

PRODUÇÃO DE ÁCIDO-3-INDOLACÉTICO (AIA) POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ISOLADAS DE SOLOS CULTIVADOS COM *Brachiaria* sp.

Márcio de S. DIAS¹; Adauton V. REZENDE²; Ligiane A. FLORENTINO³

RESUMO

O processo de degradação das pastagens no Brasil esta em torno de 50% da área cultivada, o que pode ser explicado, principalmente, pela baixa fertilidade do solo e pela falta de reposição de nutrientes, principalmente nitrogênio. Em relação ao nitrogênio, o uso da biotecnologia da fixação biológica do nitrogênio (FBN) apresenta-se como uma alternativa à utilização de fertilizantes nitrogenados, reduzindo os custos de produção e também possíveis impactos ambientais. Nesse sentido este trabalho visou identificar por métodos fenotípicos bactérias fixadoras de nitrogênio associadas à *Brachiaria* sp., e, posteriormente, analisar a capacidade, *in vitro*, destas bactérias produzirem hormônios de crescimento (ácido-3-indolacético / AIA). Para tanto, foram analisadas 332 estirpes pertencentes à coleção da UNIFENAS, as quais foram obtidas de amostras de solos cultivados sob *Brachiaria* sp. e partes de tecido vegetal desta gramínea nas épocas de seca e chuvosa em áreas de pastagens nos municípios de Alfenas e Machado, Sul de Minas Gerais. As amostras foram submetidas às análises biológicas quanto a ocorrência de bactérias diazotróficas associativas, sendo utilizados meios de cultura semi-sólidos e semi-específicos: FAM, JMV, JNFb, LGI e NFb. Posteriormente, as estirpes bacterianas foram testadas quanto à capacidade de produzir AIA através de método colorimétrico, o que resultou em 78 isolados com resultado positivo, sendo 32 originados do solo e 46 de tecido vegetal (raiz).

¹ Mestrando em Ciência Animal, bolsista CAPES/PROSUP, UNIFENAS – Alfenas/MG, e-mail: marciodesouzadias2013@gmail.com;

² Prof.Dr. Coorientador, UNIFENAS – Alfenas/MG, e-mail: adauton.rezende@unifenas.br;

³ Profa. Dra., orientadora, UNIFENAS – Alfenas/MG, e-mail: ligianeflorentino@gmail.com.

INTRODUÇÃO

A degradação das pastagens no Brasil esta em torno de 50%, fenômeno este que é explicado pelos baixos índices de produtividade, do manejo inadequado, falta de reposição de nutrientes e conseqüentemente a baixa fertilidade do solo em função do déficit de nitrogênio no solo.

O solo é constituído por organismos microscópicos e macroscópicos que desempenham diferentes funções como a decomposição e mineralização da matéria orgânica, a ciclagem de nutrientes e a fixação biológica de nitrogênio (FBN), processos estes que garantem a manutenção e o equilíbrio no ecossistema terrestre (Moreira & Siqueira, 2006). O potencial de utilização da FBN tem sido intensamente estudado devido ao fornecimento de nitrogênio, contribuindo assim para a sustentabilidade agrícola, onde os solos apresentam baixo nível de fertilidade, principalmente em regiões tropicais.

Cerca de 78% do ar atmosférico é constituído por gás nitrogênio (N_2), entretanto, esta parcela de nitrogênio não esta disponível nutricionalmente para a maioria dos seres vivos. Apenas uma pequena parcela de procariotos possui a enzima nitrogenase, a qual é capaz de reduzir o N_2 para a forma inorgânica NH_3 , forma de nitrogênio disponível para os vegetais e outros organismos. Esses procariotos são denominados fixadores de nitrogênio (N_2) ou diazotróficos

Esses procariotos podem estabelecer associação com espécies vegetais, como as gramíneas forrageiras sendo encontrados na rizosfera, interior das raízes, colmos e folhas dessas plantas. Além da contribuição com o N, essas bactérias diazotróficas podem ainda, contribuir para o crescimento vegetal por meio de produção do hormônio ácido indolacético (AIA).

