

Resistência de diferentes isolados de rizóbio a diferentes temperaturas e concentrações de NaCl ⁽¹⁾

Aline Assis Cardoso⁽²⁾; Michel de Paula Andraus⁽²⁾; Anderson Petrônio de Brito Ferreira⁽³⁾; Rafael Lopes Esteves⁽⁴⁾; Gustavo Hernane Costa Oliveira⁽⁴⁾; Marcílio José de Oliveira Júnior⁽⁴⁾.

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos da Embrapa e Capes.

⁽²⁾ Estudante de Pós-Graduação; Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás; Goiânia, Goiás; aline.assiscardoso@gmail.com; ⁽³⁾ Pesquisador; Embrapa Arroz e Feijão; ⁽⁴⁾ Estudante de Graduação; Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás.

RESUMO: Cultivado por pequenos e grandes produtores, em diversificados sistemas de produção e em todas as regiões brasileiras, o feijoeiro-comum reveste-se de grande importância econômica e social. A salinização do solo constitui uma das mais sérias formas de degradação dos recursos edáficos e, em áreas secas, caracteriza-se como um fenômeno complexo causado pela interação entre fatores biofísicos e sócio-econômicos. Alguns trabalhos realizados principalmente com leguminosas de clima temperado relatam o efeito prejudicial da salinidade na nodulação. Nesse contexto, o NaCl tem sido considerado bom indicador da tolerância de bactérias a sais. As temperaturas elevadas são outro fator também limitante para o rizóbio que nodula o feijoeiro-comum. Por isso o trabalho tem como objetivo avaliar a resistência a diferentes concentrações de NaCl (0%; 1%; 2%; 4% e 6%) a 28°C, e em diferentes temperaturas (28°C; 33°C; 38°C; 43°C e 48°C) com concentração de 0% de NaCl. Alguns isolados apresentaram boa resistência a salinidade e temperatura, resultados melhores que as estirpes padrões (SEMIA 4077; SEMIA 4080 e SEMIA 4088) utilizadas na inoculação do feijão. As bactérias 71 e 117 do grupo 1 apresentaram tanto resistência a salinidade quanto a temperatura. É de grande importância que se tenha estudos nessa área avaliando estirpes eficientes na nodulação que superem as padrões comerciais utilizadas na inoculação do feijão.

Termos de indexação: Salinidade; fixação; *Phaseolus vulgaris*.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o Brasil tem ocupado o primeiro lugar na produção e consumo mundial de feijão, *Phaseolus vulgaris* L. (Fao, 2007), que é um dos alimentos básicos e uma das principais fontes de proteína na alimentação da população brasileira. A salinização do solo constitui uma das mais sérias formas de degradação dos recursos edáficos e, em

áreas secas, caracteriza-se como um fenômeno complexo causado pela interação entre fatores biofísicos e socioeconômicos.

Assim como as plantas, as bactérias diazotróficas simbióticas apresentam grande variação na tolerância à salinidade. Essa tolerância ao estresse salino pode ser atribuída a variações de pH, temperatura, fonte de carbono solúvel e à presença de solutos osmoprotetores (Graham, 1992). Para bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, os efeitos prejudiciais dos sais são mais evidentes, particularmente em relação aos efeitos da concentração do íon específico do que ao efeito osmótico (Elsheikh, 1998), variando de acordo com a forma iônica presente e a tolerância da estirpe. Nesse contexto, o NaCl tem sido considerado bom indicador da tolerância de bactérias a sais (Abdelmoumen et al., 1999).

No semiárido brasileiro, a salinidade alcança cerca de 20% dos 95 milhões de hectares (Melo et al., 2006). Nas áreas irrigadas desta região – 300 mil ha – o problema já está presente em 25% da área (Goes, 1977). Caracterizado por baixa precipitação pluviométrica, estiagens prolongadas, altas temperaturas e, muitas vezes, baixa fertilidade do solo, o semiárido do Brasil concentra a população com menor Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) do país.

Alguns trabalhos realizados principalmente com leguminosas de clima temperado relatam o efeito prejudicial da salinidade na nodulação. A maioria desses trabalhos considera que o efeito é mais acentuado no sistema radicular, prejudicando o desenvolvimento do rizóbio (Tu, 1981). Alguns pesquisadores observaram variações na tolerância de diferentes estirpes quanto a concentrações crescentes de NaCl (Rai, 1983; Rai et al., 1985), enquanto outros consideram que a tendência e magnitude das reduções por efeito da salinidade dependem também das variedades apresentadas pelas plantas (Ahmad et al., 1981). Acredita-se que, quando os estresses são de curta duração, predominem os efeitos osmóticos dos sais, fazendo com que o potencial hídrico do ambiente radicular

diminua e restrinja a absorção de água; em estresses de longa duração, todavia, os íons se acumulam e provocam toxidez, induzindo distúrbios nutricionais e metabólicos (Munns 2002).

