

SELEÇÃO DE ESTIRPES DE RIZÓBIOS TOLERANTES À SALINIDADE PROVENIENTES DO BAIXO ACARAÚ NO CEARÁ

Mayara Gama da Cunha (1); Marcelo de Sousa Pinheiro (2); Suzana Cláudia Silveira Martins (4);
Claudia Miranda Martins (4)

¹Bolsista de Iniciação Científica da Universidade Federal do Ceará, (gama.mayara@gmail.com),²Doutorando em Agronomia-Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, (marcelospufc@gmail.com),⁴Professora do Departamento de Biologia da Universidade do Ceará, (claudia.miranda.martins@gmail.com)

INTRODUÇÃO

Os rizóbios são usualmente definidos como bactérias de solo fixadoras de nitrogênio capazes de induzir a formação de nódulos em leguminosas, onde o nitrogênio atmosférico é reduzido a amônia para o benefício da planta (Boakye *et al.*, 2016). São importantes do ponto de vista econômico e ecológico, pois podem dispensar total ou parcialmente os fertilizantes nitrogenados, contribuindo assim para viabilizar reflorestamentos e minimizar possíveis impactos ambientais decorrentes da utilização destes insumos (Barberi *et al.*, 1998).

A eficiência da associação rizóbio-leguminosa é condicionada não somente a combinação da estirpe bacteriana e a variedade cultivada, mas também com as condições ambientais onde a simbiose ocorre (FERREIRA *et al.*, 2012). A salinidade é um dos principais fatores adversos que podem ser encontrados nos solos de regiões semiáridas. Seus efeitos podem se manifestar como inibição do processo de nodulação, diminuindo a colonização nas raízes das leguminosas (VENTORINO *et al.*, 2012). Nesse contexto, a inoculação com estirpes tolerantes seria importante para melhorar o crescimento e desenvolvimento das leguminosas em ambiente salino (VENTORINO *et al.*, 2012; SHARMA *et al.*, 2013).

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar estirpes de rizóbios oriundas do semiárido e avalia-las quanto à tolerância a salinidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de solo foram coletadas na Fazenda Duvalle Frutas, dentro do Perímetro Irrigado Baixo Acaraú (PIBAU), no município de Marco-CE. O feijão-caupi cv “setentão” foi utilizado como planta-isca para a obtenção dos isolados. O plantio foi feito em vasos de 300 mL adotando-se três repetições. Antes do plantio as sementes foram desinfestadas, por imersão em etanol 95% durante 30 segundos, em seguida foram imersas em hipoclorito de sódio (5% por 5 minutos), e logo após, lavadas seis vezes em água destilada esterilizada. Efetuou-se o plantio de três sementes por vaso, e após sete dias do plantio foi realizado o desbaste deixando uma planta por vaso (SOUSA, 2014).

Após o período de 40 dias foram retirados os nódulos das raízes e acondicionados em potes com sílica. Os nódulos coletados foram reidratados com água destilada por uma hora e em seguida desinfestados com álcool etílico absoluto por 30 segundos e solução de hipoclorito de sódio 5% por três minutos, depois lavados com água destilada estéril cinco vezes. Logo após a desinfestação, os nódulos foram macerados em placas de Petri contendo meio YMA (VINCENT, 1970) adicionado do corante vermelho congo, e incubado por sete dias. Após esse período foi realizada a purificação dos isolados, até obtenção da cultura pura de cada isolado.

Os isolados foram autenticados mediante plantio e inoculação dos mesmos em feijão-caupi. Houve o preparo do substrato composto por areia e vermiculita na proporção de 2:1 sendo o mesmo

esterilizado em autoclave a 121°C durante uma hora. O plantio foi realizado em vasos de 300 mL adotando-se três repetições por isolados e usando sementes de feijão-caupi cv. setentão.

Efetuiu-se o plantio de três sementes por vaso, sendo realizado o desbaste após sete dias deixando uma planta por vaso. Para preparo do inóculo adicionou-se 100 mL do meio YM em erlenmeyer, em seguida foi adicionada a cultura permanecendo sob agitação orbital a 150 rpm por três a seis dias até observação do crescimento da cultura.

