



## SISTEMA SIMBIÓTICO FORMIGA-PLANTA APRESENTA BACTÉRIAS COM ALTOS ÍNDICES DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO

RAONI GWINNER; KLEBERSON DE OLIVEIRA; ROGERIO DE OLIVEIRA NEVES; LEONARDO SILVA BARBEDO; GILVAN FERREIRA DA SILVA

### RESUMO

Solos ácidos com altos teores de óxidos de Fe e Al, apresentam grande capacidade de retenção de fosfato e constituem um forte dreno deste nutriente quando aplicado em sistemas agrícolas como fertilizante. O fósforo (P) é essencial ao desenvolvimento vegetal, contudo apenas uma pequena fração encontra-se em solução, estima-se menos de 0.1% do P total esteja na solução do solo, ou seja, mais de 95% do fósforo do solo encontra-se não disponível. Eventos como absorção, adsorção, fixação, lixiviação e retrogradação afetam diretamente a disponibilidade de fósforo na solução do solo. Algumas espécies de bactérias possuem mecanismos como produção de ácidos e fosfatases que permitem a solubilização de fosfato adsorvido no solo, tornando o P disponível na solução do solo, tais bactérias podem ter aplicação na agricultura como biofertilizantes auxiliando no incremento de P em sistemas agrícolas, e constituir uma importante ferramenta para agricultura sustentável. Portanto, buscamos a prospecção de ativos biológicos para a solubilização de fosfato com base em bactérias isoladas da interação Formiga-Planta. Plantas de embaúba foram identificadas em simbiose com formigas e abertas longitudinalmente, e do interior das domácias foi realizado o isolamento direto de microrganismos utilizando alça estéril descartável. As colônias que apresentaram halos em meio PVK foram isoladas e passaram por screening e identificação molecular do gênero via 16S. Foram selecionadas 5 bactérias com altos índices de solubilização *in vitro*, e posteriormente identificadas como do gênero *Pantoea* e *Serratia*. A identificação molecular das formigas de embaubeira foi realizada pela análise da região COI. Concluímos que o sistema simbiótico *Azteca-Cecropia* apresentou bactérias com níveis alto e médio de solubilização de fosfato constituindo em potencial, ativos biológicos para elaboração de biofertilizantes.

**Palavras-chave:** Amazônia; ativo biológico; biofertilizante; bioeconomia, sustentabilidade

### 1 INTRODUÇÃO

Associações simbióticas decorrem da interação contínua entre espécies ao longo de seu processo evolutivo, tal relação pode atingir elevado nível de especialização devido a co-evolução. O sistema biológico Formiga-Planta constitui uma fonte para exploração de novos compostos antimicrobianos, visto que a microbiota nestes sistemas está sob constante pressão de seleção de patógenos, herbívoros e parasitas. Associações que co-evoluíram apresentam benefícios para ambas espécies, conferindo vantagem adaptativa frente a adversidades bióticas e abióticas, e como consequência enorme potencial biotecnológico pode ser explorado de relações ecológicas que levaram milhões de anos para se estabelecerem. Na relação mutualística entre plantas e formigas, a espécie vegetal confere abrigo e alimento para a colônia enquanto os insetos são beneficiados pela proteção contra herbívoros, patógenos e parasitas. Além disso, formigas podem carregar microrganismos simbiotes com atividade biológica crucial para estabilidade da colônia e da planta, atuando

