATTACHARYYA, JHA, 2012).

Entre os principais gêneros bacterianos estudados, encontra-se o gênero *Bacillus* spp., sendo também encontrado associado à rizosfera. *Bacillus* spp. são responsáveis por diversos mecanismos e benefícios às plantas, tais como o controle da infestação de pragas e patógenos, a redução de estresses abióticos e a disponibilização de nutrientes (SAXENA et al., 2020).

Logo, supõe-se que a adoção de práticas de manejo propostas pela agroecologia é responsável pelo aumento da diversidade biológica nos agroecossistemas, sendo importantes para o isolamento de RPCP nessas áreas. Além disso, a identificação desses micro-organismos atua como indicador biológico da qualidade do solo (ZILLI et al., 2003), indicativo favorável, especialmente quando consideramos agroecossistemas em transição agroecológica.

Dessa forma, objetiva-se com o trabalho realizar o isolamento de rizobactérias do gênero *Bacillus* de solo rizosférico de plantas de couve-folha, crotalária e margaridão, cultivadas em horta mandala conduzida em sistema agroecológico.

Metodologia

Inicialmente foram coletadas amostras de solo da região rizosférica de plantas de couve-folha (*Brassica oleracea* L.), crotalária (*Crotalaria juncea* L.) e margaridão (*Tithonia diversifolia* Hemsl.) cultivadas em horta mandala conduzida em sistema agroecológico na Área Agroecológica, localizada na Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus II, em Lagoa Seca, PB. Essa área encontra-se em transição agroecológica, uma vez que costumava ser utilizada como aterro para o descarte de resíduos de construção civil.

Na horta mandala são realizadas diversas práticas com o objetivo de aumentar a diversidade no agroecossistema, sendo as seguintes: adição de matéria orgânica por meio da utilização de compostos, biofertilizantes, esterco, restos culturais e incorporação de adubos verdes; proteção do solo com cobertura morta; cultivos consorciados e rotação de culturas, levando em consideração a época do plantio e plantio de plantas medicinais e arbustos para a criação de barreiras fitossanitárias e quebra-vento.

Sendo assim, na mandala foram coletadas três amostras simples de solo da região rizosférica de crotalária (utilizada como adubo verde e para o controle de nematoides), margaridão (utilizada para produção de biomassa, atrativo para



agentes polinizadores e cerva-viva) e a couve-folha (utilizada para a alimentação). Em seguida, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Fitopatologia da UEPB, localizado no mesmo Campus, onde foram conduzidos os procedimentos metodológicos, adaptados de Mariano e Silveira (2005), para isolamento das rizobactérias do gênero *Bacillus*.

As amostras de solo foram peneiradas para remoção dos restos culturais. Cada amostra foi dividida em duas subamostras - A e B - de 1 g cada. Para as subamostras A foi realizado pré-tratamento térmico, onde as amostras foram aquecidas a 80°C por 30 minutos em estufa com circulação de ar, seguido por agitação em água destilada e banho-maria a 60°C por 30 minutos. As subamostras B foram imersas diretamente em banho-maria a 60°C por 30 minutos.

Após o tratamento térmico adotado para a seleção de espécies do gênero *Bacillus*, pela capacidade das bactérias em resistir a elevadas temperaturas por produzirem endósporos, todas as subamostras foram encaminhadas para o processo de diluição seriada, realizado dentro de uma cabine de segurança biológica para diminuir os riscos de contaminações. O plaqueamento das subamostras foi realizado com uma diluição de 10^{-4} , com três repetições por diluição. Para o isolamento, a suspensão contendo 100 μ L das amostras foi adicionada em placa de Petri contendo meio de cultura nutriente ágar (NA). Em seguida, as placas foram incubadas a 25°C por um período de 48 horas.

Logo após o período de incubação, as unidades formadoras de colônia (UFC), provenientes de uma única célula bacteriana foram contabilizadas e identificadas conforme Tejera-Hernández et al. (2003), quanto às características de cor, formato e textura do gênero *Bacillus*. A transferência das colônias para outra placa contendo meio NA foi realizada utilizando a técnica de semeadura por esgotamento, seguida de purificação e preservação (MARIANO; SILVEIRA, 2005).

