

# Atividade Amilolítica de Rizóbios de Feijão-Caupi sobre Diferentes Fontes de Amido

## Amylolytic Activity of Cowpea Rhizobia on Different Starch Sources

---

*Layane Silva Barbosa de Souza<sup>1</sup>, Aline Araújo Sampaio<sup>2</sup>, Lindete Miria Vieira Martins<sup>3</sup>, Carlos Alberto Tuão Gava<sup>4</sup>, Paulo Ivan Fernandes Júnior<sup>5</sup>*

### Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade amilolítica extracelular de rizóbios de feijão-caupi in vitro. Foram realizados dois experimentos. No primeiro, as bactérias foram crescidas previamente em meio YM líquido e inoculadas em placas de Petri contendo meio YMA modificado pela utilização de amido como única fonte de carbono. No segundo ensaio, as bactérias selecionadas no primeiro experimento foram avaliadas quanto à capacidade de degradar amido de outras três fontes, além do amido de milho. Em ambos os experimentos, as bactérias foram incubadas e a atividade amilolítica foi verificada por meio da adição de tintura de iodo na placa de Petri, verificando-se a formação de um halo não corado ao redor das colônias. Das 22 bactérias avaliadas no primeiro experimento,

---

<sup>1</sup>Estudante de Biologia, FFPP/UPE, Petrolina, PE, estagiária da Embrapa Semiárido.

<sup>2</sup>Engenheira-agrônoma, aluna do curso de pós-graduação em Horticultura Irrigada, DTCS/UNEB, Juazeiro, BA.

<sup>3</sup>Engenheira-agrônoma, D.Sc., Professora Adjunta, DTCS/UNEB, Juazeiro, BA.

<sup>4</sup>Engenheiro-agrônomo, D. Sc. Em Proteção de Plantas, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

<sup>5</sup>Biólogo, D. Sc. em Ciência do Solo, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, paulo.ivan@embrapa.br.

as bactérias I13-4, I21-5, I21-4, I21-6, M53-1, I11-5, I12-6 e BR 3262 apresentaram atividade amilolítica. Os isolados I13-4 e I21-5 se destacaram, pois seus índices enzimáticos foram muito superiores na degradação do amido de trigo. Duas outras bactérias, I21-5 e I21-4, apresentaram maiores atividades amilolíticas na degradação do amido de mandioca, enquanto outras duas, BR 3262 e M53-1, se destacaram na degradação do amido de soja.

**Palavras-chave:** enzimas, amilase, micro-organismos.

## Introdução

Os rizóbios são bactérias benéficas presentes no solo que se associam a plantas da família Fabaceae (leguminosas) formando nódulos radiculares e/ou caulinares (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). No interior dos nódulos ocorre o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) do ar realizado por essas bactérias. Esse processo fornece ao hospedeiro grandes quantidades de nitrogênio e tem sido explorado na agricultura por meio da inoculação de sementes de leguminosas com rizóbios selecionados. A tecnologia de inoculação de sementes de leguminosas com rizóbios eficientes e competitivos é capaz de substituir, pelo menos parcialmente, a adubação nitrogenada, resultando em benefícios ao produtor e ao meio ambiente (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Pouco se conhece a respeito do perfil enzimático das bactérias fixadoras de nitrogênio, porém, a capacidade dos rizóbios em produzir enzimas extracelulares, principalmente amilases, já foi demonstrada (FERNANDES JÚNIOR et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2007, 2010), indicando o potencial de utilização de isolados de rizóbios para a produção de moléculas de interesse industrial. A utilização de enzimas nas indústrias vem crescendo a cada ano por causa de sua vasta aplicação em diversos setores, sendo, depois dos antibióticos, o grupo mais importante de insumos biológicos, utilizado em diversos ramos da indústria (LIMA et al., 2001).

Estudos para avaliar a capacidade de estirpes rizobianas em produzir moléculas de interesse agroindustrial apresentam potencial para as indústrias do setor de inoculantes, além de fornecer informações importantes para a caracterização polifásica dessas bactérias.

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade amilolítica de isolados de rizóbios de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) utilizando-se diferentes fontes de amido.

## Material e Métodos

Foi avaliada a capacidade amilolítica de 22 de rizóbios de feijão-caupi, sendo três estirpes de referência recomendadas para a produção de inoculantes no Brasil e 19 bactérias oriundas de solos sob diferentes sistemas de manejo no Submédio do Vale do São Francisco (SAMPAIO et al., 2011).

