

Identificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de compostos indólicos produzidos por bactérias

Marilene S. Oliveira (PQ)*, Karina F. d'Eça N. Santos (PQ), Railane M. de Paula (IC), Claudia C. Garcia Martin-Didonet (PQ)

e-mail: *marilenes36@gmail.com

Campus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo, Universidade Estadual de Goiás. CCET, BR 153 n°3105 - Fazenda Barreiro do Meio, Anápolis - GO, CEP 75132-903.

Resumo: Auxinas são fitohormônios que desempenham papel fundamental na regulação dos processos fisiológicos de plantas. Estes fitohormônios são sintetizados por bactérias e é uma característica de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV). A auxina mais estudada é o ácido indolacético (AIA) e um dos precursores de sua biossíntese é o triptofano, com vários caminhos e diferentes intermediários. Neste trabalho a produção de auxinas foi avaliada em oito espécies de bactérias BPCV pela detecção de compostos indólicos (CI) espectroscopicamente e pela identificação e separação das auxinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os dados espectroscópicos mostraram maior produção de CI para *Agrobacterium fabrum* (R5) de $59,16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e para *Rhizobium tropici* (Br322) de $41,15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Dois padrões de auxinas, além do AIA, foram utilizados para as análises por CLAE, o indol-3-carboxialdeído e o indol-3-acetaldeído bissulfato de sódio, os quais foram identificados nas bactérias Pal 5, L40 e R5. Um número maior de picos foram encontrados para R5 do que nas demais indicando que esta bactéria produz mais de uma auxina. A utilização destas técnicas possibilitará a identificação, separação e quantificação de auxinas produzidas por bactérias e também pode auxiliar nos estudos para o entendimento da interação planta-bactéria.

Palavras-chave: Auxinas, Ácido Indolacético, Cromatografia

Introdução

As rizobactérias são bactérias presentes no solo que habitam regiões próximas as raízes das plantas (rizosfera). Algumas dessas rizobactérias não somente beneficiam a planta com nutrientes secretados, mas também através da fixação biológica do nitrogênio, convertem o N_2 em amônio, o qual é uma forma assimilável pelas plantas. Assim, são consideradas como biofertilizantes (DIXON; KAHN, 2004).

A presença de diferentes sistemas que envolvem a utilização e aplicação de biofertilizantes é de fundamental importância na simbiose de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e leguminosas (VARGAS; HUNGRIA, 1997). No entanto, os estudos de outros gêneros como potenciais biofertilizantes, do tipo *Azospirillum*,

Gluconacetobacter, *Azoarcus*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Rhizobium* têm sido extensivamente explorados (BALANDREAU, 2001)

A produção de auxinas também é um exemplo de efeitos benéficos para a planta. Os fitohormônios como auxinas estão envolvidos em alguns estágios do crescimento e desenvolvimento da planta, como alongamento e divisão celular, diferenciação do tecido e também estão envolvidos na interação planta-bactéria. Efeitos como alterações no desenvolvimento do sistema radicular na absorção da biomassa pela planta têm sido relacionados principalmente a produção de auxinas. O ácido indolacético (AIA) é a auxina mais importante. O triptofano é considerado o precursor da biossíntese do AIA, a adição deste amino ácido ao meio de cultura aumentam a produção de AIA, sendo que é descrito que a biossíntese de AIA utilizando esse precursor pode seguir pelo menos cinco rotas de biossíntese, as quais podem produzir outras auxinas como intermediários (RODRIGUES, 2009; COSTACURTA, 1995). Diante disso um estudo de identificação e quantificação de compostos indólicos produzidos por diferentes bactérias é fundamental para entender a simbiose planta-bactéria.

