

PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO POR BACTÉRIAS E FUNGOS ISOLADOS DA RIZOSFERA DO TAMBORIL (*Enterolobium contortisiliquum*)

Lucas Brilhante F. Batista¹
Ronald H. R. D. da Silva²
Fabiana Costa Bezerra³
Renan Tavares Leite⁴
Sharline F. de Melo Santos⁵

RESUMO

A Caatinga é um bioma brasileiro que apresenta clima semiárido, ocupando cerca de 11% do território brasileiro e 70% da região Nordeste. Apresenta uma grande biodiversidade de fauna, flora e microrganismos; muitas das suas espécies são adaptadas ao estresse hídrico e às altas temperaturas. A *Enterolobium contortisiliquum*, popularmente conhecida por tamboril, é uma árvore pertencente à família das leguminosas e que se adaptou ao Nordeste brasileiro, onde é facilmente encontrada. O tamboril possui crescimento rápido e grande porte, características que demonstram tanto sua atividade microbiana eficiente quanto seu largo emprego no reflorestamento de áreas degradadas. Dessa forma, o objetivo do trabalho é avaliar a produção do ácido indol-3-acético (AIA), que é uma auxina que promotora de crescimento vegetal, por fungos e bactérias isoladas da rizosfera do Tamboril. Os resultados foram satisfatórios; as bactérias TB3 e TB5 apresentaram um alto nível de produção de ácido AIA com a suplementação de triptofano. Para os fungos, os resultados da produção de AIA apresentaram um elevado nível de produção da auxina.

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

¹ Graduado pelo Curso de eng. Química da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, lucasbrilhante13@yahoo.com.br;

² Mestrando em eng. Química da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, rddelfino13@email.com;

³ Mestre em eng. renováveis da Universidade Federal de Campina grande – UFCG, fabianacostaufpb@gmail.com;

⁴ Graduando do curso de biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, renanvfc@hotmail.com

;

⁵ Professor orientador: Doutora em eng. química pela UFRN, Professora do departamento de eng. Química na Universidade Federal da Paraíba – UFPB, sharline@ct.ufpb.br;

INTRODUÇÃO

A Caatinga é o único bioma exclusivamente brasileiro e ocupa 800.000 km². O nome “caatinga” tem origem Tupi-Guarani, significa "mata branca", e refere-se à paisagem esbranquiçada da vegetação, adaptada à seca e aos ciclos climáticos (FILIZOLA e SAMPAIO, 2015), compreendendo os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Sergipe e o norte de Minas Gerais (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2016).

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). O *Enterolobium contortisiliquum*, popularmente conhecida como tamboril, timbaúba ou orelha-de-negro, é uma espécie nativa da caatinga pertencente à família FabaceaeMimosoideae. É uma espécie decídua, heliófita, seletiva e higrófitas, dispersa em várias Formações florestais. Possui altura de 20 a 35 m, com tronco de 80 a 160 cm de diâmetro; formando uma copa ampla e frondosa com folhas compostas bipinadas com 2-7 jugas (LORENZI, 1998).

O uso de microrganismos promotores de crescimento vegetal em solos construídos combinado com algumas espécies de plantas, pode contribuir na recuperação de áreas degradadas, como demonstrado por Gervazio et al. (2015), além de ser considerado um parâmetro indicador de recuperação de áreas degradadas através de sua quantidade e diversidade encontrados ao longo dos monitoramentos (SILVEIRA; MELLONI; PEREIRA, 2004). Apesar de alguns microrganismos se mostraram prejudiciais às plantas, como os patogênicos, há uma grande parcela de microrganismos benéficos, promovendo a manutenção e sobrevivência da vida vegetal, com efeitos no crescimento e no desenvolvimento das plantas (VRIEZE, 2015; GEORGE; DOU; WANG, 2016).

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 (2013), 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).

Dessa forma, este trabalho tem por objetivo avaliar o potencial, *in vitro*, dos microrganismos isolados do solo rizosférico do Tamboril, coletados na caatinga paraibana, quanto a sua capacidade de produzir ácido indol-3-acético.

METODOLOGIA

Para a avaliação das bactérias isoladas em relação a produção de ácido indol-3-acético (AIA) *in vitro* foi utilizada uma metodologia adaptada de Cavalcanti (2016) e Braga (2016).

