

## PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS POR BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS *IN VITRO*

Natalia Caetano Vasques<sup>1</sup>, Paula Cerezini<sup>2</sup>, Marco Antonio Nogueira<sup>3</sup>, Mariangela Hungria<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Pós-Graduada em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina – PR. Bolsista CAPES. natalia.vasques@uel.br

<sup>2</sup>Coorientadora, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA SOJA, Londrina – PR. paulacerezini@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Pesquisadores da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA SOJA, Londrina – PR. marco.nogueira@embrapa.br; mariangela.hungria@embrapa.br

<sup>4</sup>Orientadora

### RESUMO

Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (BPCP) contribuem para o crescimento de plantas por meio de diferentes mecanismos, entre eles, o biocontrole de patógenos, a síntese de fitormônios e a disponibilização de nutrientes, como, por exemplo, o ferro (Fe). Neste estudo, objetivou-se caracterizar estirpes capazes de produzir sideróforos, a partir de 100 estirpes pré-selecionadas da “Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Soja: Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas”, através de análises laboratoriais. Foram identificadas 31 estirpes com capacidade de produzir sideróforos, incluindo 11 gêneros, sendo *Pseudomonas* o predominante. A síntese de sideróforos representa uma vantagem nutricional e de biocontrole, impactando a competitividade na rizosfera em relação a outros microrganismos, incluindo patogênicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** BPCP; Bioquelante; Ferro; *Pseudomonas*.

## 1 INTRODUÇÃO

O efeito de alguns microrganismos, classificados como bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP), em estimular o crescimento das plantas se deve a uma série de processos microbianos, atuando isoladamente ou em conjunto. A promoção pode estar relacionada, por exemplo, à fixação biológica de nitrogênio, à produção de substâncias reguladoras de crescimento e à solubilização de nutrientes (LOREDO-OSTI; LÓPEZ-REYES; ESPINOSA-VICTORIA, 2004). Esses processos podem resultar em benefícios que incluem incremento no volume radicular (BOWEN; ROVIRA, 1999), modulação da atividade patogênica, aumento da tolerância ao estresse salino e hídrico (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010), entre outros.

No que diz respeito ao fornecimento de nutrientes às plantas e à modulação da atividade patogênica, a síntese de sideróforos desempenha um papel relevante. A biodisponibilidade do ferro é incomum no ambiente aeróbio devido à forma apresentada ( $Fe^{3+}$ ), mas alguns organismos são capazes de formar quelantes biogênicos para a complexação do ferro presente no ambiente, nomeados sideróforos (RÖMHELD, 1987). Desta forma, o nutriente que antes se apresentava indisponível, pode ser assimilado tanto por plantas, como por alguns microrganismos que apresentarão vantagem competitiva e, até mesmo inibição do crescimento de microrganismos patogênicos que não possuem essa propriedade, caracterizando uma estratégia de biocontrole (KLOEPPER, 1980; SCHALK; MISLIN; BRILLET, 2012).

O objetivo da presente pesquisa foi, através de análises laboratoriais, caracterizar potenciais estirpes capazes de produzir sideróforos, a partir de 100 estirpes pré-selecionadas da “Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Soja: Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas”. As quais distribuem-se entre os 23 gêneros: *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Azoarcus*, *Azorhizobium*, *Azorhizophilus*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Bradyrhizobium*, *Chromobacterium*, *Delftia*, *Gluconacetobacter*, *Kosakonia*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Neorhizobium*,

*Niveispirillum*, *Ochrobacterium*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Paraburkholderia*, *Pseudomonas* e *Rhizobium*. Com 58 espécies definidas e 42 em etapa de definição taxonômica.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a avaliação da produção de sideróforos foi utilizado o protocolo proposto por Schwyn e Neilands (1987). Os isolados foram cultivados em meio de cultura ágar King B contendo cromoazurol S (CAS), o qual foi preparado a partir das soluções 1 (7,5 mL), 2 (37,5 mL), 3 (30 mL) e 4 (volume completado para 100 mL). Quanto à composição, tem: Solução 1: 13,5 mg de  $\text{FeCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e 41 mL HCl (10mM), completado com água destilada para o volume final de 50 mL; solução 2 (121 mg de CAS, 100 mL água destilada); solução 3: 364,45 mg de CTAB (HDTMA), 100 mL água destilada; solução 4 por: 4,307 g de Piperazina anidra, 6,25 mL de HCl (12M), 100 mL água destilada. A adição do corante CAS ao ágar King B foi realizada após o processo de esterilização em autoclave a 121 °C por 20 minutos.

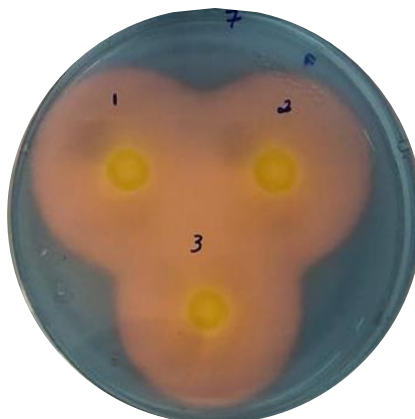
O meio de cultura foi distribuído em placas de Petri, procedendo-se à inoculação das 100 estirpes bacterianas da “Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Soja: Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas” ( $\text{DO}_{600} = 0,6$ ) em gotas de 10  $\mu\text{L}$ .

