Detecção de óxido nítrico produzido por microrganismos

Karina F. D. N. Santos[1] (PG)*, Marilene Silva Oliveira[1] (PG), Railane Monteiro de Paula[1] (IC), Claudia C. G. Martin-Didonet[1] (PQ)

e-mail: kabiomol@gmail.com

[1]Câmpus De Ciências Exatas E Tecnológicas – CCET, BR 153 n°3105 - Fazenda Barreiro do Meio, Anápolis - GO, CEP 75132-903.

Resumo: Bactérias promotoras de crescimento de planta são potenciais biofertilizantes devido a várias características como: fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios e produção de óxido nítrico (NO), entre outras. Este último é um importante mensageiro secundário em plantas com um papel central nas vias de sinalização para o crescimento e desenvolvimento da raiz. Assim, o objetivo deste trabalho é identificar bactérias produtoras de NO, através do método de Griess associado com a detecção do 2,3-diaminonaftaleno (DAN) por fluorescência, o qual ao entrar em contato com NO forma um complexo fluorescente (NAT). A produção de NO foi monitorada durante 24, 48 e 72 horas, sendo utilizadas oito estirpes: FP2 (*Azospirillum brasilense)*, HM053 (*A. brasilense*), SmR1 (*Herbaspirillum seropedicae*), Y2 (*Nitrospirillum amazonense)*, BR322 (*Rhizobium tropici)*, L40 (*Agrobacterium fabrum*), Pal5 (*Gluconacetobacter diazotrophicus)* e R5 (*Agrobacterium fabrum*). A espécie *R. tropici* (Br322) foi a que apresentou maior produção de NO nos diferentes tempos de crescimento, enquanto a *N. amazonense* (Y2) e *H. seropedicae* (SmR1) não foram capazes de produzir NO. Esses resultados corroboram com as análises de fluorescência do NAT. Esta estratégia de estudo permitirá monitorar bactérias em diferentes ambientes, quanto à produção de NO para elaboração de novas tecnologias para a utilização na agricultura.

Palavras-chave: Rizobactérias. Biofertilizantes. 2,3-diaminonaftaleno (DAN).

Introdução

As rizobactérias que estabelecem interação positiva com a raiz são denominadas de bactérias promotoras de crescimento da planta ou PGPB (*Plant Growth Promoting Bacteria*), e são promissoras como biofertilizantes na agricultura sustentável (VESSEY, 2002). As PGPB podem promover o crescimento das plantas diretamente através da fixação biológica do nitrogênio, disponibilizando nutrientes presentes no solo (solubilizam fósforo e ferro) e pela produção de fitormônios como ácido indol acético (AIA), giberilina e citocinina que induzem mudanças morfológicas e fisiológicas das raízes promovendo o crescimento vegetal. Ainda podem atuar indiretamente reduzindo os efeitos negativos de patógenos (DOBBELAER; VANDERLEYDEN; OKON, 2003; GLICK 2012).

Os benefícios da aplicação de biofertilizantes são amplamente reconhecidos na simbiose de leguminosas com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (VARGAS;

HUNGRIA, 1997). No entanto, outros gêneros de bactérias como *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum, Burkholderia e Rhizobium* também são potenciais biofertilizantes e por isso têm sido extensivamente estudados (BALANDREAU, 2001; BALDANI et al.,1986; BILAL et al., 1990; GILLIS et al., 1989; REINHOLD-HUREK et al., 1993; YANNI; DAZZO 2010).

Algumas rizobactérias também são responsáveis pelo processo de nitrificação-desnitrificação, sendo o óxido nítrico ou nitric oxide (NO), um intermediário obrigatório nestes processos. No processo de desnitrificação ocorre a redução do nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), NO, e óxido nitroso (N_2O) a nitrogênio gasoso (N_2), envolvendo as enzimas: nitrato redutase (reduz NO_3^- a NO_2^-), nitrito redutase (NO_2^- a NO), óxido nítrico redutase (NO a N_2O) e a óxido nitroso redutase (N_2O a N_2) (SPANNING et al., 2007). Já no processo de nitrificação ocorre a oxidação da amônia (NH_3) a nitrito (NO_2^-), sendo a hidroxilamina (NH_2OH) um dos intermediários. As principais enzimas desta etapa de nitrificação são: a amônia mono-oxigenase (converte NH_3 para NH_2OH), e a hidroxilamina oxidoredutase (converte NH_2OH em NO_2^-). Existem outras enzimas envolvidas no processo de nitrificação como a nitrito redutase e a óxido nítrico redutase (KLOTZ; STEIN 2008).