Foi feita a inoculação de cada bactéria em 5 mL de meio líquido de caldo nutriente e foram incubadas sob agitação constante para a produção de um pré-inóculo. Após um período de 24h, alíquotas de 1 mL foram inoculadas em meio líquido de caldo nutriente, suplementado com e sem triptofano, em triplicata, e incubadas sob agitação constante de 140 rpm a 30°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 $DO_{540} = 0,5$. Após o ajuste da DO_{540} , alíquotas de 3 mL foram centrifugadas durante 3 min a 6000 rpm.

Uma alíquota de 1 mL do sobrenadante, obtido da incubação, foi adicionada à 0,5 mL de reagente de Salkowski (2% de $FeCl_3$ 0,5 M em 35% de ácido perclórico) e esta mistura foi incubada no escuro durante 30 minutos. Posteriormente foi efetuada a leitura óptica das amostras no espectrofotômetro a 540 nm para a avaliação da concentração de AIA produzido.

metodologia do resumo expandido deverá apresentar os caminhos metodológicos e uso de ferramentas, técnicas de pesquisa e de instrumentos para coleta de dados,

informar, quando for pertinente, sobre a aprovação em comissões de ética ou equivalente, e, sobre o direito de uso de imagens.

Produção de ácido indol-3-acético por fungos

Os fungos isolados foram previamente cultivados em placas de Petri contendo o meio BDA (Ágar, Batata e Dextrose) por 7 dias a 31 °C aproximadamente.

Para a avaliação quantitativa da produção de AIA foram retirados do meio BDA, quadrados de aproximadamente 0,5 cm de lado contendo o micélio e os esporos do fungo, e transferidos para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 10 mL do meio líquido FAN (Glicose 20 g/L, Extrato de levedura 3 g/L, fosfato dipotássico K₂HPO₄ 0.6 g/L, sulfato de magnésio MgSO₄ 0.3g/L, pH 5,9 – 6,1) (FAN, 2002). O teste foi realizado na ausência e na presença de triptona no meio líquido. A concentração de triptona utilizada foi de 100 mg/L.

Após sete dias de crescimento sob um agitador rotatório (140 rpm) a 31 ± 2 °C, uma alíquota de 2 mL do meio foi centrifugada a 12.000 rpm por durante 15 minutos.

Para a análise colorimétrica de AIA (GORDON & WEBER, 1951), uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi retirada e misturada a 0,5mL do reagente de Salkowski [FeCl₃ 0,5 mol/L em HClO₄(35%)]. Esta mistura foi incubada no escuro durante 30 minutos, e após esse período, foi realizada a leitura óptica das amostras no espectrofotômetro a 540 nm para que se avalie a concentração de ácido indol-3-acético sintetizado.

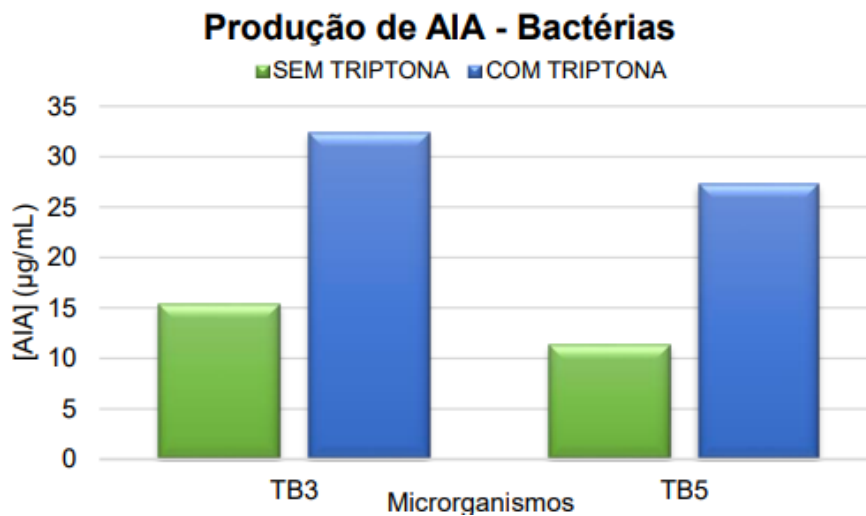
As concentrações, em µg/mL foram calculadas a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas do ácido indol-3-acético.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção de AIA por bactérias

Das 5 bactérias isoladas, 2 apresentaram a produção de AIA, conforme mostrado na Figura 01.