Aos três dias do plantio foram aplicados 3 mL do inóculo por planta e aos 35 dias foram verificadas as raízes para observação de presença de nódulos radiculares e de leghemoglobina no interior dos nódulos. As estirpes autenticadas foram incorporadas a coleção de culturas de bactérias diazotróficas do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAB) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

As estirpes autenticadas foram repicadas em placas de Petri com o meio de cultura YMA adicionado do indicador de pH azul de bromotimol para realização da caracterização cultural. Foram analisadas características como tempo de crescimento das colônias, em dias, segundo NÓBREGA *et al.* (2004a) as estirpes que apresentaram crescimento significativo em até três dias de incubação foram classificadas como de crescimento rápido e as que apresentaram crescimento maior após três dias de incubação, foram classificadas como de crescimento lento. No que diz respeito à alteração do pH do meio após o crescimento das estirpes, aquelas em que o meio adquiriu a coloração amarela foram classificadas como acidificantes e as que o meio adquiriu coloração azul, alcalinizantes.

Com relação a produção do muco, as estirpes foram classificadas como viscosa, seca, gomosa e butírica. Quanto ao diâmetro das colônias em milímetros (mm), as mesmas foram classificadas como puntiforme, quando as colônias apresentam diâmetro inferior a 0,5 mm, menor que 1 mm, igual a 1 mm, maior que 1mm, menor que 2 mm, e maior que 2 mm (MARTINS *et al.*, 1997).

Para o teste de salinidade, as estirpes foram cultivadas em tubos rosqueados contendo caldo YM, onde permaneceram sob agitação orbital por sete dias, a 125 rpm. No decorrer desse período foi retirado 1 mL do caldo com suspensão de células dos tubos e transferidos para microtubos estéreis. Os microtubos foram centrifugados por quatro minutos a 8000 rpm e em seguida, descartado o sobrenadante. As células foram ressuspensas em solução salina 0,85%. O processo de centrifugação e ressuspensão de células foi repetido três vezes (TRANNIN *et al.*, 2001). O objetivo foi a remoção de resíduos do meio de cultura do inóculo que poderia resultar em um falso crescimento positivo (NÓBREGA *et al.*, 2004b). Após esse procedimento foi retirado 0,1 mL do microtubo contendo células em solução salina e inoculados em placas de Petri contendo meio YMA modificado com adição de NaCl. As concentrações utilizadas em cada tratamento foram 1; 2; 2,5; 3; 10; 20; 30 e 50 g de NaCl L⁻¹. Foram utilizadas placas com meio YMA sem alteração na sua composição como controle. Adotou-se três repetições para cada tratamento. As placas inoculadas foram incubadas por 10 dias em estufas incubadoras B.O.D. (Biochemical oxygen demand) a 28 °C. Em seguida foi avaliada a intensidade do crescimento das estirpes em cada tratamento e comparados com a intensidade de crescimento das estirpes cultivadas no meio sem alteração da composição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 24 isolados a partir das amostras de solo, e destes, 19 isolados foram capazes de formar nódulos nas raízes das plantas, sendo confirmados como estirpes de rizóbio e 5 não formaram nódulos.

Das 19 estirpes, 100% não modificaram o pH do meio permanecendo neutro, apresentaram crescimento lento e muco com consistência butírica e cor das colônias branca. Para o diâmetro médio das colônias, observou-se que 15,78 % apresentaram diâmetro maior que 1 mm, 78,94% menor que 1 mm e 5,26 % puntiforme.

A alteração de pH em meio de cultura YMA é, comumente uma característica para diferenciação dos gêneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* que apresentam a propriedade de acidificar o meio de cultura, enquanto *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium* alcalinizam o meio YMA (Coutinho *et al.*, 1999). Esta mudança de pH promovido pelo rizóbio no meio de cultura pode ser devido à utilização preferencial de açúcares pelos rizóbios de crescimento rápido, seguida da excreção de ácidos orgânicos e compostos de nitrogênio pelos rizóbios de crescimento lento, com conseqüente liberação de cátions (TAN; BROUGHTON, 1982). Os maiores valores encontrados na fixação de nitrogênio tanto para isolados de nódulos de raiz quanto de caule foram realizados por rizóbios que alcalinizam o meio de cultivo (MARTINS *et al.*, 2001).

