

BACTÉRIAS EXTREMÓFILAS FACULTATIVAS MELHORANDO A GERMINABILIDADE DE SEMENTES DE *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake¹

Eder Marques², Kleiton Rodrigues Aquiles³, Luiz Eduardo Bassay Blum⁴ e Carlos Hidemi Uesugi²

RESUMO – Neste estudo, avaliou-se o efeito da microbiolização de sementes com bactérias extremófilas facultativas (*Bacillus* sp. e *Enterobacter* sp.), isoladas, em trabalhos anteriores, a partir de condições extremas de pH e NaCl e capazes de levar ao incremento na fitomassa de eucalipto, na germinação de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. Para avaliar a germinabilidade, foram mensurados o tempo médio, a velocidade e o coeficiente de velocidade de germinação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 11 tratamentos (cinco estirpes de *Bacillus* sp., cinco de *Enterobacter* sp. e uma testemunha sem bactéria), formados por oito repetições com 25 sementes cada. Os resultados do estudo indicaram que as estirpes UnB 1366 e UnB 1374 de *Bacillus* sp. reduziram, significativamente, menor tempo médio e maiores coeficientes e velocidades de germinação em relação às demais estirpes.

Palavras-chave: Microbiolização de sementes; Tempo médio de germinação; *Bacillus* sp.

FACULTATIVE EXTREMOPHILE BACTERIA IMPROVING THE GERMINABILITY OF *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake SEEDS

ABSTRACT – In this study the effect of seed microbiolization with facultative extremophile bacteria (*Bacillus* sp. and *Enterobacter* sp.), isolated in previous work, from extreme conditions of pH and NaCl and able to increase eucalyptus phytomass, on seed germinability of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake was evaluated. Mean germination time, speed of germination and coefficient of speed germination were measured to evaluate germinability. The experiment was conducted in a completely randomized design including 11 treatments (five strains of *Bacillus* sp., five of *Enterobacter* sp. and one control without bacteria), formed by 8 replicates with 25 seeds each. The results showed that *Bacillus* sp. strains UnB 1366 and UnB 1374 significantly reduced the lower mean germination time and higher coefficients and speed of germination in relation to the other strains.

Keywords: Seed microbiolization; Average germination time; *Bacillus* sp.

1. INTRODUÇÃO

Estudos de prospecção de microrganismos benéficos são realizados há várias décadas, e diferentes grupos de bactérias são utilizados de forma a melhorar o crescimento vegetal (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Entre os parâmetros utilizados para avaliar a promoção do crescimento vegetal, está a germinabilidade, realizado por meio das medidas de tempo e velocidade de

germinação (ROMEIRO, 2007), envolvendo o uso de expressões matemáticas e testes estatísticos (SANTANA; RANAL, 2004).

A germinação é uma sequência de eventos fisiológicos, influenciada por fatores ambientais e internos (dormência, inibidores e promotores da germinação) às sementes. Trata-se de um fenômeno biológico, considerado como a retomada do crescimento do embrião,

¹ Recebido em 22.03.2013 aceito para publicação em 30.04.2014.

² Departamento de Fitopatologia, Bacteriologia Vegetal, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil. E-mail: <eder.marques.08@gmail.com> e <uesugich@unb.br>.

³ Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, Brasil. E-mail: <kleitonaquiles1@gmail.com>.

⁴ Departamento de Fitopatologia, Fungos Fitopatogênicos, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil. E-mail: <luizblum@unb.br>.



com o subsequente rompimento do tegumento pela radícula. Entre os principais fatores que afetam a germinação, podem ser citados: luz, temperatura, disponibilidade de água e oxigênio. Entre os fatores do ambiente, a água é o mais importante. Com a absorção de água, por embebição, a reidratação dos tecidos intensifica a respiração e todas as outras atividades metabólicas, que resultam no fornecimento de energia e nutrientes necessários para a retomada de crescimento (NASSIF et al., 1998).

Além da melhora do enraizamento, as bactérias benéficas têm múltiplas funções, agindo no controle de fitopatógenos, indução de germinação, promoção do crescimento e aumento do estabelecimento de mudas no campo após o transplantio (LUZ, 1996; MAFIA et al., 2009). Todos esses benefícios podem ser alcançados através de técnicas como a microbiolização ou pré-imunização de sementes, estacas ou mudas.

