

## Produção de ácidos orgânicos por bactérias endofíticas de milho solubilizadoras de fosfato

Crísia Santos de Abreu<sup>(1)</sup>; Eliane Aparecida Gomes<sup>(2)</sup>; Christiane Abreu de Oliveira<sup>(2)</sup>; José Edson Fontes Figueiredo<sup>(2)</sup>; Vera Lúcia dos Santos<sup>(3)</sup>; Ivanildo Evódio Marriel<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Doutoranda em Microbiologia; Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG; Belo Horizonte; Minas Gerais; crisiaabreu@gmail.com; <sup>(2)</sup> Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo; <sup>(3)</sup> Professora da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG;

**RESUMO:** Bactérias solubilizadoras de fósforo (BSP) têm sido reconhecidas como uma estratégia alternativa para melhoria da aquisição de fósforo (P) por plantas a partir de mecanismos de biossolubilização do fosfato no solo pela produção de ácidos orgânicos. BSP endofíticas facultativas podem colonizar o tecido da planta e da rizosfera, bem como atuar em mecanismos adaptativos que favorecem a sua competição com outros microrganismos. Cinquenta e cinco bactérias previamente selecionadas como BSP endofíticas de milho eficientes na solubilização de P isoladas a partir da seiva, folhas e raízes de milho foram identificadas por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e testadas quanto à sua eficácia para a produção de ácidos orgânicos. As estirpes foram cultivadas em meio líquido contendo fosfato tricálcio insolúvel por 6 dias a 30 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi utilizado para a quantificação dos ácidos por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). A produção dos ácidos orgânicos variou significativamente ( $p \leq 0,05$ ) entre os isolados. O ácido glucônico foi o mais frequente, o que pode ser explicado pelo mecanismo de sua formação via oxidação direta da glicose pela enzima glicose desidrogenase dependente de pirroloquinolina quinona (PQQ). O gênero *Bacillus* foi o predominante (54,55 %) entre os isolados e estão sendo testados em plantas para uso como bioinoculantes na melhoria de aquisição de P na cultura do milho.

**Termos de indexação:** ácido glucônico, fósforo, *Zea mays* L.

### INTRODUÇÃO

Os solos de Cerrado são caracteristicamente ácidos, possuem baixa fertilidade natural e, conseqüentemente, baixa disponibilidade de nutrientes essenciais, como o fósforo (P). Mesmo

com adubação fosfatada, o P fica pouco disponível para as plantas devido ao fenômeno de fixação com componentes do solo.

Uma forma alternativa para disponibilização de P é a utilização de rochas fosfáticas (fosfato natural) como insumo estratégico em muitos países (Mechri et al., 2014). No entanto, a aplicação direta de fosfatos naturais como fertilizante, principalmente para culturas anuais como o milho, não é economicamente viável em solos com alta capacidade de adsorção e baixa capacidade de troca iônica, como os de Cerrado brasileiro, devido à baixa solubilidade destas rochas.

A combinação entre fosfato de rocha e bactérias solubilizadoras de P (BSP), capazes de solubilizarem o fosfato proveniente destas rochas, incrementa a eficiência de utilização dos fosfatos naturais, sendo uma estratégia biotecnológica viável para aumentar a efetividade dos fertilizantes e/ou para diminuir a dose de fertilizantes solúveis empregada em sistemas agrícolas (Singh & Reddy, 2011). Um dos principais mecanismos bioquímicos envolvidos na solubilização de P é produção de ácidos orgânicos como acetato, láctico, oxálico, tartárico, succínico e principalmente o ácido glucônico que atuam dissolvendo diretamente o material fosfático e/ou quelando cátions que acompanham o ânion fosfato (Chen et al., 2006).

Diante disto, o objetivo deste trabalho foi quantificar a produção de ácidos orgânicos por bactérias endofíticas solubilizadoras de fosfato, isoladas de milho.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 55 estirpes de bactérias endofíticas provenientes da raiz, folha e seiva de milho, pertencentes à Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo, previamente caracterizadas como BSP.

### Quantificação de ácidos orgânicos

A quantificação dos ácidos acético, butírico, cítrico, glucônico, 2-cetoglucônico, 5-cetoglucônico, láctico, oxálico, propiônico e succínico foi realizada no Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Minas Gerais, por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). As estirpes foram inoculadas em meio líquido NBRIP (Nautiyal, 1999) por 6 dias e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação desses ácidos.

A concentração de cada ácido orgânico foi determinada utilizando-se um cromatógrafo modelo LC-20A Prominence, Shimadzu (Japão), equipado com uma coluna SUPELCOGEL C-610H 30 cm x 7,8 mm (Sigma). A separação ocorreu a 65 °C, sendo a fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM com um fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>. Foi utilizado detector de índice refrativo RID-10A, com a temperatura da célula a 45°C. As concentrações dos diferentes ácidos orgânicos foram determinadas a partir da construção de curva padrão relacionando as concentrações individuais de soluções padrões de ácidos orgânicos com as áreas dos picos geradas.

