

Caracterização de rizóbios nativos isolados de leguminosas de adubo verde da Borda Oeste do Pantanal

FÁDHUA DE MOURA COSTA⁽¹⁾, ALBERTO FEIDEN⁽²⁾, MARIVAINÉ DA SILVA BRASIL⁽³⁾ & JOLIMAR ANTONIO SCHIAVO⁽⁴⁾

RESUMO - O sucesso da simbiose rizóbio/leguminosas, é dependente de diversos fatores, dentre eles das condições edafoclimáticas. A primeira etapa da seleção de estirpes de rizóbio é o seu isolamento em condições naturais e para isso levam-se em conta as características da colônia em meio de cultivo. As características morfofisiológicas de bactérias do gênero rizóbio podem variar, de acordo com a sua procedência. Este trabalho teve como objetivo caracterizar fisiologicamente, rizóbios nativos provenientes de dois assentamentos rurais com características pedológicas distintas (Mato Grande e Taquaral) em Corumbá, MS. Foram avaliados: capacidade de acidificação do meio de cultura, tempo de crescimento e atividade amilolítica. Os resultados mostram diferenciação nas características das colônias bacterianas isoladas dos dois locais estudados. Quanto a capacidade de acidificação dos isolados, 25% (Mato Grande) e 50 % (Taquaral), foram positivos. Todos os isolados provenientes do Taquaral, apresentaram crescimento rápido, já no assentamento Mato Grande, o tempo variou entre rápido e lento. Os índices enzimáticos observados para a atividade da amilase, não demonstraram valores considerados ótimos no desempenho das bactérias para esta função.

Palavras – Chave: (Fixação Biológica de Nitrogênio, assentamentos, fisiologia)

Introdução

O uso de adubos verdes é uma antiga prática agrícola, no entanto, por muito tempo, seu uso ficou restrito aos pequenos produtores. Nos últimos anos, em muitos países da América Latina, especialmente na parte tropical, o uso dos adubos verdes está crescendo significativamente de ano para ano na agricultura, contribuindo não somente do ponto de vista econômico, como também do ponto de vista da conservação do meio ambiente [1].

O nitrogênio (N) é o nutriente mais estudado em relação aos efeitos da adubação verde nas

culturas vegetais. O cultivo de leguminosas herbáceas torna possível a disponibilização de N aos agroecossistemas pelo processo de fixação biológica, o que reduz ou elimina a necessidade de aplicação de fertilizantes minerais nitrogenados [2].

Dentre os organismos do solo favorecidos pela adubação verde, merecem destaque as bactérias dos gêneros *Rhizobium*. Tais microrganismos são capazes de promover a fixação biológica do N₂ atmosférico, associando-se à diversas leguminosas num processo simbiótico [3].

Em razão da sua importância econômica, os estudos da interação rizóbio-leguminosas têm sido um bom suporte econômico quando comparado às demais áreas de pesquisa agrônoma em diversas partes do mundo, e atualmente é a interação planta - microrganismo mais bem estudada [3].

A caracterização morfofisiológica dessas bactérias é um passo inicial no estudo desses microrganismos. Os dados obtidos serão úteis na classificação taxonômica e em posteriores estudos como busca de estirpes mais eficientes para o processo de FBN, mais competitivas a nível regional e que poderão ser utilizadas posteriormente em desenvolvimento de inoculantes.

Esse trabalho tem como objetivo, avaliar as características fisiológicas de rizóbios nativos isolados de nódulos de leguminosas de adubo verde na Borda Oeste do Pantanal.

Material e Métodos

Área de estudo

Delimitaram-se dois assentamentos rurais, com características pedológicas marcadamente distintas. São eles Mato Grande (Argissolo) e Taquaral (Chernossolo).

Solo

Foram coletadas três amostras de solo em cada assentamento para a realização da análise química, cujos resultados são apresentados na Tabela 1, como médias de três repetições.

(1) Mestranda em Agronomia, Produção vegetal, Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, unidade- Aquidauana, MS.

(2) Pesquisador em agroecologia, Embrapa Pantanal. Corumbá, MS.

