

Bactérias resistentes à anti-bióticos em nódulos de *Vigna* spp. cultivados em solos de Caatinga

Valéria Borges da Silva¹; Aleksandro Ferreira da Silva²; Adailson Pereira de Souza³; Paulo Ivan Fernandes Júnior⁴

Resumo

O objetivo deste trabalho foi isolar e determinar a resistência intrínseca a anti-bióticos (RIA) de bactérias de nódulos de *Vigna* spp. em solos de Caatinga. Foi realizado um experimento utilizando-se amostras de solos de áreas de Caatinga dos municípios de Teresina, PI, Paulistana, PI; Uauá, BA; Juazeiro, BA e Petrolina, PE com três espécies de *Vigna* spp. A identificação filogenética de todos os isolados foi realizada pela análise das sequências parciais do gene 16S rRNA. Foi selecionado um isolado de cada gênero para os testes de resistência a nove tipos de anti-bióticos. Foram identificadas 17 bactérias, pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bacillus* e *Sphingomonas* isoladas de diferentes cultivares e locais de coleta, consideradas resistentes a pelo menos quatro tipos de anti-bióticos.

Palavras-chave: competitividade, fixação biológica de nitrogênio, inoculação, Semiárido.

Introdução

A associação entre leguminosas e bactérias do grupo rizóbio se destaca como uma relação simbiótica de grande eficiência e importância econômica (Moreira; Siqueira, 2006). No entanto, os nódulos dessas plantas podem ser

¹Bacharel em Tecnologia em Fruticultura Irrigada, doutoranda em Ciência do Solo – UFPB, professora do IFPI, Areia, PB.

²Engenheiro-agrônomo, doutorando em Ciência do Solo – UFRPE, Recife, PE.

³Engenheiro-agrônomo, DSc. em Fitotecnia, professor da UFPB, Areia, PB.

⁴Biólogo, D.Sc. em Ciência do Solo, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, paulo.ivan@embrapa.br.

colonizados, naturalmente, por diversos grupos de bactérias não rizobianas que, apesar de não nodularem, podem promover o crescimento vegetal por outros mecanismos (Dhole et al., 2016; Leite et al., 2017; Cardoso et al., 2018).

Bactérias autóctones possuem melhor adaptabilidade e estabilidade genética em suas condições ambientais de origem, quando comparadas às alóctones, introduzidas via inoculação, o que confere melhor eficiência na colonização, resistência a estresses abióticos e sobrevivência no solo. A capacidade de produzir ou resistir a bacteriocinas, substâncias antibacterianas produzidas por diversos rizóbios, e outros antibióticos sintetizadas pela população microbiana do solo, pode beneficiar estirpes nativas na co-colonização dos tecidos vegetais, como os nódulos radiculares (Naamala et al., 2016).

A identificação de bactérias resistentes a essas bacteriocinas e com potencial para promoção de crescimento possui implicações práticas importantes na recomendação de novas estirpes como inoculantes.

O objetivo deste trabalho foi determinar a sensibilidade a antibióticos de bactérias isoladas de nódulos de *Vigna* em solos de Caatinga do Semiárido nordestino.

Material e Métodos

Foi realizado um experimento para a obtenção de bactérias nodulares utilizando-se amostras de solos de áreas de Caatinga dos municípios de Teresina, PI (Latossolo); Paulistana, PI (Luvissolo); Uauá, BA (Planossolo); Juazeiro, BA (Neossolo flúvico) e Petrolina, PE (Argissolo). Como plantas-isca para a obtenção dos isolados foram utilizadas três espécies de *Vigna*: *V. mungo*; *V. radiata* e *V. unguiculata*, sendo esta última representada por duas variedades comerciais (BRS Pujante e BRS Novaera) e um genótipo de *V. unguiculata* subsp. *sesquipedalis* não cultivado comercialmente.

