

## Caracterização fenotípica de bactérias isoladas de nódulos de angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan) em solos do Semiárido<sup>(1)</sup>

**Kelly Alexandra Souza Menezes<sup>(2)</sup>; Gersika Fakirra de Oliveira Nunes<sup>(2)</sup>; Aline Araujo Sampaio<sup>(2)</sup>; Aleksandro Ferreira da Silva<sup>(3)</sup>; Lindete Míria Vieira Martins<sup>(4)</sup>; Paulo Ivan Fernandes Junior<sup>(5)</sup>**

<sup>(1)</sup> Parte da dissertação de mestrado da primeira autora desenvolvida no Programa de Pós-graduação em Horticultura Irrigada - Universidade do Estado da Bahia (UNEB);

<sup>(2)</sup> Mestranda do Programa de Pós-graduação em Horticultura Irrigada; Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (DTCS); Universidade do Estado da Bahia (UNEB). Av. Edgard Chastinet, s/n, São Geraldo, Juazeiro, BA, CEP 48900-000. E-mail: [kelly\\_alexandra@hotmail.com](mailto:kelly_alexandra@hotmail.com); <sup>(3)</sup> Engenheiro Agrônomo formado pelo DTCS/UNEB; <sup>(4)</sup> Adjunta do DTCS/UNEB; <sup>(5)</sup> Pesquisador A, Embrapa Semiárido, BR 428, Km 152, Petrolina, PE.

**RESUMO:** A caracterização fenotípica tem sido a primeira abordagem utilizada para a avaliação da diversidade de bactérias fixadoras de N. Esse trabalho tem como objetivo caracterizar fenotipicamente os isolados oriundos de nódulos de angico (*Anadenanthera colubrina*), cultivada em diferentes amostras de solos do Semiárido. O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação, em blocos ao acaso com três repetições. Aos 120 dias após a emergência das plantas, os nódulos foram coletados e as bactérias isoladas e analisadas quanto às características culturais em meio YMA. Foram obtidos 19 isolados tendo, a maioria, apresentado hábito de crescimento rápido (58%), capacidade de acidificar o meio de cultura (47%) e produção de muito muco (84%). Os isolados foram agrupados pelo método UPGMA, baseado no coeficiente de Jaccard. Foram obtidos 13 grupos distintos em um coeficiente de similaridade de 100%. Das estirpes referência utilizadas, apenas a BR3407 (*Burkholderia sabiae*) apresentou 100% de similaridade com apenas um dos isolados, indicando haver bactérias distintas nodulando angico. O conhecimento sobre as bactérias que nodulam angico em regiões semiáridas, pode revelar associações eficientes na fixação de nitrogênio e no estabelecimento dessa leguminosa em áreas degradadas.

**Termos de indexação:** FBN, Fabaceae, Caatinga.

### INTRODUÇÃO

O Semiárido é caracterizado pela escassez e irregularidade de chuvas, elevadas temperaturas (Queiroz, 2009) e por apresentar uma vegetação heterogênea e adaptada às condições de aridez, denominada Caatinga (Silva et al., 2010). Devido a essas características, parte da população regional está diretamente vinculada a atividades voltadas a sistemas agro-silvi-pastoris, que juntamente com os fatores climáticos tem levado a uma rápida degradação ambiental, tornando essa região uma das mais ameaçadas do Brasil (Silva et al., 2010; Sá

et al., 2010). Para mitigar esses efeitos e recuperar as áreas já depauperadas, é necessária a busca por novos métodos, dentre os quais a utilização de plantas da família das leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio.

A família Fabaceae (Leguminosae) é uma das mais diversas e abundantes entre as famílias das plantas. Sua classificação reconhece três subfamílias: Mimosoideae, Faboideae (Papilionoideae) e Caesalpinioideae e apresenta aproximadamente 18.000 espécies em cerca de 650 gêneros (Souza & Lorenzi, 2008), sendo na Caatinga encontrado cerca de 86 gêneros e mais de 320 espécies (Queiroz, 2009).

Uma das espécies nativas da Caatinga é o angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan), arbórea de porte médio comumente utilizada para alimentação de animais e também na medicina popular (Maia, 2012). Esta leguminosa apresenta capacidade de formar nódulos em simbiose com rizóbios.

Para o levantamento de informações da diversidade de rizóbios e seleção de estirpes eficientes na fixação biológica de nitrogênio, a caracterização fenotípica tem sido o primeiro método utilizado para uma primeira classificação de estirpes desconhecidas (Wolde-Meskel et al., 2004), envolvendo diversas avaliações culturais e morfológicas, que contribuem para sua identificação e agrupamento.