Alguns grupos de bactérias já foram relatados beneficiando a germinação de sementes em diferentes espécies vegetais. Araújo et al. (2010) verificaram que sementes de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas tiveram a velocidade de germinação aumentada. Schlindwein et al. (2008) observaram que rizóbio, conhecido por sua capacidade de fixar nitrogênio, aumentou os parâmetros de germinação de não leguminosas como o alface. Além da utilização direta de estirpes bacterianas, é comum a realização de formulações ou misturas, tal como a realizada por Araújo (2008), em que a inoculação com um formulado contendo *Bacillus subtilis* e farinha de ostra levou a uma interação positiva, proporcionando aumento de emergência em sementes de soja e algodão.

Em eucalipto, Campello (1992) observou aumento da germinação de sementes com o uso de estirpes de *Pseudomonas fluorescens*, *P. marginalis* e *B. subtilis*. Entretanto, por quase não se utilizarem sementes como forma de propagação dessa planta, trabalhos que descrevam a germinabilidade beneficiada pelo uso de bactérias são escassos.

Recentemente, Marques e Uesugi (2013) isolaram bactérias de diferentes tipos de solos e em condições ambientais extremas (chamadas de “extremófilas facultativas”), a fim de estudar seu efeito no aumento da fitomassa de plantas de eucalipto. Tais autores verificaram que estirpes dos gêneros *Bacillus* sp. e *Enterobacter* sp. foram capazes de aumentar a massa de matéria seca, tanto de raízes quanto de parte aérea

dessa planta. Adicionalmente, foi observada também uma aparente indução na germinação das sementes, apesar de não ter sido feito naquele momento qualquer estudo ou medida. Diante disso, foi objetivo deste trabalho: verificar um possível aumento nos parâmetros de germinabilidade de sementes microbiolizadas com estirpes de bactérias extremófilas facultativas previamente identificadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de realização dos experimentos, origem das sementes e estirpes bacterianas

O experimento foi conduzido no Laboratório de Bacteriologia Vegetal, do Departamento de Fitopatologia, da Universidade de Brasília, Brasília, DF. Utilizaram-se sementes de *Eucalyptus urophylla* cedidas pelo Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF) e estirpes bacterianas recuperadas da Coleção de Bactérias do Departamento de Fitopatologia, da Universidade de Brasília (Tabela 1), obtidas originalmente de estudos anteriores (MARQUES; UESUGI, 2013).

2.2. Desinfestação superficial e microbiolização das sementes

A higienização das sementes foi realizada pela imersão em álcool 70% (30 s), seguida da imersão em solução de hipoclorito de sódio 1% (3 min) e lavagem em água destilada esterilizada, por duas vezes consecutivas.

Tabela 1 – Descrição das bactérias extremófilas facultativas avaliadas nos testes de germinação de sementes de *Eucalyptus urophylla*.

Table 1 – Description of facultative extremophile bacteria evaluated in germination tests of *Eucalyptus urophylla* seeds.

Estirpes	Condição inicial de isolamento	Gênero
UnB 1366	pH 3	* <i>Bacillus</i> sp.
UnB 1367	pH 5	<i>Enterobacter</i> sp.
UnB 1368	pH 5	<i>Bacillus</i> sp.
UnB 1369	pH 7	<i>Enterobacter</i> sp.
UnB 1370	pH 7	<i>Enterobacter</i> sp.
UnB 1371	pH 7	<i>Enterobacter</i> sp.
UnB 1372	pH 9	<i>Bacillus</i> sp.
UnB 1373	pH 10	<i>Enterobacter</i> sp.
UnB 1374	10% NaCl	<i>Bacillus</i> sp.
UnB 1375	15% NaCl	<i>Bacillus</i> sp.

*Identificação feita com base no sequenciamento do gene do 16S rDNA (MARQUES; UESUGI, 2013).

*Identification based on sequencing of 16S rDNA gene (MARQUES; UESUGI, 2013).

Em seguida, as sementes foram imersas em uma suspensão bacteriana na concentração aproximada de 10^9 UFC mL⁻¹ (escala 7 de McFarland), agitadas a 150 rpm em incubador rotativo, a 28 °C por 24 h, com exceção das sementes-testemunhas que foram mantidas nas mesmas condições, porém em água destilada esterilizada. Após esse período, foram semeadas em placas contendo meio ágar-água (20%), como substrato para manutenção da umidade, e mantidas sobre bancadas à temperatura (24 ~ 25 °C) e luz ambiente.

2.3. Condução do estudo: observação da germinação

Foram consideradas como germinadas as sementes com o rompimento do tegumento pela radícula (NASSIF et al., 1998). As observações foram feitas diariamente, a partir do segundo dia do ensaio, realizado às 10 h da manhã. As sementes com radículas emergidas a cada dia foram contadas e descartadas no mesmo horário até o vigésimo primeiro dia, após o início do ensaio.

