

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO ISOLADAS DE ESTILOSANTES (*Stylosantes* spp.) ISOLADAS NO CERRADO DE RORAIMA.⁽¹⁾

Krisle da Silva⁽²⁾; Josimar da Silva Chaves⁽³⁾; Alexandre Cardoso Baraúna⁽⁴⁾; Cátia Aparecida Mosqueira⁽⁴⁾; Vicente Gianluppi⁽⁵⁾; Jerri Édson Zilli⁽⁶⁾.

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos da Embrapa Projeto RizoABC: 02.12.08.001.00.02.

⁽²⁾ Pesquisadora em Microbiologia do Solo; Embrapa Roraima, Rodovia BR-174, Km 8, Distrito Industrial, CEP 69301-970, Boa Vista-RR; ⁽³⁾ Professor, Instituto Federal de Ciência e Tecnologia de Roraima/IFRR – Campus Novo Paraíso, Br-174 S/N, Caracará, RR. E-mail: josimar.chaves@ifrr.edu.br; ⁽⁴⁾ Discentes do curso de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Roraima (UFRR), Centro de Ciências Agrárias, Campus Cauamé, BR 174, Km 12 - Monte Cristo, CEP 69301-970, Boa Vista-RR; ⁽⁵⁾ Eng^o Agrônomo, Pesquisador, Embrapa Roraima, Br.174 Km 8, Distrito Industrial, Boa Vista, RR; ⁽⁶⁾ Pesquisador em Microbiologia do Solo; Embrapa Agrobiologia, Rodovia BR-465 Km 7 caixa Postal 74505, CEP 23890-000, Seropédica-RJ

RESUMO: Entre as leguminosas forrageiras adaptadas as condições edafoclimáticas do Brasil, o gênero estilosantes (*Stylosanthes* spp.), destaca-se com uma ampla adaptação e por estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, tornando-se alternativa para a melhoria da fertilidade em pastagens consorciadas com gramíneas. Desta forma, objetivo deste trabalho foi caracterizar fenotipicamente bactérias isoladas de cinco espécies de estilosantes coletadas no cerrado de Roraima. Foram coletadas plantas de estilosantes em dois municípios de Roraima (Boa Vista e Bonfim). As bactérias foram caracterizadas quanto à morfofisiologia das colônias em meio de cultivo YMA contendo azul de bromotimol, onde foram avaliadas: crescimento em dias, alteração do pH do meio, diâmetro das colônias, forma, elevação, borda, superfície, produção de muco, transparência e produção de muco. Foi encontrada uma elevada diversidade entre as bactérias obtidas, e esta é determinada pela espécie hospedeira.

Termos de indexação: Leguminosa forrageira; fixação biológica de nitrogênio; Amazônia.

INTRODUÇÃO

Entre as leguminosas forrageiras, merece destaque o gênero *Stylosanthes*. Esta leguminosa estabelece simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, sendo assim uma alternativa para a melhoria da fertilidade das pastagens em consórcio com gramíneas. O gênero compreende cerca de 50 espécies e subespécies nativas de áreas tropicais e subtropicais da Ásia, África e as Américas, principalmente a América do Sul (Quecini et al. 2002). No entanto, pouco se sabe sobre a diversidade de bactérias fixadora de nitrogênio, isto é, os rizóbios em simbiose com esta leguminosa.

A Amazônia é considerada uma das áreas com maior biodiversidade do planeta e trabalhos têm demonstrado grande diversidade de bactérias que nodulam leguminosas em diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia (Lima et al. 2009; Guimarães, et al., 2012). No entanto, mais trabalhos são necessários devido ao tamanho e diferentes ecossistemas encontrados na região. Por exemplo, o ecossistema savana ou também conhecido como lavrado e cerrado presente no Estado de Roraima, que difere das áreas de mata encontradas na Amazônia.

