

SÍNTESE DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO POR BACTÉRIAS E FUNGOS ISOLADOS DA RIZOSFERA DO SABIÁ (*Mimosa caesalpinifolia*)

Ronald H. R. D. da Silva¹
Lucas Brilhante F. Batista²
Flávio Luiz H. da Silva³
Débora Jamila de Melo⁴
Sharline F. de Melo Santos⁵

RESUMO

Os microrganismos associados às plantas da caatinga se encontram bem adaptados às condições impostas pelo clima, desenvolvendo mecanismos de proteção celular contra o estresse hídrico, assim como proteção vegetal contra a dessecação. Assim, o objetivo deste trabalho constituiu em avaliar o potencial dos microrganismos isolados do solo rizosférico do sabiá, coletados na caatinga paraibana, quanto a sua capacidade de produzir ácido indol-3-acético. As bactérias e fungos testadas nesse estudo, foram inoculadas em caldo nutriente e meio FAN, respectivamente, na ausência e presença da triptona, incubadas sob agitação constante durante 7 dias. Para a avaliação quantitativa, as culturas foram centrifugadas, com a obtenção do sobrenadante, uma alíquota 1,5 ml do sobrenadante foi adicionada à 1 ml de reagente de Salkowski, esta mistura foi incubada no escuro durante 30 minutos, seguidamente foi realizada a leitura óptica das amostras no espectrofotômetro a 540nm para que se avalie a concentração de ácido indol-3-acético sintetizado. Após as análises, 75% das bactérias testadas apresentaram a produção de AIA, variando entre 1,17 g/ml e 50,89 g/ml. Todos os fungos testados foram capazes de sintetizar AIA, a síntese da auxina variou de 7,32 a 38,07 g/ml, tendo 55% com síntese consideradas altas.

Palavras-chave: Bioprospecção, Ácido Indol-3-Acético, Caatinga, desertificação.

¹ Mestrando em eng. Química da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, rddelfino13@email.com;

² Graduado pelo Curso de de eng. Química da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, lucasbrilhante13@yahoo.com.br;

³ Mestre em eng. Química da Universidade Federal de Campina grande - UFCG, demorajamila@gmail.com;

⁴ Doutor pela Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, flavioluizh@yahoo.com.br;

⁵ Professor orientador: Professora do departamento de engenharia química da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, sharline@ct.ufpb.br.

INTRODUÇÃO

A caatinga, bioma nativo brasileiro, possui em seu extenso território uma grande biodiversidade de plantas, animais e um grande potencial microbiológico ainda inexplorado. As condições naturais de estresse hídrico e temperaturas elevadas, caracteriza a caatinga como um bioma bastante seletivo, tendo sua flora bem adaptada a tais condições. Desse modo, quando comparada a outras regiões semiáridas pelo mundo, a caatinga é a área mais biodiversa, que tem o maior conjunto de espécies de fauna e flora (Fernandes, 2022).

Apesar de sua grande extensão, a desertificação da caatinga vem avançando muito nos últimos tempos, 13% do seu território já se encontra em estágio avançado de desertificação. O crescente estresse hídrico na região, é um dos fatores que mais acelera a degradação da caatinga, somado às consequências do desmatamento, cerca de 50% do seu território já foi desmatado (ANTONGIOVANNI et al., 2022).

Dados do Laboratório de Análise e Processamento de Imagens e Satélites (LAPIS), mostra que atualmente a caatinga possui 8,8% de áreas protegidas, ainda assim, menos de 2% da caatinga é área de proteção integral da biodiversidade. Portanto, faz-se necessário ações de restauração desse bioma que carrega consigo inúmeros potenciais desvalorizados e ainda inexplorados.

O conhecimento da biodiversidade e bioprospecção de novos microrganismos tornaram-se um dos focos principais da era biotecnológica, visto que a utilização de microrganismos na busca de soluções nas áreas de meio ambiente e indústria vêm crescendo de forma acelerada no atual cenário mundial (COELHO, 2018). Segundo Kavamura (2012), os microrganismos associados às plantas da caatinga se encontram bem adaptados às condições impostas pelo clima, desenvolvendo mecanismos de proteção celular contra o estresse hídrico, assim como proteção vegetal contra a dessecação. Desse modo, uma das alternativas de recuperação a ser considerada é a de utilização da atividade microbiana como biorremediador e biofertilizante.

