

Bactérias Associadas a Plantas do Bioma Caatinga: Fixação de Nitrogênio X Salinidade

Luana Lira-Cadete¹; Andreza Raquel Barbosa de Farias¹; Maria Camila da Silva Barros²; Andresa Priscila de Sousa Ramos³; Danubia Ramos Moreira de Lima³; Itamar Soares de Melo⁴; Júlia Kuklinsky-Sobral⁵

Resumo

A Caatinga é um bioma com alto grau de endemismo, típico do Semiárido do Nordeste brasileiro, e enfrenta problemas de salinidade, principalmente nas áreas com agricultura irrigada. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é o principal processo responsável pela entrada de nitrogênio de forma assimilável pelas plantas nos ecossistemas. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo selecionar bactérias fixadoras de nitrogênio, isoladas de plantas da Caatinga, e avaliar a influência da salinidade sobre esse processo. As bactérias foram inoculadas em meio semisólido NFB, livre de nitrogênio, e para avaliação da salinidade sobre a FBN foram inoculadas em NFB com o acréscimo de 0,01%; 0,1%; 1%; 2,5%; e 5% de NaCl. Foi observado que 65% das bactérias foram capazes de fixar nitrogênio in vitro, apresentando maior frequência entre as linhagens isoladas da raiz. A estimativa da distância entre o halo de crescimento e a superfície do meio apresentou diferenças entre as bactérias, podendo-se inferir diferenças de tolerância ao oxigênio. Quanto à influência da salinidade sobre a FBN, foi observado que a concentração de 5% inibiu a FBN em todas as linhagens avaliadas. Além disso, as bactérias apresentaram diferentes limites de tolerância quanto à capacidade de fixar nitrogênio in vitro.

Palavras-chave: bactérias diazotróficas, cloreto de sódio, Semiárido, rizobactérias.

Introdução

Apesar do nitrogênio (N_2) ser encontrado em grandes quantidades na atmosfera, essa forma não está disponível às plantas. Dentre os processos capazes de transformar N_2 em forma assimilável às plantas, está a fixação biológica de nitrogênio (FBN), que pode ser realizada por micro-organismos que possuem o complexo enzimático da nitrogenase (BODDEY et al., 2007).

A FBN transforma o nitrogênio atmosférico indisponível às plantas em formas amoniacais (NH_3), e contribui com o "input" de nitrogênio de forma significativa, mais que processos não biológicos (FERNADES-JUNIOR; REIS 2008). Dentre as bactérias que realizam a FBN existem aquelas que toleram elevados teores de sais

¹ Estudante de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG), Garanhuns, PE, luanalirac@gmail.com.

² Mestranda em Produção Agrícola, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG), Garanhuns, PE.

³ Mestranda em Ciências do Solo, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG), Garanhuns, PE.

⁴ Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

⁵ Professora Adjunta, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns, LGBM/UAG, Garanhuns, PE.

nos solos, ou seja, os micro-organismos halotolerantes. Essas bactérias se desenvolvem em meio contendo de 2% a 5% de sais, ou mais, e os micro-organismos halófitos (Archea) são os que requerem no mínimo 9% de sais, sendo dependentes de sal (SANTOS, 2010).

Sabe-se que a salinidade constitui um dos problemas a ser enfrentado, principalmente em áreas irrigadas do Semiárido, pela alta taxa de evaporação e consequente concentração de sais que, dependendo da densidade, podem interferir no desenvolvimento vegetal (SOUSA et al., 2000).

Segundo Sousa et al. (2000), o problema da salinização do solo é mais frequente em áreas de clima seco quente, resultando em altas taxas de evapotranspiração, condições que caracterizam muitas áreas do Nordeste brasileiro, em terras cobertas pela Caatinga, e em especial no Semiárido, onde se encontra grande área de cultivo com a utilização da irrigação.

Santos (2010) relata que os isolados bacterianos nativos que expressem a capacidade de fixação de nitrogênio são potenciais candidatos a promover o crescimento vegetal, e a utilização desses micro-organismos para melhorar o uso de solos de áreas afetadas pela salinidade, podem, portanto, contribuir para o desenvolvimento agrícola e remediação dessas áreas. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo selecionar bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de plantas da Caatinga e avaliar a influência da salinidade sobre esse processo.

Diversos trabalhos têm apresentado a tolerância de crescimento a altas concentrações de sal por bactérias associadas às plantas (NÓBREGA et al., 2004; MEDEIROS et al., 2007), mas pouco se tem relatado sobre a influência da salinidade em relação às características expressas por bactérias, como a fixação de nitrogênio.