2.4. Delineamento experimental e análise dos dados

O delineamento foi o inteiramente casualizado com oito repetições, compostas por 25 sementes, incluindo os 10 tratamentos mais a testemunha. Com base nos dados de germinação, foram calculados: o tempo médio de germinação, a velocidade de germinação e o coeficiente de velocidade de germinação, utilizando-se as seguintes equações (SANTANA; RANAL, 2004):

- $T = \Sigma(fi * xi) / \Sigma(fi)$ (dias)
tempo médio de germinação (1)
- $v = 1/T$ (dias⁻¹)
velocidade de germinação (2)
- $CVG = [\Sigma(fi) / \Sigma(fi * xi)] * 100$ (%)
coeficiente de velocidade de germinação (3)

em que f_i = número de sementes germinadas no i -ésimo dia; e x_i = número de dias contados da semeadura até o dia da leitura.

Os dados do ensaio foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando o Programa Assistat 7.6 beta (SILVA; AZEVEDO, 2009). As médias dos valores dos parâmetros de germinabilidade foram comparadas pelo teste T, a 5% de probabilidade.



3. RESULTADOS

A análise dos resultados permitiu observar que quase todos os tratamentos com as estirpes bacterianas levaram à diminuição no tempo de germinação e ao aumento na velocidade de germinação das sementes de eucalipto, exceto pelo tratamento com a estirpe UnB 1370.

O tratamento com a estirpe UnB 1366 foi o que proporcionou o menor valor (8,6 dias) de tempo médio de germinação (Figura 1), sendo semelhante estatisticamente somente ao UnB 1374 (10,3 dias), ou seja, as sementes germinaram mais rapidamente. Ao contrário dos dois tratamentos anteriores, a utilização da estirpe UnB 1370 conduziu a um tempo maior (12,8 dias) que o da testemunha (12,5 dias), também não se diferindo estatisticamente de UnB 1373 (12,3 dias), UnB 1371 (12,3 dias), UnB 1369 (12,2 dias), UnB 1367 (12,0 dias), UnB 1375 (11,9), UnB 1368 (11,5 dias) e UnB 1372 (11,5 dias).

A comparação das médias de velocidade de germinação com o teste T mostrou que as sementes microbiolizadas com a estirpe UnB 1366 (0,12 dia⁻¹) germinaram com maior rapidez do que a testemunha (0,08 dia⁻¹) e demais tratamentos, inclusive com diferença estatística significativa (Figura 2).

O coeficiente de velocidade de germinação é apenas a velocidade multiplicada por 100, variando de 0% a 100%, o que facilita o raciocínio. Assim como na

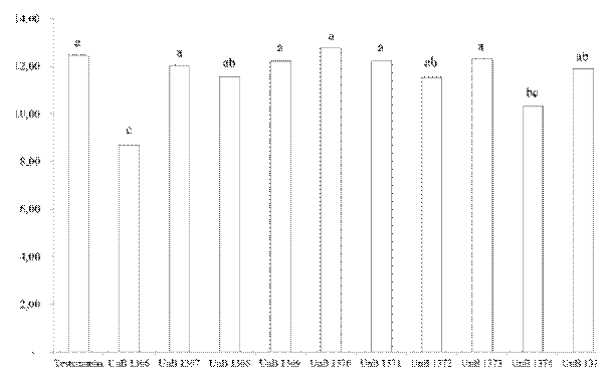


Figura 1 – Tempo médio de germinação em dias (Eixo y) de sementes tratadas com bactérias extremófilas facultativas (Eixo x). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste T ($P \leq 0,05$).

Figure 1 – Mean germination time in days (y axis) of seeds treated with facultative extremophile bacteria (x axis). Means followed by the same letter do not differ statistically by T test ($P \leq 0.05$).

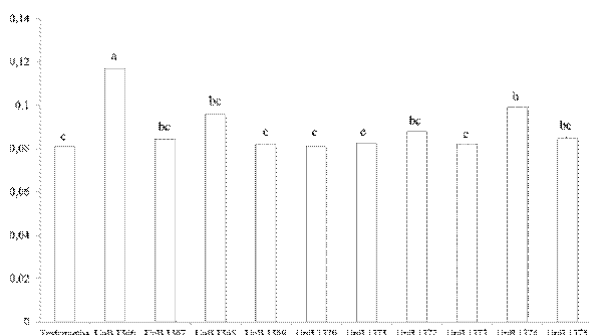


Figura 2 – Velocidade de germinação em dias⁻¹ (Eixo y) de sementes tratadas com bactérias extremófilas facultativas (Eixo x). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste T ($P \leq 0,05$).