De modo geral, os efeitos prejudiciais dos sais são mais evidentes, particularmente em relação aos efeitos da concentração do íon específico do que ao efeito osmótico (Elsheikh, 1998). Nesse contexto, o NaCl tem sido considerado bom indicador da tolerância de bactérias à sais (Abdelmoumen et al., 1999).

Por outro lado, temperaturas elevadas são outro fator também limitante para o rizóbio, onde o tamanho do nódulo parece ser o parâmetro mais sensível a altas temperaturas do que o número de nódulos em estudos com a cultura da soja realizados por Castro et al. (1993). Esta sensibilidade a temperaturas elevadas pode ser exemplificada pelas simbioses do feijoeiro, com sensibilidade. No caso do feijoeiro, tanto a planta como o rizóbio são afetados quando em temperaturas superiores à 34°C, sendo que no caso do rizóbio, os plasmídeos que carregam os genes simbióticos podem ser perdidos.

Com o intuito de avaliar novos isolados o presente trabalho tem como objetivo avaliar a qualidade dos rizóbio usando como parâmetros a tolerância à salinidade e temperatura. Podendo assim colaborar no aumento da nodulação gerando uma disponibilização de nitrogênio maior para a planta.

MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados de rizóbio foram coletados nos estados de GO, MG e PR e levados para o laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Arroz e Feijão, localizada no município de Santo Antônio de Goiás. Os isolados foram armazenados de acordo com a metodologia descrita por Hungria (1994), utilizando-se meio Yeast Mannitol Agar (YMA) em placas de Petri e mantidas em geladeira.

Os 51 isolados coletados e as 3 estirpes padrões (SEMIA 4077; SEMIA 4080 e SEMIA 4088) foram transferidas para pequenos vidros com meio líquido e colocados para agitar a 28°C e 120 Rpm por 48 horas em agitador horizontal. Retirou-se os vidros com as bactérias crescidas e com uma pipeta transferiu-se as estirpes para uma placa com poços, onde para cada bactéria existiam três repetições e com um carimbo de metal específico essas bactérias foram carimbadas em placas contendo meio sólido com diferentes concentrações de NaCl.

No momento do preparo do meio sólido foram adicionadas diferentes concentrações do sal. Sendo essas: 0%; 1%; 2%; 4% e 6%, o que constituirá um

fator experimental de interação com as bactérias. As placas com diferentes concentrações foram levadas para um BOD com temperatura ajustada para 28°C por 48 horas. Para testar diferentes temperaturas (28°C; 33°C; 38°C; 43°C e 48°C) foram utilizadas apenas placas com 0% de NaCl, onde cada placa foi levada às temperaturas diferentes por 48 horas. Após dois dias realizou-se a leitura das bactérias que cresceram. Para comparação de resultados foram feitos gráficos (figura 1 e figura 2) e uma tabela (tabela 1) mostrando o desempenho de crescimento dos diferentes isolados em cada fator experimental proposto.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na resistência à temperatura obteve-se isolados que apresentaram bons resultados, estas formaram o grupo um, conforme (figura 1 e figura 2) e (tabela 1), semelhante a estirpe padrão SEMIA 4077 crescendo até 48°C. Já o grupo dois, que agrupou as bactérias de resultado intermediário, os crescimentos se compararam as estirpes padrões SEMIA 4080 e SEMIA 4088 crescendo até 38°C. E as do grupo três apresentaram a menor resistência a temperatura crescendo apenas até 33°C, conforme tabela 1.

Quanto a resistência à salinidade o grupo um apresentou os melhores resultados com isolados crescendo a 6%, sendo os isolados 71, 111 e 117 mais resistentes a salinidade que as estirpes padrões SEMIA 4077 e SEMIA 4088 que pertencem ao grupo dois onde o crescimento chegou até 4%. A estirpe SEMIA 4080 faz parte do grupo três com crescimento até 2%. O grupo quatro foram os isolados que apresentaram resultados inferiores as estirpes padrões crescendo até 1%, conforme tabela 1. A literatura é bem diversificada quanto à informações sobre as diferentes capacidades de bactérias diazotróficas, tanto associativas quanto simbióticas, em tolerar salinidade (CHEN et al., 1995; SHEREEN et al., 1998; RASA et al., 2001; TAMIMI, 2001; HUNGRIA et al., 2001; NÓBREGA et al., 2004).

O grupo um (Figura 1 e Figura 2) apresenta os isolados com maior resistência, destacando os isolados 71, 111 e 117 as que apresentaram resistência a temperatura quanto a salinidade, sendo melhores que as estirpes padrões SEMIA 4077, SEMIA 4080 e SEMIA 4088. Estudos com essa finalidade objetivam não só identificar estirpes potenciais para usos diversos, mas também auxiliar na caracterização das espécies bacterianas (CHEN et al., 2000; FRIONI et al., 2001; NÓBREGA, et al., 2004).