Óxido nítrico está envolvido no crescimento, desenvolvimento e na resposta de defesa das plantas (LAMATTINA et al., 2003). Esta molécula sinal induz a produção de AIA, promovendo a formação de raízes adventícias, raízes laterais e pêlos radiculares, o que contribui para o melhoramento do crescimento e desenvolvimento das plantas (PAGNUSSAT et al., 2002). Segundo Koul e colaboradores (2015) existem uma forte correlação entre o metabolismo de NO e a biossíntese de AIA, o que sugere mecanismos de sinalização comuns entre essas duas vias em bactérias.

Desta forma a identificação e seleção de bactérias PGPB produtoras de NO, podem auxiliar no desenvolvimento de novas tecnologias para ser utilizadas na agronômica. Assim, o objetivo deste trabalho é detectar bactérias produtoras de NO e selecionar estirpes promissoras para testes *in planta* que poderão ser utilizadas como biofertilizantes.

Materiais e Métodos

Material biológico: Foram utilizadas 8 diferentes estirpes de bactérias: 1) FP2 *(Azospirillum brasilense);* 2) HM053 *(*A. *brasilense);* 3) SmR1 *(Herbaspirillum*

seropedicae); 4) Y2 *(Nitrospirillum amazonense*); 5) BR322 *(Rhizobium tropici*); 6) L40 *(Agrobacterium fabrum);* 7) Pal5 *(Gluconacetobacter diazotrophicus)* e 8) R5 *(Agrobacterium fabrum).*

Meio de cultivo: As bactérias foram crescidas em placas de 96 poços contendo meio líquido NFbHP-lactato (PEDROSA; YATES, 1984), acrescido de 10 mM de KNO_3, a 30˚C sob 140 rpm de agitação. Após 24, 48 e 72 horas de crescimento as bactérias foram coletadas, centrifugadas e o sobrenadante utilizado para as dosagens de NO.

Detecção de NO: A determinação de NO pelo método de Griess foi realizada segundo Amenta e colaboradores (2015). Já para a detecção da fluorescência as bactérias foram crescidas nas mesmas condições descritas acima, exceto que foi acrescido ao meio um captador de NO, o 2,3-diaminonaftaleno (DAN) na concentração de 80 µg . ml $^{-1}$. Foram utilizados 2 controles (meio líquido sem bactéria): 1) meio NFbHP-lactato com DAN; 2) meio NFbHP-lactato sem DAN. Após os tempos de incubação, as bactérias foram centrifugadas e o sobrenadante foi depositado em uma placa de Elisa de 96 poços (própria para fluorescência) e as análises foram realizadas no equipamento ExpectraMax Paradigm (Molecular Devices) com excitação em 360 nm e emissão em 465 nm.

Resultados e Discussão

Através do método de Griess (1879), método colorimétrico que quantifica indiretamente a produção de NO, foi analisada a produção de NO pelas diferentes bactérias após 24, 48 e 72 horas de crescimento em meio líquido. A espécie *R. tropici* (Br322) foi a que apresentou maior produção de NO nos diferentes tempos de crescimento (Tabela 1). Enquanto as espécies *N. amazonense* (Y2) e *H. seropedicae* (SmR1) não foram capazes de produzir NO em nenhum tempo avaliado (Tabela 1). *A. fabrum* (R5) apresentou um valor baixo (11,7 µM de NO) com 24 horas de crescimento, sendo observada ausência de produção de NO nos demais tempos (Tabela 1). As espécies *A. brasilense* (FP2 e HM053), *G. diazotrophicus* (Pal5) e *R. tropici* (Br322) apresentaram produção de NO com 24 horas da inoculação, após esse período houve um decréscimo na produção de NO para todas as estirpes, exceto para a *Azospirillum sp* (L40). Esta estirpe L40 não produziu NO com 24 horas de crescimento, porém com 48 e 72 horas foram detectadas 252,5 e 142,7 µM de NO, respectivamente (Tabela 1). Essa diferença no tempo de detecção de NO pode estar relacionada com um perfil de crescimento diferente observado

para a estirpe L40, porém uma curva de crescimento deverá ser realizada para melhor caracterização desta bactéria.