### Identificação das bactérias endofíticas

A identificação molecular dos isolados bacterianos endofíticos de raiz, seiva e folha de milho foi realizada com base na identidade de sequências de 16S rDNA, utilizando os *primers* universais F968 e R1401 (Nubel et al., 1996).

Os produtos da amplificação da PCR foram removidos do gel e purificados utilizando-se o kit “*QIAquick Gel Extraction*” (Qiagen). As reações de sequenciamento foram preparadas com Big Dye V3.1 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA) e analisadas no sequenciador automático ABI Prism 3100 (*Applied Biosystems*). As sequências obtidas foram comparadas com sequências de DNA depositadas no banco de dados GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)) por meio da ferramenta Blast (Altschul et al., 1997) para identificação das bactérias.

### Delineamento e análise estatística

Os ensaios foram conduzidos segundo o delineamento inteiramente casualizado com três repetições por amostra. Os resultados de cada ensaio foram submetidos à análise de variância e, quando ocorreram diferenças significativas pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade utilizando-se o programa Sisvar 5.3 (Ferreira, 2010).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise cromatográfica para determinação de ácidos orgânicos produzidos por bactérias

endofíticas solubilizadoras de P foi realizada considerando-se o tempo de incubação de 6 dias, pois, nesse período, observou-se que a maioria dos isolados apresentou, em média, maiores valores absolutos de P solubilizado (Abreu, 2014).

A produção dos ácidos orgânicos variou significativamente ( $p \leq 0,05$ ) entre os isolados, assim como o tipo de ácido produzido por cada bactéria. De forma geral, a produção de ácidos orgânicos varia com as condições do meio, estado fisiológico e o tipo de microrganismo (Sousa, 2010).

Os ácidos orgânicos detectados foram acético, butírico, cítrico, glucônico, 2-cetoglucônico, láctico, oxálico, propiônico e succínico (**Figura 1**). Neste estudo, o ácido glucônico foi o mais frequente (**Figura 2**), o que já era esperado uma vez que, dentre os ácidos produzidos pelo metabolismo de bactérias solubilizadoras de P, os mais frequentemente detectados são o glucônico, 2-cetoglucônico, oxálico, succínico, cítrico, láctico (Bidondo et al., 2012). Os ácidos glucônico e 2-cetoglucônico são relatados como um dos principais mecanismos responsáveis pela solubilização de fosfato mineral, sendo resultados da via de oxidação direta de açúcares aldose mediada por ação enzimática. Behera et al. (2014) observaram que a concentração de 60 mM de ácido glucônico é comum em ensaios com solubilização de P e Miller et al. (2010) relataram que a produção de ácido glucônico pode chegar a 32,8 mM. em *Pseudomonas*. No nosso trabalho, as concentrações de ácido glucônico mensuradas foram de 16 a 324 mM, evidenciando o potencial de solubilização de P dos isolados avaliados.

O gênero *Bacillus* foi predominante (54,55%) entre os isolados endofíticos produtores de ácidos orgânicos. Todas as espécies identificadas foram relatadas na literatura como endofíticas facultativas, devido a sua capacidade de colonizar tanto o tecido vegetal quanto a rizosfera (Bacon & Hinton, 2011).

## CONCLUSÕES

Há variabilidade genética quanto ao potencial de produção de ácidos orgânicos entre as estirpes bacterianas endofíticas avaliadas.

O principal ácido orgânico produzido pelas bactérias endofíticas de milho solubilizadoras de P, foi o ácido glucônico.

A produção de ácido glucônico mensurada neste estudo foi superior à de outros trabalhos relatados na literatura.

*Bacillus* foi o gênero predominante entre os isolados avaliados.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Embrapa Milho e Sorgo e à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

## REFERÊNCIAS

ABREU, C. S. Seleção e caracterização de bactérias endofíticas isoladas de plantas de milho com potencial para a biossolubilização de rochas fosfáticas. 2014. 47 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de São João Del Rei, Sete Lagoas.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

BACON, C.W.; HINTON, D.M. *Bacillus mojavensis*: Its Endophytic Nature, the Surfactins, and Their Role in the Plant Response to Infection by *Fusarium verticillioides*. In: MAHESHWARI, D.K. (Ed.). **Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses**, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2011, p.21-39.

BEHERA, B.C.; SINGDEVSACHAN, S.K.; MISHRA, R.R.; DUTTA, S.K.; THATOI, H.N. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilizing microorganism in mangrove – a review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p.1-14, 2014.

BIDONDO, L.F.; BOMPADRE, J.; PERGOLA, M.; SILVANI, V.; COLOMBO, R.; BRACAMONTE, F.; GODEAS, A. Differential interaction between two *Glomus intraradices* strains and a phosphate solubilizing bacterium in maize rhizosphere. **Pedobiologia**, v.55, p.227-232, 2012.