Assim, neste trabalho objetivou-se caracterizar fenotipicamente bactérias isoladas de cinco espécies de estilosantes coletadas no cerrado de Roraima.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem das bactérias

Trezentas e três bactérias foram isoladas de cinco espécies de estilosantes coletadas no cerrado de Roraima. A origem e o número de bactérias isoladas por espécie de estilosantes são apresentados na (Tabela 1).

Caracterização fenotípica

A caracterização fenotípica foi realizada através da morfologia das colônias em meio de cultura sólido 79 (Fred & Waskman 1928), contendo azul de bromotimol e incubadas a 28°C. A caracterização foi iniciada a partir do aparecimento das primeiras colônias isoladas. As características avaliadas foram: crescimento em dias (aparecimento de colônias isoladas), alteração do pH do meio (neutro, ácido e alcalino), forma (puntiforme, circular ou irregular), elevação das colônias (plana, convexa, côncava, elevada e protuberante), borda (inteira ou irregular), superfície da colônia (lisa ou rugosa), produção de muco (escassa, pouco, moderada e

abundante), transparência (opaca, transparente e translúcida), muco (homogêneo ou heterogêneo).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto à caracterização fenotípica das 303 bactérias isoladas de estilosantes, através da morfologia cultural das colônias, verificou-se que 99 (32,7%) das bactérias apresentaram crescimento muito rápido, 140 (46,2%) rápido, 62 (20,5%) intermediário e 2 (0,7%) lenta. Quanto à alteração do pH do meio, 108 (35,6%) apresentaram reação ácida; 183 (60,4%) neutra e 12 (4%) alcalina em meio YMA acrescido de azul de bromotimol. Já para a característica de forma da colônia observou-se que 265 (87,4%) das bactérias apresentaram forma circular, 36 (11,9%) irregular e 2 (0,7%) puntiforme. Quanto à elevação da colônia no meio, 49,2% foram plana, 37% elevada, 13,5% convexa e 0,3% protuberante. Em relação à superfície das colônias, verificou-se que 301 (99,3%) apresentaram superfície lisa e somente duas (0,7%) superfície rugosa. Na característica de produção de muco, a maioria apresentou entre moderado e abundante, 118 (38,9%) e 112 (37%), respectivamente, enquanto somente 72 (23,8%) produziram pouco muco e uma bactéria (0,3%) com produção escassa. Quanto à transparência do muco as bactérias ficaram distribuídas entre opaca 133 (43,9%), translúcida 104 (34,4%) e transparente 66 (21,8%) das bactérias. Na consistência do muco ocorreu predominância de bactérias gomosas 248 (81,8%), seguidas por butíricas 27 (8,9%), aquosa 19 (6,3%), seca 5 (1,6%) e viscosa 4 (1,3%) viscosa. As bactérias apresentaram em relação à aparência do muco em sua maioria, homogeneidade, com 214 (70,6%), enquanto que, 89 (29,4%) foram heterogêneo. Quanto à cor das colônias, verificou-se que 130 (42,9%) são amarelas, 112 (37%) brancas e 61 (20,1%) cremes. Em relação à elasticidade do muco produzido pelas bactérias verificou-se que 279 (92,1%) não apresentaram elasticidade. Os resultados indicam uma elevada diversidade morfológica cultural entre as bactérias obtidas.

Quando comparado as características de alteração do pH do meio e tempo de crescimento foi observado diferenças entre as espécies de estilosantes (**Figura 1** e **Figura 2**). Foi verificado que as espécies de *Stylosanthes gracilis*, *S. humilis* e *S. scabra* houve predominâncias de bactérias com reação neutra em meio YMA (Gráfico 1). Já *S. angustifolia* e *S. capitata* houve predominância de bactérias que acidificam o meio, seguidas por

bactérias com reação neutra. Para tempo de crescimento, exceto para *S. gracilis* com predominância de bactérias com crescimento intermediário e *S. angustifolia* com muito rápido, a maioria apresentou crescimento rápido (**Figura 2**). Estes resultados indicam influência da espécie hospedeira quanto às características morfológicas das bactérias obtidas. Isto é importante para futuros estudos de eficiência com estilosantes, visto que há diferenças na especificidade para nodulação e eficácia na fixação biológica de nitrogênio por espécie e solo de (Date, 1984; Date, 2010).