Figure 2 – Germination speed in days⁻¹ (y axis) of seeds treated with facultative extremophile bacteria (x axis). Means followed by the same letter do not differ statistically by T test ($P \leq 0.05$).

velocidade média, quanto maior o valor, mais rápido a semente germinou. Por isso, a estirpe UnB 1366 (11,7%) também se destacou individualmente da testemunha (8,1%) e dos demais tratamentos (Figura 3).

4. DISCUSSÃO

A medida do tempo é uma variável muito usada para descrever a amostra de sementes estudada. Neste estudo, o cálculo foi realizado usando médias ponderadas,

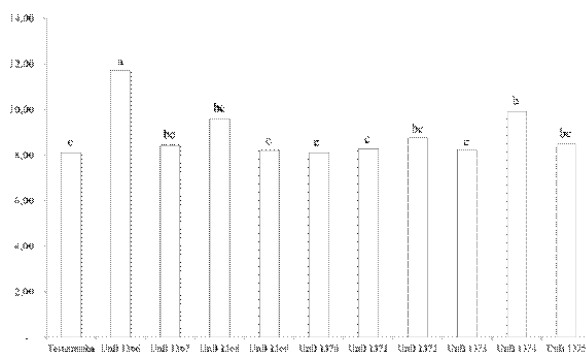


Figura 3 – Coeficiente de velocidade de germinação em % (Eixo y) de sementes tratadas com bactérias extremófilas facultativas (Eixo x). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste T ($P \leq 0,05$).

Figure 3 – Coefficient of germination speed in % (y axis) of seeds treated with facultative extremophile bacteria (x axis). Means followed by the same letter do not differ statistically by T test ($P \leq 0.05$).

pois levam em consideração que número variável de sementes germinou em cada tempo, diminuindo, assim, a influência da variação (SANTANA; RANAL, 2004). Como na espécie *E. urophylla* não existem especificações quanto a substrato ou tempo para contagem inicial na regra para a análise de sementes (BRASIL, 2009), o experimento foi realizado da forma descrita.

Entre relatos da literatura, avaliando a germinabilidade na interação sementes-bactérias, Araújo et al. (2010) observaram que bactérias diazotróficas (*Herbaspirillum* sp., *H. seropedicae*, *Burkholderia brasilensis* e *Azospirillum* sp.) inoculadas em sementes de arroz armazenadas há quatro anos, aumentaram a porcentagem de germinação, pois também inibiram *in vitro* o desenvolvimento do fungo de pós-colheita *Fusarium* sp. Neste estudo, não foi avaliada a inibição de patógenos de sementes, já que elas foram desinfestadas superficialmente, mas pôde-se notar o benefício das estirpes bacterianas nos parâmetros avaliados.

Em plantas de soja e algodão, Araújo (2008) observou que um formulado de *Bacillus subtilis* com farinha de ostras levou a uma interação positiva, aumentando a velocidade de germinação das sementes. A interação das bactérias aliada a fontes nutritivas deve ser investigada futuramente nas estirpes aqui estudadas, já que experimentos como o citado anteriormente mostram resultados positivos.

Em sementes de alface, isolados de *Bradyrhizobium* sp., noduladores originalmente de plantas de acácia-negra, elevaram os parâmetros de germinação das sementes dessa hortaliça, pois produziam ácido indolacético (AIA) em quantidades adequadas (SCHLINDWEIN et al., 2008).

Em eucalipto, Campello (1992) relatou o aumento da germinação de sementes com o uso de *P. fluorescens*, *P. marginalis* e *B. subtilis*, além do incremento na massa seca e na altura das plântulas. Também em eucalipto e em estudos prévios, a estirpe UnB 1366 de *Bacillus* sp. levou ao maior ganho de matéria seca de parte aérea do híbrido “Urograndis” de eucalipto (MARQUES; UESUGI, 2013). Neste estudo, a mesma estirpe bacteriana reduziu o tempo de germinação das sementes da espécie *E. urophylla*, confirmando seu efeito benéfico.

Os integrantes do gênero *Bacillus* (Família: Bacillaceae) possuem grande diversidade e habilidade fisiológica (GARRITY et al., 2005), inclusive com relato na promoção do crescimento vegetal e aumento de

germinação. Sabendo que na germinação, após a absorção de água, ocorre acréscimo no teor de enzimas e aumento da atividade metabólica (KRAMER; KOZLOWSKI, 1972) e que nesse experimento as sementes foram microbiolizadas em uma suspensão bacteriana, é provável que no momento da reidratação as bactérias penetraram as sementes e agiram aumentando a germinação, tanto na produção de enzimas próprias quanto na indução da produção de enzimas pelas sementes.