(3) Professora da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul- Campus do Pantanal- Corumbá-MS.

(4) Professor da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul - Unidade de Aquidauana, MS.

Origem dos isolados bacterianos avaliados.

A tabela 2 apresenta o número de isolados para cada espécie de leguminosa de adubo verde (*Cajanus cajan*, *Crotalaria juncea*, *Canavalia ensiformes* e *Mucuna pruriens*) nos locais estudados.

Capacidade de Acidificação e Tempo de Crescimento.

As colônias puras foram repicadas em placas com meio YMA tendo azul de bromotimol como indicador para averiguar sua capacidade de acidificação e tempo de crescimento. As placas foram incubadas em estufa a 30°C e observadas até o 10º dia. Colônias que alteram o pH do meio deixando-o ácido reagem modificando a coloração inicial verde para amarela. Para a verificação da velocidade de crescimento, foram testados somente alguns isolados, aqueles que possuíam características morfológicas diferentes. Foram consideradas colônias de crescimento rápido (1-4 dias) e crescimento lento (5-8 dias).

Atividade Amilolítica

Para verificação da atividade de utilização do amido, todos os isolados foram inoculados em meio sólido YMA, suplementado com amido 1%, sem corante, pH inicial 6,8. A identificação da atividade amilolítica foi realizada após 2-3 dias (ou mais quando necessário) de incubação a 30°C, através da medida do halo formado, que pode ser mais bem identificado através da utilização de solução de iodo, que permite a visualização de uma zona mais clara e transparente ao redor da colônia, em contraste com o meio marrom escuro, que indica atividade amilolítica.

Resultados

A análise para o tempo de crescimento mostra que no assentamento Taquaral todas as colônias tiveram crescimento rápido (Figura 1A). Já para o assentamento Mato Grande a velocidade variou, destacando-se os isolados do Guandu (Figura 1B).

Quanto à capacidade de acidificação do meio, cerca de 25% e 50% das estirpes isoladas do assentamento Mato Grande e do Taquaral respectivamente, foram capazes de acidificar. Porém essa percentagem varia para cada espécie de planta (Tabela 3).

Quanto a atividade amilolítica, os resultados são demonstrados nas Tabelas 4 e 5. Observa-se que a produção da amilase foi mais expressiva nas bactérias isoladas no Mato Grande.

Discussão

Estirpes de crescimento rápido são geralmente menos tolerantes a acidez do que as de crescimento lento. Porém a procedência da estirpe pode ser mais importante na sua relação de tolerância do que a característica de crescimento, ou seja, estirpes isoladas de solos

ácidos mostram-se mais adaptadas a estas condições do que às isoladas de pH mais elevado [4]. Esse comportamento também foi observado no Assentamento Taquaral, cujo pH alcalino, proporcionou bactérias de crescimento rápido (Figura 1A). Em estudos com rizóbios, Sprent [5] confirma que aqueles de crescimento rápido são mais comuns em regiões áridas, constituindo esta característica uma estratégia de sobrevivência, já que são mais tolerantes à seca que os de crescimento lento e se multiplicam rápido, em curto espaço de tempo úmido o que também explica a sua maior frequência nos solos das regiões semiáridas em estudos realizados por Martins et al [6], corroborando os resultados do Assentamento Taquaral que possui características de semi-árido.

A alteração de pH pelas colônias em meio de cultura é uma característica fisiológica que deve ser estudada em conjunto com o fator velocidade de crescimento (rápida ou lenta), desta forma infere-se quais às condições edáficas estariam associadas a estas estirpes. Segundo Moreira & Siqueira [4] estirpes dos tipos “rápidas acidificantes e “lentas alcalinizantes” podem ocorrer tanto em regiões tropicais, como temperadas. Estirpes rápidas e acidificantes, por exemplo, são comuns em solos de pH neutro a alcalino [7].