como mecanismo de defesa e manutenção da sanidade da colônia. Dessa forma, a prospecção de microrganismos associados a sistemas Formiga-Planta é fundamentada no fato de que simbioses se estabeleceram ao longo da evolução, por conferir às espécies envolvidas vantagem adaptativa, e portanto identificar ativos biológicos ainda não descritos pode abrir caminho para desenvolvimento de bioinsumos inovadores. Existe uma demanda mundial por produtos agrícolas mais sustentáveis, que substituam defensivos de maior impacto ambiental, portanto a prospecção de ativos biológicos que contribuam para o desenvolvimento de bioinsumos contribui diretamente com a bioeconomia no estado do Amazonas. O gênero *Cecropia* é composto por cerca de 60 espécies, sendo 46 mirmecófitas, ou seja, apresentam interação simbiótica com formigas (BERG et al., 2005; MAYER et al., 2018). As espécies de *Cecropia* estão amplamente distribuídas pela região amazônica, onde é possível encontrar cerca de 24 espécies, algumas são utilizadas para alimentação e como fitoterápico. Conhecida por inúmeros nomes: embaúba, imbaúba, umbaúba e embaúva, seu nome popular tem origem na palavra “ambaíba” do Tupi que significa “tronco oco” (COSTA; SCHENKEL; REGINATTO, 2011). Também são utilizadas para reflorestamento, devido ao seu rápido crescimento e baixa exigência nutricional. São árvores pioneiras atingindo de 5 a 25 m. A maioria das espécies apresentam caule central ereto e vascularizado. Em plantas adultas (3-5 anos) é comum o desenvolvimento de novos ramos a partir do caule, resultando numa arquitetura de candelabro. Plantas de *Cecropia* comumente apresentam associação com formigas e outros insetos, o gênero de formigas *Azteca* é o mais frequente em interações simbióticas envolvendo espécies de *Cecropia* e formigas (BERG et al., 2005). O gênero *Azteca* é constituído por cerca de 150 espécies de formigas, das quais 13 espécies obrigatoriamente fazem associação com espécies de *Cecropia* (AYALA et al., 1996; FUKUDA et al., 2021). É um gênero de formigas neotropicais arbóreas, que podem se abrigar em plantas vivas ou caules em decomposição, e estabelecem associação com plantas mirmecófitas de 16 gêneros distintos (OLIVEIRA; CORREA; DELABIE, 2015). Formigas do gênero *Azteca* possuem o hábito de cultivar fungos com objetivo alimentar, tornando o sistema simbiótico ainda mais geneticamente complexo. A biodiversidade presente nestes sistemas difere daquelas no ambiente ao redor, além disso, mesmo no interior de uma mesma planta de *Cecropia*, câmaras adjacentes podem apresentar diversidade microbiológica (LUCAS et al., 2019). O sistema simbiótico *Azteca-Cecropia* confere ganhos de produção significativos para a planta hospedeira, conforme descrito por OLIVEIRA et al. (2015), utilizando 25 simbiontes de *Cecropia glaziovii* em associação com *Azteca muelleri* e 23 sem associação verificou que plantas colonizadas cresceram 3,7 vezes mais que as não colonizadas. Além disso, plantas de *Cecropia glaziovii* não colonizadas sofreram maior taxa de herbivorismo. A colonização de uma *Cecropia* ocorre do ápice para a base, o orifício de entrada é construído utilizando o prostoma (estrutura vegetal especializada) para acessar as domácias que são câmaras no interior do caule utilizadas como abrigo. Após entrada, operárias mastigam entradas individuais no caule, e nos espaços intermodais, favorecendo a livre passagem pelo interior da planta (MARTING et al., 2018). As domácias podem ser subdivididas, compartimentalizando componentes em seu interior como larvas e alimento, promovendo um melhor aproveitamento do espaço. Além das domácias e prostoma, outra estrutura vegetal especializada desse sistema é a triquilha, estrutura constituída por tricomas, localizada na junção do pecíolo foliar com o caule. A triquilha é um indumento onde ocorre a produção de corpos müllerianos, compostos ricos em glicogênio utilizados como fonte de alimento por insetos. Dessa forma, formigas em associação, obtém abrigo e comida, enquanto a planta se beneficia da proteção contra herbívoros e de efeitos benéficos ao seu crescimento (GIBERT et al., 2019). Esse mecanismo de defesa é resultado da ação conjunta de insetos e microrganismos que compõem a associação. Microbiomas associados à plantas mirmecófitas e insetos, constituem uma valiosa fonte de recursos genéticos microbianos, sua análise e

