



Microbiologia de Solo e Sedimento

ISOLADOS DE RIZÓBIO DE FEIJÃO-CAUPI TOLERANTES A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaCl E FAIXAS DE TEMPERATURA *IN VITRO*

MARCIONILA GONÇALVES MALHEIRO^{1*}; LUIZ B. MORGADO²; CARLOS A. T. GAVA²; GUSTAVO R. XAVIER⁴; LINDETE MÍRIA V. MARTINS⁵

¹Bolsista Iniciação Tecnológica Industrial/CNPq mail: malheiro@cpatsa.embrapa.br; ²Pesquisador Embrapa Semi-Árido; ⁴Embrapa Agrobiologia; ⁵Universidade do Estado da Bahia.

INTRODUÇÃO

A região Nordeste do Brasil, em especial o semi-árido, caracteriza-se por um ecossistema com reconhecidas limitações edafoclimáticas que afetam a produtividade da maioria das espécies cultivadas (Mota e Oliveira, 1999). A salinização do solo constitui uma das mais sérias formas de degradação dos recursos naturais dos solos e, associada à elevação de temperatura, interfere drasticamente na produção agrícola nordestina, onde cerca de 25% dos 300 mil hectares de área irrigada do semi-árido já sofre com os altos teores de sais e as elevadas temperaturas em seus solos (FAO, 2000). Nessa região, a produção agrícola ocorre tradicionalmente em cultura de subsistência e o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp), uma leguminosa com alto teor de proteínas no grão, representa um recurso importante por ser uma planta capaz de resistir às condições de déficit hídrico, salinidade e temperaturas elevadas. É uma espécie rústica, precoce, além de realizar associação simbiótica com bactérias diazotróficas do solo do gênero *Rhizobium*, favorecendo o processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN) (Freire filho, et al., 2005). A seleção de estirpes de rizóbio adaptáveis ao estresse de salinidade e temperatura elevada da região semi-árida amplia as chances de sucesso na produção de grãos. Este trabalho teve como objetivo testar diferentes estirpes de bactérias isoladas de feijão-caupi com relação à tolerância a diferentes concentrações de NaCl e faixas de temperatura, sua relação quanto à origem dos solos e velocidade de crescimento das estirpes *in vitro*.

MATERIAL E METODOS

Foram testados 370 isolados de rizóbio obtidos de um estudo de caracterização morfológica a partir de nódulos de raízes de feijão-caupi, cultivado em cinco diferentes solos da Região do Sub-médio São Francisco (S1: Área de chapada com plantio de feijão-caupi, S2: Caatinga de Volta do Riacho-PE, S3: Área de vazante com cultivo de caupi, S4: Área em pousio, S5: Caatinga próxima à margem do Rio São Francisco), realizado em ensaio em casa de vegetação na Embrapa Semi-árido localizada em Petrolina-PE (2007). As características dos isolados foram tabuladas em dendograma por agrupamento UPGMA calculando uma matriz de similaridade (Rohlf, 1992), sendo identificados 32 grupos com 80% de similaridade.

As bactérias foram, inicialmente, recuperadas em repicagem em meio YMA sólido (Vincent, 1970) contendo azul de bromotimol e incubadas a 28°C para garantir a viabilidade e pureza do inóculo.

Para o teste de tolerância a salinidade, as bactérias foram testadas nas concentrações de 1; 2,5; 5; 10; 20; 25; 30 e 35 gramas de NaCl e um controle com a concentração original do meio (0,02% NaCl) para confirmar as características morfológicas iniciais do



Microbiologia de Solo e Sedimento

inóculo. As bactérias foram repicadas em placa de Petri descartáveis, com o auxílio de alça de platina, em três repetições, e incubadas em temperatura constante de 28°C durante o aparecimento das colônias ou até o décimo oitavo dia de incubação em BOD.

Para o teste de tolerância a diferentes temperaturas, as bactérias foram repicadas em meio YMA com concentrações originais, submetidas a temperaturas de 39, 41, 43 e 45°C em BOD durante o aparecimento das colônias ou até o 18º dia de incubação.

Os isolados que obtiveram crescimento uniforme nas diferentes condições, com aparecimento de colônias isoladas, receberam sinal + e os que não cresceram receberam sinal -.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação aos estudos dos efeitos da salinidade (NaCl) em meio de cultivo, todas as 370 estirpes foram inicialmente cultivadas a 0,02% de NaCl a 28°C, onde 100% apresentaram crescimento em meio YMA. Nas concentrações de 1; 2,5 e 5 gramas de NaCl o índice de crescimento foi maior que 90%. Observou-se que à medida que a concentração de NaCl aumentou ocorreu uma redução na porcentagem de isolados tolerantes: 1 a 10g de NaCl a porcentagem de crescimento foi de 83%, com 307 bactérias crescidas; 2 - a 20g o percentual teve uma acentuada queda para 35,4% com 131 bactérias; 3 - a 25g caiu para 21%, com 77 bactérias; 4 - a 30g apenas 38 bactérias cresceram, representando 10%; e 5 a 35g, concentração máxima (CM) de NaCl, apresentou apenas 3% de crescimento, correspondendo a 10 isolados tolerantes à CM (Figura 1A). Destes dez isolados, dois apresentaram crescimento rápido, cinco crescimento lento e três crescimento intermediário. Além de cinco apresentarem colônias secas e cinco com colônias produtoras de grande quantidade de muco.