Após 24 horas de incubação a 28 °C, no escuro, a capacidade de produção de sideróforos foi considerada positiva quando observada a formação de halo de coloração laranja ou rosada ao redor da colônia e, então, foi medida sua extensão (colônia e halo) com o auxílio de um paquímetro.

O delineamento utilizado foi o inteiramente ao acaso, com três repetições por tratamento. As médias foram comparadas através de teste de Scott-Knot a 5 %.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o ensaio de aferição da produção de sideróforos foram identificadas 31 estirpes positivas, ou seja, capazes de desenvolver tal estrutura, mostrando o halo característico (Figura 1).



**Figura 1:** A produção de sideróforos pode ser avaliada como positiva quanto houver a presença de halo com coloração laranja-rosada ao redor da colônia. A quantificação da produção de sideróforos pode ser dada pela razão halo/colônia.

A síntese de sideróforos foi observada em estirpes dos gêneros *Rhizobium*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, *Azoarcus*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Paraburkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Delfitia* e *Paenibacillus*. Dentre esses gêneros, houve

predominância de *Pseudomonas*, com 12 estirpes. Algumas estirpes apresentaram uma relação halo x colônia mais pronunciada, indicando maior síntese de sideróforos, como, por exemplo, a Estirpe 1, que apresentou o maior valor às 72 h após a repicagem, conforme indicado na Tabela 1. Tais estirpes apresentaram valores de relação halo x colônia estatisticamente diferentes das demais pelo teste de Scott-Knott a 5%.

**Tabela 1:** Relação halo x colônia das estirpes produtoras de sideróforos quando avaliadas 72 horas após a inoculação.

Tratamento	Halo x Colônia (cm) 72h	Tratamento	Halo x Colônia (cm) 72h
Estirpe 1	4,34a	Estirpe 17	2,92e
Estirpe 2	2,39f	Estirpe 18	1,37i
Estirpe 3	3,27d	Estirpe 19	3,55c
Estirpe 4	2,89e	Estirpe 20	2,14g
Estirpe 5	1,47i	Estirpe 21	1,31i
Estirpe 6	1,91g	Estirpe 22	1,44i
Estirpe 7	1,96g	Estirpe 23	1,39i
Estirpe 8	1,32i	Estirpe 24	1,21i
Estirpe 9	1,57h	Estirpe 25	2,07g
Estirpe 10	1,54h	Estirpe 26	1,56h
Estirpe 11	3,57c	Estirpe 27	1,66h
Estirpe 12	4,07b	Estirpe 28	1,73h
Estirpe 13	1,45i	Estirpe 29	1,73h
Estirpe 14	3,27d	Estirpe 30	1,33i
Estirpe 15	3,37d	Estirpe 31	1,26i
Estirpe 16	1,71h		

Os dados representam médias de 3 repetições que, quando seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

As 31 estirpes produtoras de sideróforos apresentam potencial biotecnológico na agricultura como bioinsumos, sendo capazes tanto de favorecer a disponibilidade de nutrientes às plantas, como de modular a atividade patogênica (KLOEPPER, 1980; SCHALK; MISLIN; BRILLET, 2012). Contudo, são necessários estudos subsequentes sobre possíveis associações das estirpes com as culturas, visando confirmar o potencial biotecnológico.

#### 4 CONCLUSÕES

Dentre as 31 estirpes positivas para produção de sideróforos, foram identificados 11 gêneros, com predominância de estirpes de *Pseudomonas*.

Pesquisas de associação das estirpes às diferentes culturas devem ser conduzidas para comprovar os benefícios da produção de sideróforos.

#### REFERÊNCIAS

BOWEN, G. D.; ROVIRA, A. D. The rhizosphere and its management to improve plant growth. **Advances in agronomy**, v. 66. p. 1-102, 1999.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669-678, 2010.

KLOEPPER, J. W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M. N. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils. **Current Microbiology**, v. 4, n. 5, p. 317-320, 1980.

LOREDO-OSTI, C.; LÓPEZ-REYES, L.; ESPINOSA-VICTORIA, D. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. **Terra Latinoamericana**, v. 22, n. 2, p. 225-239, 2004.

RÖMHELD, V. Different strategies for iron acquisition in higher plants. **Physiologia Plantarum**, v. 70, p. 231-234, 1987.

SCHALK, I. J.; MISLIN, G. L. A.; BRILLET, K. Structure, function and binding selectivity and stereoselectivity of siderophore–iron outer membrane transporters. **Current Topics in Membranes**, v. 69, p. 37-66, 2012.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47-56, 1987.