O ácido indol-3-acético é considerado o hormônio vegetal mais relevante pelos fisiologistas vegetais (CASSEL et al., 2021). Capaz de regular o crescimento vegetal de plantas, microrganismos e animais. A produção desse fitormônio por microrganismos

associados a plantas, é um dos principais fatores a ser considerado quando se busca cepas com potencial comercial para a promoção de crescimento de plantas (LANA et al., 2017).

Dentre a ampla diversidade da flora nativa da caatinga, nota-se que algumas plantas se sobressaem em meio a paisagem seca. A *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth (Sabiá), se destaca por seu vigor, tamanho e resistência ao estresse hídrico, tais características podem estar associadas a uma intensa atividade microbiana promotora de crescimento vegetal.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho constituiu em avaliar o potencial, *in vitro*, dos microrganismos isolados do solo rizosférico do sabiá, coletados na caatinga paraibana, quanto a sua capacidade de produzir ácido indol-3-acético.

METODOLOGIA

Produção de ácido indol-3-acético por bactérias

Todas as bactérias isoladas foram submetidas ao teste de produção de AIA, conforme a metodologia adaptada de Cavalcanti (2016) e Braga (2016). As bactérias inicialmente isoladas no meio AN (ágar nutriente), estavam mantidas sob refrigeração à 51° C. Para avaliar os microrganismos isolados quanto à capacidade de produzir ácido indol-3-acético (AIA) *in vitro*, cada bactéria foi inoculada em 5 ml de meio líquido caldo nutriente, foram incubadas sob agitação constante para a produção de um pré-inóculo. Após o período de 24h, as alíquotas de 1 ml do pré-inóculo foram inoculadas em 4 ml caldo nutriente, suplementado com e sem triptona, em triplicata, e incubadas sob agitação constante de 140 rpm a 312°C durante 7 dias.

Após os 7 dias, a densidade óptica das culturas foi avaliada em espectrofotômetro a 540 nm, ajustando-se a sua concentração para DO540= 0,5. Após o ajuste da DO540, as alíquotas de 3 ml foram centrifugadas durante 3 min a 6000 rpm.

Com a obtenção do sobrenadante, uma alíquota 1,5 mL do sobrenadante foi adicionada à 1 ml de reagente de Salkowski (2% de FeCl₃ 0,5 M em 35% de ácido perclórico) esta mistura foi incubada no escuro durante 30 minutos, seguidamente foi realizada a leitura óptica das amostras no espectrofotômetro a 540nm para que se avalie a concentração de ácido indol-3-acético sintetizado.

Produção de ácido indol-3-acético por fungos

Os fungos inicialmente isolados no meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar), estavam mantidos sob refrigeração a 51°C. Para a avaliação da produção de AIA, os fungos foram transferidos para o meio de cultura líquido, o meio FAN (Glicose 20 g/l, Extrato de levedura 3 g/l, K₂HPO₄ 0,6g/l, MgSO₄ 0,3g/l) Os isolados foram transferidos, através de discos de aproximadamente 8 mm de diâmetros contendo o micélio e esporos do fungo, para Erlenmeyer contendo 10 ml de meio na ausência e presença de triptona. A concentração de triptona utilizada foi de 100 mg/L.

Após sete dias de crescimento sob agitação constante de 140 rpm a 312°C, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 15min. Para a análise colorimétrica de AIA (GORDON & WEBER, 1951), 1,5 ml do sobrenadante foi adicionada à 1 ml de reagente de Salkowski, esta mistura foi incubada no escuro durante 30 minutos, seguidamente foi realizada a leitura óptica das amostras no espectrofotômetro a 540nm para que se avalie a concentração de ácido indol-3-acético sintetizado.