Os resultados qualitativos de fluorescência confirmaram a formação do complexo fluorescente pela reação de NO com DAN. A figura 1 mostra um gráfico em 3D da análise de fluorescência, onde foram observados que as espécies *A. brasilense* FP2, HM053, *R. tropici* Br322 e *G. diazotrophicus* Pal5 foram as que apresentaram maior índice de fluorescência após a incubação com DAN, corroborando com os dados espectroscópicos obtidos pela reação de Greiss. Enquanto para as espécies *H. seropedicae* (SmR1), *Azospirillum sp* (L40), *N. amazonense* (Y2) e *A. fabrum* (R5) não foi observada formação do complexo NAT até 72 horas de crescimento, como observado por Griess para *H. seropedicae* (SmR1), *N. amazonense* (Y2) e *A. fabrum* (R5)(produção muito baixa de NO e apenas com 24 horas de crescimento) (Tabela 1 e Figura 1). A *Azospirillum sp* (L40) não formou o complexo fluorescente NAT após 48 e 72 horas como era esperado, já que foi observado a produção de NO pelo método de Griess (Tabela 1 e Figura 1). Esses dados deverão ser melhor investigado.

Creus e colaboradores (2005) também observaram a produção de NO para a espécie *A. brasilense*, e concluíram que o NO produzido por esta bactéria está envolvido com a indução de raízes laterais em plantas de tomate. Já para o gênero *Rhizobium* a produção de NO ocorre durante o processo de simbiose entre *Rhizobium* e leguminosas desde os primeiros passos até a formação dos nódulos de fixação de nitrogênio (PUPPO et al., 2013). O genoma de *H. seropedicae* SmR1 foi completamente sequenciado e não foram encontrados genes que codificam enzimas presentes no processo de desnitrificação, como a óxido nitroso redutase (PEDROSA et al., 2011). Baldani e colaboradores (1986) também não encontram evidências do processo de desnitrificação em *H. seropedicae.* Esses resultados são consistentes com os dados obtidos em nosso trabalho.

Tabela 1. Determinação de óxido nítrico pelo método de Griess (1879) para 8 diferentes estirpes de bactérias crescidas por 24, 48 e 72 horas em meio líquido acrescido de 10 mM de KNO_3 a 30˚C sob 140 rpm de agitação.

Espécies e estirpes	[µM de NO] em diferentes tempos:		
	24 horas	48 horas	72 horas
Azospirillum brasilense (FP2)	245,5	104,3	0,0
Nitrospirillum amazonense (Y2)	0,0	0,0	0,0
A. brasilense (HM053)	255,7	167,7	91,5
Gluconacetobacter diazotrophicus (Pal 5)	254,7	183,7	164,5
Rhizobium tropici (Br322)	276,3	252,7	193,7
Azospirillum sp (L40)	0,0	252,5	142,7
Herbaspirillum seropedicae (SmR1)	0,0	0,0	0,0
Agrobacterium fabrum (R5)	11,7	0,0	0,0

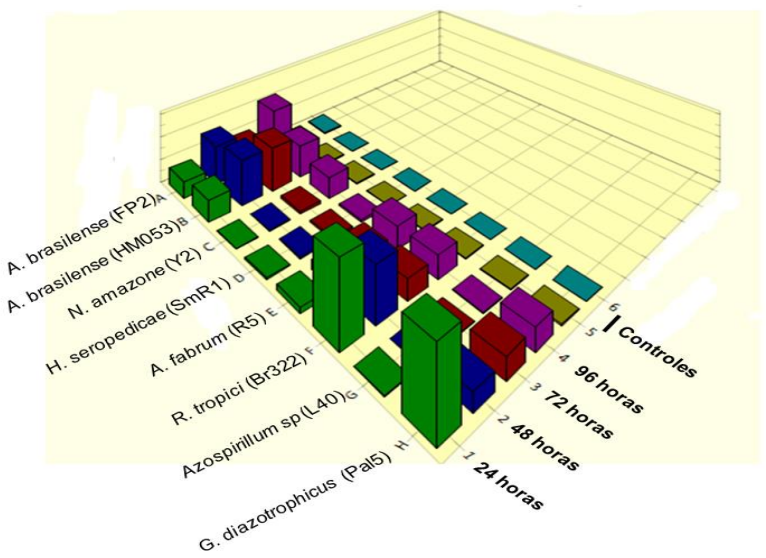

Figura 1. Dados de Fluorescência obtidos para os sobrenadantes das 8 diferentes estirpes de bactérias após 24, 48, 72 e 96h de incubação com DAN. Controles sem bactérias: 1) meio líquido NFBHP-lactato sem DAN (linha 5); e 2) meio líquido NFBHP-lactato com DAN (linha 6).