Resultados e Discussão

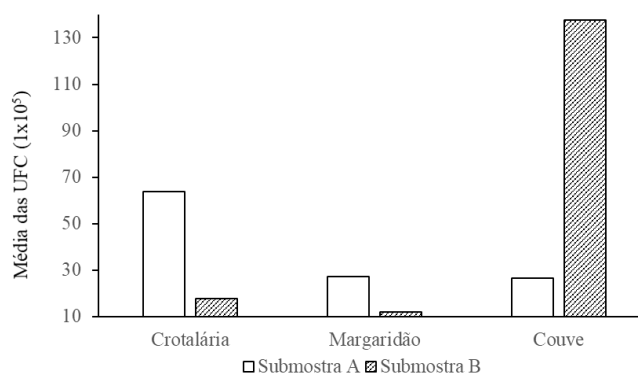
Para cada subamostra A (com tratamento térmico em estufa a 80°C por 30 min) e B (sem tratamento térmico em estufa) de solo coletado na região rizosférica da couve-folha, foram obtidas $2,7 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ e $13,8 \times 10^6$ UFC mL⁻¹, para a crotalária $6,4 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ e $1,8 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ e para o margaridão $2,7 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ e $1,4 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ de colônias características do gênero *Bacillus* spp, respectivamente. A amostra de solo da região rizosférica da couve-folha foi responsável pelo maior média de unidades formadoras de colônia (UFC) bacteriana para a amostra que não teve o pré-tratamento térmico em estufa (B), quando comparadas com as amostras de solo rizosférico de crotalária e margaridão (Figura 1). Observa-se uma variação nas quantidades de UFC entre as amostras, indicando uma possível diferença na abundância das bactérias associadas à região rizosférica dessas plantas. A couve-folha foi cultivada em canteiros sem revolvimento, em consórcio com coentro e com adição de esterco bovino em cobertura. A crotalária foi cultivada em solo em consórcio com tomate, com revolvimento por meio de enxadas



na renovação dos canteiros, e a adubação é realizada na fundação. O margaridão foi cultivado como cerca-viva, sem adição de matéria orgânica de cobertura.

O maior número de UFC de *Bacillus* spp. na região rizosférica da couve-folha pode ser explicado devido ao não revolvimento do solo e adição de adubação em cobertura. A cobertura do solo é responsável por favorecer a criação de um microclima favorável ao desenvolvimento de micro-organismos, como as bactérias (KLUTHCOUSKI et al., 1999).

Figura 1 – Média de UFC de *Bacillus* spp. isolados de amostras com pré-tratamento térmico (A) e sem o pré-tratamento (B). O pré-tratamento corresponde ao tratamento térmico de 80°C por 30 min em estufa. Ambas as amostras foram submetidas ao tratamento térmico em banho-maria (60°C/30min).



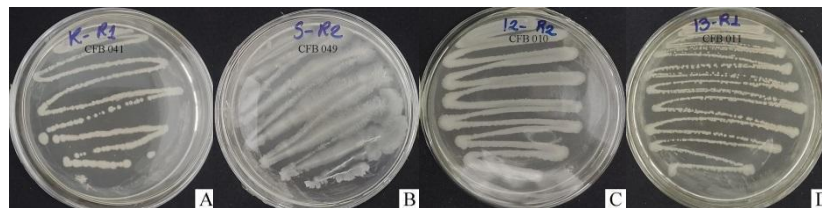
Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

No contexto da análise da variação de tratamento térmico (Figura 1), para a couve-folha, a sub amostra A apresentou uma média inferior de UFC em comparação com a subamostra B, devido à seleção de espécies mais resistentes ao calor. Entretanto, para o margaridão e a crotalária, o pré-tratamento A foi responsável por aumentar o isolamento de *Bacillus* spp., apresentando uma maior média de UFC. Essa ocorrência pode estar relacionada com a adaptação ecológica dos micro-organismos isolados presentes nos sistemas radiculares. Sendo assim, o tratamento térmico teve um impacto na UFC, resultando em diferenças na contagem para as subamostras A e B.

Por conseguinte, foram isoladas 17 bactérias com características morfológicas distintas obtidas das amostras de solo. Sendo 9 isolados provenientes da região rizosférica do margaridão, 5 isolados da região rizosférica da crotalária e 3 isolados da couve-folha. As colônias observadas apresentaram aspectos representativos e semelhantes ao gênero *Bacillus*, também identificados por Monnerat et al. (2020). Esses aspectos variados incluem coloração esbranquiçada, creme e creme claro, além de colônias opacas e com pouco brilho (Figura 2). Quanto à superfície, algumas colônias eram lisas, enquanto outras apresentavam rugosidades, e algumas delas mostravam uma elevação na parte central. Importante destacar que para a identificação precisa do gênero *Bacillus* e das espécies é necessário realizar o sequenciamento genético.