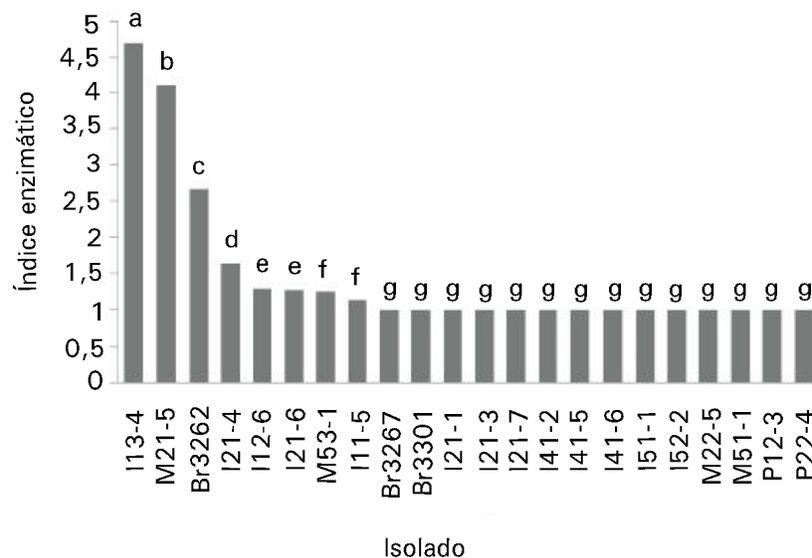
No primeiro experimento, as bactérias foram crescidas em meio YMA sólido por 3 dias, para as bactérias de crescimento rápido, e 7 dias para as bactérias de crescimento lento. As culturas puras foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura YM (VINCENT, 1970) líquido e incubadas em um agitador orbital a 100 rpm pelo tempo adequado para o crescimento de cada isolado (3 dias para as bactérias de crescimento rápido e 7 dias para as bactérias de crescimento lento). Após a incubação, com o auxílio de um pipetador automático, foram inoculados 10  $\mu$ L em três pontos equidistantes de placas de Petri contendo meio YMA modificado, em que o manitol foi substituído por amido de milho comercial. As placas foram incubadas por 4 dias para as bactérias de crescimento rápido e 8 dias para as bactérias de crescimento lento. A atividade amilolítica dos isolados foi avaliada por meio da adição de 2 mL de tintura de iodo (0,07% v/v), tendo sido observada a formação de um halo não corado ao redor da colônia em contraste com o meio azulado, indicando atividade amilolítica (OLIVEIRA et al., 2007).

No segundo ensaio, foram selecionadas oito bactérias que apresentaram atividade amilolítica no primeiro experimento. Essas bactérias foram crescidas no meio YM nas mesmas condições anteriormente descritas no primeiro ensaio. Depois da incubação, as bactérias selecionadas foram inoculadas em meio YMA modificado, em que o manitol foi substituído por farinha de trigo, farinha de mandioca e farinha de soja, além do amido de milho comercial como controle. Todas as bactérias selecionadas apresentaram atividade amilolítica nas diferentes fontes de carbono, diferindo-se, em alguns meios, o diâmetro do halo de uma bactéria para outra. A capacidade amilolítica foi avaliada por meio do cálculo do índice enzimático

dividindo o diâmetro do halo pelo diâmetro da colônia. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

## Resultados e Discussão

De um total de 22 isolados bacterianos avaliados, oito apresentaram capacidade amilolítica ao final do tempo de incubação (Figura 1). Dentre os isolados que apresentaram capacidade de degradar o amido de milho, destacaram-se os isolados de crescimento lento I13-4 e M21-5, que apresentaram índices enzimáticos superiores a 4. A estirpe BR 3262, recomendada para a produção de inoculantes para o feijão-caupi, também se destacou e apresentou alta capacidade de degradação do amido, com índice enzimático superior a 2,5.



**Figura 1.** Atividade amilolítica de 19 isolados de rizóbios de feijão-caupi e três estirpes de referência. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade.