CONCLUSÕES

Houve grande diversidade entre as bactérias isoladas.

Há diferenças entre pH e tempo de crescimento de acordo com a espécie hospedeira em que a bactéria foi isolada.

REFERÊNCIAS

- QUECINI, V.M.; OLIVEIRA, C.A.; ALVES, A.C.; VIEIRA, M.L.C. Factors influencing electroporation-mediated gene transfer to *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. protoplasts. *Genetics and Molecular Biology*, 25:73-80, 2002.
- DATE, R.A. *Rhizobium* for *Stylosanthes*. In: STACE, H.E.; EDYE, L.A., eds. *The biology and agronomy of Stylosanthes*. 1.ed. Orlando: Florida, 1984. p.243-256.
- DATE, R.A. *Bradyrhizobium* effectiveness response in *Stylosanthes hamate* and *S. seabrana*. *Tropical Grasslands*, 44:141-157, 2010.
- FERNANDES JUNIOR, P.I. Caracterização fenotípica e produção de biopolímeros por bactérias isoladas de nódulos de Guandu [*Cajanus cajan* (L.) MILLSP.]. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ; 2009 183p. (Tese de Doutorado).
- GUIMARÃES, A. A.; JARAMILLO, P. M. D.; NÓBREGA, R. S. A.; FLORENTINO, L. A. SILVA, K. B.; MOREIRA, F. M. S. Genetic and Symbiotic Diversity of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Agricultural Soils in the Western Amazon by Using Cowpea as the Trap Plant. *Applied and Environmental Microbiology*, 78:6726-6733, 2012.
- LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A.; SILVA, K.; FERREIRA, D. F.; MOREIRA, F. M. S.



Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). Plant and Soil, 319:127-145, 2009.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. Revista Symposium, 6:36-41, 2008.

HOAGLAND. D.R.; ARNON D.I. 1950. The water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station circular n°. 347. University of California, Berkeley, CA.

FRED, E.B.; WAKSMAN, S.A. Laboratory manual of general microbiology, McGraw-Hill Book, New York, 1928. 145p

Tabela 1. Origem, espécies e número de bactérias isoladas de diferentes espécies de estiloides do cerrado de Roraima.

Coordenadas	Origem	Espécies	Nº de bactérias
N 02°39'49,8" W 060°50'55,8"	Boa Vista/ Campo Experimental Água Boa Embrapa-Roraima	<i>Stylosanthes capitata</i> Vogel	74
N02°39'53,0" W 060°50'37,1"	Boa Vista/ Campo Experimental Água Boa Embrapa-Roraima	<i>Stylosanthes scabra</i> Vogel	39
N 02°40'10,7" W060°50'55,8"	Boa Vista/ Campo Experimental Água Boa Embrapa-Roraima	<i>Stylosanthes gracilis</i> Kunth	86
N 03°17'20.5" W 060°20'45.6"	Bonfim/ Área Particular	<i>Stylosanthes humilis</i> Kunth	30
N 03°17'32.8" W 060°21'26.7"	Bonfim/ Área Particular	<i>Stylosanthes angustifolia</i> Vogel	74
TOTAL		5	303