prospecção pode revelar aplicação agrícola, farmacológica e industrial. Em trabalho realizado no Panamá, a análise metagenômica de diferentes amostras da associação entre *Azteca alfari* e *Cecropia peltata*, utilizando as regiões 16S e ITS, foram identificados como filos mais frequentes *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Ascomycota* e *Basidiomycota* (LUCAS et al., 2019). Em trabalho realizado no Rio de Janeiro, Fukuda et al., (2021) descreveram o rico potencial microbiológico de sistemas *Cecropia-Azteca*. Foi relatado que os gêneros de maior ocorrência nessa associação foram: *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Rhizobium*, *Methylobacterium* e *Streptomyces*, gêneros os quais foram extensivamente descritos quanto ao seu efeito benéfico a plantas e potencial biotecnológico (WALTERSON; STAVRINIDES, 2015; NASCIMENTO et al., 2020; DÍEZ-MÉNDEZ; MENÉNDEZ, 2021; CHEVRETTE et al., 2019; QUINN et al., 2020; KUMAR et al., 2021; HAMDAN; ABD-EL-MAGEED; GHANEM, 2021; ERDEMCI, 2020). De forma geral, na associação simbiótica a promoção de crescimento vegetal pode ser resultante de diferentes mecanismos, como: fixação de N atmosférico, supressão de pragas e doenças, indução de resistência em plantas, modulação dos níveis de hormônios vegetais, redução dos níveis de etileno e produção de sideróforos. A diversidade de organismos que possuem efeito benéfico para produção vegetal é notável, há um vasto potencial desconhecido e inexplorado sobre a aplicabilidade de produtos naturais desses organismos no setor agrícola, industrial, farmacêutico ou cosmético.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Plantas de Embaúba foram identificadas com base em características morfológicas como presença de triquilhas, prostomas, corpos müllerianos e pelas características peculiares das folhas, descritas em profundidade por Berg (2005). Posteriormente a presença de formigas foi confirmada com uma batida suave no tronco da árvore que normalmente leva ao aparecimento de atividade de formigas na superfície da planta. Após a identificação da planta e confirmação da atividade de formigas, o ápice da planta foi cortado e aberto em corte transversal com facão esterilizado. Com auxílio de uma alça inoculadora estéril foi realizado o isolamento direto de microrganismos do interior da superfície das domácias em placas de ágar PVK (Pikovskaya agar). As placas foram incubadas a 28 °C por 48 h e observadas quanto à solubilização de halos; placas apresentando halos foram utilizadas para subcultura e isolamentos bacterianos. Após o primeiro subcultivo, os materiais biológicos que mantinham halos de solubilização em meio PVK foram isolados pelo método de esgotamento por estrias. Foi coletado material de 3 plantas (simbiontes), denominadas A, B e C das quais foram isolados microrganismos e coletadas formigas de cada simbiote (FA, FB e FC). Isolados bacterianos foram inoculados no centro de placas PVK e incubados a 30 °C e fotografados no quinto dia, o diâmetro transversal e longitudinal da colônia e o halo foram medidos usando o software ImageJ. O índice de solubilização de fosfato (PSI) foi calculado para cada isolado utilizando a seguinte fórmula:  $PSI = H + C / C$ ; foram H: diâmetro médio dos halos transversal e longitudinal; e C: diâmetro médio transversal e longitudinal da colônia. De acordo com os valores do índice de solubilização (IS) obtidos, as bactérias foram classificadas como de baixo valores menores que 2; médio de 2 a 3; e alto IS maior que 3. Para identificação molecular das bactérias e formigas a nível de gênero, foram amplificadas as regiões 16S (JAMES, 2010) e CO1, respectivamente (FOLMER et al. 1994), e os produtos de PCR foram purificados por precipitação com PEG. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando volume de 10 µL sendo 5 µL de produtos de PCR purificados, 2 µL de Big Dye v3.1 (Thermo Fisher), 2 µL de tampão 5X (Applied Biosystems) e 3,2 pmol de cada primer. As reações de sequenciamento foram posteriormente analisadas em um sequenciador 3500 Genetic Analyze