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



Segundo Kavamura et al. (2013), de acordo com a concentração de AIA é considerado que menor que 1 µg/mL baixa produção, 1-10µg/mL média produção, 11-50 µg/mL alta produção e maior que 51 µg/mL elevada produção. Desse modo, temos que as bactérias TB3 e TB5 apresentaram uma alta produção de AIA, conforme mostrado na Figura 01.

Os resultados obtidos nestes testes em relação a produção de ácido indol-3-acético (AIA) são similares aos apresentados por Albdaawi (2019) onde produziram os níveis mais elevados de concentrações de AIA, através de bactérias isoladas do solo retirado de plantas de trigo duro, cultivados em ambientes salinos na região do Mar Morto. Dessa forma, pode-se observar que as bactérias isoladas apresentaram um alto potencial na produção de AIA e a promoção de crescimento vegetal.

Segundo Mirza et al. (2001), a síntese desta auxina pode ser influenciada pelas condições de cultura, estágio de crescimento e disponibilidade de substrato. Assim podemos observar que as bactérias intituladas TB3 e TB5 expressaram uma alta produção de ácido indol3-acético. A bactéria TB3 apresentou uma produção aproximada de 15,36 g/mL de AIA sem a suplementação do triptofano e 32,31 g/mL de AIA com a suplementação do triptofano; a bactéria TB5, nos meios sem suplementação e com suplementação de triptofano respectivamente, apresentou uma produção aproximada de 11,28g/mL e 27,18g/mL. As demais bactérias isoladas e avaliadas obtiveram uma produção de AIA quase insignificante.

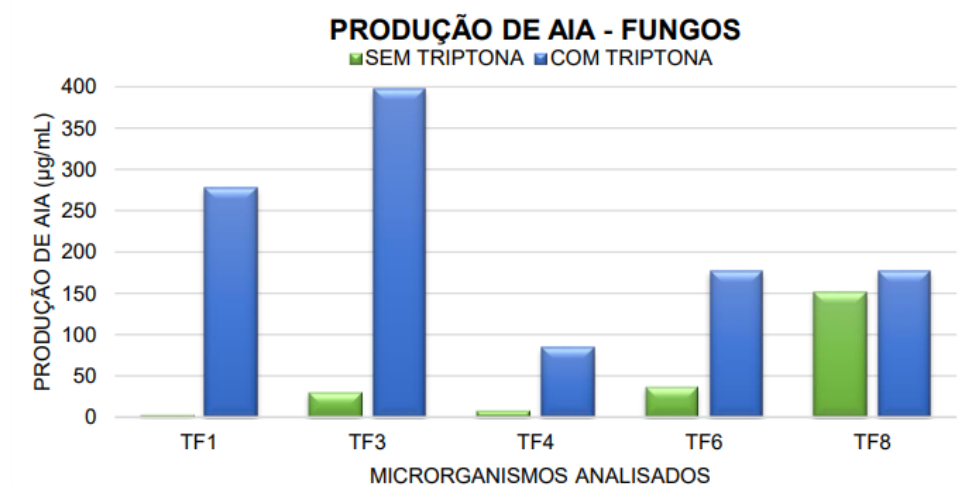
No seu estudo de bactérias endofíticas e rizosféricas associada ao *Paspalum atratum*, De Paula et al. (2022), isolou bactérias rizosféricas do gênero pseudomonas ssp onde a produção de AIA variou entre 24.39 e 65.12 g/mL.

CASSAN et al., (2009) detectou a concentração de AIA, em inoculantes comerciais, de 6,62 e 13,16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *Bradyrhizobium japonicum* E109 e *Azospirillum brasilense* Az39, respectivamente, as bactérias isoladas no presente estudo apresentaram síntese semelhante e superior aos identificados por CASSAN (2009) e De PAULA (2022), corroborando assim a promissora síntese de AIA pelos isolados do tamboril, além de direcionar melhor as próximas etapas de seleção e identificação dos microrganismos.

Produção de AIA por fungos

Os resultados dos testes de produção de AIA por fungos encontram-se na Figura 02.

Figura 02: Produção média de AIA dos fungos isoladas do Tamboril.



Todos os isolados foram capazes de sintetizar AIA com e sem a presença da triptona. Para os testes realizados sem a presença da triptona, a produção de AIA pelos fungos variou significativamente entre 3,22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para os testes com o fungo TF1 e 151,62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o fungo TF8. Para os testes realizados na presença da triptona, a produção de AIA variou significativamente entre 84,20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para os testes com o fungo TF4 e 397,77 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o fungo TF3. Todas as produções de AIA se caracterizaram com sendo produções elevadas.