A via do ácido indole-3-pirúvico (IPyA) é a via principal para a produção de AIA na presença de triptofano exógeno (Dobbelaere *et al.*, 1999). O aminoácido L-triptofano, funciona como um precursor fisiológico na biossíntese de auxina em plantas e em microrganismos.

Embora alguns estudos tenham demonstrado a existência de bactérias diazotróficas em *Brachiaria* spp., é necessário ressaltar que os mesmos não foram realizados de forma regular em um determinado intervalo de tempo um ano com as plantas sendo submetidas sob condição de pastejo.

A FBN promovida por *Azospirillum* tem sido durante anos, o foco de muitos estudos da comunidade científica, o que permitiu o surgimento de evidências quanto a contribuição de bactérias deste gênero no que se refere à produção de hormônios, principalmente o ácido indol-acético (AIA). Segundo Bashan & Holguim (1997) a excreção destes hormônios pela *Azospirillum* tem papel essencial no crescimento de plantas em geral.

O objetivo deste estudo foi identificar a capacidade, *in vitro*, de bactérias diazotróficas associativas e isoladas de *Brachiaria* sp., de produzirem hormônios de crescimento (ácido-3-indolacético / AIA).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia Agrícola da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS). Foram utilizadas 332 estirpes de BFN pertencentes à coleção da UNIFENAS, as quais tiveram sua origem de solo e de tecidos vegetais coletados nos municípios de Alfenas e Machado, ambos localizados na região Sul do Estado de Minas Gerais, cujas coletas ocorreram em dois diferentes períodos sazonais, no final do período de seca e no meio do período chuvoso, cujas estirpes foram selecionadas utilizando-se cinco meios de cultura semi-sólidos e semi-específicos: FAM (Magalhães & Döbereiner, 1984), JMV (Reis *et al.*, 2004), JNFb, LGI e NFb (Döbereiner *et al.*, 1995), em que a presença da bactéria foi evidenciada pela formação de película típica, próximo a superfície dos frascos contendo os meios de cultura, em seguida, procedeu-se a obtenção de isolados puros através de sucessivas repicagens em placas de Petri.

A produção de ácido-3-indolacético (AIA), foi determinada por teste *in vitro* através de método colorimétrico adaptado de Brick *et al.* (1991), conforme descrito por Cattelan (1999). As estirpes puras foram transferidas para meio de cultura líquido batata (Döbereiner, 1995) e incubadas por três dias, em temperatura ambiente e posteriormente foi transferida a alíquota de 20 microlitros do sobrenadante para placas de petri contendo meio sólido de tripticaseína de soja (TSA), enriquecida com 5 mM de L-triptofano (1,021 g por L) e meio sólido contendo TSA (sem a adição de L-triptofano), com 4 repetições. Após a transferência, os meios foram cobertos com discos (\emptyset 11 mm) de membrana de nitrocelulose (devidamente identificadas) e incubados a temperatura de 28° - 30°C

por 24 horas. Ao final do período de incubação, as membranas de nitrocelulose foram transferidas para outras placas, as quais foram saturadas com solução de Salkowski (Gordon & Weber, 1951) e incubadas à temperatura ambiente em câmara escura, sendo avaliadas no período entre 30 minutos e 2 horas quanto à formação de halo avermelhado na membrana, caracterizando assim, resultado positivo quanto da produção de AIA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido a vários fatores como facilidade de manipulação, rapidez, sensibilidade e baixo custo, o reagente de Salkowski tem sido empregado de forma ampla na detecção do ácido-3-indolacético produzido por bactérias diazotróficas (MASCARUA-ESPARZA, *et al.*, 1988; PEDRAZA, *et al.*, 2004). O método colorimétrico baseia-se na oxidação de compostos indólicos por sais férricos (MAYER, 1958), onde a reação do ácido-3-indolacético com o reagente de Salkowski produz coloração rosa avermelhada para o teste positivo e coloração amarelada para teste negativo.

Como observado na Tabela 1, dos isolados testados, apenas 78 apresentaram resultado positivo para produção de ácido-3-indolacético (AIA), dos quais 32 tiveram sua origem do solo e 46 do tecido vegetal (raiz), dados estes, confirmados com a presença de halo avermelhado no período de 30 minutos a 2 horas.