(Thermo Fisher). A identificação a nível de gênero foi realizada por meio de BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) da sequência consenso gerada.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cinco isolados apresentaram potencial de solubilização de fosfato inorgânico. De acordo com a tabela de classificação baseada nos índices de solubilização de fosfato em meio Pikovskaya agar *in vitro*, 4 isolados apresentaram alto índice de solubilização, e um isolado apresentou IS médio, os isolados com baixos índices de solubilização foram descartados. Os isolados A2, A3, B1 e C1 apresentaram alto índice de solubilização de fosfato, enquanto o isolado C3 apresentou IS médio (Tabela 1). Os dados indicam que as bactérias isoladas do sistema *Azteca-Cecropia* apresentam valores expressivos de IS. Chakdar et al. (2018) isolou bactérias com alta eficiência em solubilização de fosfato, dentre elas duas pertencentes ao gênero *Pantoea* apresentaram valores de IS de 1.8 (*Pantoea* sp. A34) e 2.0 (*Pantoea* sp. A3). Kirui, Njeru e Runo (2022) avaliaram 71 bacterias solubilizadoras de fosfato e obtiveram valores de IS que variaram de 1.14 (isolado 7) até 5.8 (isolado 22) e verificaram que apenas 20% dos isolados analisados apresentaram IS maior que 4. Prasad et al. (2022) também relataram bactérias do gênero *Pantoea* com altos índices de solubilização de fosfato, apresentando valores de 4.7 (HCF6) e 5.4 (HCF9) em meio NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium). Os dados obtidos corroboram com os resultados relatados, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Diâmetro médio das colônias, diâmetro médio dos halos de solubilização em meio PVK e os índices de solubilização de fosfato aos 5 dias de incubação dos isolados analisados.

o	Isolad (cm)	Colônia (cm)	Halo (cm)	IS ção	Classifica ção
a2		0.78±0.10	2.68±0.0	4.43	alto
		4			
a3		0.99±0.17	3.08±0.0	4.11	alto
		4			
b1		0.96±0.13	2.18±0.0	3.27	alto
		4			
c1		0.86±0.11	2.75±0.0	4.19	alto
		3			
c3		1.74±0.22	3.28±0.1	2.88	médio
		2			

Os halos de solubilização de fosfato *in vitro* podem ser observados na figura 1, assim como a folha e a estípula do respectivo simbiote. Foram observadas diferenças morfológicas na folha e estípula dos diferentes simbiotes (A, B e C).