Figura 1: Resistência de isolados de rizóbio à temperatura

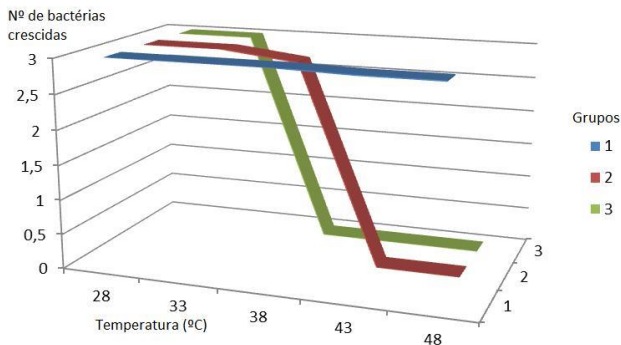
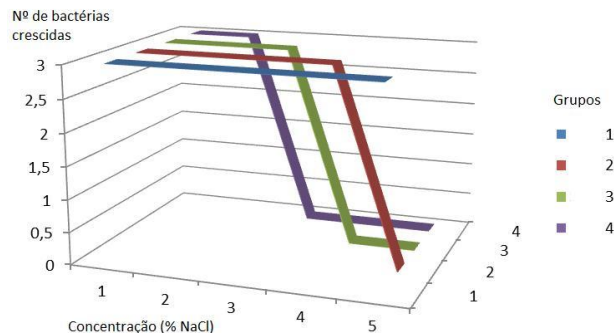


Figura 1: Resistência de isolados de rizóbio à salinidade



CONCLUSÕES

Isolados de rizóbio do grupo um, como as bactérias 71 e 117 apresentam resistência à salinidade e temperatura, superior as estirpes padrões SEMIA 4077; SEMIA 4080; SEMIA 4088 recomendadas pelo MAPA.

REFERÊNCIAS

ABDELMOUMEN, H.; FILALI-MALTOUF, A.; NEYRA, M.; BELABED, A.; IDRISSEI, M. M. Effect of high salts concentration on the growth of rhizobia and responses to added osmótica. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 86, n. 6, p. 889-898, June 1999.

AHMAD, M. H.; EAGLESHAM, A. R. J.; HASSOUNA, S.; SEAMAN, B.; AHMAD, M.H.; EAGLESHAM, .R.J.; HASSOUNA, S.; SEAMAN, B.; AYANABA, A.; MULONGOY, K.; PULVER, E.L. Examining the potential for inoculant use with cowpea in West African soils. *Tropical Agriculture*, Trinidad, v.58, p.325-335, 1981.

CASTRO, O.M. de; PRADO, H. do; SEVEDO, A.C.R.; CARDOSO, E. J. B. N. Evaluation of nitrogen fixation and soil microorganisms in soybean under conventional and minimal cultivation regimes. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, vol.50, no.2, p.212-219. 1993.

CHEN, W.; WANG, E.; WANG, S.; LI, Y. Characteristics of *Rhizobium tiansahnense* sp. Nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from a arid saline environment in Xinjiang, People sRepublic of China. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v. 45, n. 1, p. 153-159, 1995.

ELSHEIKH, E. A. E. Effects of salt on rhizobia and bradyrhizobia: a review. *Annals of Applied Biology*, Lannham, v. 132, n. 3, p. 507-524, June 1998.

FAO. Faostat. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/desktopDefault.aspx?PageID=567>. Acesso em: 10 maio 2007.

GOES, E.S. O problema de salinidade e drenagem em projetos de irrigação do Nordeste e a ação da pesquisa com vistas a seu equacionamento. Recife: SUDENE, 20p. 1977.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment* 28:239-250. 2002.

RAI, R.; NASAR, S.K.T.; SINGH, S.J.; PRASAD, V. Interactions between *Rhizobium* strains and lentil (*Lens culinaris* L.) genotypes under salt stress. *Journal of Agricultural Sciences*, Cambridge, v.104, p-199-205, 1985.

RAI, R. The salt tolerance of *Rhizobium* strains and lentil genotypes and the effect on salinity aspects of symbiotic N-fixation. *Journal of Agricultural Sciences*, Cambridge, v.100, p.81-86, 1983.

SHEREEN, A.; ANSARI, R.; NAQVI, S. S. M.; SOOMRO, A. Q. Effect of salinity on *Rhizobium* sp., nodulation and growth of soybean (*Glycine max.* L.). *Pakistan Journal of Botany*, Pakistan, v. 30, n. 1, p. 75-81, June 1998.

