

Atividade enzimática de isolados de rizóbio obtidos de nódulos de leguminosas forrageiras ⁽¹⁾.

Gersika Fakirra de Oliveira Nunes⁽²⁾; Kelly Alexandra Souza Menezes⁽²⁾; Aline Araujo Sampaio⁽²⁾; Adriana Bezerra dos Santos⁽³⁾; Paulo Ivan Fernandes Júnior⁽⁴⁾; Lindete Míria Vieira Martins⁽⁵⁾.

⁽¹⁾ Parte da dissertação de mestrado da primeira autora apresentada ao PPGHI, DTCS/ UNEB.

⁽²⁾ Estudante do Programa de Pós Graduação em Horticultura Irrigada; Universidade do Estado da Bahia (UNEB), Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (DTCS); Juazeiro, Bahia; gerrickafakirra@hotmail.com ⁽³⁾ Estudante de Graduação em Engenharia Agrônoma; UNEB, DTCS. ⁽⁴⁾ Pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, Pernambuco

⁽⁵⁾ Professora Adjunta; UNEB, DTCS.

RESUMO: Este trabalho objetivou avaliar a atividade amilolítica e carboximetilcelulolítica de isolados de rizóbios obtidos de nódulos de leguminosas forrageiras cultivadas em solos do Submédio do Vale do São Francisco. Foram selecionados dez isolados de rizóbios, sendo seis oriundos de nódulos de cunhã (*Clitoria ternatea*) e quatro de estilosantes (*Stylosanthes capitata*). Os isolados foram repicados em meio de cultura contendo como substrato amido e carboximetilcelulose como fontes de C para verificação de atividade amilolítica e carboximetilcelulolítica, respectivamente. A atividade enzimática foi verificada pelo método de coloração e pelo cálculo do índice enzimático, baseado na relação entre o diâmetro da colônia e o halo de degradação ao redor da colônia. Todos os isolados foram capazes de crescer no meio de cultura contendo os dois substratos avaliados como única fonte de carbono. Contudo, apenas três isolados apresentaram atividade amilolítica e quatro, atividade carboximetilcelulolítica. Assim, existem rizóbios nodulantes de estilosantes e cunhã com potencial para exploração biotecnológica para produção de enzimas de interesse agroindustrial.

Termos de indexação: *Clitoria ternatea*; *Stylosanthes capitata*; enzimas.

INTRODUÇÃO

As enzimas são proteínas vitais que atuam como catalisadores nos diferentes processos metabólicos dos seres vivos. São substâncias complexas, compostas por polímeros de aminoácidos e ocorrem em todos os organismos vivos.

Dentre as diferentes aplicações das enzimas para atenderem às necessidades humanas, destacam-se as nas áreas industrial e ambiental. Sendo que as enzimas de origem microbiana apresentam um grande potencial biotecnológico por serem ecologicamente corretas, possuírem uma alta especificidade e possibilitarem grande diversidade de reações (VERMELHO et al., 2012).

As amilases e celulasas consistem no segundo grupo mais importante de enzimas utilizadas nos setores industriais, apresentando destaque nas indústrias de alimentos, têxtil e detergente. Daí a importância de pesquisas que visem à exploração de micro-organismos produtores dessas substâncias (OLIVEIRA et al., 2006).

Os rizóbios são bactérias gram-negativas do solo com alto potencial biotecnológico, além de fixarem o nitrogênio atmosférico quando associados simbioticamente a espécies vegetais leguminosas, apresentam-se como vantajosos produtores de enzimas para os mais diversos fins tecnológicos (COSTA, 2011). Kumari et al. (2010), afirmam que esse grupo de bactérias pode sintetizar uma ampla gama de enzimas pelo uso de diferentes substratos. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de amilase e carboximetilcelulase por isolados de rizóbios obtidos de nódulos de leguminosas forrageiras cultivadas em solos do Vale do Submédio do São Francisco.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados dez isolados pertencentes à coleção de rizóbios de leguminosas forrageiras do Laboratório de Microbiologia do Solo, Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (DTCS) da Universidade do Estado da Bahia para avaliação das atividades enzimáticas amilolítica e carboximetilcelulolítica.

Dos isolados selecionados, seis foram obtidos de nódulos de cunhã (*Clitoria ternatea* L.), 263-2, 263-3, 271-2, 273-2, 291-4 e 292-6; e quatro de nódulos de estilosantes (*Stylosanthes capitata* Vogel), 391-9, 391-11, 391-12 e 391-13 (Tabela 01).

Inicialmente os isolados foram cultivados em meio líquido YM (VINCENT, 1970) sob agitação constante de 150 rotações por minuto em agitador orbital pelo tempo de crescimento dos isolados. Após verificado crescimento bacteriano, foram aliqüotados 20µL da cultura bacteriana em cinco pontos equidistantes nas placas de Petri contendo



os respectivos meios para avaliação enzimática, em três repetições.