As plantas foram cultivadas em viveiro com sombrite nas dependências da Embrapa Semiárido por 35 dias, sendo irrigadas diariamente com água destilada autoclavada. Na ocasião da coleta, dois nódulos foram coletados aleatoriamente de cada vaso e sanitizados superficialmente de acordo com Vincent (1970) e, com auxílio de um estilete esterilizado, foram cortados e esfregados (parte interna) em placas de Petri com meio BDA com cloranfenicol (100 mg L⁻¹) e, em seguida, incubados a 28 °C.

Todos os isolados crescidos tiveram o DNA extraído com a utilização do kit de extração de DNA genômico Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega), seguindo-se as instruções do fabricante. A identificação filogenética de todos

os isolados foi realizada pela análise das sequências do gene 16S rRNA, amplificado utilizando-se os iniciadores universais Y1 e Y3.

Os produtos da PCR foram purificados e enviados para a empresa MacroGen (Seul, Coreia do Sul) para sequenciamento. A similaridade das sequências obtidas foi comparada às depositadas no banco de dados GenBank, do National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando-se a ferramenta BLASTn (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov).

O fingerprinting molecular foi avaliado por meio de reação de PCR com o iniciador microssatélite (GAC)₅. Em seguida, foi selecionado um isolado de cada gênero para os testes de resistência intrínseca a antibióticos.

O antibiograma foi realizado pelo método de difusão em placa com discos de papel impregnados utilizando-se os antibióticos ampicilina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), neomicina (30 µg), estreptomina (300 µg), eritromicina (15 µg), rifampicina (5 µg), vancomicina (10 µg) e ácido nalidíxico (30 µg). As bactérias foram crescidas em meio Dyg's líquido por 72 horas e a OD₅₄₀ ajustada para 0,3 em espectrofotômetro.

Uma alíquota de 100 µL de caldo de cultivo ajustado foi inoculado nas placas de meio BDA para posterior depósito dos discos com antibióticos. O experimento foi implantado em triplicata e as placas incubadas por 7 dias.

Resultados e Discussão

Foram obtidas 17 bactérias isoladas dos nódulos das plantas de *Vigna*, consideradas resistentes a cloranfenicol. A análise filogenética das sequências, obtidas a partir da análise parcial do gene 16S rRNA, revelou que a maioria das bactérias pertencem ao gênero *Pseudomonas* (10), isoladas de diferentes cultivares e locais de coleta, seguida dos gêneros *Rhizobium* (3), *Bacillus* (2) e *Sphingomonas* (2) (Figura 1).

A diversidade da comunidade de bactérias pode ocorrer em função da planta hospedeira, mas principalmente do solo cultivado (Leite et al., 2017). Neste trabalho, foi observada presença de isolados geneticamente próximos em amostras de solos de diferentes locais e em genótipos de *Vigna* distintos cultivados nos mesmos solos, indicando diversidade de bactérias resistentes a antibióticos, variando nos locais de coleta de solo e plantas-isca utilizados.

Os gêneros isolados nos nódulos de *Vigna*, coabitando com rizóbios neste estudo, são reconhecidos como bactérias promotoras de crescimento, capazes de produzir sideróforos, hormônios de crescimento, solubilizar fosfatos e tolerância a estresses abióticos, além de serem coabitantes dos nódulos de leguminosas com os rizóbios nodulantes (Dhole et al., 2016; Leite et al., 2017).