Considerações Finais

O trabalho traz uma nova abordagem para a detecção NO em bactérias ao utilizar o captador 2,3-diaminonaftaleno (DAN), o qual é um método mais sensível que a reação de Greiss. Além de identificar bactérias promissoras para testes *in planta* que poderão ser utilizadas como biofertilizantes na agricultura.

Agradecimentos

Aos programas de pós-graduação: Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde (CAPS) e Ciências Moleculares – UEG/Campos Henrique Santillo. Ao suporte financeiro PNPD/CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e CNPq.

Referências

AMENTA, M; MOLINA-FAVERO, C; CREUS, C. M; LAMATTINA, L. Chapter 9: Nitric oxide in *Azospirillum* and Related Bacteria: Production and Effects. In: Cassán; F.D; Okon, Y; Creus, C.M Handbook for *Azospirillum*. Ed. Springer, pp 155-180, 2015.

BALANDREAU, J.; VIALLARD, V.; COURNOYER, B.; COENYE, T.; LAEVENS, S.; VANDAMME, P. *Burkholderia cepacia* genomovar III is a common plant-associated bacterium. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, p.982-985, 2001.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **Int J Syst Bacteriol,** v. 36, p. 86-93, 1986.

BILAL, R.; RASUL, G.; QURESHI, J.A.; MALIK, K. A. Characterisation of *Azospirillum* and related diazotrophs associated with roots of plants growing in saline soils. **World J Microbiol Biotechnol,** v. 6, p. 46-52, 1990.

DOBBELAERE, S; VANDERLEYDEN, J; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Review in Plant Sciences** v. 22, p.107–149, 2003

GILLIS, M; KERSTERS, K; HOSTE, B; JANSSENS, D; KROPENSTEDT, R. M; STEPHEN, M.P; TEIXEIRA, K. R. S; DÖBEREINER, J; DE LEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. **Int J Syst Bacteriol,** v. 39, p. 361-364, 1989.

GLICK, B.R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Hindawi Publishing Corporation, **Scientifica**, 2012.

GRIESS, J. P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH: Wesely und Benedikt “U¨ ber einige Azoverbindungen.” Ber. Deutsch. **Chem. Ges**. 12, 426–428, 1879.

KLOTZ, M.G; STEIN, L.Y. Nitrifier genomics and evolution of the nitrogen cycle. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, n. 2, p. 146-56, 2008.

LAMATTINA, L. et al. The Versatility of an Extensive Signal Molecule. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, n. 1, p. 109–136, 2003.

PAGNUSSAT, G. et al. Nitric Oxide Is Required for Root Organogenesis. **Plant Physiology**, v. 129, n. 3, p. 954–956, 2002.

PEDROSA, F.O; YATES, M.G. Regulation of nitrogen fixation (nif) genes of A*zospirillum brasilense* by nifA and ntrC (glnG) type genes. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 55, p. 95-101, 1984.

Pedrosa F.O; Monteiro R.A; Wassem R; Cruz L.M; Ayub R.A, et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses. **PLoS Genet.** v.7, p.1-10, 2011.

PUPPO, A; PAULY, N; BOSCARI, A; MANDON, K; Brouquisse, R. Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide: Key Regulators of the Legume—*Rhizobium*and Mycorrhizal Symbioses. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.18(16)p.2202-2219, 2013.

REINHOLD-HUREK, B. R; HUREK, T; GILLIS, M; HOSTE, B; VANCANNEYT, M; KERSTERS, K. DE LEY. *Azoarcus* gen. nov. Nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of kallar grass (Leptochoa fusca (L.) Kunth) and description of two species, *Azoarcus indigens* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. **Int J Syst Bacteriol**, v. 43, p. 574-584, 1993.

SPANNING, R; RICHARDSON, D.J; FERGUSON, S.J. Introduction to the Biochemistry and Molecular Biology of Denitrification. In: Bothe, H.; Ferguson, S; Newton, W.E. **Biology of the Nitrogen Cycle**. Amsterdam: Elsevier, p. 198-217, 2007.

VARGAS, M. A. T; HUNGRIA, M. Fixacao biologica do N_2 na cultura da soja. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M (Ed.). Biologia dos solos de cerrados. Planaltina, **Biologia dos solos de cerrados,** 1997.

VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil,** v. 255, p.571–586, 2002.

YANNI, Y.G; DAZZO, F.B. Enhancement of rice production using endophytic strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in extensive field inoculation trials within the Egypt Nile delta. **Plant and Soil,** v. 336, p.129-142, 2010.