Material e Métodos

As bactérias utilizadas foram isoladas da raiz e rizosfera de plantas da Caatinga, de cinco famílias botânicas Anacardiaceae (*Myracrodruon urundeuva*), Apocynaceae (*Aspidosperma pyriformium*), Caesalpinaceae (*Caesalpinia pyramidalis*), Cobretaceae (espécie vegetal não identificada) e Rhamnaceae (*Ziziphus joazeiro*), em meio de cultura acrescido de 5% de NaCl, sendo pertencentes à coleção de culturas microbianas do Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UAG/UFRPE).

Para a seleção de bactérias capazes de fixar nitrogênio in vitro, as linhagens bacterianas foram inoculadas em meio semissólido NFb, livre de nitrogênio (DÖBEREINER et al., 1995), incubadas a 28 °C durante 8 dias, por duas vezes consecutivas. A formação de um halo de crescimento bacteriano de cor clara dentro do meio foi utilizada como indicativo da fixação biológica. Para avaliar se estas linhagens demonstravam diferenças quanto ao comportamento em meio NFb, mediu-se a distância do halo à superfície do meio, e as bactérias classificadas em três grupos: G1 (Halo ≤ 0,3 cm); G2 (0,3 < Halo ≤ 0,49 cm); e G3 (Halo ≥ 0,5 cm).

Para a avaliação da salinidade sobre o processo de FBN in vitro foi realizado o mesmo processo acima descrito para algumas bactérias identificadas como diazotróficas. Contudo, houve o acréscimo de diferentes concentrações de NaCl ao meio NFb: 0,01%; 0,1%; 1%; 2,5%; e 5%.

Resultados e Discussão

Foram avaliadas 129 linhagens bacterianas isoladas da raiz e rizosfera de plantas da Caatinga. Destas, 65% apresentaram a capacidade de fixar nitrogênio *in vitro*. Considerando-se o nicho das quais as bactérias foram isoladas, foi possível observar que a raiz (endofiticamente) apresentou maior frequência de bactérias diazotróficas (58%) em relação às bactérias isoladas da rizosfera (55,7%). As bactérias endofíticas, em vários casos avaliados, podem iniciar sua interação com a planta hospedeira por meio da colonização da rizosfera e penetram no interior do vegetal por meio dos espaços intercelulares formados durante o crescimento da raiz ou na emissão de raízes secundárias (COMPANT et al., 2009). Segundo Oliveira et al. (2003), a capacidade de colonização desses micro-organismos, em tecidos endofíticos, apresenta-se relacionada a diversos fatores, sendo o principal a interação com o genótipo do vegetal e do micro-organismo. Assim, por ter uma relação mais específica com a planta hospedeira, é esperado que se encontre com maior frequência bactérias fixadoras de nitrogênio nas raízes.

Teixeira (1997) afirma que a concentração de oxigênio é desfavorável à atividade da nitrogenase, complexo enzimático responsável pela fixação biológica de nitrogênio. Logo, a medição da distância do halo de crescimento bacteriano em relação à superfície do meio, foi realizada, neste trabalho, para classificar as bactérias quanto à capacidade de suportar diferentes tensões de oxigênio, uma vez que o meio utilizado no experimento foi um meio de cultura semissólido, podendo se verificar diferenças fenotípicas na capacidade de fixar nitrogênio. Foi observada maior frequência de linhagens classificadas como G2 ($0,3 < \text{Halo} \leq 0,49$ cm), oriundas dos dois nichos avaliados, mostrando que as bactérias associadas a plantas da Caatinga podem fixar nitrogênio sob diferentes tensões de oxigênio (Figura 1).

