



# CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE RIZÓBIO NATIVO DE LEGUMINOSA FORRAGEIRA DO PANTANAL SUL MATO - GROSSENSE.

Pereira, M.D

Brasil, M.S

Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Departamento de Ciências do Ambiente-CPAN, Campus do Pantanal;. Av. Rio Branco, nº. 1.270 , Bairro Universitário. 79.304 - 902, Mato Grosso do Sul, Brasil. Fone: (67) 3234 - 6800. mar - diamante@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

O *Desmodium* se apresenta em uma vasta gama de ambientes no pantanal, e se destaca pela boa produção de massa, ocorrência generalizada e excelente palatabilidade (Allem & Valls, 1987). O *Desmodium* spp é uma leguminosa forrageira que pode adquirir N<sub>2</sub> do ar através da simbiose com bactérias do gênero rizóbio.

As bactérias do gênero *Rhizobium* exercem importante função no ciclo do nitrogênio, convertendo o nitrogênio presente na atmosfera diretamente em nitratos, ao contrário das Nistrossomas, que convertem amônia (NH<sub>3</sub>), resultante do processo de decomposição, em nitrito que posteriormente é convertido pela ação das bactérias (Vincent, 1970).

Estes microrganismos transferem o N<sub>2</sub> reduzido às leguminosas, enquanto que os carboidratos produzidos por essas plantas são fornecidos às bactérias e servem como fontes de energia, ocorrendo assim uma simbiose (Espindola *et al.*, 2005).

O isolamento de Rhizobio tem importância, para selecionar bactérias eficientes na fixação de N<sub>2</sub>. A caracterização morfológica é um passo fundamental para a identificação destes organismos, os dados emitidos serão úteis facilitando a identificação, e futuramente realizar a classificação taxonômica visando desde já à seleção de bactérias mais eficientes e adaptáveis a seu ambiente específico com pH e temperatura favorável ao seu desenvolvimento.

Hoje há inúmeros estudos que procuram visar o desempenho destas bactérias no meio ambiente, são realizados testes em laboratório para avaliar produção de enzimas ou outros compostos, dentre estes estudos pode ser agrupado o teste amilolítico, em que bactérias do gênero *Rhizobium* são submetidas ao desenvolvimento em meios de cultura sólido, com fins avaliar a hidrolização por meio de enzima amilase. Outro estudo de compostos produzidos por bactérias e a capacidade de solubilização de fosfato, estes microrganismos produzem fosfato que no meio ambiente pode atuar

facilitando a absorção de nutriente pelas raízes das plantas (Villegas *et al.*, 2002).

## OBJETIVOS

Isolar e caracterizar morfofisiologicamente bactérias nodulíferas nativas da região do Pantanal da Nhecolândia.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste projeto foram utilizados em laboratório vidrarias, equipamento de esterilização a pressão e vapor, câmara asséptica, reagentes para o preparo dos meios de cultura, equipamento de Phgâmetro e estufas para incubação.

Área de estudo.

Foram coletadas amostras de raízes de *Desmodium* spp, na região do Pantanal da Nhecolândia, Mato grosso do Sul, a fim de isolar e caracterizar morfofisiologicamente colônias isoladas a partir de nódulos bacterianos. Estes nódulos foram coletados em período de estiagem em terreno com solo arenoso. A área de coleta se destaca por se apresentar submersa em períodos chuvosos, permanecendo submerso por aproximadamente 2 a 3 meses após o início de estiagem.

- Isolamento e caracterização morfológica de colônia.

Para o isolamento das bactérias diazotróficas (fixadoras de nitrogênio), em laboratório se separou dois nódulos de cada uma das três amostras, os nódulos foram imersos, por cerca de 5 a 10 segundos, em álcool a 90 % a 95%.

Em seguida transferidos para uma solução a 1% de hipoclorito de sódio por um minuto. Após a última lavagem, os nódulos foram amassados com bastão de vidro e este material foi riscado em placas com meio de cultura sólido, levedura manitol (YMA), contendo extrato de - levedura, tendo o Vermelho - Congo como indicador (Vicent, 1980).

Para o isolamento de bactérias de crescimento rápido utilizou-se como fonte de carbono a glicose. Estas foram incubadas em estufa a 30°C.

De acordo com Hungria (1994), meio de cultura contendo a glicose como fontes de carbono selecionam bactérias de crescimento rápido (até 3 dias) e com manitol bactérias de crescimento lento (até 7 dias).