Figura 2 - Isolados bacterianos após 48 horas de incubação. A: Isolado CFB 041. B: CFB: 049. C: CFB 010. D: CFB 011.



Fonte: Autoria própria, 2023.

Apesar de a couve-folha ter apresentado a maior média de UFC, esse resultado não se correlacionou com a diversidade de micro-organismos, visto que a região rizosférica do margaridão foi responsável pelo maior número de isolados de *Bacillus* spp. Sendo assim, no presente estudo, o menor revolvimento do solo foi responsável por uma maior diversidade de bactérias associadas à região das raízes, como observado no caso do margaridão. Conforme apontado por Brandani e Santos (2016), a diminuição da perturbação do solo em condições naturais cria um ambiente propício para o crescimento das comunidades bacterianas, justificando os resultados encontrados neste trabalho para a prática de manejo com menor revolvimento do solo.

Essa diversidade de isolados associados ao gênero *Bacillus* apresenta-se como um indicador favorável das regiões rizosféricas de plantas em sistemas agroecológicos de produção, sendo um indicador biológico da qualidade do solo (ZILLI et al., 2003), uma vez que as bactérias isoladas confirmam a presença desse gênero associado às raízes. Além disso, a identificação de *Bacillus* spp. pressupõe benefícios diretos para as plantas exercidos por meio de mecanismos diretos e/ou indiretos (SAXENA et al., 2020).

Conclusões

O solo rizosférico de couve-folha tem maior população de bactérias com características do gênero *Bacillus*, quando comparado ao solo rizosférico da crotalária e do margaridão.

A maior diversidade de bactérias com características do gênero *Bacillus* é obtida de solo rizosférico de margaridão, quando comparada com o solo rizosférico de crotalária e couve-folha.

Sistemas agroecológicos de produção são promotores da diversidade microbiana, os quais atuam como indicadores da qualidade biológica do solo. Nesse contexto, as rizobactérias de plantas isoladas nesse estudo revelaram-se como indicadoras da presença do gênero *Bacillus* associado às espécies cultivadas na Mandala - Área Agroecológica da UEPB, comprovando a importância do manejo ecológico adotado na promoção da biodiversidade.



Referências bibliográficas

ALTIERI, Miguel. **Agroecologia a dinâmica produtiva da agricultura sustentável**. 4. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2004. 120 p.

BRANDANI, Carolina Braga; SANTOS, Danielle Gonçalves dos. Transformações do carbono no solo. *In*: CARDOSO, Elke Jurandy Bran Nogueira; ANDREOTE, Fernando Dini. **Microbiologia do Solo**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ, 2016. p. 81-98.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World J. Microbiol Biotechnol**, vol. 28, p. 1327-1350, 2012.

KLUTHCOUSKI, João; OLIVEIRA, Itamar Pereira de; Fancelli, Antônio Luiz; NETO, Durval Dourado; SANTOS, Sérgio Mota dos. Componentes bióticos de um campo de pesquisa sob quatro sistemas de manejo de solo. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.29, p.33-41, 1999.

MARIANO, Rosa de Lima Ramos; SILVEIRA, Elineide Barbosa da. **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. 2. ed. Recife: UFRPE, 2005. 184 p.

PRIMAVESI, Ana. **Manual do Solo Vivo: Solo Sadio, Planta Sadia, ser Humano Sadio**. 2. ed. São Paulo: Expressão Popular, 2016. 205 p.

SAXENA, A. K.; KUMAR, M.; CHAKDAR, H.; ANUROOPA, N.; BAGYARAJ, D. J. *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. **Journal of applied microbiology**, v. 128, n. 6, p. 1583-1594, 2020.

SUYAL, Deep Chandra; SONI, Ravindra; SAI, Santosh; GOEL, Reeta. Microbial Inoculants as Biofertilizer. **Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity**, vol. 1, p. 311-318, 2016.

TEJERA-HERNÁNDEZ, Berto; HEYDRICH-PÉREZ, Mayra; ROJAS-BADÍA, Marcia M. Aislamiento de *Bacillus* solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo del arroz. **Agronomía Mesoamericana**, vol. 24, n. 2, p. 357-364, 2013.

ZILLI, Jerri Édson; RUMJANEK, Norma Gouvêa; XAVIER, Gustavo Ribeiro; COUTINHO, Heitor Luiz da Costa; NEVES, Maria Cristina Prata. Diversidade Microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, set./dez. 2003.