Material e Métodos

Foram utilizadas 6 diferentes espécies de bactérias: 1) *A. brasilense*, estirpe selvagem FP2 e o seu mutante espontâneo HM053; 1.1) *Azospirillum* sp (L40), 2) *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Pal5); 3) *Rhizobium tropici* (Br322), 4) *Nitrospirillum amazonense* (Y2); 5) *Herbaspirillum seropedicae* (SmR1) e 6) *Agrobacterium fabrum* (R5). Estas bactérias foram crescidas em placas de 96 poços contendo meio líquido NFbHP-lactato (PEDROSA; YATES, 1984), acrescido de 5 mM de triptofano, a 30°C sob 140 rpm de agitação. Após 72 horas de crescimento as bactérias foram centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para as dosagens espectrofotométrica (540 nm) dos compostos indólicos totais pelo reagente de Salkowski segundo Glickmann e Dessaux, (1995) e também para as análises por CLAE. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

Foram utilizados os compostos padrões para as análises por CLAE: ácido indolacético (AIA), indol-3-carboxialdeído e o indol-3-acetaldeído bissulfito. Para as análises cromatográficas foi utilizado um equipamento CLAE da Varian ProStar. O volume de injeção das amostras foram de 20 µL e as injeções foram feitas de forma automática em um injetor automático ProStar modelo 410. A coluna cromatográfica utilizada foi uma Kinetex C18 (Phenomenex, 4.6 x 250 mm, 5 µm). O sistema de

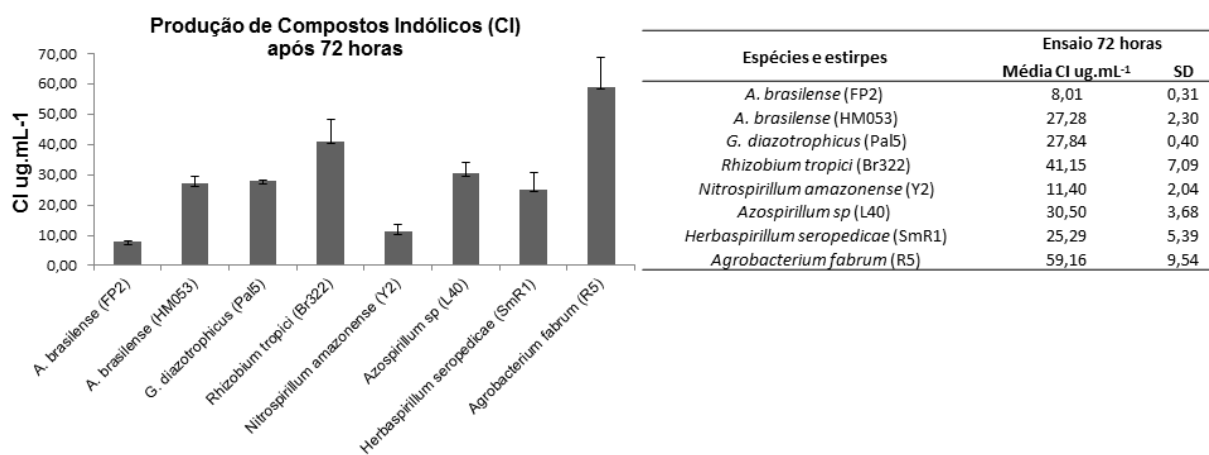
elução foi acetonitrila/ácido acético 1% em um gradiente de 5-90% de acetonitrila em 30 min, 90-5% de acetonitrila em 32 min e permanece em 5% de acetonitrila até 35 min, utilizando uma bomba PorStar modelo 240. O detector utilizado foi de UV-Vis, ProStar 310 de comprimento de onda fixo, o comprimento de onda selecionado foi 280 nm.

Para a análise dos dados foi utilizado os valores de média simples e o desvio padrão (SD) das repetições e também para a elaboração dos gráficos o software Excell (Microsoft Office 2013)

Resultados e Discussão

A dosagem dos compostos indólicos totais utilizando o reagente de Salkowski com detecção em 540 nm apresentado na Figura 1 mostrou que as bactérias R5 e Br322 apresentaram, após 72h de crescimento na presença de triptofano, maior produção de compostos indólicos (CI) de 59,16 e 41,15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados mostraram que a produção de compostos indólicos é independente da espécie da bactéria.

