

# CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE COROA DE FRADE (*MELOCACTUS* sp.) NO SEMIÁRIDO PERNAMBUCANO

Gabiane dos Reis Antunes<sup>1</sup>, João Marcos Rodrigues dos Santos<sup>2</sup>, Thaise Rosa da Silva<sup>3</sup>, Beatriz Rodrigues Carvalho<sup>4</sup>, Paulo Ivan Fernandes Junior<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Doutoranda em Zootecnia UFC, Bolsista CAPES/Embrapa Semiárido, Petrolina/ PE, gabianezeoot@gmail.com; <sup>2,3,4</sup>Graduação em Ciências Biológicas UPE, Estagiário Embrapa Semiárido, Petrolina/ PE, joaorodriguesestagio.embrapa@gmail.com; thaiserosa22@hotmail.com; bearcepe@outlook.com; Pesquisador Embrapa Semiárido, Petrolina/ PE, paulo.ivan@embrapa.br

**RESUMO:** Objetivou-se avaliar a produção de ácido indol-acético de bactérias, isoladas a partir da Coroa de frade (*Melocactus* sp.). Para as avaliações foram coletadas três amostras de raízes de Coroa de Frade (*Melocactus* sp.) de duas áreas diferentes. O isolamento das bactérias, as raízes foram lavadas e, desinfestadas. As amostras foram fragmentadas e diluídas, em meio semissólido BMGM e aqueles que desenvolveram película foram considerados positivos para determinação das populações de bactérias diazotróficas e foram purificadas em placas de Petri contendo meio Dyg's. Posteriormente foi realizada a caracterização bioquímica dos isolados, avaliando a produção do ácido indol-acético. Todos os 38 isolados foram capazes de produzir AIA "in vitro" na presença e ausência de L-triptofano. O isolado C1 produziu cerca de 53% a menos de ácido indol-acético, enquanto que nos resultados do isolado C39 a produção é cerca de 300% maior em relação a bactéria referência. No que diz respeito a ausência do precursor, o isolado C1 produziu cerca de 60% a menos de ácido indol-acético quando comparado a bactéria de referência (*Azospirillum*), já o isolado C39 produziu cerca de 250% a mais que a bactéria referência. Bactérias endofíticas isoladas de Coroa de Frade são capazes de produzir ácido indol-acético na presença e ausência de seu principal precursor.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cactaceas, Ácido indol-3-acético, Fixação de Nitrogênio.

## BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF ISOLATED BACTERIA OF FROG CROWN (*MELOCACTUS* sp.) IN THE SEMIÁRID PERNAMBUCANO

**ABSTRACT:** The objective of this study was to evaluate the indole-acetic acid production of bacteria, isolated from the Crown of Friar (*Melocactus* sp.). For the evaluations, three samples of Crown of Frade (*Melocactus* sp.) Roots were collected from two different areas. Isolation of the bacteria, the roots were washed and disinfested. The samples were fragmented and diluted in BMGM semi-solid medium and those that developed film were considered positive for determination of the populations of diazotrophic bacteria and were purified in Petri dishes containing Dyg's medium. Subsequently, the biochemical characterization of the isolates was performed, evaluating the production of indole-acetic acid. All 38 isolates were able to produce "in vitro" IAA in the presence and absence of L-tryptophan. Isolate C1 produced about 53% less of indole-acetic acid, whereas when we observed the results of isolate C39 the production is about 300% greater relative to the reference bacterium. Regarding the absence of the precursor, isolate C1 produced about 60% less of indole-acetic acid when compared to the reference bacterium (*Azospirillum*), while isolate C39 produced about 250% more than the reference bacterium. Endophytic bacteria isolated from Crown of Frade are able to produce indole-acetic acid in the presence and absence of its main precursor.

**KEY-WORDS:** Cactaceous, Indole-3-acetic acid, Fixation of Nitrogen.

## INTRODUÇÃO

A Caatinga apresenta uma vegetação heterogênea e ajustada às condições edafoclimáticas expostas pela região semiárida. No Semiárido nordestino, os vegetais e micro-organismos associados, apresentam alta resistência e são bastante adaptados aos períodos de aridez (KAVAMURA et al., 2013).

Observando a vasta importância desses micro-organismos tem-se estudado cada vez mais sobre essa interação existente entre planta/microrganismo, assim como suas ações sobre os solos, diversos estudos tem atuado para configurar cada vez mais esse processo e encontrar novos isolados, já que os mesmos possuem ampla relevância ecológica e econômica (MOREIRA, 2008). Um dos benefícios que esses micro-organismos promovem além da Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN), é a produção de fitohormônios vegetais, tais como o ácido indol-acético (AIA) da classe das auxinas, fabricado no meristema apical das plantas, propiciando o crescimento de raízes e caules por meio do alongamento celular Centellas et al.(1999). A formação de auxinas também pode ser realizada por bactérias; que, quando agregadas com as plantas promovem o crescimento vegetal (PATTEN; GLICK et al., 1996). Por conseguinte, objetivou-se avaliar a produção de ácido indol-acético de bactérias, isoladas a partir da Coroa de frade (*Melocactus* sp.).

