

Tolerância a pH extremos de bactérias diazotróficas isoladas do semiárido

Juliani Barbosa de Sousa⁽¹⁾; Marcelo de Sousa Pinheiro⁽²⁾; Suzana Cláudia Silveira Martins⁽³⁾; Claudia Miranda Martins⁽⁴⁾

⁽¹⁾Estudante de pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais; Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará; julianibarbosadesousa@gmail.com; ⁽²⁾Estudante de pós-graduação em Fitotecnia; Universidade Federal do Ceará; ⁽³⁾Prof^a. Adjunta IV, Dept^o de Biologia, Universidade Federal do Ceará; ⁽⁴⁾Prof^a. Associada I, Dept^o de Biologia Universidade Federal do Ceará.

RESUMO: O pH do solo constitui um dos principais fatores limitantes na fixação de nitrogênio pelas leguminosas, devido ao retardamento ou supressão da formação de nódulos. O objetivo desse trabalho foi testar, com relação à tolerância a pH extremos, isolados provenientes do Ceará e Rio Grande do Norte. Foram testados 27 isolados e seis estirpes padrão, em triplicata para cada isolado em meio YM modificado para pH 4 e pH 10. Os dados obtidos foram agrupados em uma matriz de similaridade e utilizados para a elaboração de um dendrograma. Dos 27 isolados testados, 20 apresentaram resistência ao pH 10 e 9 apresentaram resistência ao pH 4. Cinco isolados não apresentaram resistência a nenhum dos valores de pH testados. Com um nível de similaridade de 70% foi possível formar dez grupos distintos para a característica resistência a pH extremos. Dentre os 27 isolados de rizóbios testados LAMAB 1, LAMAB 8, LAMAB 10, LAMAB 11, LAMAB 12, LAMAB 21 e LAMAB 22 se destacaram em relação a pH extremos, sendo esta uma das características relevantes para recomendação de novos inoculantes.

Termos de indexação: Fixação Biológica de Nitrogênio. Estirpes nativas. Rizóbio.

INTRODUÇÃO

Embora o nitrogênio (N₂) seja o principal constituinte da atmosfera apenas micro-organismos procaríotos (bactérias e cianobactérias) apresentam capacidade de fixar nitrogênio atmosférico. Muitas bactérias fixadoras de N₂ formam associações simbióticas com plantas, especialmente leguminosas através do desenvolvimento da estrutura do nódulo (FRIGHETTO; VALARINE, 2000). Entre as características importantes para o estabelecimento da simbiose destaca-se a resistência a antibióticos e fungicidas, tolerância a pH ácido, à seca e altas temperaturas (BARAIBAR *et al.*, 1999).

O pH do solo constitui um dos principais fatores limitantes na fixação de nitrogênio pelas leguminosas, devido ao retardamento ou supressão da formação de nódulos. Seus efeitos podem ser diretos, através da influência sobre a sobrevivência

da bactéria, ou indiretamente pela maior ou menor disponibilidade de nutrientes e presença de elementos tóxicos (MARTINS, 2010; MOHAMMADI *et al.*, 2012). Entre os fatores de natureza físico-química, o pH e a temperatura podem influenciar tanto no número como na atividade enzimática dos micro-organismos (OLIVEIRA *et al.*, 2010)

O objetivo desse trabalho foi testar, com relação à tolerância a pH extremos, isolados provenientes do Ceará e Rio Grande do Norte.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram testados 27 isolados, recuperados da Coleção de Culturas de Rizóbio existente no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAB) da Universidade Federal do Ceará (UFC), provenientes dos municípios de Quixadá-CE, Cascavel-CE e Santana do Mato-RN e Jardim de Angicos-RN, mais seis estirpes padrão, BR 3486 (*Burkholderia phymatum*), INPA 03-11B- *Bradyrhizobium sp* (BR 3301), UFLA 03-84 - *Bradyrhizobium sp* (BR 3302), BR 3267 (*Bradyrhizobium sp*), BR 2003 e BR 2801 – (*Bradyrhizobium elkanii*). As análises foram realizadas em triplicata para cada isolado em meio YM (VINCENT, 1970) modificado para pH 4 com adição de HCl e pH 10 com adição de NaOH. Os isolados foram incubados a 28°C sob agitação de 150 rpm. A análise de crescimento foi feita sete dias após a incubação. Tubos que apresentaram turbidez no caldo, em comparação ao controle negativo, foram considerados como resultado positivo e os que não apresentaram turbidez como resultado negativo.

Os resultados obtidos foram convertidos em uma matriz binária “presença-ausência” e construída uma matriz de similaridade utilizada para elaboração do dendrograma utilizando o aplicativo computacional PAST (HAMMER *et al.*, 2001) que permitiu o agrupamento de isolados semelhantes. Adotou-se o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method) e coeficiente de Jaccard.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 27 isolados testados, 20 apresentaram



resistência ao pH 10 e 9 apresentaram resistência ao pH 4. Cinco isolados não apresentaram resistência a nenhum dos valores de pH testados (LAMAB 9, LAMAB 25, LAMAB 26, LAMAB 29, LAMAB 30). Afirma-se que a tolerância dos rizóbios a pH depende da capacidade de manter um pH intracelular (pHi) entre 7,2 e 7,5, quando um pHi cai abaixo de 6,5 o crescimento cessa o que indica que algum processo citoplasmático é extremamente sensível a acidez (HUNGRIA; VARGAS, 2000). Cuadrado *et al.* (2009) observaram que todas as cepas resistentes aos pH 7 e 9 pertencem ao grupo de crescimento rápido, neste experimento apenas quatro estirpes são de crescimento rápido. Hara e Oliveira (2005) indicam que isolados de rizóbio, quando submetidos a baixo pH, podem ter seu crescimento influenciado também por algum outro fator.