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Desse modo, os resultados encontrados são promissores, visto a alta síntese dos isolados TF3, TF4 e TF6 na 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

Para a produção de ácido indol-3-acético (AIA) por bactérias rizosféricas do Tamboril, duas das cinco bactérias isoladas apresentaram resultados favoráveis, a TB3 e TB5 apresentaram um alto nível de produção com a suplementação de triptofano, ambas produziram mais de 20µg/mL, apresentando um grande potencial de promoção de crescimento vegetal. Na ausência de triptona apenas os fungos TF3, TF6, TF8 apresentaram alta produção de AIA; já na presença da triptona, todos os fungos testados se mostraram muito promissores em relação a produção de AIA, apresentando produções elevadas dessa auxina.

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: Março. 2023.

ARTIGAS, Rafael Cámara; SOUZA, Bartolomeu Israel de; LIMA, Eduardo Rodrigues Viana de. CAATINGA E DESERTIFICAÇÃO. MERCATOR, Fortaleza - CE, v. 14, n. 1, p. 131-150, 2015.

BRASIL – Ministério do Meio Ambiente. Caatinga. Disponível em: Acesso em: Abril. 2023.

CAVALCANTI, M. I. P. Seleção de bactérias promotoras de crescimento em milho cultivado no semiárido obtidas por diferentes estratégias de isolamento. 2016. 109p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Paraíba. Campina Grande – PB. 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.

CASSEL. et al. Insegurança alimentar e fatores sociais, econômicos e nutricionais em estudantes de escolas rurais. *Cad Saúde Colet*, 2021;29(2):153-162. <https://doi.org/10.1590/1414-462X202129020204>.

COELHO GD et al. Potencial de Fungos da Caatinga para Produção de Enzimas Amilolíticas. *Revista Saúde e Ciência online*, v. 7, n. 2, (maio a agosto de 2018). 502 p. FAN, L. Produção de exopolissacarídeos de *Agaricus blazei* teste antitumorais. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2002. 86p. Tese Doutorado.

FERNANDES, Iali Karine LeiteLeite. Riqueza de espécies e facilitação influenciando o aporte de serrapilheira em uma área restaurada da Caatinga. 2022. 33f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ecologia), Departamento de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2022.

FILOZOLA, B. C., & Sampaio, M. B. (2015). Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável de cascas. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza.

GEORGE, T.S.; DOU, D.; WANG, X. Plant–microbe interactions: manipulating signals to enhance agricultural sustainability and environmental security: manipulating signals to enhance agricultural sustainability and environmental security. *Plant Growth Regulation*, [s.l.], v. 80, n. 1, p. 1-3, 4 maio 2016. Springer Science and Business Media

LLC. GERVAZIO, W. et al. Agrobiodiversidade e qualidade do solo em quintais agroflorestais urbanos na cidade de Alta Floresta – MT. Tese (mestrado em Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos) – Universidade Estadual do Mato Grosso, Alta Floresta. 2015.

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

LANA, U. G. de P.; RIBEIRO, V. P.; GOMES, E. A.; OLIVEIRA-PAIVA, C. A. Seleção em Larga Escala de Bactérias Produtoras do Hormônio Ácido Indolacético (AIA), Auxina Associada à Promoção de Crescimento em Plantas. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. v. 01, p. 177, 1998.

MIRZA, M., Ahmad, W., Latif, F. et al. Isolamento, caracterização parcial e efeito de bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB) em cana-de-açúcar micropropagada in vitro. *Plant and Soil* 237 , 47-54 (2001).

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.

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. 7 Tese (doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química e Biotecnologia, RENORBIO, Universidade Federal de Alagoas, Maceió. 2021.

SILVEIRA, R.B.; MELLONI, R.; PEREIRA, E.G. Atributos microbiológicos e bioquímicos como indicadores da recuperação de áreas degradadas, no sul de Minas Gerais. *Revista Acadêmica: Ciência Animal*, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 21-29, 15 abr. 2004.

SPAEPEN, S. et al. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev.* 2007 Jul;31(4):425-48. doi: 10.1111/j.1574- 6976.2007.00072.x. Epub 2007 May 17. PMID: 17509086.

VRIEZE, J. de. The littlest farmhands. *Science*, [s.l.], v. 349, n. 6249, p. 680-683, 13 ago. 2015. American Association for the Advancement of Science (AAAS).