Em relação a tolerância à salinidade todas as estirpes cresceram com a concentração de NaCl até 3g L⁻¹, as estirpes LAMAB 112, LAMAB 113, LAMAB 115, LAMAB 116, LAMAB 118, LAMAB 122, LAMAB 125 e LAMAB 130 cresceram em concentrações de 10g L⁻¹ e não houve crescimento a concentração de 20g L⁻¹. Para as sete estirpes padrão quatro destas (57,14%) acidificaram o meio de cultura, uma (14,28%) alcalinizou o meio e duas (28,57%) não alteraram o pH do meio. Seis estirpes (87,71%) apresentaram crescimento lento e uma estirpe (14,28%) apresentou crescimento rápido. Em relação ao muco três estirpes (14,85%) apresentaram colônias com muco viscoso, quatro (57,14%) com butírico. Para o diâmetro das colônias, duas (28,57%) apresentaram diâmetro maior do que 1 mm, e cinco (71,42%) apresentaram diâmetro maior do que 2 mm. Todas as estirpes apresentaram colônias de coloração branca. No que diz respeito à tolerância a salinidade, as sete estirpes padrão cresceram com a concentração de NaCl até 3g L⁻¹ e foram susceptíveis a salinidade em concentrações de 10g L⁻¹ (Figura 1).

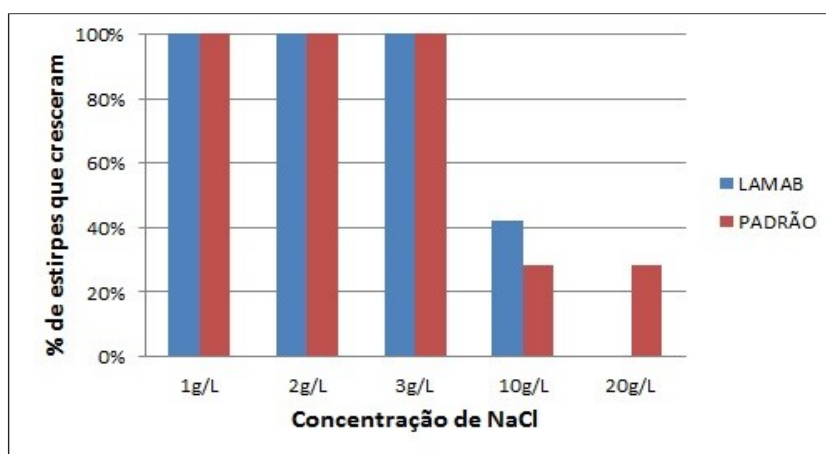
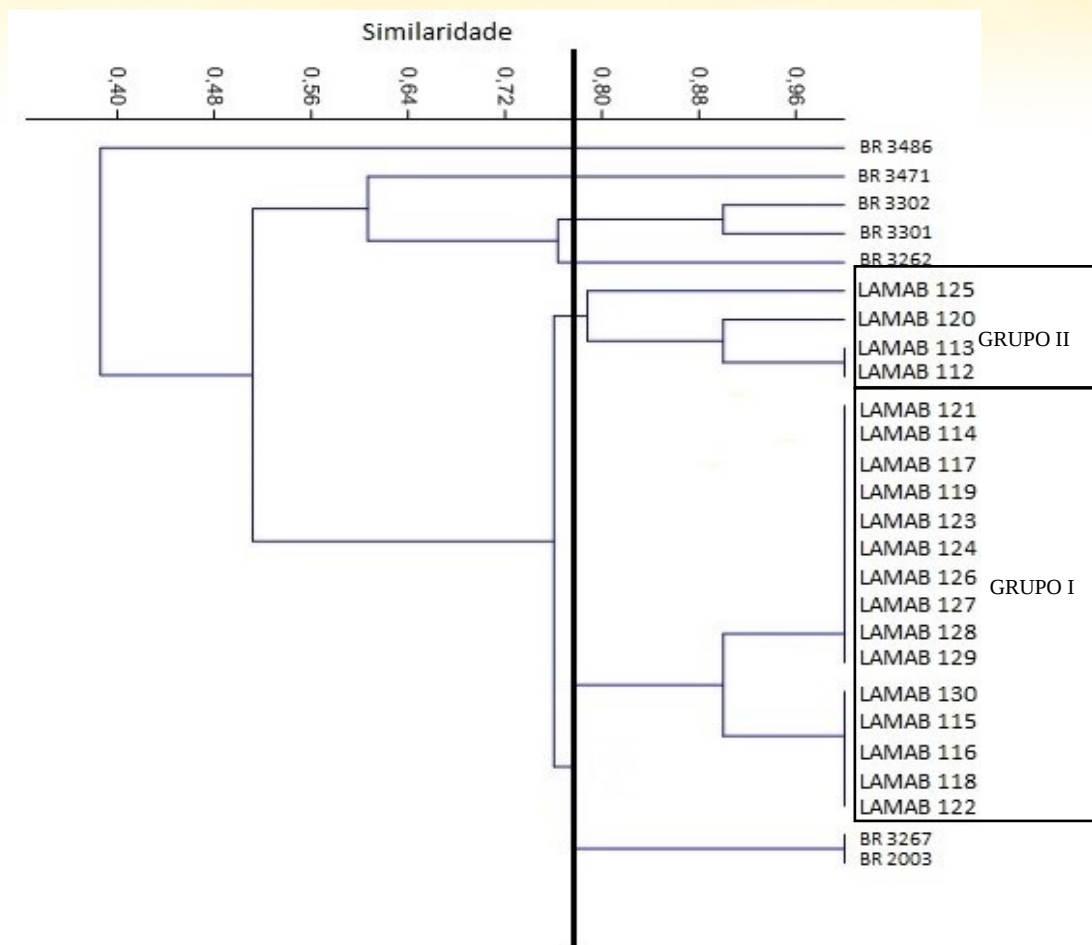