Estudos da diversidade de rizóbios associadas a espécies autóctones da Caatinga ainda são muito escassos. Estes estudos podem promover o conhecimento ecológico e taxonômico de rizóbios de regiões semiáridas, bem como fornecer bactérias eficientes na fixação de nitrogênio para espécies de leguminosas nativas, possibilitando, assim, a recuperação dessas áreas.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a caracterização fenotípica de bactérias isoladas de nódulos de angico, cultivadas em amostras de diferentes solos do Semiárido.

## MATERIAL E MÉTODOS

Amostras do horizonte superficial (0-20 cm) do solo de três áreas foram coletadas no Semiárido, sendo uma de área preservada e duas de áreas consideradas degradadas cujas características estão descritas na tabela 1. As amostras foram destorroadas, peneiradas e distribuídas em vasos de poliestireno com capacidade de 500 mL.

Para a obtenção dos nódulos foi conduzido um experimento em condições de casa de vegetação localizado no Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (DTCS), pertencente à Universidade do Estado da Bahia – UNEB, em Juazeiro-BA.

Antes do plantio, a dormência das sementes de angico foi superada por meio de hidratação em água fria por 2 horas e, em seguida, desinfestadas superficialmente com etanol comercial (30 segundos), hipoclorito de sódio a 2% (5 minutos) e dez lavagens com água destilada estéril (ADE) (Vincent, 1970). Foram semeadas seis sementes por vaso e 20 dias após a emergência (DAE) estas foram desbastadas, deixando-se apenas duas plantas por vaso. Na condução do ensaio, foi efetuada irrigação conforme necessário. A coleta foi realizada aos 120 DAE, procedendo-se a lavagem das raízes com água corrente. Os nódulos foram destacados, contados e armazenados em recipientes contendo sílica gel, para o subsequente isolamento das bactérias.

Para o isolamento, 30% do número de nódulos coletados em cada parcela foram escolhidos aleatoriamente. Inicialmente os nódulos foram reidratados por 40 minutos em ADE e desinfestados superficialmente em álcool etílico 70% por 30 segundos, e posteriormente em hipoclorito de sódio a 2% por 5 minutos, seguido de oito lavagens em ADE (Vincent, 1970).

Após a desinfestação, com o auxílio de uma pinça, os nódulos foram macerados sobre placas de Petri contendo meio de cultura YMA com adição de vermelho Congo (Vincent, 1970) como indicador, sendo posteriormente incubadas em estufa tipo BOD por 10 dias a 28°C. Após o crescimento, as bactérias foram repicadas para placas de Petri contendo meio YMA com azul de bromotimol como indicador, até a obtenção de colônias puras. Com as culturas puras foi realizada a caracterização cultural dos isolados avaliando a alteração do pH, o tempo de crescimento, cor da colônia e tipo e produção de muco.

*Bradyrhizobium elkanii* (BR5609), *Rhizobium tropici* (BR322) e *Burkholderia sabiae* (BR3407) foram utilizados como estirpes de referência.

Para a captura dos isolados o delineamento utilizado foi em blocos ao acaso com três repetições,

onde cada tratamento corresponde a um solo. Os dados da caracterização cultural foram transformados em uma matriz binária a partir da qual foi construído um dendograma de similaridade, utilizando o método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard. O dendograma foi gerado com o programa PaSt (Hammer et al., 2001).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos nódulos coletados no experimento, foram obtidos 19 isolados bacterianos de angico que foram caracterizados culturalmente.

Na coleção, os isolados em relação ao tempo de crescimento foram 58% rápidas, seguido de 26% de intermediárias e 16% de lentas. Quanto a alteração de pH 47% acidificaram, 11% alcalinizaram e 42% não alteraram o meio de cultura. Em relação à quantidade de muco 84% e 16% produziram muito e pouco muco, respectivamente.

Quando comparados o tempo de crescimento dos isolados em relação aos solos de origem, observa-se que as bactérias pertencentes aos solos 1 e 2 apresentaram maior percentual de crescimento rápido (75%). Enquanto que no solo 3, 71% apresentaram hábito de crescimento lento. A análise da alteração do pH do meio de cultura, mostrou que os isolados dos solos 1 e 2 apresentaram 50% de reação ácida e neutra, não apresentando reação alcalina, enquanto que no solo 3, 28% dos isolados alcalinizaram o meio de cultura. Com relação à produção de muco, os isolados em cada solo apresentaram maior quantidade de muco, se destacando nos solos 2 (88%) e 3 (86%).