Cada estipe ao ser isolado recebeu uma identificação, uma sigla e uma numeração seqüente, (1MDB a 56MDB). As colônias de cada isolado foram caracterizadas quanto à forma da colônia, cromogênese, consistência, tamanho, capacidade de acidificação, tempo de crescimento e atividade amilolítica das colônias (Larrent, 1975).

Após purificação estes estipes foram submetidos a testes de acidificação e atividades enzimáticas amilolítica e solubilização de fosfato.

Avaliações fisiológicas;

Capacidade de acidificação.

As colônias puras foram repicadas em placas YMA sólido tendo azul de bromotimol como indicador para averiguar sua capacidade de acidificação. O meio de cultura utilizado apresentava glicose para crescimento rápido e manitol para crescimento lento (Hungria, 1994).

Atividade amilolítica.

Para verificação da atividade de produção de amilase, todos os isolados foram inoculados em meio sólido C.P (Peixoto *et al.*, 2003) suplementado com 1% amido, com pH inicial 6,8. A identificação da atividade amilolítica foi realizada após um período de 2 a 3 dias incubados a 30°C. Para a visualização dos resultados foi adicionado solução de iodo sobre as colônias já desenvolvidas para que possível visualizar a presença ou não do halo.

Teste de Solubilização de Fosfato.

A capacidade de solubilização de fosfato insolúvel foi testada em meio de cultura GL sólido (Oliveira *et al.*, 2003). As bactérias foram riscadas nesse meio de forma circular. O diâmetro do halo de solubilização foi observado como uma área translúcida em torno da colônia após sete dias de incubação.

## RESULTADOS

Após a purificação consegui - se obter 56 isolados dentre estes, 75% (4 dias) e 25% de crescimento lento (6 dias).

Os resultados demonstraram que, 39,28 % das colônias apresentaram a pigmentação rosa, 8,92 % amarelas, 42,85 % laranja e 5,35 % com pigmentação branca.

Foi observado que, 76,78 % dos 56 dos estipes isolados apresentaram consistência seca e 23,21 % destacaram consistências viscosas. Em relação ao tamanho das colônias, 68,28 % se caracterizou de tamanho grande, 28,57 % médio e 7,14 % tamanho pequeno.

Quanto ao teste de acidificação, solubilização de fosfato e amilase, dentre 56 estipes testados resultou - se em: 41 estipes apresentaram capacidade de acidificar o meio de cultura, 14 emitiram capacidade de produção de enzima amilolítica e 1 estipe produziu enzima fosfatase.

Os resultados apresentados evidenciaram que o uso de meio de cultura YMA glicose selecionou maior diversidade de colônias bacterianas, em relação ao meio YMA manitol. De

acordo com Hungria, meios contendo glicose como fontes de carbono selecionam bactérias de crescimento rápido (até 3 dias) e com manitol bactérias de crescimento lento (até 7).

A caracterização fisiológica das colônias submetidas ao teste de acidificação foi estabelecida observando a pigmentação do meio de cultura. Por meio de observações foi evidenciado que colônias que alteraram o pH do meio de cultura deixaram - no ácido reagindo e modificando a coloração inicial de verde para amarelo.

Após o teste de acidificação foi possível observar que um grande número de estipes apresentava capacidade de acidificar o meio de cultura, este fator esteve presente em 73,21% das colônias submetidas ao teste.

Esta capacidade de acidificar o meio de cultura pode estar relacionada com o pH do solo onde os nódulos destas bactérias foram coletados, que por motivo de adaptação possuem este desempenho (Moreira & Siqueira, 2002). Sendo assim em maioria estes organismos estariam adaptados a habitar solo com pH ácido.

Foi observado que a viscosidade é uma característica de isolados tanto lentos como rápidos, apresentando variações intrínsecas, como por exemplo, pouca, média e muita elasticidade do muco produzido (Hungria 1994). Segundo Coutinho *et al.*, (2005), sugeriram que a produção de muco pode representar um mecanismo envolvido no processo de adaptação e sobrevivência dos rizóbios, em diferentes condições edafó - climáticas.

As caracterizações morfológicas destas bactérias podem ser explicadas ressaltando características que as mais diferenciavam uma das outras, analisando sua forma, tamanho, consistência e pigmentação. Estas características estiveram presentes nestas colônias avaliadas, ocorrendo em maior o menor grau de proporções. Foi possível atribuir varias características as estas variedades de colônias, em relação à forma destacou desde cúpula, cônica ou achatada, podem apresentar tamanhos variados, desde pequeno, médio ou grande, em questão a consistência podem ser encontradas colônias com consistência viscosas ou secas.