Tabela 1. Origem dos isolados que apresentaram resultado positivo para produção de ácido-3-indolacético (AIA).

Origem dos isolados	Isolados	Total de isolados
Solo	Unifenas-100-47; 48; 50; 53; 54; 55; 61; 62; 78; 159; 163; 167; 170 a 173; 178; 181; 184; 185; 198; 212; 223; 227; 228; 230; 238 a 240; 263; 323; 325.	32 isolados
Tecido vegetal (raiz)	Unifenas-100-03; 17; 19; 21; 26; 34; 38; 40; 52; 63; 72; 73; 85; 88; 105; 125; 129; 130; 137; 138; 142 a 145; 147; 150 a 153; 274; 281; 282; 303; 307; 308,310; 311; 313 a 315; 317; 318; 321; 322; 330; 331.	46 isolados

A produção de compostos indólicos, por diferentes espécies de bactérias diazotróficas têm sido relatada em diversos estudos (MONTEIRO *et al.*, 2012), o que demonstra a importância deste organismos quanto a sua contribuição para o desenvolvimento vegetal.

De acordo com Neves (1985) as bactérias diazoficas endofíticas podem promover a transferência, de forma eficiente, os compostos nitrogenados produzidos para as plantas. Demason (2005), destaca a modulação exercida pelos fitormônios e sua relação quanto aos níveis de auxinas. A promoção do crescimento vegetal por pode ser influenciado pela fixação de nitrogênio e síntese de fitormônios.

CONCLUSÕES

Apenas 78 isolados dos 332 testados foram capazes de produzir compostos indólicos o que contribui não somente quanto a FBN, como também a produção de fitormônio.

A produção de compostos indólicos foi observada tanto em isolados oriundos do solo quanto de tecido vegetal (raiz), sendo a maior parte originada do tecido vegetal, tendo o triptofano como precursor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASHAN, Y. & HOLGUIN, G. **Azospirillum-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996)**. Canadian J. Microbiol., 43:103-121, 1997.

BRICK, J.M; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S.E. **Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane**. Appl Environ Microbiol 57:535–538, 1991

CATTELAN, A.J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 36 p. (Embrapa Soja. Documentos, 139). Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/461542>>. Acesso em: 10 dez. 2013

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; BROEK, A. V.; VANDERLEYDEN, J. **Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat**. Plant and Soil, v. 212, p. 155–164, 1999.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. & BALDANI, V. L. D. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília, Embrapa-SPI. Itaguaí, Embrapa- CNPAB, 1995. 60p.

DEMASON, D. A. Auxin-cytokinin and auxin-gibberellin interactions during morphogenesis of the compound leaves of pea (*Pisum sativum*). **Planta**, v. 32, p. 1432-2048, 2005.

GORDON, S.A.; WEBER, R.P. **Colorimetric estimation of indoleacetic acid**. **Plant Physiology**. Bethesda, v.26, p.192-195, 1951

MAGALHAES, F.M.M. & DÖBEREINER, J. **Occurrence of *Azospirillum amazonense* in some Amazonian (Brazil) ecosystems**. *R. Microbiol.*, 15:246-252, 1984.

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

MAYER, A.M. Determination of indole acetic acid by the Salkowsky reaction. **Nature**, v.162 p.1670-1671, 1958.

MONTEIRO, R.A.; BALSANELLI, E.; WASSEN, R.; MARIN, A.M.; RUSAMARELLO-SANTOS, L.C.C.; SCHMIDT, M.A.; TADRA-SFEIR, M.Z.; PANKIEVICZ, V.C.S.; CRUZ, L.M.; CHUBATSU, L.S.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. Herbaspirillum-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant Soil**, v. 356, n.1, p. 175-196, 2012.

MOREIRA, F. M. S. & SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729p.

NEVES, M.C.P.; DIDONET, A. D.; DUQUE, F.F.; DOBEREINER, J. Rhizobium strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.22, p.1179-1192, 1985.

PEDRAZA, R.O.; RAMIREZ-MATA, A.; XIQUI, M.L.; BACA, B.E. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. **FEMS Microbiol Lett**. v.233(1), p.15-21, 2004.

REIS, V. M.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L.D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 2155-2162, 2004.