AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SOLUBILIZAR MINERAIS E IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE ISOLADOS BACTERIANOS.

Vanilda Mroginski de Souza (BIC/CNPq/UEPG), Erick Parize, Letícia Reis, Rafael Mazer Etto, Carolina Weigert Galvão (Orientadora), e-mail: carolwgalvao@yahoo.com.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/ Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética / Setor de Ciências Biológicas e da Saúde

Bioquímica: Bioquímica dos Microrganismos.

Palavras-chave: Bactérias promotoras do crescimento vegetal, solubilização de minerais, MALDI-TOF.

Resumo

Pesquisas envolvendo microorganismos promotores do crescimento vegetal vêm crescendo nos últimos anos, visando uma agricultura sustentável, de alto rendimento e que substitua parcial ou totalmente o uso de fertilizantes químicos. Os microorganismos são de grande importância no desenvolvimento e nutrição da planta devido à presença de mecanismos como a fixação biológica de nitrogênio, solubilização de minerais, entre outros. No presente trabalho a capacidade se solubilizar minerais foi testada em bactérias endofíticas isoladas da raíz de plantas de trigo cultivadas em campo sobre duas condições diferentes, inoculadas com *Azospirilum brasiliense* e sem inoculante, e submetidas a diferentes doses de nitrogênio (0, 40, 80 e 120 kg/ha). Dos 80 isolados endofíticos, 39 apresentaram atividade para solubilização de minerais, (49%). Na sequência, os isolados de interesse foram submetidas ao sequenciamento parcial do gene 16SrRNA e 5 bactérias foram identificadas. Os isolados foram analisados por Espectrometria de Massas de MALDI-TOF, os espectros observados possibilitaram a criação de um dendograma onde é possível observar o agrupamento dos isolados.

Introdução

As pesquisas envolvendo microorganismos promotores do crescimento vegetal vêm crescendo nos últimos anos, visto a importância desses microorganismos no desenvolvimento e nutrição da planta. Essas pesquisas visam uma agricultura sustentável e de alto rendimento através do uso de alternativas para a utilização de fertilizantes químicos, que possuem alto custo e são danosos ao ambiente. A importância dos microorganismos promotores de crescimento esta na sua capacidade de realizar a fixação biológica do nitrogênio, o controle biológico de organismos patogênicos (pela produção de substâncias como o cianeto de hidrogênio e sideróforos); a produção de fitormônios (como o ácido indol acético – AIA); a solubilização de minerais que favorecem o desenvolvimento da planta (Vessey, 2003).

Dentre os minerais, o fósforo (P) é um importante macronutriente para a planta, e tem papel fundamental no seu crescimento, pois participa ativamente nas atividades metabólicas e bioquímicas (GYANESHWAR et al., 2002). Sua reserva nos solos é grande, entretanto, é encontrado principalmente na forma insolúvel como complexos de matéria orgânica ou na forma inorgânica, como precipitados

com íons Ca^{+2}, Fe^{+3} e Al^{+3} (FERREIRA et al., 2011), levando a indisponibilidade de captação das plantas (SANTOS et al., 2012).

A identificação bacteriana feita através de resultados de análises morfológicas e fisiológicas, como análise macroscópica da cultura, provas bioquímicas diferenciais e testes sorológicos, por dependerem de processos metabólicos do microorganismo, o crescimento bacteriano e o tempo de incubação acabam sendo fatores limitantes, além de apresentarem variabilidade e baixo poder discriminatório (ASSIS et al., 2011).

Nos últimos anos surgiram novas técnicas de identificação e classificação de microorganismos, com o intuito de agilizar os resultados e obter identificações mais detalhadas. O avanço das técnicas moleculares propiciou a utilização de análises baseadas na sequência de DNA genômico. Dentre os testes moleculares, destaca-se o sequenciamento do gene 16S rRNA, que tornou-se referência na identificação bacteriana. A espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF é uma técnica que vem sendo bastante utilizada, nas bactérias o principal biomarcador analisado pela técnica são as proteínas, sendo assim, o espectro obtido é exclusivo para cada microorganismo analisado(SAUER; KLIEM, 2010).

Materiais e Métodos

Contagem e isolamento de bactérias diazotróficas

O trigo TBIO Iguaçu foi cultivado no campo em sistema de blocos sobre duas condições de inoculação (sementes inoculadas com *Azospirilum brasiliense* estirpes Abv5/Abv6 e sem inoculante), e quatro doses de nitrogênio (0, 40, 80 e 120 kg/ha) com 3 repetições. Foram coletadas 24 amostras no total, sendo 8 amostras de cada bloco. No laboratório o protocolo de contagem e isolamento de bactérias diazotróficas foi seguido conforme descrito por DÖBEREINER, ANDRADE e BALDANI (1999).

Solubilização de minerais

A capacidade de solubilizar minerais foi determinada em meio de cultivo desenvolvido por Pikovskaya (1948) enriquecido com 0,5% de fosfato de tricálcio $Ca_3(PO_4)_2$ e 0,12% de óxido de zinco (ZnO). A identificação dos isolados com capacidade de solubilizar minerais foi feita através da observação da formação de um halo claro ao redor da colônia. O diâmetro do halo e o diâmetro da colônia foram medidos e da razão entre eles obtido o Índice de Solubilização (IS).

Identificação por sequenciamento parcial do gene 16SrRNA

Uma região especifica do gene 16S RNAr foi amplificada por PCR utilizando os iniciadores 27F/1492R (LANE, 1991) e colônia bacteriana isolada como material genético molde. A reação de sequenciamento e a análise das sequencias seguiu o descrito por Silva (2014).