Sugere-se que leguminosas que nodulam melhor, em condições ácidas se associam, preferencialmente com rizóbios de crescimento lento, que não produzem ácido em meio de cultura [4]. Esse dado explica o porquê do assentamento Mato Grande, com pH baixo ter variado mais em termos de velocidade de crescimento das colônias e apresentarem poucas colônias acidificando o meio de cultura. Já as estirpes isoladas do assentamento Taquaral foram capazes de produzir ácido em meio de cultura em maior quantidade, ao contrário do esperado, essas estirpes não são mais tolerantes a acidez do solo, mas seu crescimento rápido parece conferir uma certa vantagem competitiva na rizosfera devido a maior competição quando entre microrganismos [6].

Para considerar um microrganismo como um bom produtor de enzimas extracelulares em meio sólido, LEALEM e GASHE [8] indica um índice enzimático (IE) $\geq 2,0$. Neste estudo o índice maior observado foi 1 para a crotalaria (Tabela 5). A atividade amilolítica pode estar relacionada com a degradação do amido e conseqüentemente na absorção da glicose que deverá ser utilizado pelo microrganismo para seu crescimento. Assim, as probabilidades de associações simbióticas entre as leguminosas e bactérias aumentam.

São raros os trabalhos disponíveis que associam rizóbios à atividade amilolítica. Oliveira et al.[9] estudando a produção de amilase por rizóbios tendo a farinha da pupunha como substrato, registrou 19 isolados com atividade amilolítica em meio YMA modificado, 7 deles apresentam $IE \geq 2,1$. Oliveira et al [9] sugerem uma possível participação de algumas glicosidases, como as amilases, no estabelecimento intracelular da simbiose leguminosa versus rizóbio

Conclusões

- Isolados com capacidade de acidificação foram obtidos em ambos os assentamentos, mostrando que essa característica não só relaciona-se com o pH do solo, mas envolve fatores intrínsecos de cada espécie estudada.

- Todos os isolados do assentamento Taquaral apresentaram crescimento rápido, influenciados pela baixa umidade do solo e pH alcalino.

- A maioria dos isolados proveniente do assentamento Mato Grande apresentou atividade amilolítica.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Embrapa Pantanal, UFMS, UEMS, a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do estado de Mato Grosso do Sul - FUNDECT, chamada Fundect/CNPq Nº 02/2007-PPP, e ao CNPq projeto “casadinho” processo 620029/20080, pelo apoio financeiro.

Referências

[1] URQUIAGA, S.; JANTALIA, C. P.; RESENDE., A. S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Contribuição da Fixação Biológica de Nitrogênio na Produtividade dos Sistemas Agrícolas na América Latina. In: AQUINO, A. M., ASSIS, R. L. (Ed). **Processos biológicos no sistema solo - planta: ferramentas para uma agricultura sustentável**. Embrapa Agrobiologia - Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 181-200.

[2] ESPINDOLA, J. A. A.; GUERRA, J. G. M.; DE - POLLI, H.; ALMEIDA, D. L.; ABOUD, A. C. S. **Adubação verde com leguminosas**. Embrapa Agrobiologia - Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 49p.: (Coleção saber).

[3] STRALIOTTO, R. Diversidade do Rizóbio - Evolução dos Estudos Taxonômicos. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. (Ed). **Processos biológicos no sistema solo - planta: ferramentas para uma agricultura sustentável**. Embrapa Agrobiologia - Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 221-256.

[4] MOREIRA, F. S. M. & SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002. 626 p.

[5] SPRENT, J. I. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory? **Plant and Soil**, Dordrecht, v.161,1994. p.1-10.

[6] MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. **Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de “Rizóbio”**. Embrapa Agrobiologia. COMUNICADO TÉCNICO, Nº 19. 1997.

[7] SANTOS, C. E. de R. e S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUNJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. UFRPE. Recife, PE. **Revista Brasileira de Ciências agrárias**, 2007.

[8] LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). **J. Appl. Bacteriol.**; v. 77 (1) 348-352, 1994.

[9] OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. **Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato**. Campinas, SP, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101>> . Acesso em: 05/10/08.

Tabela 1 - Análise química dos solos

Solo/ Local	pH (H ₂ O)	Ca (cmolc/dm ³)	MG (cmolc/dm ³)	P (mg/L)	K (cmolc/dm ³)	Na (cmolc/dm ³)
Taquaral	8,94	27,28	4,72	101,8	1,01	0,039
Mato Grande	5,9	2,96	1,11	38,2	0,431	0,008

Tabela 2 - Número de isolados bacterianos obtidos a partir de leguminosa cultivadas em dois assentamentos de Corumbá, MS.