Ao avaliar a capacidade de degradação de amido de outras fontes pelas bactérias selecionadas, foi possível observar que outras fontes também foram degradadas de forma diferenciada (Tabela 1). Os isolados I11-5, I12-6, I21-4, I21-6 e M53-1 foram os que apresentaram a menor capacidade hidrolítica na degradação do amido de milho, com os menores índices enzimáticos. Com exceção do isolado I21-4, estes foram os que também apresentaram a maior capacidade de degradar o amido de trigo.

**Tabela 1.** Atividade amilolítica em quatro fontes de amido por oito rizóbios de feijão-caupi.

Fonte de amido	Isolado bacteriano ou estirpe de referência							
	I13-4	M21-5	BR3262	I21-4	I21-6	M53-1	I11-5	I12-6
Milho	4,69 aA	4,11 aB	2,66 bB	1,63 cB	1,28 cB	1,25 cB	1,14cA	1,11 cA
Mandioca	2,00cC	4,52aB	3,53bA	4,13aA	1,77cA	1,21dB	1,13dA	1,27dA
Soja	2,76 aB	1,72bC	3,11aB	1,99bB	2,16bA	3,43aA	1,59bA	1,33bA
Trigo	5,11 aA	5,05aA	3,50bA	3,91bA	1,20cB	1,18cB	1,20cA	1,14cA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade.

Os isolados I13-4 e M21-5 apresentaram as maiores atividades amilolíticas para o amido de milho no primeiro experimento. Dentre eles, o isolado M21-5 apresentou índice enzimático para a degradação do amido de trigo. O isolado I21-4 e a estirpe de referência BR 3262 apresentaram maiores atividades hidrolíticas na degradação do amido de mandioca, enquanto os isolados I13-4, BR3262 e M53-1 apresentaram maior atividade amilolítica extracelular para o amido de soja, com destaque para esta última bactéria, que apresentou, para essa fonte de amido, o índice enzimático 3,43; enquanto para as outras fontes, os índices foram próximos a 1.

Isolados de rizóbios podem apresentar diferenças na capacidade de degradação de amido por enzimas hidrolíticas extracelulares. Essa capacidade pode ser influenciada pelo potencial genético do isolado e pela fonte de amido fornecida (FERNANDES JÚNIOR et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2007). Avaliando a capacidade amilolítica de rizóbios de guandu, Fernandes Júnior et al. (2012) demonstraram grande variabilidade na degradação de amido de milho por rizóbios de guandu. A fonte de amido apresenta influência na degradação

extracelular do amido por rizóbios de feijão-caupi (OLIVEIRA et al., 2010), conforme pode ser observado, por exemplo, para o isolado M53-1, que apresentou índices enzimáticos muito baixos na degradação de amido de milho, mandioca e trigo, e índice enzimático acima de 3,5 na degradação de amido de soja.

A seleção de bactérias que possam produzir enzimas de interesse industrial em condições de cultivo rotineiras poderá permitir a obtenção de isolados bacterianos que apresentam interesse agroindustrial, conforme indicam os resultados deste estudo.

## Conclusões

As bactérias avaliadas neste estudo apresentam potencial para o emprego na produção de amilases para a degradação de amidos de diferentes fontes.

A atividade amilolítica foi influenciada pela fonte de amido empregada.

## Agradecimentos

À Embrapa Semiárido, pelo apoio às atividades de pesquisa.

## Referências

- FERNANDES JÚNIOR, P. I.; LIMA, A. A.; PASSOS, S. R.; GAVA, C. A. T.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Phenotypic diversity and amylolytic activity of fast growing rhizobia from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, 2012. No prelo.
- LIMA, U. A.; AGUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2006. 729.
- OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. Produção de Amilase por Rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato: **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 61-66, 2007.

OLIVEIRA, A. N.; FLOR, N. S.; OLIVEIRA, L. A. Influência do pH e temperatura sobre a atividade amilolítica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 40, p. 401-404, 2010.

SAMPAIO, A. A.; CARVALHO, R. S.; NUNES, G. F. O.; SILVA, A. F.; SANTOS, A. B.; MARTINS, L. M. V. Avaliação da capacidade nodulífera de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* Walp). In: SIMPÓSIO DE MUDANÇAS CLIMÁTICAS E DESERTIFICAÇÃO NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO, 3., 2011, Juazeiro. **Experiências para mitigação e adaptação**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2011. 1 CD-ROM. (Embrapa Semiárido. Documentos, 239).

VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164 p.