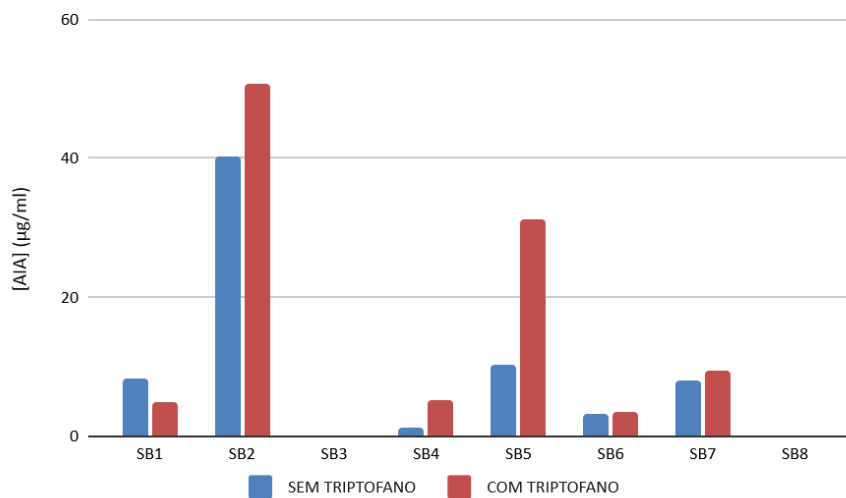
Para a estimativa da produção de ácido indol-3-acético, foi construída uma curva padrão com concentrações conhecidas de AIA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção de AIA por bactérias

De acordo com a concentração de AIA detectada, é considerado que < 1 g/ml baixa produção, 1-10g/ml média produção, 11-50 g/ml alta produção e > 51 g/ml elevada produção. (KAVAMURA et al, 2013). Desse modo, temos que das bactérias testadas, 75% apresentaram a produção de AIA, variando entre produções médias e altas, conforme mostrado na figura 01.

Figura 01: Produção média de AIA das bactérias isoladas do Sabiá.



Assim podemos observar que bactéria intitulada SB2 expressou uma produção do ácido alta de 41 g/ml e 50,89 g/ml, sem e com o triptofano respectivamente. A SB5 obteve uma produção alta de 31,23g/ml com a suplementação do triptofano, as demais bactérias avaliadas obtiveram uma produção considerada média entre 1,17 e 10,27 g/ml com e sem a suplementação do triptofano. Segundo Mirza et al. (2001), a síntese desta auxina pode ser influenciada pelas condições de cultura, estágio de crescimento e disponibilidade de substrato.

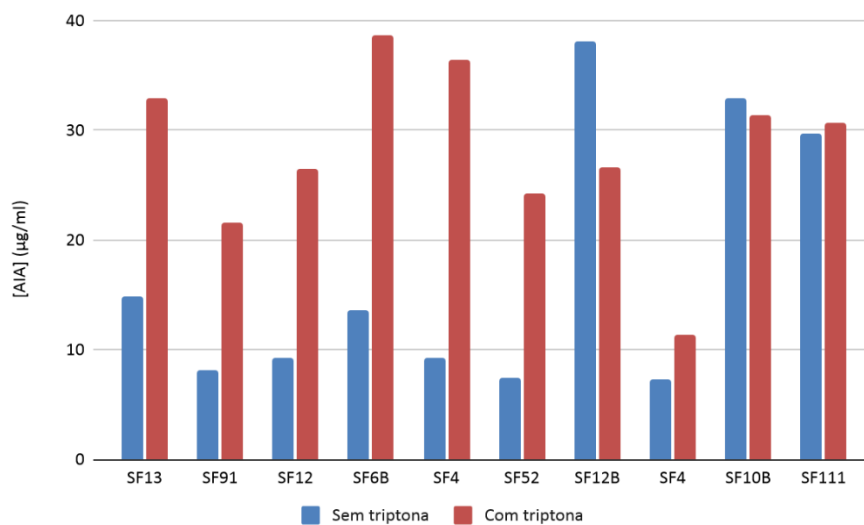
ALBDAIWI (2019) obteve concentrações de AIA de 10µg/mL em média, produzidas por bactérias, sem o aditivo do triptofano, isoladas do solo rizosférico de áreas salinas da região do Mar Morto. De Paula et al. (2022), isolou bactérias do gênero *pseudomonas ssp*, do solo rizosférico do capim Ipojuca (*Paspalum atratum*) onde a produção de AIA variou entre 24.39 e 65.12 g/ml. CASSAN et al., (2009) detectou a concentração de AIA, em inoculantes comerciais, de 6,62 e 13,16 µg/ml para *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*, respectivamente.

Desse modo, os resultados obtidos no presente estudo são promissores, pois 20% das bactérias apresentam síntese semelhante e superior aos identificados por CASSAN (2009). (IBDAIWI, 2019) e PAULA (2022), corroborando assim a promissora síntese de AIA pelos isolados do sabiá, além de direcionar melhor as próximas etapas de seleção e identificação dos microrganismos.