Figura 1 Porcentagem de estirpes de rizóbio e padrões que cresceram em meio YMA com diferentes níveis de concentração de NaCl.

Estudos com variedades de feijoeiros em solos salinos e alcalinos concluem que a eficiência simbiótica provavelmente está mais relacionada com a variação de genótipos dentre as cultivares leguminosas do que às estirpes de rizóbios tolerantes ou adaptadas à salinidade (SHAMSELDIN; WERNER, 2005).



Utilizando os dados obtidos com as características culturais e de tolerância a diferentes níveis de NaCl foi gerado um dendrograma de similaridade (Figura 2). O grupo I é constituído de 15 estirpes que apresentaram colônias de diâmetro menor que 1mm do qual cinco (33,33%) suportaram concentrações de NaCl de até 1%. O grupo II é composto por quatro estirpes sendo uma estirpe com colônias de tamanho puntiforme e três com diâmetro maior que 1mm, onde três das estirpes (75%) suportaram concentrações de NaCl de até 1%.

Figura 2 Dendrograma construído com os dados das características culturais e de tolerância à salinidade em diferentes níveis de concentração de sais das estirpes de rizóbio e padrão. A linha vertical indica grupos formados com cerca de 78% de similaridade.

A salinidade pode inibir o crescimento e a multiplicação dessas bactérias tornando testes para a tolerância a NaCl importante para a caracterização e descrição de bactérias isoladas de nódulos de leguminosas. A tolerância a esse fator é uma característica intrínseca destes organismos, podendo ser resultado da adaptação ao ambiente em que se estabelecem. É fato que a salinidade dos solos afeta mais a nodulação que a alcalinidade (SHAMSELDIN; WERNER, 2005). Talvez a combinação de fatores como alta concentração salina e pH alcalino favoreça a eficiência da fixação de nitrogênio realizada por rizóbios adaptados ao ambiente salino. Pois, como afirma Shamseldin e Werner (2005) há correlação positiva entre esses fatores e a atividade da enzima nitrogenase. Os maiores valores encontrados na fixação de nitrogênio tanto para isolados de nódulos de raiz quanto de caule foram realizados por rizóbios que alcalinizam o meio de cultivo (MARTINS *et al.*, 2001).