De acordo com os agrupamentos com base nas características avaliadas (tempo de crescimento, alteração de pH, quantidade e tipo de muco e cor da colônia) observou-se que 13 grupos distintos foram formados em um coeficiente de similaridade de 100% para o angico (Figura 1). A maioria dos grupos foram formados por um ou dois isolados com exceção do grupo 3, que foi o mais abundante, com seis isolados. Este grupo tem como características rápido crescimento, acidificação do meio de cultura, produção de muito muco, colônias de cor creme e muco do tipo viscoso. As estirpes de referência BR5609 (*Bradyrhizobium elkanii*) e BR322 (*Rhizobium tropici*) não formaram grupos com os isolados de angico, pertencendo aos grupos isolados 4 e 11, respectivamente. A estirpe BR3407 (*Burkholderia sabiae*) se enquadrou no grupo 6 com apenas um isolado de angico. Como pode ser observado, grande parte dos isolados não formaram grupos com as estirpes referência, indicando haver isolados ainda não conhecidos nodulando angico.

A característica de rápido crescimento pode ser considerada como uma estratégia de sobrevivência

destas bactérias, por serem mais tolerantes a ambientes secos e crescerem mais rápido em um curto espaço de tempo úmido (Santos et al., 2007).

Bactérias de crescimento rápido nodulando leguminosas arbóreas são relatadas na literatura. Shetta et al. (2011) ao analisarem as características de crescimento de isolados de leguminosas arbóreas crescendo na região de Riyadh, Arabia Saudita, observaram que todos os isolados foram de crescimento rápido. Bala et al. (2003), em trabalho realizado em solos de regiões tropicais da África, Ásia e América Latina, examinaram a nodulação de quatro espécies agroflorestais de leguminosas e verificaram que todos as leguminosas hospedeiras utilizadas no ensaio foram noduladas apenas por rizóbios de rápido crescimento.

Estudos avaliando o tempo de crescimento, o pH do meio de cultura e produção de muco de rizóbios nativos da região da Caatinga associada com *Cratylia mollis*, *Mimosa tenuiflora* e *Calliandra depauperata*, mostraram que a maioria foram de crescimento rápido, não modificaram o pH e tiveram alta produção de muco (Teixeira et al., 2010). Por outro lado, também há relatos de rizóbios tanto de crescimento rápido quanto de crescimento lento nodulando leguminosas em regiões áridas (Gehlot et al., 2012).

Esse estudo é a base inicial para o conhecimento de estirpes de rizóbios nodulando o angico (*Anadenanthera colubrina*) no Semiárido brasileiro. No entanto, estudos de eficiência simbiótica desses isolados serão necessários para avaliar o potencial dessa coleção para a FBN.

## CONCLUSÕES

Verificou-se que o angico (*Anadenanthera colubrina*) é predominantemente nodulado por bactérias com características de crescimento rápido, pH ácido e produção de muito muco.

Os isolados de angico se mostraram fenotipicamente distintos das estirpes BR5609 e BR322.

## AGRADECIMENTOS

A UNEB, Embrapa Semiárido, BNB e CAPES pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

BALA, A.; MURPHY, P.J.; OSUNDE, A.O.; GILLER, K.E. Nodulation of tree legumes and the ecology of their native rhizobial populations in tropical soils. *Applied Soil Ecology*, 22: 211-223, 2003.

GEHLOT, H. S.; PANWAR, D.; TAK, N.; TAK, A.; SANKHLA, I. S.; POONAR, N.; PARIHAR, R.; SHEKHAWAT, N. S.; KUMAR, M.; TIWARI, R.; ARDLEY, J.; JAMES, E. K.; SPRENT, J. I. Nodulation of legumes from the Thar desert of India and molecular characterization of their rhizobia. *Plant and Soil*, 2012. 17p.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and data Analysis. *Paleontologia Eletrônica*, 2001. 4 n.p.

MAIA, G. N. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. Fortaleza: Printcola Gráfica e Editora, 2012. 413p.

QUEIROZ, L.P. Leguminosas da Caatinga. Feira de Santana, UEFB, 2009. 443p.

SÁ, I. B.; CUNHA, T. J. F.; ANGELOTTI, F.; DRUMOND, M. A. Processos de desertificação no semiárido brasileiro. In: SÁ, I. B.; SILVA, P. C. G. (Ed.). *Semiárido brasileiro: pesquisa, desenvolvimento e inovação*. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. p. 126-158.

SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. F. 2007. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 2: 249-256, 2007.

SHETTA, N. D.; AL-SHAHARANI, T. S.; ABDEL-AAL, M. Identification and Characterization of Rhizobium Associated with Woody Legume Trees Grown under Saudi Arabia Condition. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 10: 410-418, 2011.