Apesar do benefício geral das estirpes, o tratamento com a estirpe UnB 1370 mostrou interação negativa, pois levou a um tempo de germinação maior e a um coeficiente de velocidade de germinação semelhante ao da testemunha. Nos experimentos anteriores, foram as sementes microbiolizadas com as estirpes UnB 1367 (*Enterobacter* sp.) e UnB 1374 (*Bacillus* sp.), que levaram ao baixo incremento de massa seca de parte aérea e biomassa de raízes. Segundo Kloepper e Schorth (1978), bactérias colonizadoras de plantas podem ter efeito benéfico, neutro ou deletério às suas hospedeiras. Schlindwein et al. (2008) observaram que alguns isolados bacterianos tinham efeito deletério em sementes de alface, pois produzem AIA numa faixa tóxica. Procópio (2004) avaliou a promoção de crescimento em eucalipto com bactérias endofíticas dessa planta e também observou interação negativa. Assis et al. (1995) constataram que *Pseudomonas* do grupo das fluorescentes e *B. subtilis* não aumentaram a germinação de rabanete; pelo contrário, causaram redução na germinação. Tais relatos podem justificar a interação negativa bactéria-planta, observada na estirpe UnB 1370.

Levando em consideração os argumentos supracitados, novos testes devem ser realizados tanto do ponto de vista da interação das estirpes bacterianas quanto da forma de veiculação destas, uso de fontes nutritivas e, principalmente, elucidação de quais compostos agem na promoção de crescimento de eucalipto, mostrada em estudos anteriores (MARQUES; UESUGI, 2013) e na indução de germinação agora observada. Isso pode ser alcançado através do uso de técnicas, tal como a cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE (MALDANER et al., 2010).

5. CONCLUSÃO

O estudo em questão permitiu confirmar que estirpes bacterianas de *Bacillus* sp. (UnB 1366 e 1374), obtidas de condições ambientais extremas para pH e NaCl, foram capazes de acelerar a germinação das sementes de *E. urophylla*.

6. AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF), por ceder as sementes de *Eucalyptus urophylla* utilizadas neste estudo.

7. REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, A. E. S. et al. Germinação e vigor de sementes de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas. **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, n.4, p.932-939, 2010.
- ARAÚJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.2, p.456-462, 2008.
- ASSIS, S. M. P. et al. Ação de rizobactérias no crescimento de rabanete e no controle biológico da podridão negra e da antracnose. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.38, n.3, p.843-850, 1995.
- CAMPELLO, F. B. B. **Controle biológico de *Cylindrocladium scoparium* Morgan, agente causal do tombamento de mudas de *Eucalyptus* spp., com bactérias antagonistas**. 1992. 84f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1992.
- GARRITY, G. M. et al. **The firmicutes**. Bergey's manual of systematic bacteriology. East Lansing: Michigan State University, 2009. 1450p.
- KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. M. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 4., 1978, Angers. **Proceedings...**Angers: 1978. p.879-882.
- KRAMER, P. J.; KOZLOWSKI, T. **Fisiologia das árvores**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1972. 745p.
- LUZ, W. C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.4, p.1-49, 1996.
- MAFIA, R. G. et al. Microbiolização e interação entre rizobactérias promotoras do crescimento em clones de eucalipto. **Revista Árvore**, v.33, n.5, p.789-797, 2009.



MALDANER, L. et al. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v.33, n.7, p.1559-1568, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regra para análise de sementes**. Brasília: 2009. 399p.

MARQUES, E.; UESUGI, C. H. U. Avaliação de bactérias extremófilas facultativas na promoção do crescimento do híbrido “urograndis” de eucalipto, a partir de sementes. **Revista Árvore**, v.37, n.1, p.41-47, 2013.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2006. 729p.

NASSIF, S. M. L. et al. **Fatores externos (ambientais) que influenciam na germinação de sementes**. 1998. Disponível em: <<http://www.ipef.br/tecsementes/germinacao.asp>>. Acesso em: 08 mar. de 2013.

PROCÓPIO, R. E. **Diversidade de bactérias endofíticas de *Eucalyptus* spp. e avaliação do seu potencial biotecnológico**. 2004. 120f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de doenças de plantas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 172p.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. **Análise da germinação, um enfoque estatístico**. Brasília: Universidade de Brasília, 2004. 248p.

SCHLINDWEIN, G. et al. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.658-664, 2008.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal components analysis in the software assistat-statistical attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7. Reno, 2009. **Proceedings...** Reno: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009. p.393-396.