Com um nível de similaridade de 70% foi possível formar dez grupos distintos para a característica resistência a pH extremos (**Figura 1**). Os grupos I, II, III, IV e X representam isolados que não foram agrupados, são aqueles que não apresentaram resistência a nenhum dos valores de pH testados. Quatro das estirpes padrões testadas (BR 2801, BR 3301, BR 3486 e BR 2003) estão presentes no grupo VIII, onde estão os isolados que apresentaram resistência a dois valores de pH.

CONCLUSÕES

Dentre os 27 isolados de rizóbios testados LAMAB 1, LAMAB 8, LAMAB 10, LAMAB 11, LAMAB 12, LAMAB 21 e LAMAB 22 se destacaram em relação a pH extremos, sendo esta uma das características relevantes para recomendação de novos inoculantes.

REFERÊNCIAS

BARAIBAR, A.; FRIONI, L.; GUEDES, M. E.; LJUNGGREN, H. Symbiotic effectiveness and ecological characterization of indigenous *Rhizobium loti* populations in Uruguay. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.34, n.6, p.1011-1017, jun. 1999.

CUADRADO, B.; RUBIO, G.; SANTOS, W. Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. **Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.** v. 38 (1), 78-104, 2009.

FRIGHETTO, R. T. S.; VALARINI, P. J. **Indicadores biológicos e bioquímicos da qualidade do solo.** EMBRAPA Meio Ambiente, Jaguariúna, p. 77-88. 2000.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica** v. 4, n. 1, 9 p. 2001. Disponível em: <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>. Acesso em: 20 fev. 2013.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, S. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 40, n.7, p.667-672, jul. 2005.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. T. A. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, New York, n. 65, p. 151-164, 2000.

MARTINS, A. F. **Rizóbios para *Lótus spp*, resistentes à acidez e à salinidade do solo.** Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 81 p. 2010.

MOHAMMADI, K. *et al.* Effective factors on biological nitrogen fixation. **African Journal of Agricultural Research**, v. 7(12), p. 1782-1788. 2012.

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 Amazônica**. v. 40(2), 401 – 404. 2010.

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

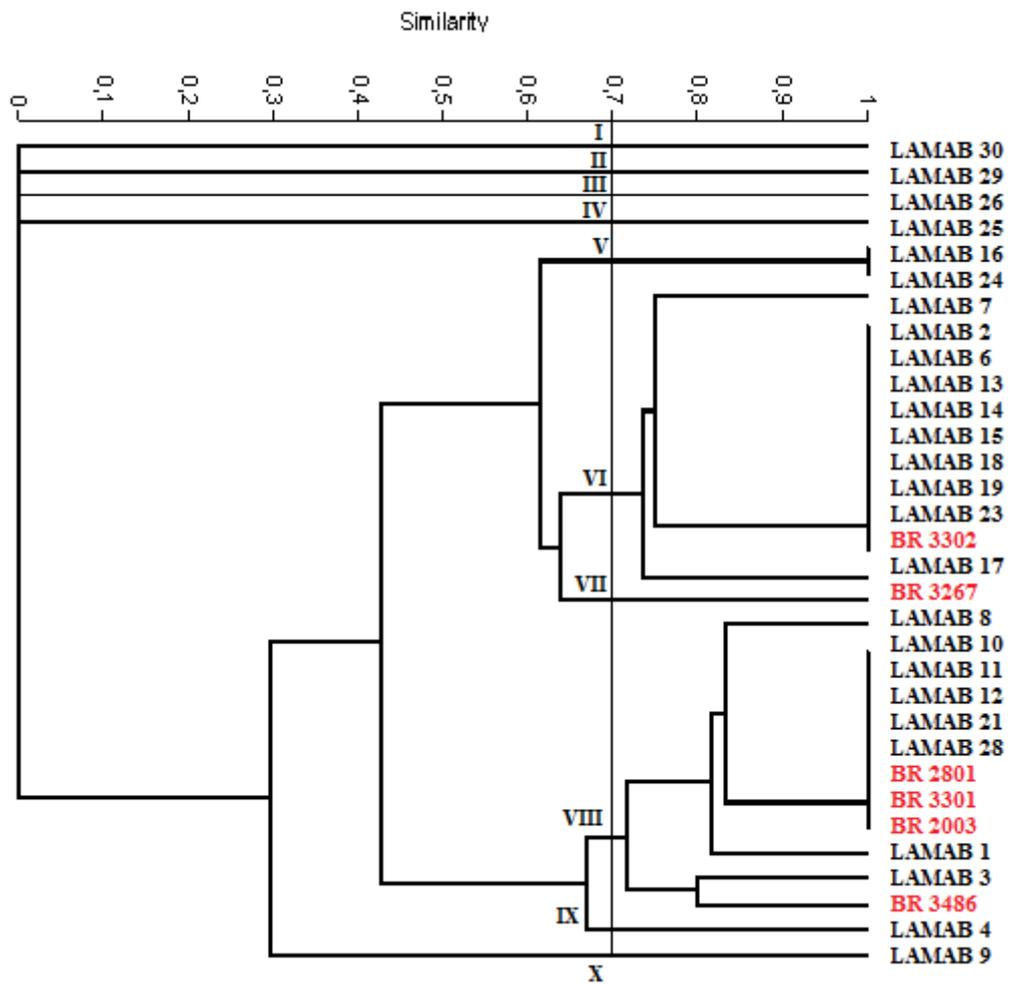


Figura 1 – Dendrograma de similaridade baseado na tolerância a pH extremos (4 e 10) para isolados de bactérias fixadoras de nitrogênio (estirpes padrão em destaque). A linha vertical indica grupos formados com 70% de similaridade.