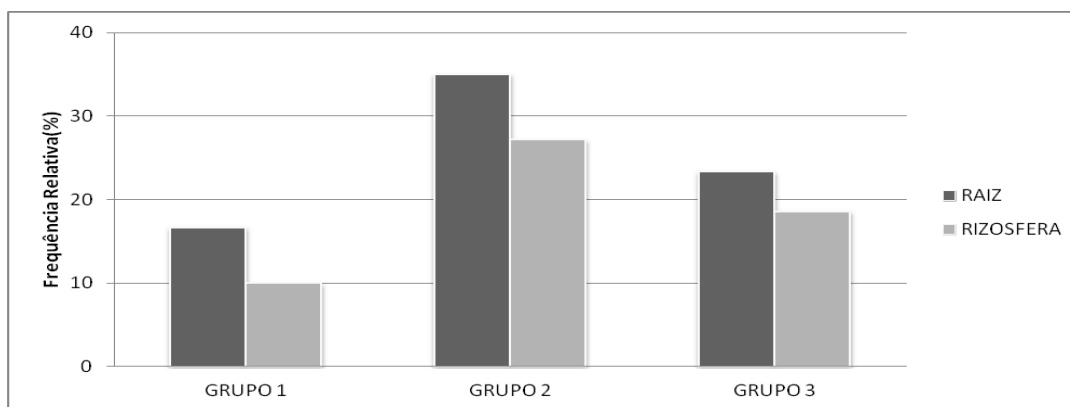


Figura 1. Frequência relativa (%) de bactérias fixadoras de nitrogênio, isoladas da raiz e rizosfera de plantas da Caatinga, segundo a profundidade do halo de crescimento em relação à superfície do meio de cultura. Classificadas em grupos: G1 ($\text{Halo} \leq 0,3$ cm); G2 ($0,3 < \text{Halo} \leq 0,49$ cm), e G3 ($\text{H} \geq 0,5$ cm).

Quanto à influência da salinidade sobre a capacidade de fixação de nitrogênio *in vitro*, foram avaliadas seis linhagens bacterianas em diferentes concentrações de NaCl. Foi observado que nenhuma das bactérias foi capaz de fixar nitrogênio na presença de 5% de NaCl, *in vitro*. Além disso, três bactérias foram capazes de fixar nitrogênio em meio com 2,5% de sal e as outras três bactérias foram menos tolerantes, sendo capazes de fixar nitrogênio apenas até a concentração de 1% de NaCl (Tabela 1), revelando que bactérias

associadas a plantas da Caatinga capazes de fixar nitrogênio in vitro, apresentam diferentes limites de tolerância na expressão desta característica.

Tabela 1. Bactérias fixadoras de nitrogênio, isoladas da raiz e rizosfera de plantas da Caatinga, em meio de cultura NFb com diferentes concentrações de NaCl. (+: crescimento; -: não crescimento).

NaCl (%)	UAGCa2	UAGCa3	UAGCa7	UAGCa17	UAGCa51	UAGCa104
0,01	+	+	+	+	+	+
0,1	+	+	+	+	+	+
1,0	+	+	+	+	+	+
2,5	-	-	+	-	+	+
5,0	-	-	-	-	-	-

Conclusões

Bactérias associadas a plantas da Caatinga apresentam a capacidade de fixar nitrogênio in vitro.

Altas concentrações de NaCl influencia negativamente a capacidade de fixação de nitrogênio in vitro por bactérias diazotróficas associadas a plantas da Caatinga.

Agradecimentos

Às agências de fomento CNPq e FACEPE pelo apoio financeiro e à toda a equipe que faz o Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana da UAG/UFRPE.

Referências

BODDEY, L. H.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. **A avaliação da fixação biológica de N₂ associada a leguminosas e não-leguminosas utilizando a técnica da redução do acetileno**: história, teoria e prática. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. Seropédica, 2007. 43 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 245). Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/622536>>. Acesso em: 20 jul. 2011.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. P. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology & Biochemistry**, [New York], v. 42, n. 5, p. 669-678, 2009.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Itaguaí: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60 p.

FERNANDES-JÚNIOR, P. I.; REIS, V. M. **Algumas limitações à fixação biológica de nitrogênio em leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 33 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 252). Disponível em: <<http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/doc252.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2011.

MEDEIROS, E. V., SILVA, K. J. P.; MARTINS, C. M.; BORGES, W. L. Tolerância de bactérias fixadoras de nitrogênio provenientes de municípios do Rio Grande do Norte à temperatura e salinidade. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, João Pessoa, v. 7, n. 2, p.160-168, 2007.

NÓBREGA, R. S. A.; MOTTA, J. S.; LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. S. Tolerância de bactérias diazotróficas simbiotes à salinidade. **Revista Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, p. 899-905, 2004.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. **Processos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 40 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161). Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/624875>>. Acesso em: 23 set. 2011.

SANTOS, K. C. F. **Atividade biológica e bioprospecção de bactérias associadas a *Atriplex nummularia* em solos sódico no Agreste de Pernambuco**. 2010. 65 f. Dissertação (Mestrado Ciência do Solo) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SOUSA, L. C.; QUEIROZ, J. E., GHEYI, H. R. Variabilidade espacial da salinidade de um solo aluvial no Semiárido paraibano. **Revista Brasileira de Engenharia Ambiental**, Campina Grande, v. 4, p.35-40, 2000.

TEIXEIRA, K.R. dos S. **Bases moleculares e genética da fixação de nitrogênio**. Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1997. 26 p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 32).