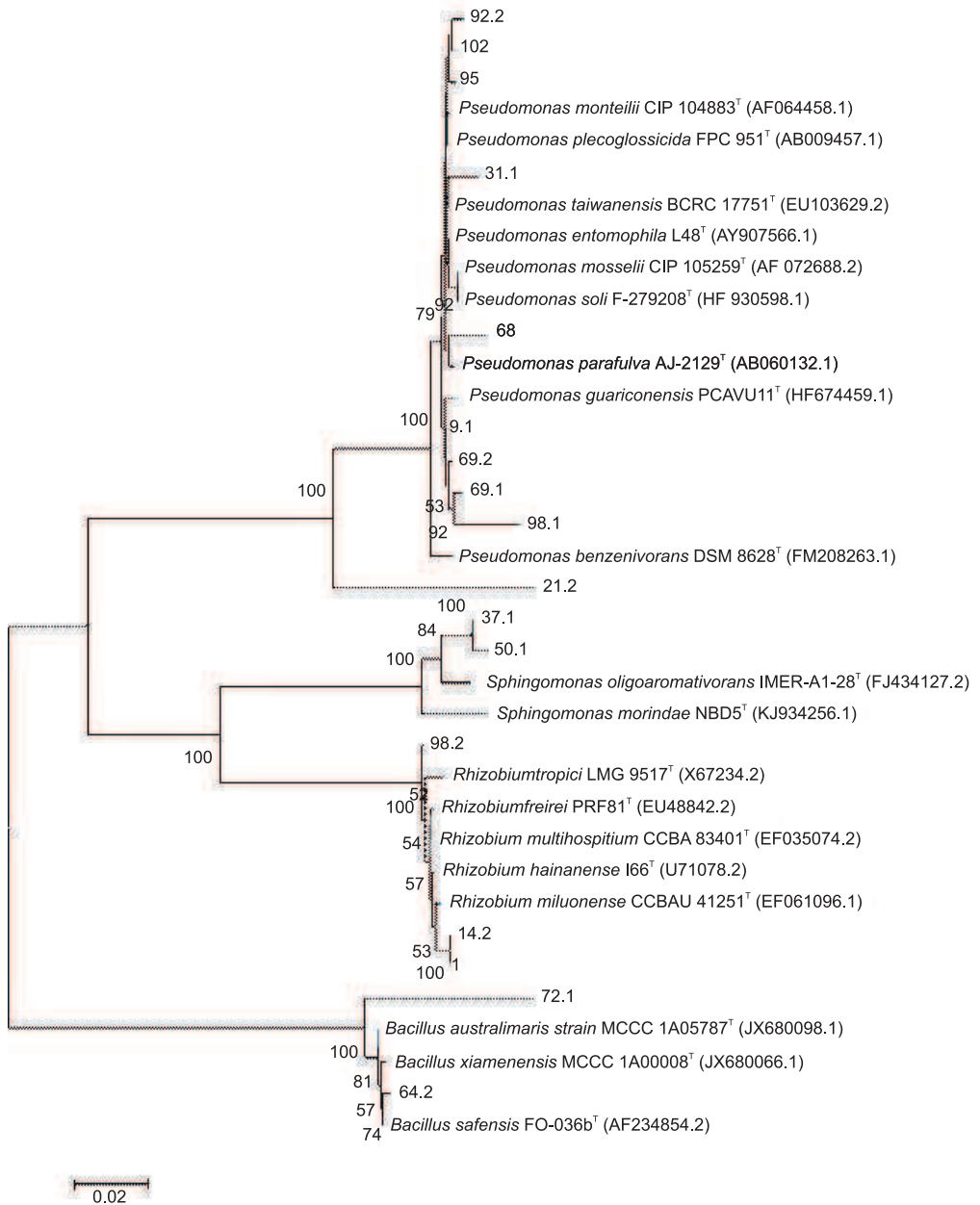


Figura 1. Árvore filogenética montada com base nas sequências parciais do gene 16S rRNA dos isolados bacterianos resistentes à cloranfenicol.

O fingerprinting molecular mostrou grande variação dos perfis de bandas dos isolados (dados não mostrados), permitindo ainda identificar isolados idênticos e excluir culturas clones dentro dos isolados classificados no mesmo gênero.

O antibiograma revelou que as bactérias foram consideradas resistentes a pelo menos quatro antibióticos testados (Tabela 1). A resistência intrínseca a antibióticos pode ser adquirida por transferência horizontal de genes (HTG) ou induzida por micro-organismos do solo do qual o isolado foi obtido por meio de seleção de isolados tolerantes (Zhang; Dick, 2014). A resistência intrínseca a bacteriocinas e sua intensidade, por estirpes nativas varia com a população microbiana antagônica presente no local.