Eaglesham et al (1987) estudando aspectos fisiológicos e bioquímicos da diversidade de *Bradyrhizobium* spp isolados de feijão-caupi em solos do oeste africano encontraram somente uma estirpe capaz de resistir a 1% de NaCl, dentre 79 estirpes estudadas. Para Graham (1992), muitas espécies de rizóbio podem tolerar acima de 2% de NaCl no meio de cultura. Os resultados obtidos foram superiores aos destes autores, sendo constatada tolerância para crescimento em até 35g de NaCl (3,5%).

As características relacionadas com o local de origem do rizóbio são, provavelmente, associadas com as características do solo. Neste estudo, avaliando a tolerância das estirpes às diferentes temperaturas, foi observado que a relação de crescimento das colônias à temperatura máxima (TM) de 45°C se deu predominantemente nos solos de Caatinga nativa, sendo facilmente interpretado por se referir aos solos onde temperaturas acima de 40°C são frequentemente observadas em sua superfície (Lal, 1993). Dentre os 370 isolados, 343 (93 %) cresceram a 39°C, 249 (67%) a 41°C, 125 (34%) a 43°C e 43 isolados, representando 11,6%, toleraram a temperatura de 45°C (Figura 1B). Das 43 bactérias tolerantes a 45°C, 18 são de crescimento lento, 14 de crescimento rápido e 11 de crescimento intermediário. Dentre os isolados tolerantes a TM, 25 (58%) são bactérias secas ou produtoras de pouco muco e 18 (42%) são de bactérias produtoras de grande quantidade de muco.

Os altos valores obtidos para tolerância à temperatura máxima e diferentes níveis de NaCl dessas estirpes são indicativos ecologicamente importantes para as condições climáticas do semi-árido do nordeste brasileiro.



Microbiologia de Solo e Sedimento

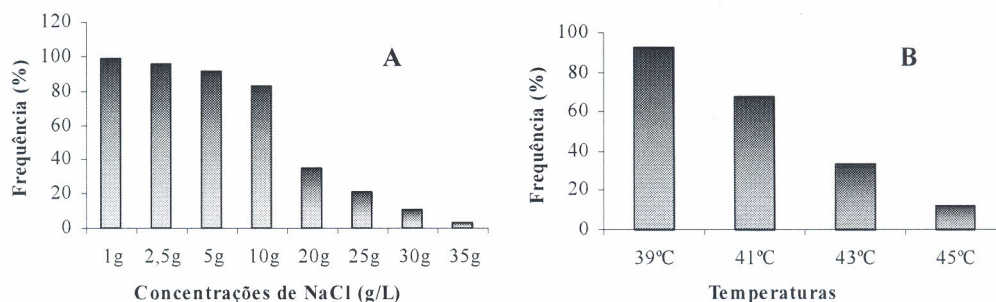


Figura 1: Distribuição de isolados de rizóbio obtidos de nódulos de feijão-caupi tolerantes a diferentes concentrações de NaCl (A) e temperaturas elevadas (B)

CONCLUSÕES

Os isolados capturados dos solos de Caatinga nativa apresentaram uma maior capacidade de tolerância tanto para as concentrações máximas de NaCl como para as diferentes temperaturas, em uma escala de crescimento em 35 gramas de NaCl e a 45°C, demonstrando que há uma relação de tolerância à salinidade e à temperatura quando avaliados *in vitro*.

Os isolados de rizóbio testados são uma opção promissora para a produção de inóculo uma vez que apresentaram adaptabilidade a temperaturas altas e diferentes teores de sal em concentrações superiores às encontradas em condições naturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- EAGLESHAM, A.R.J.; STOWERS, M.D.; MAINA, M.L.; GOLDMAN, B.J.; SINCLAIR, M.J.; AYANABA, A. Physiological and Biochemical Aspects of Diversity of Bradyrhizobium sp. (Vigna) from three West African Soils. **Soil Biology and Biochemistry**. Oxford, v.19, p. 575-581, 1987.
- FAO. Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils. 2000. Disponível em <http://www.fao.org/ag/AGL/agll/spush/intro.htm>.
- FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.J. A.A.; VIANA, F.M.P.; RIBEIRO, V.Q. **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Teresina: Embrapa Meio-norte, 2005. 640p.
- GRAHAM, P.H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal Microbiology*, v.38, 1992, p. 474-484.
- LAL, R. The role of no-till farming in sustainable agriculture in tropics. **Anais do I Encontro Latinoamericano sobre Plantio Direto na Pequena Propriedade**, IAPAR, Ponta Grossa/Brasil, 22-26 Novembro, pp.29-62, 1993.
- ROHLF, J.F. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and multivariate analysis system: version 1.70. New York: Applied Biostatistics, 1992. Não paginado.
- MOTA, F.O.B.; OLIVEIRA, J.B. Mineralogia de solos com excesso de sódio no estado do Ceará. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 23, n. 4, 1999, p. 799-806.
- VINCENT, J.M.A. *Manual for the practical study of root-nodule bacteria*. London: International Biological Programmer (Handbook, 15), 1970. 164p.