SILVA, P. C. G.; MOURA, M. S. B. de; KILL, L. H. P.; BRITO, L. T. de L.; PEREIRA, L. A.; SA, I. B.; CORREIA, R. C.; TEIXEIRA, A. H. de C.; CUNHA, T. J. F.; GUIMARÃES FILHO, C. Caracterização do Semiárido brasileiro: fatores naturais e humanos. In: SÁ, I. B.; SILVA, P. C. G. (Ed.). *Semiárido brasileiro: pesquisa, desenvolvimento e inovação*. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. p. 18-48.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2ª ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 704p.

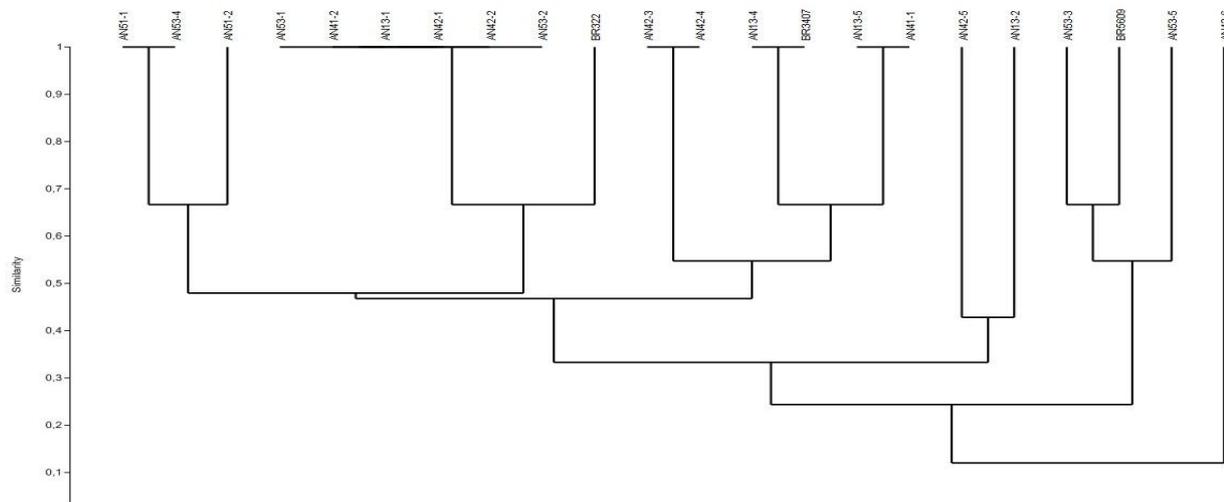
TEIXEIRA, F. C. P.; BORGES, W. L.; XAVIER, G. R.; RUMJAMEK, N. G. Characterization of indigenous rhizobia from Caatinga. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41: 201-208, 2010.

VINCENT, J.M. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1970. 164p. (IBP Handbook, 15).

WOLDE-MESKEL, E.; BERG, T.; PETERS, N. K.; FROSTEGÅRD, Å. Nodulation status of native woody legumes and phenotypic characteristics of associated rhizobia in soils of southern Ethiopia. *Biology and Fertility of Soils*, 40: 55-66, 2004.

**Tabela 1.** Localização e caracterização das áreas onde foram coletadas as amostras de solo.

Solo	Localização	Município	Área	Descrição da área
(1) Argissolo	40° 25'06 "W 9 ° 35'38" S	Juazeiro- BA	Fazenda São Pedro. Distrito de Carnaíba do sertão	Área muito degradada com vegetação escassa e solo nu. Cobertura vegetal predominante: Umburana de cheiro, Caatingueira e Umbuzeiro.
(2) Vertissolo	40° 25'27 "W 9 ° 26'40" S	Juazeiro- BA	IRPAA - Instituto Regional da Pequena Agropecuária Apropriada	Área antropizada, onde há uma densa plantação de algaroba ( <i>Prosopis juliflora</i> ).
(3) Vertissolo	40° 21'32 "W 9 ° 43'46" S	Juazeiro- BA	Área Reserva Legal- Distrito de Juremal (CODEVASF- Companhia do Desenvolvimento do Vale do São Francisco)	Área preservada. Reserva com uma alta diversidade de cactos, árvores e arbustos. Cobertura vegetal predominante: Catingueira, Pinhão, Coroa de frade e Xique-xique.



**Figura 1:** Dendrograma de similaridade com base em características culturais dos 19 isolados de bactérias oriundos de nódulos de angico (*Anadenanthera colubrina*) em solos do Semiárido. Dendrograma gerado a partir da matriz de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard. Agrupamento realizado utilizando o algoritmo UPGMA, programa PaSt.