Dentre os isolados submetidos à atividade de solubilização de fosfato, foi apresentado um baixo numero de colônias bacterianas que produziram enzima fosfatase, dentre as 56 isoladas, apenas 1 colônia apresentou resultados positivos.

A capacidade de produção de enzima amilase esteve presente em 25% das colônias submetidas ao teste, os resultados só foram possíveis ser analisados por meio de uma tintura de iodo. Estas colônias após a adição do iodo destacaram uma zona meio azulada, indicando a atividade amilolítica (Buzzini & Martini. 2002).

Há relatos de atividade amilase em outras diazotróficas como o trabalho de Oliveira *et al.*, . 2003, que observou a produção de amilase por rizóbios tendo a farinha da pupunha como substrato, registrou 19 isolados com atividade amilolítica em meio YMA modificado. Oliveira *et al.*, (2003) sugerem uma possível participação de algumas glicosidases, como as amilases, no estabelecimento intracelular da simbiose leguminosa versus rizóbio.

## CONCLUSÃO

Isolou - se um número razoável de estipes a partir de apenas uma espécie de planta, podendo se dizer que a diversidade da comunidade microbiota da região é bem diversificada.

Em geral os isolados a partir do *Desmodium* spp não apresentaram eficiência em produzir enzima fosfatase.

O pH do solo da região de origem destes nódulos bacterianos, pode estar ligado à capacidade destes microrganismos acidificarem o meio de cultura.

Em relação ao tempo de crescimento destas bactérias em meio de cultura YMA manitol, foi observado que ocorreram alguns casos em que a colônia não se desenvolveu, constatando características de desenvolvimento rápido nestas colônias.

A atividade amilolítica de alguns isolados pode permitir o estabelecimento da simbiose planta/bactéria nessas plantas. Pode se concluir que as bactérias que apresentaram capacidade de acidificar um substrato, e produzir enzimas amilase e fosfatase estão mais aptos a se desenvolverem em seu ambiente de origem (Pantanal).

Estas bactérias se apresentaram em grande escala de variedades, pode se concluir que estas além de apresentar uma simbiose com as leguminosas da região, estão relacionadas ao equilíbrio ecológico como o pH do solo.

As bactérias que se apresentaram eficiente na solubilização de fosfato podem suprir a necessidade da assimilação de fosfato apresentadas por plantas.

Conclui se que bactérias provenientes de solo alcalino possuem capacidade de acidificar um substrato.

Agradecimentos;

A professora Dr<sup>a</sup>. Marivaine da Silva Brasil, pela sua plausível colaboração e disposição nas orientações laboratoriais.

Aos colegas de estágio (EMBRAPA E UFMS) que se dispuseram nas atividades de campo.

A UFMS, pelo laboratório na realização do trabalho.

## REFERÊNCIAS

- Allen, A.C.; Valls, J.F.M. 1987. **Recursos forrageiro Nativos do Pantanal Mato-Grossense**. Embrapa Cenargen. Brasília: Documentos 8. 339p.
- Buzzini, P.; Martini, A. 2002. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast - like strains isolated from tropical environments. **J. Appl. Microbiol** v. 93, p. 10120 - 1025.
- Coutinho, H.L.C., Oliveira, V.M., Manfio, G.P.; Rosado, A.S. **Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations**. Anais Academia Brasileira de Ciências 71: 491v.
- Espindola, J. A. A.; Guerra, J. G. M.; DE - Polli, H.; Almeida, D. L.; Abboud, A.C. S. 2005. **Adubação verde com leguminosas**. Embrapa Agrobiologia - Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica., 49p.: (Coleção saber).
- Hungria, M. 1994. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola/** Editores Mariângela Hungria, Ricardo S. Araújo; EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. Brasília: EMBRAPA - SPI., p. 52,54,55,56,57. (EMBRAPA - CNPAF, Documentos, 46).
- Moreira, M.F.S.; Siqueira, J.O. 2002. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 626.
- Sylvester - Bradley, R.; Askawa, N.; Latorraca, S.; Magalhães, F.M.M.; Oliveira, L.A.; Pereira, R.M. 1982. **Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia**. Acta Amazonica, Manaus. 12:12 - 22.
- Peixoto, S. C. Æ J. A. Jorge Æ H. F. Terenzi Æ M. L. T. M. Polizeli., 2003. **Rhizopus microsporus var. rhizopodiformis : a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases** Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- Vincent, J.M. 1970. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell., 164 p.