Produção de AIA por fungos

Todos os isolados foram capazes de sintetizar AIA com e sem a presença da triptona. Na ausência do precursor, a síntese de AIA variou de 7,32 a 38,07 g/ml, com os isolados SF12B e SF10B obtendo as maiores concentrações, respectivamente, com a suplementação da triptona, a síntese variou significativamente entre 21,61 e 38,71 g/ml, sendo respectivamente SF6B e SF4 os maiores produtores, conforme mostrado na figura 02.

Figura 02: Produção média de AIA dos fungos isolados do Sabiá.



Carvalho Filho (2008) concluiu que alguns isolados de *Trichoderma* revelaram produção do fitormônio AIA, em testes de filtrados de colônias com o reagente de Salkowski. Oliveira (2012) também identificou a síntese de AIA por fungos do gênero *Trichoderma spp.* Cultivadas no meio FAN obtendo a maior concentração de 19,9 µg/ml. Desse modo, os resultados encontrados são promissores, visto a alta síntese dos isolados SF12B, SF10B e SF111 sem a presença do precursor.

De acordo com Spaepen et al. (2007) são inúmeros os fatores ambientais e químicos que podem modelar a taxa de produção/biossíntese do AIA por microrganismos, incluindo pH, fonte de carbono e aeração. Ademais, é importante a prospecção de novos organismos promissores para o desenvolvimento de formulações inoculantes, especialmente com características que proporcionem atuar nos processos fisiológicos das plantas (SILVA, 2021).

CONCLUSÃO

Diante do exposto, os resultados obtidos neste estudo são promissores, pois 75% as bactérias testadas apresentaram a produção de AIA, variando entre 1,17 g/ml e 50,89 g/ml. Todos os fungos testados foram capazes de sintetizar AIA, a síntese da auxina variou de 7,32 a 38,07 g/ml, tendo 55% com síntese consideradas altas. As demais etapas de seleção estão em andamento, para assim seguirmos para a análise, *in vivo*, dos microrganismos isolados.

AGRADECIMENTOS

A CAPES e a Universidade federal da Paraíba pelo investimento na presente pesquisa.

REFERÊNCIAS

ALBDAIWI RN, Khyami-Horani H, Ayad JY, Alananbeh KM and Al-Sayaydeh R (2019) Isolation and Characterization of Halotolerant Plant Growth Promoting Rhizobacteria From Durum Wheat (*Triticum turgidum* subsp. durum) Cultivated in Saline Areas of the Dead Sea Region. *Front. Microbiol.* 10:1639. doi: 10.3389/fmicb.2019.01639. Acesso em: 24 jul. 2022.

ANTONGIOVANNI, Marina et al. (2022), Prioridades de restauração para florestas secas da Caatinga: resiliência da paisagem, conectividade e valor da biodiversidade, Dryad, Dataset. Disponível em: <https://doi.org/10.5061/dryad.cvdncjt60>. Acessado em: 17 ago. 2022.

BRAGA, A. P. A. Rizobactérias nativas da Caatinga com potencial para redução dos efeitos da seca em soja (*Glycine max* L.). 2016. 88p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP, 2016.

CARVALHO FILHO, M.R. *Trichoderma* spp. como agentes de biocontrole de *Cylindrocladium scoparium* e como promotores de crescimento de mudas de eucalipto. Brasília: Universidade de Brasília, 2008. 74p. Dissertação de mestrado.

CASSAN, F. et al. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur. J. Soil Biol.*, v.45, n.1, p.28-35, 2009

PAULA, A. F. et al. Endophytic and rhizospheric bacteria associated with *Paspalum atratum* and its potential for plant growth promotion with different phosphate sources. *Frontiers in plant science*, v. 13, p. 884716, 2022.

FAN, L. Produção de exopolissacarídeos de *Agaricus blazei* teste antitumorais. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2002. 86p. Tese Doutorado.

MARCHIORO, T.E.L. 2005. Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio. Tese de Doutorado, Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

KAVAMURA, V.N.; SANTOS, S.N.; SILVA, J.L.; PARMA, M M.; AVILA, L A. .Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. Microbiological Research^Jaangnunä,jv. 168, p. 183-191, 2013.

SILVA, João Manoel da. Bioprospecção de fungos rizosféricos associados à cactáceas em área de processo de desertificação para promoção de crescimento em plantas. 113 f. 2021. Tese (doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química e Biotecnologia, RENORBIO, Universidade Federal de Alagoas, Maceió. 2021.