Tabela 1. Resistência intrínseca a antibióticos em quatro bactérias isoladas de nódulos de *Vigna* spp. em diferentes solos.

Isolado	Gênero	Antibióticos									Nº de antibióticos
		AMP	CLO	GEN	NEO	EST	ERI	RIF	VAN	NAL	
14.2	<i>Rhizobium</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	+	7
72.1	<i>Bacillus</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	+	5
98.1	<i>Pseudomonas</i>	+	+	+	+	-	+	-	+	+	7
50.1	<i>Sphingomonas</i>	-	-	+	+	-	+	+	-	-	4

* Sinal de (+) indica crescimento da estirpe, (-) ausência de crescimento. Na última coluna, mostra-se a quantidade de antibióticos que o isolado foi resistente. AMP - ampicilina, CLO - cloranfenicol, GEN - gentamicina, NEO - neomicina, EST - estreptomicina, ERI - eritromicina, RIF - rifomicina, VAN - vancomicina, NAL - ácido nalidixico.

Apesar de inicialmente ter sido isolado em meio com cloranfenicol, o isolado de *Sphingomonas* mostrou-se suscetível a este e a mais quatro antibióticos. Provavelmente, esta característica pode ter sido alterada durante os processos de isolamento, purificação e estocagem, pela perda dos genes de resistência. A perda dessa característica, no entanto, diminui a probabilidade de HTG de genes relacionados à RIA para bactérias patogênicas a humanos e animais, o que poderia resultar na aquisição de multirresistências, um sério problema de saúde pública.

Estirpes rizobianas nativas resistentes a antibióticos possuem vantagens ecológicas, podendo competir pelos sítios de infecção de forma mais eficiente, quando comparada às introduzidas (Naamala et al., 2016). A competitividade e a capacidade de promover crescimento nas plantas possuem implicações práticas importantes, principalmente na recomendação de novas estirpes como inoculantes.

Conclusão

As bactérias isoladas neste estudo, pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bacillus* e *Sphingomonas* apresentam RIA a diferentes antibióticos. Esses gêneros são descritos como promotores de crescimento vegetal e habitantes de nódulos de leguminosas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Embrapa (03.16.05.016.00.00), à Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e ao Instituto Federal do Piauí (IFPI), pelo apoio financeiro

Referências

- CARDOSO, P. A.; ALVES, A.; SILVEIRA, P.; SÁ, C.; FIDALGO, C.; FREITAS, R.; FIGUEIRA, E. Bacteria from nodules of wild legume species: Phylogenetic diversity, plant growth promotion abilities and osmotolerance. **Science of the Total Environment**, v. 645, p. 1094-1102, 2018.
- DHOLE, A.; SHELAT, H.; VYAS, R.; JHALA, Y.; BHANGE, M. Endophytic occupation of legume root nodules by nifH-positive non-rhizobial bacteria, and their efficacy in the groundnut (*Arachis hypogaea*). **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1397-1407, 2016.
- LEITE, J.; FISCHER, D.; ROUWS, L. F. M.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I.; HOFMANN, A.; KUBLIK, S.; SCHLOTTER, M.; XAVIER, G. R.; RADL, V. Cowpea nodules harbor Non-rhizobial bacterial communities that are shaped by soil type rather than plant genotype. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. Jan, p. 1-11, 2017.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora Ufla, 2006. 624 p.
- NAAMALA, J.; JAISWAL, S. K.; DAKOR, F. D. Antibiotics resistance in rhizobium: type, process, mechanism and benefit for agriculture. **Current Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 804-816, June 2016.
- VINCENT, J. M. A. **Manual for the practical study of rootnodule bacteria**. Oxford: Blackwell Science Publication, 1970. 164p.
- ZHANG, Q.; DICK, W. A. Growth of soil bacteria, on penicillin and neomycin, not previously exposed to these antibiotics. **Science of the Total Environment**, v. 493, p. 445-453, 2014.