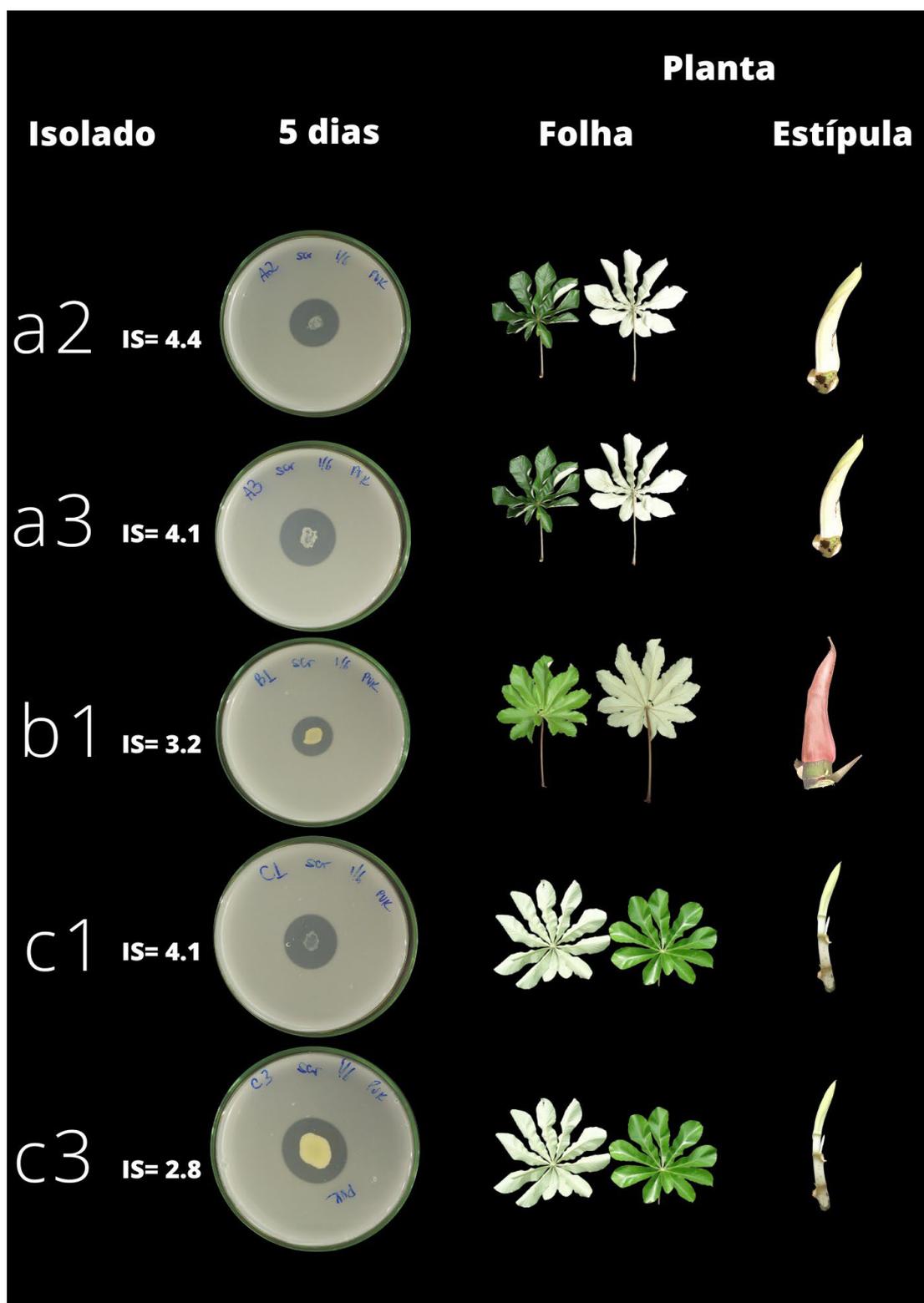


Figura 1- Isolados a2, a3, b1, c1 e c3 em placas de petri de 90 mm contendo meio PVK aos 5 dias de cultivo a 30 °C, IS= Índice de solubilização de fosfato; e folha e estípula do simbionte.

Os resultados de BLAST indicam que as bactérias podem pertencer ao gênero *Pantoea*, com exceção da C3 cujo gênero de maior similaridade foi *Serratia* (Tabela 2).

Tabela 2 - Identificação molecular baseada nas sequências do gene 16S rRNA e CO1.

<b>Isolado</b>	<b>Identificação baseada no 16S</b>	<b>N acesso no GenBank</b>	<b>Cobertura (%)</b>	<b>Identidade (%)</b>
a2	<i>Pantoea cypripedii</i>	KX507160.1	100	98
a3	<i>Pantoea cypripedii</i>	KX507160.1	99	98
b1	<i>Pantoea dispersa</i>	MT386231.1	99	99
c1	<i>Pantoea cypripedii</i>	MN428177.1	100	97
c3	<i>Serratia rubidaea</i>	MN793318.1	90	98

<b>Formiga</b>	<b>Identificação baseada no mtDNA CO1</b>	<b>N acesso no GenBank</b>	<b>Cobertura (%)</b>	<b>Identidade (%)</b>
FA	<i>Azteca ovaticeps</i>	JQ867544.1	95	92
FB	<i>Azteca ovaticeps</i>	JQ867544.1	93	95
FC	<i>Azteca ovaticeps</i>	JQ867544.1	94	95

#### 4 CONCLUSÃO

Em muitas regiões do Brasil a embaúba é uma planta encontrada com frequência, contudo o enorme potencial biotecnológico que ali reside ainda é pouco conhecido. Muitas das espécies de *Cecropia* possuem adaptações morfológicas que favorecem a simbiose com formigas, o que torna cada indivíduo parte de um sistema simbiótico composto por Formiga-Planta e microrganismos. Espécies mirmecófitas de *Cecropia* podem fornecer ativos biológicos com capacidade de solubilização de fosfato inorgânico, e fundamentar a elaboração de biofertilizantes de menor impacto ambiental para produção agrícola sustentável.

#### REFERÊNCIAS

- AYALA, F. J. et al. Molecular Phylogeny of Azteca Ants (Hymenoptera: Formicidae) and the Colonization of Cecropia Trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 5, n. 2, p. 423–428, abr. 1996.
- BERG, C. et al. *Cecropia*. *Flora Neotropica*, v. 94, p. 1–230, 2005.
- CHAKDAR, Hillol et al. Characterization of mineral phosphate solubilizing and plant growth promoting bacteria from termite soil of arid region. *3 Biotech*, v. 8, n. 11, p. 1-11, 2018.
- CHEVRETTE, M. G. et al. The antimicrobial potential of *Streptomyces* from insect microbiomes. *Nature Communications*, v. 10, n. 1, p. 516, 31 dez. 2019.
- COSTA, G. M.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia*. *Natural Product Communications*, v. 6, n. 6, p. 913–920, 1 jun. 2011.

