CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL

Erick Parize (PIBIC/CNPq/UEPG), Vanilda Mroginski de Souza, Fernanda Carolina da Silva, Rafael Mazer Etto, Carolina Weigert Galvão (Orientadora), e-mail: carolinawgalvao@hotmail.com.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética.

Bioquímica: Bioquímica dos Microrganismos.

Palavras-chave: Espectrometria de massa, Sideróforos, Ácido indol acético.

Resumo

As bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) agem de forma benéfica as plantas, aumentando seu crescimento e produtividade, e destacam-se ao fixar biologicamente o nitrogênio (FBN), produzir sideróforos e fitohormônios. O objetivo deste trabalho foi identificar bactérias do solo e avaliar a capacidade de promoverem o crescimento vegetal. A avaliação da produção de sideróforos desses isolados foi determinada a partir da formação de halo dos isolados crescidos em meio CAS Agar. Para avaliar a produção de AIA, foi utilizado reagente Salkowski para a análise espectrofotométrica. A identificação das bactérias procedeu pelo sequenciamento parcial do gene 16S RNAr e a análise por MALDI-TOF consistiu na geração de espectros característicos de cada isolado. Foi possível isolar 193 bactérias diazotróficas, 43 delas foram selecionadas como potenciais promotoras do crescimento vegetal e todas apresentaram positividade para a produção de sideróforos e de ácido indol acético. Foi identificado um isolado como *Enterobacter* sp. e a análise por MALDI-TOF demonstrou diferentes agrupamentos dos isolados. Conclui-se que devido a um bom desempenho nos testes *in vitro* alguns isolados apresentam potencial como futuros inoculantes promotores do crescimento vegetal.

Introdução

As Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal (BPCV) têm sido amplamente empregadas no desenvolvimento agrícola atuando como fertilizantes naturais de plantas (BALDANI et al., 2014). Essas bactérias são vistas como uma alternativa altamente promissora, já que são responsáveis por diversas atividades tais como: fixação biológica do nitrogênio, produção de sideróforos e fitohormônios.

A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é realizada somente por procariotos que transformam o nitrogênio molecular (N2) em amônia (NH3), permitindo assim sua assimilação pelas plantas (BALDANI et al., 2014). Os sideróforos são definidos como agentes quelantes de específicos íons férricos, sintetizados por bactérias e fungos durante a limitação de ferro (NEILANDS, 1995). O ácido Indol acético é um fitohomônio produzido pelas bactérias que em interação com as plantas tem o potencial de interferir no crescimento e desenvolvimento radicular (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007).

Devido à importância dessas BPCV, há a necessidade de maior compreensão da diversidade bacteriana para otimizar a sua utilização. Dentre os testes moleculares para identificação, destaca-se o sequenciamento do gene 16S RNAr e pela metodologia de espectrometria de massas. O objetivo deste trabalho foi identificar bactérias do solo e avaliar a capacidade de promoverem o crescimento vegetal.

Materiais e Métodos

Isolamento das bactérias rizosféricas: O isolamento da rizosfera do trigo foi realizado segundo Baldani et al. (2014).

Avaliação da produção de sideróforos: A avaliação da produção de sideróforos foi adaptado do método universal para avaliação em placas de CAS-Ágar de Schwyn e Neilands (1987). A avaliação da produção foi realizada ao sétimo dia e a presença de um halo laranja indicou atividade positiva.

Avaliação da produção de Ácido Indol Acético: A capacidade de produção de AIA foi determinada de acordo com o método descrito por Glickmann e Dessaux (1995), através da reação do reagente de Salkowski com o sobrenadante do isolado, na proporção 1:1 para a análise espectrofotométrica. Os isolados que apresentaram coloração avermelhada na reação foram considerados positivos e o que apresentaram cor amarela negativo.

Sequenciamento parcial do gene 16S RNAr: A sequência do gene 16S RNAr foi determinada utilizando colônia bacteriana isolada como molde, 27F/1492R (LANE, 1991) como iniciadores, seguindo o programa de PCR, a reação de sequenciamento e a análise das sequencias como descritos por Silva (2014).

Caracterização por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF: A preparação das amostras, calibração do equipamento e análise dos espectros foram realizadas segundo Stets et al (2013). Na análise dos espectros também foi utilizado o programa estatístico R (R core Team, 2012) para geração de dendrogramas. Para se ter a noção do agrupamentos das bactérias foi utilizado picos de bactérias de diferentes estirpes identificadas do Laboratório, sendo elas *Bacillus* sp. (filo Firmicutes), *Achromobacter* sp. (Proteobacteria), *Pseudomonas* sp. (Proteobacteria), *Stenotrophomonas* sp. (Proteobacteria), *Rhizobium* sp. (Proteobacteria) e *Pantoea* sp. (Proteobacteria). Estes isolados foram colocados juntos as amostras desconhecidas gerando a tabela com os picos de cada isolado. Os picos obtidos nas réplicas foram agrupados formando ao final um espectro “virtual” da bactéria analisada.

Resultados e Discussão

Após a passagem das amostras rizosféricas pelos meios semi-sólidos, foram obtidos 193 isolados diazotróficos (fixadores de nitrogênio). Todos os isolados foram submetidos a cinco diferentes avaliações de atividades bioquímicas, destes 39 apresentaram três atividades e 4 apresentam quatro atividades, totalizando 43 isolados com mais de três atividades, os quais serão aprofundados nesse trabalho.

Todos os 43 isolados apresentaram positividade tanto para a produção de sideróforos quanto de AIA. É possível ver alguns destaques positivos dessas potencias BPCV, dentre as 43 é possível identificar 9 com alta produção de sideróforos e 8 com alta produção de ácido Indol acético e dentro dessas, duas se destacam por apresentar alta produção em ambos os testes, R1SJ1 e R3AJ2.