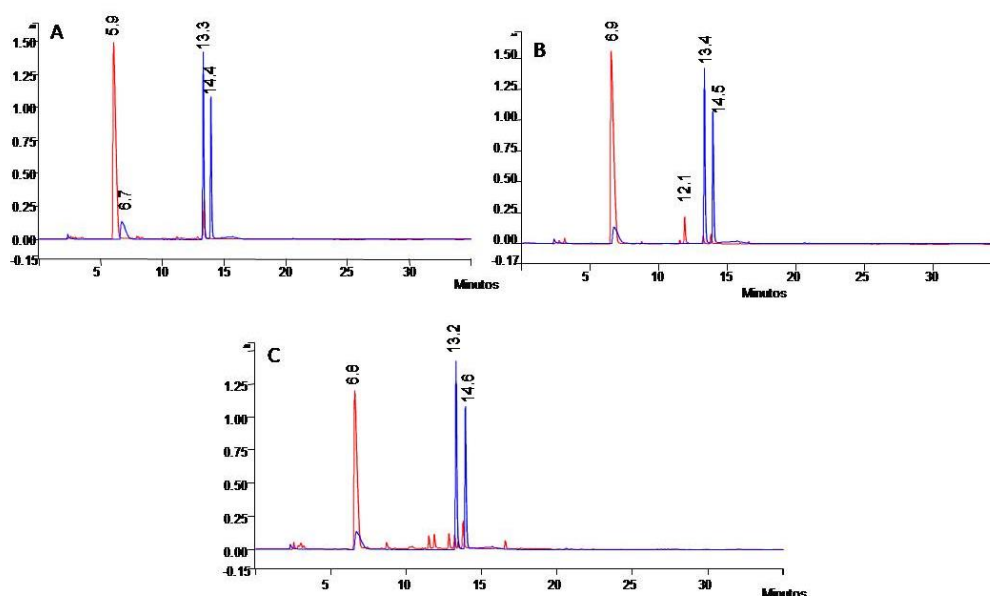
Figura 1- Quantificação de compostos indólicos em diferentes espécies de bactéria pelo método espectrofotométrico utilizando reagente de Salkowski.



Para avaliar a presença de auxinas no sobrenadante após 72h de crescimento da bactéria na presença de triptofano os sobrenadantes foram analisados por CLAE. O indol-3-carboxialdeído e o indol-3-acetaldeído bissulfato de sódio juntamente com o ácido indolacético (AIA) foram utilizados como padrão e a Figura 2 apresenta os cromatogramas obtidos para as bactérias Pal 5 (Fig. 2A), L40 (Fig. 2B) e R5 (Fig. 2C) onde foram detectados picos com mesmo tempo de retenção, sendo que os cromatogramas obtidos para as estirpes FP2 e SmR1 foram muito similares a R5, onde foram observados maior quantidade de picos. Após o

crescimento o sobrenadante apresentou uma coloração marrom, a qual precisa ser investigada, pois pode estar também ocorrendo a formação de pigmentos tais como a melanina.

Figura 2 – Cromatograma obtido para as bactérias (A) Pal 5, (B) L40, (C) R5, em vermelho, e para os padrões indol-3-carboxialdehído, indol-3-acetaldehído bissulfito de sódio e o ácido indolacético (AIA), respectivamente em azul.



Considerações Finais

- Foi possível a identificação e quantificação de compostos indólicos produzidos por 6 diferentes espécies de bactérias, sendo que a produção de auxinas pode ser considerada estirpe-específica.
- Estas análises são fundamentais para estudos abordando a interação planta-bactéria assim como esta interação pode beneficiar a planta para ser utilizada como biofertilizantes.

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

- BALANDREAU, J.; VIALARD, V.; COURNOYER, B.; COENYE, T.; LAESENS, S.; VANDAMME, P. *Burkholderia cepacia* genomovar III is a common plant-associated bacterium. *Appl Environ Microbiol*, v. 67, p.982-985, 2001.
- COSTACURTA, A.; CANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Critical Review in Microbiology*, 21, 1-18, 1995.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. Nature reviews Microbiology, v. 2, p. 621-31, 2004.

GLICKMANN E., DESSAUX Y.: A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Appl Environ Microbiol. 61, 2, 793-796. 1995.

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. 7, 1-10, 2011.

RODRIGUES, E. P.; COELHO, M. S.; SOARES, C. P.; VIDAL, M. S.; ARAÚJO, J. L. S.; BALDANI, J. I.; Identificação e quantificação de composto indólico no sobrenadante de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, cultivada em meio líquido, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento-Embrapa Agrobiologia, 1-24, 2009.

VARGAS, M. A. T; HUNGRIA, M. Fixacao biologica do N₂ na cultura da soja. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M (Ed.). Biologia dos solos de cerrados. Planaltina, Biologia dos solos de cerrados, 1997.