

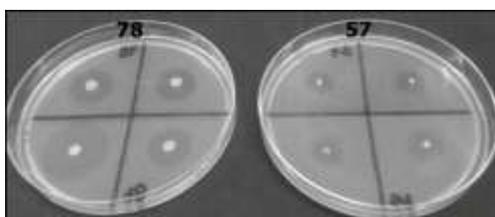
## POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E AGRÍCOLA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO CAFÉ (*COFFEASP.*) PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL E PRODUÇÃO DE ENZIMAS

DFC Silva; PHM Andrade; PT Lacava Laboratório Microbiologia e Biomoléculas- LaMiB, Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São Carlos, Via Washington Luís km 235, 13565-905, São Carlos, SP.

Microorganismos endofíticos são aqueles que colonizam o interior das plantas sendo encontrados em tecidos vegetais sadios como raízes, ramos, folhas, frutos e sementes e que não causam danos ao hospedeiro, têm sido cada vez mais estudados visando a produção de inoculantes para promoção de crescimento vegetal e biocontrole. Bactérias endofíticas podem beneficiar as culturas vegetais por meio de diferentes mecanismos de promoção de crescimento. A promoção direta de crescimento vegetal por essas bactérias envolve o aumento da disponibilização de nutrientes que ocorre pela fixação biológica de nitrogênio; solubilização de fosfato mineral e o fornecimento de substâncias como reguladores do crescimento de plantas como ácido indol acético (AIA), citocininas, etileno, aminoácidos. A presente pesquisa objetivou a avaliação do potencial biotecnológico e agrícola de bactérias endofíticas do café (*Coffeasp.*), com foco na promoção de crescimento vegetal e produção de enzimas de interesse biotecnológico; Dessa forma, bactérias endofíticas foram isolados de diferentes tecidos (raiz, caule, folhas e frutos) de plantas de café convencional, obtidos em propriedades no estado de São Paulo e testados quanto à capacidade de fixação de nitrogênio (FBN), solubilização de fosfato, produção de auxinas, inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos e realização de atividades enzimáticas de interesse. Amostras vegetais de café foram submetidas à desinfecção superficial e cortadas assepticamente em fragmentos que foram posteriormente macerados. Posteriormente foram realizadas as diluições seriadas apropriadas e o extrato foi semeado em placas contendo meio de cultura(TSA), suplementado com fungicida. As colônias bacterianas endofíticas isoladas foram repicadas em meio sólido e então preparadas para o armazenamento a -80°C. A avaliação quanto a solubilização de fosfato consistiu em inocular as bactérias em meio de cultura sólido contendo fosfato insolúvel. As placas de Petri, com o mesmo volume de meio, foram incubadas por 120 horas e posteriormente visualizadas quanto à presença de halo ao redor das linhagens capazes de solubilizar fosfato. A capacidade das linhagens bacterianas em realizar o processo de FBN foi avaliada qualitativamente em tubos de ensaio contendo meio de cultura livre de nitrogênio (NFbsemi-sólido). Esses isolados foram incubadas a 28°C por 96 horas no escuro. A fixação de N<sub>2</sub> pela bactéria foi comprovada com a presença de uma película de crescimento próximo à superfície dos tubos. Para a quantificação da produção de AIA, as bactérias foram inoculadas em meio de cultura TSB 10% suplementados com L-triptofano, e incubadas sob agitação no escuro a 28°C por 72 horas. As culturas foram centrifugadas e 900 µL do sobrenadante foram misturados com 400 µL do reagente de Salkowski; Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, foi feita a leitura em espectrofotômetro, normalizada por meio de curva-padrão com diferentes concentrações definidas de AIA comercial. A coloração rosa-avermelhada das amostras indicou a produção de auxinas. Para avaliar a capacidade dos isolados quanto à atividade amilolítica, celulolítica, proteolítica, esterásica e lipolítica, os mesmos foram inoculados em meio de cultura sólido contendo o substrato da enzima de interesse com posterior adição de corantes para visualizar os resultados por meio da formação de halos com contraste de cor em relação ao meio. As bactérias isoladas também foram testadas quanto à capacidade de inibir *in vitro* fungos fitopatogênicos. Os resultados são descritos na tabela a seguir. Como resultado do isolamento das bactérias endofíticas do café, obtivemos 33 isolados purificados. Quanto à solubilização de fosfato (Figura 1), foi verificado que 33% dos isolados bacterianos possuem essa capacidade, dos 33 testados. Em relação à FBN, os resultados revelaram que 27% isolados apresentaram resultado positivo para essa atividade. Quanto a capacidade de produção de AIA também foi verificado que 27% isolados apresentaram produção significativa da auxina. Em relação a produção de enzimas, foi observada atividade proteolítica (24%) (Figura 2), lipolítica (12%) e esterásica (18%). No teste de antagonismo 9% dos isolados bacterianos tiveram a capacidade de inibir *in vitro* o fungo do gênero *Fusarium*. Os resultados apresentados na presente pesquisa indicam o potencial dessas bactérias quanto a fatores de crescimento vegetal e produção de enzimas. A próxima etapa da pesquisa será identificar esses isolados bacterianos por meio do sequenciamento do gene 16S rDNA; assim como, avaliar a inoculação dessas bactérias em mudas de café; objetivando verificar *in vivo* o desempenho para promoção de crescimento vegetal nessa importante cultura agrícola.

**Tabela 1** – Porcentagem de isolados bacterianos com atividade positiva

Atividades de promoção de crescimento vegetal e enzimática de	
Testes <i>in vitro</i>	Isolados bacterianos com
Solubilização de fosfato	33
Fixação biológica de nitrogênio	27
Produção de ácido indolacético	27
Biocontrole de <i>Fusarium</i>	9
Atividade proteolítica	24
Atividade lipolítica	12
Atividade esterásica	18



**Imagem 1** – Avaliação da solubilização de fosfato *in vitro* por isolados bacterianos endofíticos de café.



**Imagem 2** – Atividade enzimática proteolítica *in vitro* por isolados bacterianos endofíticos de café.