DÍEZ-MÉNDEZ, Alexandra; MENÉNDEZ, Esther. *Rhizobium* presence and functions in microbiomes of non-leguminous plants. In: Symbiotic Soil Microorganisms. Springer, Cham, 2021. p. 241-266.

ERDEMCI, İ. Effect of Pseudomonas Fluorescent Rhizobacteria on Growth and Seed Quality in Lentil ( *Lens Culinaris* Medik.). Communications in Soil Science and Plant Analysis, v. 51, n. 14, p. 1852–1858, 5 ago. 2020.

FUKUDA, T. T. H. et al. Insights Into the Ecological Role of *Pseudomonas* spp. in an Ant-plant Symbiosis. Frontiers in Microbiology, v. 12, 1 fev. 2021.

GIBERT, A. et al. Plant performance response to eight different types of symbiosis. Wiley Online Library, v. 222, n. 1, p. 526–542, 1 abr. 2019.

HAMDAN, A. M.; ABD-EL-MAGEED, H.; GHANEM, N. Biological treatment of hazardous heavy metals by *Streptomyces rochei* ANH for sustainable water management in agriculture. Scientific Reports, v. 11, n. 1, p. 9314, 29 dez. 2021.

JAMES, G. Universal Bacterial Identification by PCR and DNA Sequencing of 16S rRNA Gene. In: PCR for Clinical Microbiology. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010. p. 209–214.  
KUMAR, M. et al. Proactive role of *Streptomyces* spp. in plant growth stimulation and management of chemical pesticides and fertilizers. International Journal of Environmental Science and Technology, 21 jun. 2021.

KIRUI, Charles Kibet; NJERU, Ezekiel Mugendi; RUNO, Steven. Diversity and Phosphate Solubilization Efficiency of Phosphate Solubilizing Bacteria Isolated from Semi-Arid Agroecosystems of Eastern Kenya. Microbiology Insights, v. 15, p. 11786361221088991, 2022.

LUCAS, J. et al. *Azteca* ants maintain unique microbiomes across functionally distinct nest chambers. royalsocietypublishing.org, v. 286, n. 1908, 14 ago. 2019.

MARTING, P. R. et al. Ant-plant sociometry in the *Azteca-Cecropia* mutualism. Scientific Reports, v. 8, n. 1, p. 17968, 19 dez. 2018.

MAYER, V. E. et al. Transmission of fungal partners to incipient *Cecropia*-tree ant colonies. PLoS ONE, v. 13, n. 2, 1 fev. 2018.

NASCIMENTO, F. X. et al. The extreme plant-growth-promoting properties of *Pantoea phytobeneficialis* MSR2 revealed by functional and genomic analysis. Environmental Microbiology, v. 22, n. 4, p. 1341–1355, 1 abr. 2020.

FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology, v. 3, n. 5, p. 294-299, 1994.

OLIVEIRA, G. V. DE; CORREA, M. M.; DELABIE, J. H. Interação planta-inseto: Aspectos biológicos e ecológicos do mutualismo *Cecropia-Azteca*. EntomoBrasilis, v. 8, n. 2, p. 85–90, 23 ago. 2015.

OLIVEIRA, K. N. et al. The Effect of Symbiotic Ant Colonies on Plant Growth: A Test Using an *Azteca-Cecropia* System. PLOS ONE, v. 10, n. 3, p. e0120351, 26 mar. 2015. PRASAD, Priyanka et al. Phosphate Solubilization and Plant Growth Promotion by Two *Pantoea* Strains Isolated from the Flower of *Hedychium coronarium* L. Frontiers in Agronomy, p. 86, 2022.

QUINN, G. A. et al. *Streptomyces* from traditional medicine: sources of new innovations in antibiotic discovery. Journal of Medical Microbiology, v. 69, n. 8, p. 1040–1048, 1 ago. 2020. WALTERSON, A. M.; STAVRINIDES, J. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. FEMS Microbiology Reviews, v. 39, n. 6, p. 968–984, nov. 2015.