Caracterização por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF

Colônias isoladas de uma cultura de cada isolado foram lavadas duas vezes, seguindo com centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 5 µL de ácido fórmico e 5 µL de acetonitrila, seguindo com nova centrifugação, 8 µL do sobrenadante foi então transferido para um novo tubo. Cerca de 1 µL do sobrenadante foi depositado manualmente na placa do espectrômetro de

massa e deixados secar à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 1µL da matriz e novamente deixado secar à temperatura ambiente.

O processamento das amostras ocorreu com um espectrômetro de massa MALDI-TOF. O software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics) foi utilizado para o processamento dos espectros, onde foi possível a obtenção das listas de picos por meio do programa MS-Analyser (STETS, 2013).

O espectro "virtual" construído com todos os picos das replicas de cada amostra, foram rodados no programa estatístico R, juntamente com espectros de bactérias já identificadas, gerando um dendograma.

Resultados e Discussão

Foram isoladas 80 bactérias endofíticas da raiz do trigo. Essas bactérias foram testadas quanto à solubilização de minerais. Dos 80 isolados endofíticos, 39 apresentaram-se positivos para solubilização de minerais, (49%). A classificação quanto ao Índice de Solubilização (IS) foi feito como descrito por Hara e Oliveira, 2004. Dos 39 isolados positivos para essa atividade, 10 apresentaram IS baixo e crescimento precoce, 19 apresentaram IS médio e crescimento precoce, 8 apresentaram IS baixo e crescimento tardio e 2 apresentaram IS médio e com crescimento tardio. Observou-se que a grande parte dos isolados positivos para essa atividade foram provenientes dos tratamentos com inoculação.

Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Cinco dos isolados endofíticos foram identificados por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. O isolado E1A1J2A pertencente à espécie *Pseudomonas moraviensis,* E1A1J2BI a espécie *Stenotrophomonas rhizophila*, o isolado E1A1J2BII pertencente ao gênero *Pseudomonas sp.* e os isolados E2A1J3A, E3A1J2AI pertencentes a família *Enterobacteriaceae.*

Avaliação por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF

Grande parte dos isolados endofíticos foi submetida à análise pela técnica de espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF, e um dendograma foi gerado pela similaridade dos espectros de massa obtidos. Bactérias já identificadas anteriormente no laboratório, assim como as cinco identificadas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA serviram de base para observação da distribuição dos isolados no dendograma.

Os isolados E1AN2, E3AJ2 e E3SN1 agruparam junto com o isolado já identificado E1AJ3 do gênero *Pseudomonas sp,* analisando os picos presentes nos espectros de cada isolados fui possível perceber que os picos 5086.63 m/z, 5110.5 m/z, 5127.27 m/z, 5678.34 m/z, são comuns a 75% dos isolados (3), o que resultou no seu agrupamento e supõe-se que os isolados pertençam ao mesmo gênero. Os isolados E1AJ6 e E1AJ4 agruparam com o isolado E1AJ1 já identificado pelo 16S e pertencente ao gênero *Pseudomonas moraviensis* e E2AJ1 da família *Enterobactereaceae,* analisando os picos dos espectros de cada isolado foi possível observar a presença de nove picos em comum entre os quatro isolados, o que explica seu agrupamento no dendograma nos dando a ideia que possivelmente pertençam à mesma espécie ou família. Os isolados E1AJ5, E3AN1 e E1AJ2 (espécie *Stenotrophomonas rhizophila),* agrupados, possuem nove picos em comum aos três isolados indicando grande probabilidade de pertencerem à espécie *Stenotrophomonas rhizophila.*

Conclusões

A partir da avaliação da capacidade de solubilizar minerais, 19 isolados classificados como precoces e médios solubilizadores foram selecionados para a realização de testes em casa de vegetação e a campo. Com a identificação pelo sequenciamento do gene 16S rRNA foi possível observar a presença da família *Enterobactereaceae,* do gênero *Pseudomonas sp* e das espécies *Pseudomonas moraviensis e Stenotrophomonas rhizophila.* Na análise por MALDI-TOF dos isolados, a similaridade dos espectros dos isolados ainda não identificados, com os já identificados, proporcionou diferentes agrupamentos no dendograma, indicando a diversidade de microorganismos presentes no interior das raízes da cultura de trigo.

Agradecimentos

Ao CNPq pela ajuda financeira, a equipe do LABMOM, e a UEPG.

Referências

ASSIS, D. M.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A. A espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de microorganismos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**. Três Corações, v. 9, n. 2, p. 344-355, ago./dez. 2011.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. O.; BALDANI, V. L. D. Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia**, p. 38, dez. 1999.

FERREIRA, D. C. et al. Solubilização de fosfato por bactérias endofíticas isoladas de girassol. **Simbbtec2011**. Londrina, 2011.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 343 - 357, 2004.

PIKOVSKAYA, R. I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activities by some microbial species. **Microbiologia**, v. 17, p. 362-370, 1948.

SAUER, S.; KLIEM, M. Mass spectrometry tools for the classification andidentification of bacteria. **Nature Reviews**. v.8, p.75-82, 2010.

SANTOS, I. B.; LIMA, D. R. M.; BARBOSA, J. G.; OLIVEIRA, J. T. C.; FREIRE, F. J.; SOBRAL, J. K. Diazotrophic bacteria associated to roots of sugarcane: inorganic phosphate solubilization and the salinity tolerance. **Biosci. J**, Uberlândia, v. 28, Supplement1, p. 142-149, Mar. 2012.

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

STETS, M. I. Monitoramento de *Azospirillum brasilense* e estudo da diversidade bacteriana associada a raizes de trigo (*Triticum aestivum*). Tese de Doutorado. Universidade Federal do Parana – UFPR. Curitiba, 2013.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant Soil,** v. 255, p. 571-586, 2003.