CONCLUSÃO

Entre as estirpes estudadas as dezenove estirpes apresentaram tolerância a salinidade em concentração de NaCl até 3g L⁻¹ e oito estirpes toleraram a salinidade em concentração de NaCl até 10g L⁻¹, LAMAB 112, LAMAB 113, LAMAB 115, LAMAB 116, LAMAB 118, LAMAB 122, LAMAB 125 e LAMAB 130.

REFERÊNCIAS

BARBERI, A.; CARNEIRO, M. A.C.; MOREIRA, F.M.S. ; SIQUEIRA, J.O. Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas Gerais. **CERNE**, v.4, n.1, p.145-153, 1998.

BOAKYE, E. Y.; DOTSE, L. I. Y.; DANSO, S. K. A.; OFFE, S. K. Characterization and diversity of rhizobia nodulating selected tree legumes in Ghana. **Symbiosis**, v.69, p. 89-99, 2016.

BORTHAKUR, D.; LAMB, J.W.; JOHNSTON, A.W. Identification of two of *Rhizobium phaseoli* genes required for melanin synthesis, one of which is required for nitrogen fixation and activates the transcription of the other. **Molecular Genetics and Genomics**, v.207, p.155-160, 1987.

CAVALCANTE, F. G.; SOUSA, J.B.; C.H.C.M.; MARTINS, S.C.; MARTINS, C.M. Tolerância à salinidade e uso de fontes de carbono de estirpes de rizóbio oriundas de Pentecoste-CE. **Enciclopédia Biosfera**, v.11, n.21, p. 2384-2397, 2015.

COUTINHO, H.L.C.; OLIVEIRA, V.M.; LOVATO, A.; MAIA, A.H.N.; MANFIO, G.P. Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. **Applied Soil Ecology**, v. 13, p.159-167, 1999.

FERREIRA, P. A. A.; BOMFETI, C. A.; SOARES, B. L.; MOREIRA, F. M. S. Efficient nitrogen-fixing *Rhizobium* strains isolated from amazonian soils are highly tolerant to acidity and aluminium. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 28, p. 1947- 1959, 2012.

MARTINS, M. M.; LOUREIRO, M. de F.; SOUTO, S. M.; FRANCO, A. A. Eficiência da fixação biológica de nitrogênio de isolados de nódulos de raiz e caule de *Discolobium* spp. **Agricultura Tropical**, v.5, n.5, 2001.

PINHEIRO, M.S.; SOUSA, J.B.; BERTINI, C.H.C.M.; MARTINS, S.C.; MARTINS, C.M. Isolamento e seleção de estirpes de rizóbio nativas do semiárido tolerantes a estresses ambientais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 1 8, p.2071-2082, 2014.

SATURNO, D. F.; ANDRADE, D. S. Diversidade de rizóbios que nodulam bracatinga isolado de solos cultivados e de floresta. **UNICIÊNCIAS**, v.19, n.1, p. 26-30, 2015.

SHAMSELDIN, A.; WERNER, D. High salt and high pH tolerance of new isolated *Rhizobium etli* strains from Egyptian soils. **Current Microbiology**, v.50, n.1, p.11-16, 2005.

SILVA, L.L.; PINHEIRO, M.S.; SOUSA, J.B.; MARTINS, S.C.; MARTINS, C.M. Diversidade de rizóbio da unidade de conservação Parque Nacional de Ubajara no Estado do Ceará. **Enciclopédia Biosfera** ,v.10, n.19; p. 2141-2156, 2014.

SOUSA, J.B.; PINHEIRO, M.S.; SILVA, L.L.; MARTINS, S.C.; MARTINS, C.M. Caracterização de bactérias nativas de solo do semiárido isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Enciclopédia Biosfera**, v.10, n.19; p 2797-2806, 2014.

TAN, I.K.P.; BROUGHTON, W.J. Rhizobia in tropical legumes. XIV. Ion uptake differences between fast- and slow-growing strains. **Soil Biology Biochemistry.**, v.14, p.295-299, 1982.

VENTORINO, V.; CAPUTO, R.; PASCALE, S.; FAGNANO, M.; PEPE, O.; MOSCHETTI, G. Response to salinity stress of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strains in the presence of different legume host plants. **Annals of Microbiology**, v.62, p.811-823, 2012.