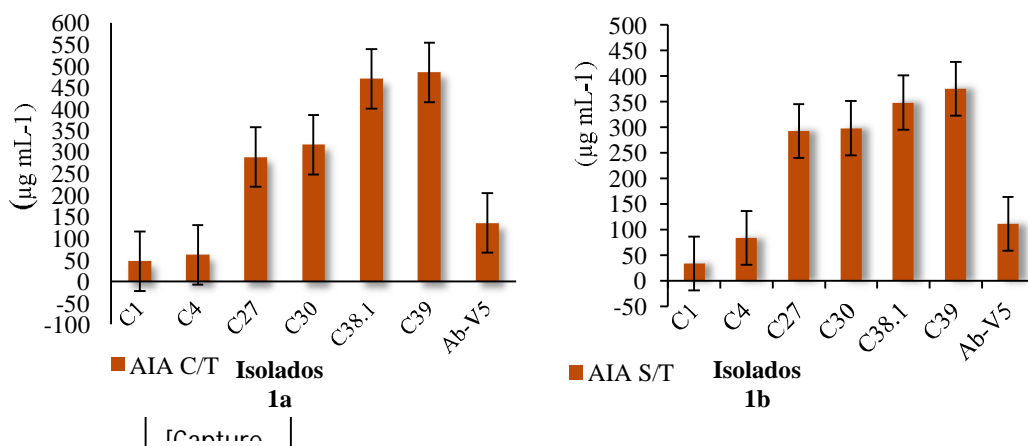
## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Campo Experimental da Caatinga pertencente a Embrapa Semiárido no Município de Petrolina-PE. Para as avaliações foram coletadas três amostras de raízes de Coroa de Frade (*Melocactus* sp.) de duas áreas diferentes, onde, cada unidade amostral foi composta por pelo menos três repetições. Para o isolamento das bactérias, as raízes foram lavadas, em seguida foram, desinfestadas. As amostras foram fragmentadas e em seguida alíquotas de 10 g foram trituradas com 90 mL de NaCl 0,85% (p/v) em um mini processador, em seguida, foram realizadas as diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ . Para cada uma das diluições, alíquotas de 0,1 mL, foram inoculadas em triplicata, em frascos de vidros de penicilina contendo 7 mL do meio BMGM semissólido (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001). Os frascos foram incubados a 28 °C, por dez dias, após esse período, aqueles que desenvolveram uma película microaerotáxica típica, foram reinoculados no mesmo meio de cultura e incubados por dez dias. Aqueles que desenvolveram película após esta segunda incubação foram considerados positivos para determinação das populações de bactérias diazotróficas, sendo assim utilizados para o isolamento das bactérias. Após a confirmação do aparecimento da película em meio semissólido, as bactérias foram purificadas em placas de Petri contendo meio Dyg's, para obter a quantificação de compostos indólicos para os 38 isolados selecionados, tendo *Azospirillum brasiliense* (Ab-V5) como bactéria de referência. A partir de um pré-inóculo, as bactérias foram inoculadas em 5 mL do meio líquido Dyg's com e sem suplementação com triptofano, e incubadas sob agitação constante durante sete dias (100 rpm). Após o período de crescimento a densidade ótica (DO) dos isolados foi avaliada em espectrofotômetro a 540 nm e ajustada para  $DO_{540}$  0,3. Posteriormente alíquotas de 1 mL das culturas foram centrifugadas por 3 min a 6000g. Uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi adicionada em placa tipo elisa de 96 poços, em seguida adicionados 100µL de reagente Salkowski (2% de  $FeCl_3$  0,5M em 35% de ácido perclórico). Em seguida, foram incubados no escuro por 30 min e após este período, as amostras foram lidas em

espectrofotômetro a 540 nm. Uma curva padrão foi previamente obtida de concentrações conhecidas de AIA sintético para estimativa de produção de compostos indólicos pelos isolados bacterianos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparação de médias por meio do teste de Scott-Knott com significância de ( $p > 0,05\%$ ) utilizando-se o programa Sisvar 5.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os 38 isolados de Coroa de frade (*Melocactus sp.*), produziram ácido indol-acético (AIA) na presença e na ausência do L-triptofano, como suplementação do meio de cultura (Figura 1). Houve diferença estatística entre os isolados submetidos ao L-triptofano ( $p > 0,05\%$ ). Ao analisarmos a Figura 1, pode-se observar que valores de AIA na presença do L- triptofano variaram entre  $47,07 \mu\text{g mL}^{-1}$  no isolado C1 a  $485,56 \mu\text{g mL}^{-1}$  no isolado C39. Ao compararmos os resultados com a bactéria referência (*Azospirillum*), observa-se que o isolado C1 produziu cerca de 53% a menos de ácido indol-acético, enquanto que observamos os resultados do isolado C39 a produção é cerca de 300% maior em relação a bactéria referência. Os isolados C27 e C30 produziram basicamente a mesma quantidade de AIA.