Para detecção das atividades enzimáticas extracelulares, utilizou-se o meio YMA com modificações, sem a adição de manitol e suplementado pelos substratos requeridos nos ensaios enzimáticos, na concentração de 1% e sem a adição do indicador de pH.

A atividade enzimática foi determinada por meio da relação entre o diâmetro do halo de degradação e o diâmetro da colônia, expressa como índice enzimático (IE) (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975).

Os isolados de rizóbio foram testados quanto à habilidade em hidrolisar amido de milho (Maizena®) como única fonte de carbono. Após sete dias de incubação a 29°C, as colônias na placa de Petri foram reveladas com solução de tintura de iodo (0,2% v/v). A formação de um halo claro ao redor da colônia em contraste com o meio azul foi utilizada como indicador da capacidade amilolítica dos isolados (BUZZINI et al., 2002).

A produção de carboximetilcelulase foi detectada em meio contendo 1% de carboximetilcelulose como única fonte de carbono. Após o período de 15 dias de incubação, a capacidade carboximetilcelulolítica foi avaliada por meio da técnica de coloração com vermelho Congo (TEATHER e WOOD, 1982) adaptada. Inicialmente foi aplicada uma solução de vermelho Congo (0,12% em 0,1 N de KOH), após a absorção do indicador no meio, cerca de 5 minutos após sua aplicação, foi aplicada uma solução de ácido acético a 10%, resultando em uma mudança da coloração do meio, permitindo a visualização de um halo claro envolta da colônia quando houvesse atividade enzimática.

Os dados obtidos de IE foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. A análise estatística foi realizada com o programa SISVAR (FERREIRA, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados foram capazes de crescer no meio suplementado com amido, porém apenas três isolados apresentaram atividade amilolítica extracelular (271-2, 291-4 e 391-12).

Segundo, Oliveira et al. (2006), o índice enzimático (IE) é um dos parâmetros semiquantitativos mais usados para se avaliar a capacidade de produção de enzimas pelos micro-organismos em meio sólido. A avaliação dos organismos produtores de enzimas correlaciona diretamente o diâmetro do halo de degradação com

a habilidade degradativa, sendo recomendado um IE $\geq 2,0$ para considerar um micro-organismo produtor de enzimas em meio sólido.

Nenhum dos isolados avaliados obteve IE maior que 2 (Tabela 02), sendo que o maior IE foi obtido pelo isolado 291-4 (1,72). Oliveira et al. (2006), avaliando a atividade amilolítica de 67 isolados de rizóbio (46 isolados de nódulos de feijão-caupi e 21 isolados de soja), verificaram que 22 destes produziram amilase extracelular. Os autores obtiveram oito isolados com IE > 2 , porém o maior valor de IE obtido foi 3,1, valores bem superiores aos obtidos no presente trabalho. Já Fernandes Júnior et al. (2012), avaliando a capacidade amilolítica de 26 isolados de rizóbios de crescimento rápido obtidos de nódulos de feijão-guandu (*Cajanus cajan*), verificaram alta produção de amilase extracelular em quatro dos isolados avaliados, dos quais um apresentou IE maior que 3,5; quatro isolados com produção intermediária desta enzima (IE entre 1,5 e 2,5) e 18 isolados com baixa atividade enzimática extracelular, apesar de serem capazes de usar o amido como única fonte de carbono para o seu crescimento.

Todos os dez isolados avaliados cresceram no meio suplementado com carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono, porém quatro isolados (291-4, 292-6, 391-9 e 391-11) foram capazes de produzir carboximetilcelulase (CMCase) extracelularmente. Considerando que um organismo é um bom produtor quando seu IE ≥ 2 , o isolado 292-6 destacou-se para essa característica, apresentando IE igual a 2,70. Os isolados 291-4 e 391-11, foram intermediários na produção de CMCase extracelular, e o 391-9 apresentou o pior desempenho para a produção dessa enzima (IE igual a 1,23) quando comparado aos demais isolados avaliados (Tabela 03). Oliveira et al. (2006), avaliando a atividade de 67 isolados de rizóbios para produção de carboximetilcelulase, verificaram esta característica em apenas 6 dos isolados testados, e com IE variando entre 1,5 e 2,0.

Segundo Robledo et al. (2008), a enzima celulase desenvolve um papel essencial no processo de simbiose entre rizóbios e leguminosas, participando ativamente no momento da infecção da bactéria nos pelos radiculares e posteriormente na liberação das bactérias do tópico de infecção dentro das células do nódulo hospedeiro. Segundo esses autores, rizóbios capazes de promover a nodulação no seu hospedeiro produzem ao menos um tipo de celulase em algum nível.



CONCLUSÕES

Existem rizóbios nodulantes de cunhã e estilosantes com potencial para exploração biotecnológica para produção das enzimas amilase e carboximetilcelulase.