Plantas	N° de isolados	
	Mato Grande	Taquaral
Crotalária	16	14
Feijão-de-porco	13	13
Guandu	39	14
Mucuna cinza	10	11
Totais	78	52

Tabela 3 - Isolados com capacidade de acidificação.

Plantas	N° de colônias com capacidade de acidificação	
	Mato Grande	Taquaral
Crotalária	5	4
Feijão-de-Porco	3	12
Guandu	7	9
Mucuna cinza	5	1
Total	20	26

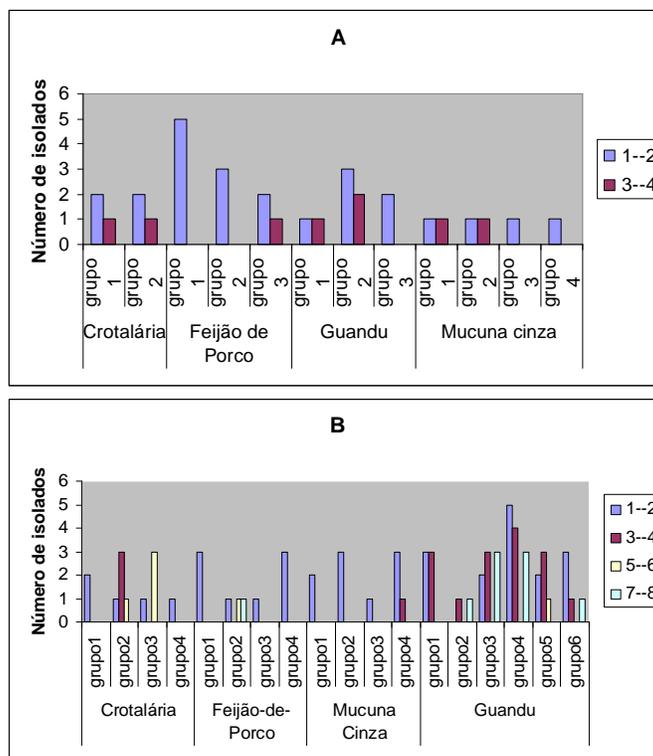


Figura 1. Tempo de crescimento em dias para as colônias do Taquaral (A) e Mato Grande (B).

Tabela 4 - Total de colônias em % que produziram halo de hidrólise para o amido.

Plantas	Mato Grande	Taquaral
Feijão-de-Porco	23,1	0
Guandu	18	21,4
Crotalária	18,7	0
Mucuna cinza	10	36,4

Tabela 5 - Atividade da amilase em rizóbios isolados em dois assentamentos de Corumbá - MS.

Planta/ Isolados	Assentamento Taquaral		
Guandu	Diâmetro colônia	Diâmetro Halo	Índice Enzimático (IE)
8	0,3cm	0,1cm	0,3
10	1,1cm	0,1cm	0,09
13	1,2cm	0,1cm	0,08
Mucuna cinza			
1	0,7cm	0,1cm	0,14
7	0,6cm	0,2cm	0,3
8	0,6cm	0,2cm	0,3
9	0,5cm	0,2cm	0,4
Assentamento Mato Grande			
Feijão-de-Porco			
1	0,7cm	0,3cm	0,4
2	0,6cm	0,3cm	0,5
5	0,8cm	0,3cm	0,4
Guandu			
8	0,8cm	0,1cm	0,1
12	0,8cm	0,1cm	0,1
13	0,7cm	0,3cm	0,4
15	0,8cm	0,4cm	0,5
16	0,9cm	0,3cm	0,3
17	0,7cm	0,1cm	0,1
26	0,7cm	0,2cm	0,3
Crotalária			
2	1,3cm	0,1cm	0,07
3	0,6cm	0,6cm	1
6	0,9cm	0,8cm	0,8
Mucuna cinza			
3	1,1cm	0,2cm	0,2

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.