**Figura 1a.** Produção de ácido indol-acético com suplementação de L-Triptofano. **Figura 1b.** Produção de ácido indol-acético sem suplementação de L-Triptofano de isolados de Coroa de Frade (*Melocactus sp.*). Barras com Erro padrão.

Na figura 2, podemos observar que o isolado C1 na ausência do L-triptofano produziu cerca de 60% a menos de ácido indol-acético quando comparado a bactéria de referência (*Azospirillum*), já o isolado C39 produziu cerca de 250% a mais que a bactéria referência. Para os isolados C27 e C30 verificou-se que a produção de ácido indol-acético (AIA) foi basicamente igual girando em torno de  $280 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Nas duas variáveis analisadas, os isolados C1 e C39 obtiveram as menores e maiores produções, respectivamente. Todos os isolados testados produziram AIA, porém os valores encontrados foram superiores ao encontrados por Mascarua-Esparza et al. (1988) que variaram entre  $28,54$  a  $97,03 \mu\text{M}$  em isolados de *A. lipoferum* originários de plantas cactáceas no México. Antunes (2016) isolando bactérias diazotróficas endofíticas de Palma forrageira obtiveram elevadas produções de AIA, superiores ao isolado comercial, com os valores variando entre  $61$  e  $132,79 \mu\text{g/mL}$ . Os micro-organismos podem ser isolados da região da rizosfera de várias culturas, a capacidade de produzir ácido indol acético como metabólito secundário pode estar ligado ao elevado

suprimento de substratos. O ácido indol-acético está diretamente relacionado na produção de raízes mais longas, com maior número de pêlos radiculares e raízes radiculares, sendo responsáveis na absorção de nutrientes (Datta e Basu, 2000). O AIA estimula o alongamento celular, modificando certas condições como, aumento da osmose, conteúdo celular e aumento da permeabilidade da água na planta. Além disso, inibe ou atrasa a abscisão das folhas, e induzem a floração e a frutificação (ZHAO, 2010).

De acordo com Spaepen et al. (2007), a biossíntese de auxinas por bactérias ocorre em diferentes rotas metabólicas, sendo o triptofano o principal precursor para síntese de AIA. Todos os isolados sintetizaram AIA tanto pela via dependente quanto por via independente de L-triptofano. Grande parte apresentou maiores valores quando na presença do aminoácido. Dessa forma, bactérias que produzem elevadas concentrações de AIA, podem ser utilizadas em futuros ensaios com inoculação em espécies vegetais.

## CONCLUSÕES

Nas condições do Semiárido Nordeste bactérias isoladas da Coroa de Frade são capazes de produzir ácido indol-acético na presença e ausência de seu principal precursor.

## REFERÊNCIAS

ANTUNES, G. R. **Diversidade e eficiência na promoção do crescimento vegetal por bactérias isoladas de plantas forrageiras do Semiárido**. Petrolina, UNIVASF, 2016. 92p. (Dissertação de Mestrado).

CENTELLAS, A. Q.; FORTES, G. R. L.; MÜLLER, N. T. G.; ZANOL, G. C.; FLORES, R.; GOTTINARI, R. A. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 181-186, fev. 1999.

DATTA, C.; BASU, P. Indole acetic acid production by a *Rhizobium* species from root nodules of a leguminous shrub *Cajanus cajan*. **Microbiol. Res.** 155, 123-127, 2000.

ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; ABALLEROMELLADO, J. Burkholderia a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.2790-798, 2001.

KAVAMURA, V.N.; SANTOS, S.N.; SILVA, J.L.; PARMA, M.M.; ÁVILA, L.A.; VISCONTIA, A.; ZUCHI, T.D.; TAKETANI, R.G.; ANDREOTE, F.D.; MELO, A. I.S. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research** 168 p.183–191. 2013.

MASCARUA ESPARZA, M.A.; VILLA GONZALEZ, R.; CABALLERO MELLADO, J. Acetylene reduction and indoleacetic acid production by *Azospirillum* isolates from Cactaceous plants. **Plant Soil**, v. 106, n. 1, p. 91-95, 1988.

MOREIRA, F. M. S. **Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas.**  
In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Ed). Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros. Lavras: UFLA, 2008. 768p.; P.13-42.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. & REMANS, R. Indole- 3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiol. Rev.**, 31:425-448, 2007.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, Vancouver, v. 42, n. 3, p. 207-220, mar. 1996.

ZHAO, Y.D. Auxin biosynthesis and its role in plant development. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v61, p.49-64, 2010.