TU, J.C. Effects of salinity on *Rhizobium* root hair interaction, nodulation and growth of soybean. *Canadian Journal of Plant Sciences*, Ontario, v.61, p.231-239, 1981.

Tabela 1. Resistência dos isolados de rizóbio à diferentes concentrações de NaCl e temperaturas.

Grupo	Bactérias	Temperatura (°C)					Grupo	Bactérias	Concentrações NaCl (%)				
		28	33	38	43	48			0	1	2	4	6
I	1	+++	+++	+++	+++	+++	I	71	+++	+++	+++	+++	+++
	4	+++	+++	+++	+++	+++		111	+++	+++	+++	+++	+++
	9	+++	+++	+++	+++	+++		117	+++	+++	+++	+++	+++
	18	+++	+++	+++	+++	+++		4	+++	+++	+++	+++	-
	27	+++	+++	+++	+++	+++		9	+++	+++	+++	+++	-
	28	+++	+++	+++	+++	+++		10	+++	+++	+++	+++	-
	37	+++	+++	+++	+++	+++		16	+++	+++	+++	+++	-
	42	+++	+++	+++	+++	+++		28	+++	+++	+++	+++	-
	48	+++	+++	+++	+++	+++		31	+++	+++	+++	+++	-
	51	+++	+++	+++	+++	+++		32	+++	+++	+++	+++	-
	52	+++	+++	+++	+++	+++	36	+++	+++	+++	+++	-	
	54	+++	+++	+++	+++	+++	37	+++	+++	+++	+++	-	
	59	+++	+++	+++	+++	+++	42	+++	+++	+++	+++	-	
	63	+++	+++	+++	+++	+++	48	+++	+++	+++	+++	-	
	65	+++	+++	+++	+++	+++	51	+++	+++	+++	+++	-	
	67	+++	+++	+++	+++	+++	52	+++	+++	+++	+++	-	
	70	+++	+++	+++	+++	+++	53	+++	+++	+++	+++	-	
	71	+++	+++	+++	+++	+++	54	+++	+++	+++	+++	-	
	72	+++	+++	+++	+++	+++	59	+++	+++	+++	+++	-	
	74	+++	+++	+++	+++	+++	II	61	+++	+++	+++	+++	-
78	+++	+++	+++	+++	+++	62		+++	+++	+++	+++	-	
80	+++	+++	+++	+++	+++	63		+++	+++	+++	+++	-	
81	+++	+++	+++	+++	+++	65		+++	+++	+++	+++	-	
89	+++	+++	+++	+++	+++	67		+++	+++	+++	+++	-	
104	+++	+++	+++	+++	+++	68		+++	+++	+++	+++	-	
112	+++	+++	+++	+++	+++	70		+++	+++	+++	+++	-	
117	+++	+++	+++	+++	+++	72		+++	+++	+++	+++	-	
S4077	+++	+++	+++	+++	+++	74		+++	+++	+++	+++	-	
16	+++	+++	+++	++	++	80		+++	+++	+++	+++	-	
II	10	+++	+++	+++	-	-	81	+++	+++	+++	+++	-	
	31	+++	+++	+++	-	-	89	+++	+++	+++	+++	-	
	32	+++	+++	+++	-	-	90	+++	+++	+++	+++	-	
	36	+++	+++	+++	-	-	102	+++	+++	+++	+++	-	
	53	+++	+++	+++	-	-	104	+++	+++	+++	+++	-	
	61	+++	+++	+++	-	-	112	+++	+++	+++	+++	-	
	62	+++	+++	+++	-	-	S4077	+++	+++	+++	+++	-	
	68	+++	+++	+++	-	-	S4088	+++	+++	+++	+++	-	
	87	+++	+++	+++	-	-	27	+++	+++	+++	-	-	
	90	+++	+++	+++	-	-	III	84	+++	+++	+++	-	-
	102	+++	+++	+++	-	-		87	+++	+++	+++	-	-
	111	+++	+++	+++	-	-		S4080	+++	+++	+++	-	-
	S4080	+++	+++	+++	-	-	IV	1	+++	+++	-	-	-
	S4088	+++	+++	+++	-	-		7	+++	+++	-	-	-
60	+++	+++	+	-	-	13		+++	+++	-	-	-	
7	+++	+++	-	-	-	17		+++	+++	-	-	-	
13	+++	+++	-	-	-	18		+++	+++	-	-	-	
17	+++	+++	-	-	-	21		+++	+++	-	-	-	
21	+++	+++	-	-	-	22		+++	+++	-	-	-	
22	+++	+++	-	-	-	33		+++	+++	-	-	-	
33	+++	+++	-	-	-	46		+++	+++	-	-	-	
46	+++	+++	-	-	-	49		+++	+++	-	-	-	
49	+++	+++	-	-	-	60	+++	+++	-	-	-		
64	+++	+++	-	-	-	64	+++	+++	-	-	-		