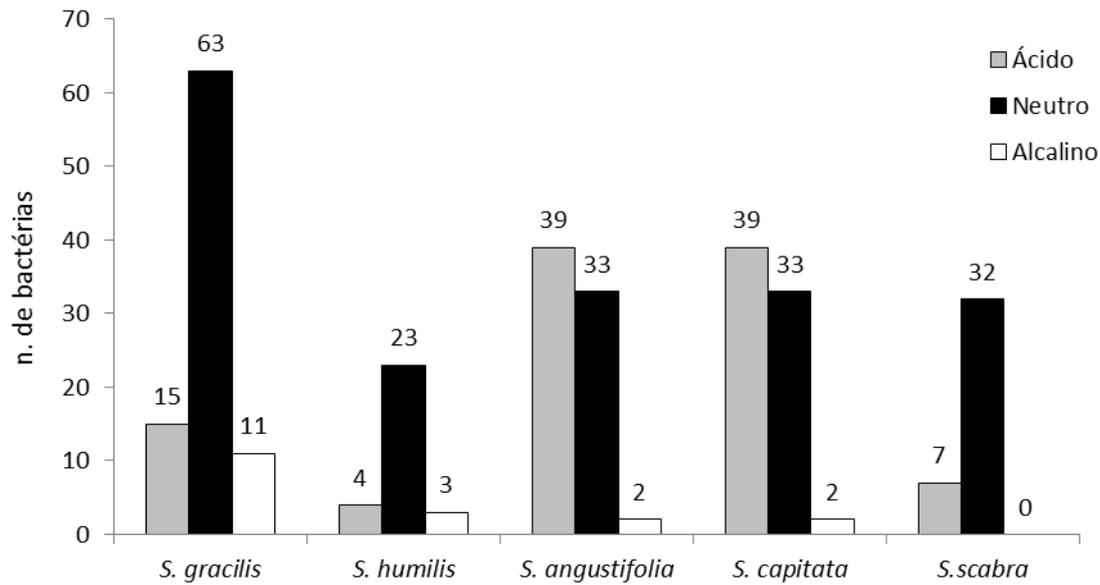


Figura 1. Reação de alteração do pH em meio YMA contendo azul de bromotimol das bactérias isoladas das cinco espécies de estilosantes coletadas no cerrado de Roraima.

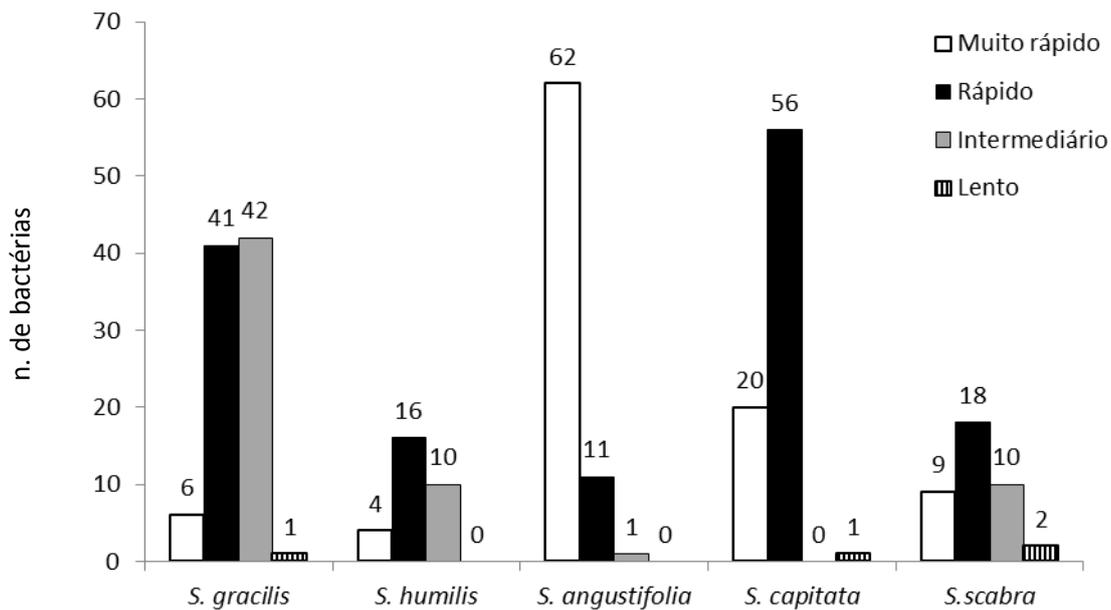


Gráfico 2. Classificação das bactérias isoladas de cinco espécies de estilosantes do cerrado de Roraima quanto ao tempo de crescimento. Muito rápido 1 dia; rápido 2-3 dias; intermediário 4-5 dias; lento 6-10 dias.