Os sideróforos, por exemplo, são sintetizados somente em situação de escassez de ferro assimilável. Desse modo, as bactérias podem quelar o ferro do ambiente e disponibiliza-lo para as plantas reduzindo o acesso do mesmo para os demais organismos, como os patogênicos, além de poder induzir o comprimento das raízes (RUNGIN et al., 2012).

Já o ácido Indol acético controla a maioria dos processos fisiológicos da planta como alongamento e divisão celular, diferenciação tecidual, dominância apical e repostas a luz e gravidade. O AIA produzido pelas bactérias em interação com as plantas tem o potencial de interferir em qualquer um desses processos aumentando a quantidade regular de auxinas presentes. Estudos com mutantes de *Azospirillum brasilense* na produção de AIA deram suporte ao aumento nos enraizamentos causado pela síntese de AIA, demonstrando a relação das BPCV com a proliferação das raízes (DOBBELAERE et al., 1999).

A identificação através do sequenciamento do gene 16S RNAr foi feita apenas para o isolado R1AN3 que foi identificado como *Enterobacter* sp. A análise foi limitada por falta de reagentes que impossibilitou a continuidade destes processos.
Através da análise feita por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF, foi possível perceber que, provavelmente, devido a diferentes formas de agrupamento gerado pelos picos, há uma grande variedade de espécies e que possivelmente não há um único grupo de espécies isoladas. As bactérias identificadas como as *Bacillus* sp., do filo Firmicutes, foram agrupadas de maneira diferente aos outros isolados identificados pertencentes ao filo Proteobacteria, indicando que os isolados não identificados (R1AJ3, R1AJ5, R1AJ6 e R4AN2), que agruparam com tais bactérias possam também ser deste filo e mais especificamente das classes alfa, beta ou gamma Proteobacteria que são as classes dessas bactérias. Tais agrupamentos indicam uma predominância do filo Proteobacteria entre os isolados desse trabalho assim como visto em outros artigos que analisaram a diversidade de bactérias diazotróficas do solo (DAHAL et al., 2017).

Cabe destacar que o agrupamento gerado pelo MALDI-TOF não reflete a relação filogenética dos isolados, visto que é gerado pela comparação dos diferentes espectros de massa de cada bactéria. No entanto, cada bactéria possui um espectro próprio que pode apresentar picos similares ao de outras bactérias, gerando esse agrupamento (DINGLE; BUTLER-WU, 2013).

O MALDI-TOF, no geral, se destaca dos demais métodos por apresentar melhor precisão que os métodos tradicionais e também maior velocidade. Enquanto que nos métodos tradicionais é necessário o isolamento e o crescimento em meios específicos para os testes bioquímicos, demorando de 24 a 48 horas, a espectrometria do organismo pode levar minutos (DINGLE; BUTLER-WU, 2013).

Conclusões

Conclui-se que foram isolados 193 bactérias diazotróficas, e a partir de testes *in vitro* foi possível selecionar 43 potencias bactérias promotoras do crescimento vegetal, todas produtoras de sideróforos e ácido indol acético. Destes isolados há 9

altas produtoras de sideróforos e 8 altas produtoras de AIA e dentro dessas, duas se destacam por apresentar alta produção em ambos os testes, R1SJ1 e R3AJ2. Tais bactérias são possíveis propostas para seguirem em testes em casa de vegetação e em campo para avaliação da promoção do crescimento vegetal. Foi possível identificar uma bactéria por sequenciamento parcial do gene 16S RNAr, *Enterobacter* sp.. Apesar de a técnica de MALDI-TOF ser mais simples e rápida, é necessária uma ampliação nos bancos de dados e uma maior padronização do protocolo de análise, para maior nível de comparação.

Agradecimentos
Ao CNPq pelo auxílio financeiro

Referências

BALDANI, J. I. et al. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and Soil**, v. 384, n. 1-2, p. 413–431. 2014.

DAHAL, B. Diversity of free-Living nitrogen fixing Streptomyces in soils of the badlands of South Dakota. **Microbiol Res**. V. 195, p. 31-39, 2017.

DINGLE, T. C., BUTLER-WU, S. M. MALDI-TOF mass spectrometry for microorganism identification. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 33 n.3, p. 589-609, 2013.

DOBBELAERE, S. et al. Phytostimulatory effect of Azospirillum brasilense wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, v. 212, n. 2, p. 153–162, 1999.

GLICKMANN, E; DESSAUX, Y. A critical examinaton of the specificity of the Salkowsky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bactéria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, p. 793-796, 1995.

LANE, D. J.; 16S/23S rRNA sequencing. In Stackebrandt, E.; Goodfellow. M.; (Eds.). Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics.**New York (Wiley)**, p. 115-148, 1991.

NEILANDS, J. B. Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 45, p. 26723–26726, 1995.

RUNGIN S, et al. Plant growth enhancing effects by a siderophore-producing endophytic streptomycete isolated from a Thai jasmine rice plant (Oryza sativa L. cv. KDML105). **Antonie Van Leeuwenhoek** v. 102, n. 3, p. 463–472, 2012

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47–56, 1987.

SILVA, Leilane. **Aplicação de espectrometria de massa no controle de qualidade de Inoculantes comerciais agrícolas contendo bactérias promotoras de crescimento vegetal**. 2014,101f. Dissertação (Mestrado em Ciências em Bioquímica) - Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2014.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS microbiology reviews**, v. 31, n. 4, p. 425–48, 1 jul. 2007.

STETS, M. I. et al. Rapid identification of bacterial isolates from wheat roots by high-resolution whole cell MALDI-TOF MS analysis. **Journal of Biotechnology** 165. P.167– 174, 2013.