CHEN, Y.P. REKHA, P.D. ARUN, A.B. SHEN, F.T. LAI, W.-A. & YOUNG, C.C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology**, v. 34, p. 33–41, 2006.

FERREIRA, D.F. SISVAR - Sistema de análise de variância. Versão 5.3. DEX.Lavras-MG: UFLA, 2010.

MECHRI, B.; ATTIA, F.; TEKAYA, M.; CHEHEB, H., HAMMAMI, M. Agronomic application of olive mill wastewaters with rock phosphate increase the 10Me18:0 fatty acid marker of actinomycetes and change rhizosphere microbial functional groups under long-term field conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 70, p.62-65, 2014.

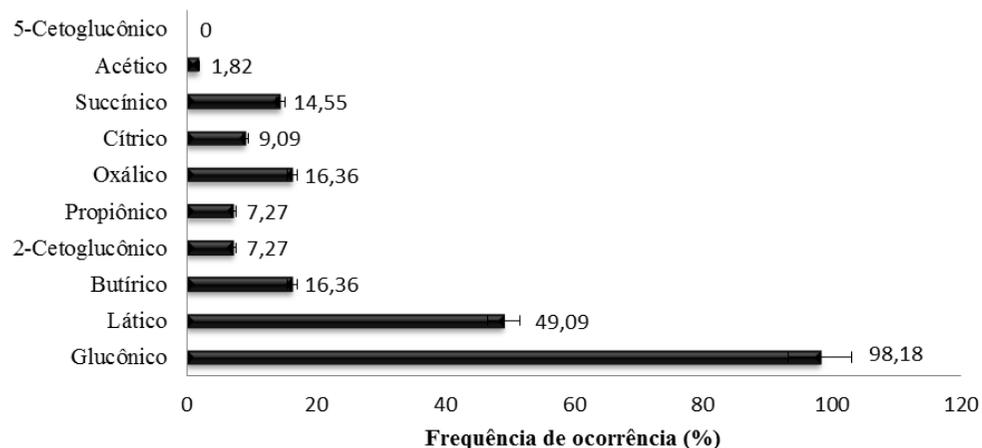
MILLER, S.H.; BROENE, P.; PRIGENT-COMBARET, C.; COMBES-MEYNET, E.; MORRISSEY, J.P.; O’GARA, F. Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species. **Environmental Microbiology Reports**, v.2, n.3, p. 403–411, 2010.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 170, p. 265-270, 1999.

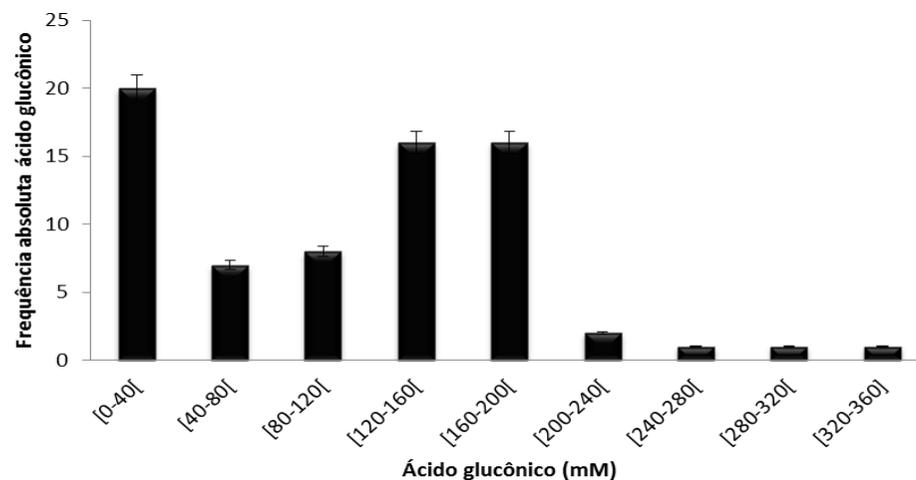
NUBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v.178, p.5636-5643, 1996.

SINGH, H.; REDDY, M. Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. **European Journal of Soil Biology**.v.47, p.30-34, 2011.

SOUSA, C.B. Solubilização de fósforo por bactérias endofíticas. 2010. 38p. **Dissertação** (mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco.



**Figura 1.** Produção relativa de ácidos orgânicos por bactérias endofíticas de milho solubilizadoras de fósforo, detectados pelo índice de refração em cromatografia líquida de alta eficiência. Barras horizontais indicam o erro padrão da média de três repetições.



**Figura 2.** Frequência absoluta de ácido glucônico (mM) dentro dos intervalos de classes [0-360 mM] para as bactérias endofíticas de milho solubilizadoras de fósforo. Barras verticais indicam o erro padrão da média de três repetições.