AGRADECIMENTOS

A UNEB, a CAPES, ao CNPq, a FAPESB e à Embrapa Semiárido pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *J. Appl. Microbiol.* 93: 1020-1025. 2002.
- COSTA, F.M. Caracterização morfofisiológica e genética de bactérias isoladas de nódulos de guandu [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.], cultivado na borda oeste do Pantanal Sul - Mato - Grossense. Dissertação (Pós-graduação em Agronomia). Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul. Aquidauna. 2011. 87p.
- FERNANDES JUNIOR., 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*. 2012. (Aceito para publicação).
- FERREIRA, D. F. Programa de análises estatísticas (Statistical Analysis Software) e planejamento de experimentos. Lavras: Universidade Federal de Lavras. 2003.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. *Mycologia*, 67:597- 607. 1975.
- KUMARI, B.S.; RAM, M.R.; MALLAIAH, K.V. Studies on nodulation, biochemical analysis and protein profiles of *Rhizobium* isolated from *Indigofera* species. *Malaysian Journal of Microbiology* 6: 133-139. 2010.
- OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central, Amazonas, Brasil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 26: 853-860. 2006.
- ROBLEDO, M.; JIMÉNEZ-ZURDO, J. I.; VELÁZQUEZ, E.; TRUJILLO, M. E., ZURDO-PIÑEIRO, J. L.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; RAMOS, B.; DÍAZ-MÍNGUEZ, J. M.; DAZZO, F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; MATEOS, P. F. *Rhizobium* cellulase CelC₂ is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *PNAS* 105: 7064-7069. 2008.
- TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. 1982. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 777-780.
- VERMELHO, A.B.; SUPURAN, C.T.; GUISAN, J.M. Editorial. *Microbial Enzyme: Applications in Industry and in Bioremediation. Enzyme Research.* 2012.
- VINCENT, J.M. A Manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford: BLACKWELL SCIENTIFIC, 1970. 164p.

Tabela 01: Caracterização fenotípica dos isolados de cunhã (*Clitoria ternatea*) e estilosantes (*Stylosanthes capitata*) em meio de cultura YMA.

Isolado	Tempo de cresc.	Colônia			Muco		pH	
		Cor	Tamanho (mm)	Forma	Aparência ¹	Tipo		Quant.
<i>Clitoria ternatea</i>								
263-2	rápida	amarela	1 a2	circular	Het.	viscoso	muito	neutro
263-3	lenta	branca	1 a 2	irregular	Hom.	viscoso	pouco	alcalino
271-2	rápida	amarela	1 a 2	circular	Hom.	viscoso	pouco	ácido
273-2	rápida	amarela	1 a 2	circular	Het.	viscoso	muito	ácido
291-4	rápida	amarela	1 a 2	circular	Hom.	viscoso	pouco	ácido
292-6	rápida	creme	>2	irregular	Hom.	viscoso	muito	neutro
<i>Stylosanthes capitata</i>								
391-9	lenta	branca	1 a 2	circular	Hom.	viscoso	pouco	neutro
391-11	lenta	branca	1 a 2	circular	Hom.	viscoso	pouco	neutro
391-12	lenta	creme	1 a 2	circular	Hom.	foculoso	pouco	neutro
391-13	lenta	branca	puntiforme	circular	Hom.	viscoso	pouco	alcalino

¹ Hom- homogênea; Het- heterogênea.

Tabela 02 – Atividade amilolítica de isolados bacterianos obtidos de nódulo de cunhã (*Clitoria ternatea*) e estilosantes (*Stylosanthes capitata*). Teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Isolado	Diâmetro do halo de degradação (cm) ¹	Diâmetros da colônia (cm) ¹	IE ²
<i>Clitoria ternatea</i>			
271-2	1,02	0,77	1,32 b
291-4	0,97	0,56	1,72 a
<i>Stylosanthes capitata</i>			
391-12	0,65	0,47	1,36 b
CV	-	-	6,31%

¹Médias de três repetições; ²Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p < 0,01$); ²Os valores dos índices enzimáticos (IE) representam a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia.

Tabela 16 – Atividade carboximetilcelulolítica de isolados bacterianos obtidos de nódulo de cunhã (*Clitoria ternatea*) e estilosantes (*Stylosanthes capitata*). Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Isolado	Diâmetro do halo de degradação (cm) ¹	Diâmetros da colônia (cm) ¹	IE ²
<i>Clitoria ternatea</i>			
291-4	1,09	0,58	1,88b
292-6	1,25	0,46	2,70 a
<i>Stylosanthes capitata</i>			
391-9	0,56	0,43	1,23 c
391-11	0,64	0,37	1,73 b
CV	-	-	7,95%

¹Médias de três repetições; ²Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p < 0,01$); ²Os valores dos índices enzimáticos (IE) representam a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia.