

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DE REGIÃO SEMIÁRIDA

Valéria Maria Araújo Silva¹; Karoline Alves Ramos²; Claudia Miranda Martins³; Suzana Cláudia Silveira Martins³

¹Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal do Ceará – UFC, mariavaleria@yahoo.com.br. ²Estudante do Curso de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Ceará – UFC, karolinea.ramos@gmail.com. ³Professora Doutora do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, UFC, Fortaleza, CE, claudia.miranda.martins@gmail.com. ³Professora Doutora do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, UFC, Fortaleza, CE, suzana220@gmail.com.

1 - INTRODUÇÃO

Regiões semiáridas apresentam características climáticas particulares que definem grande parte de sua estrutura física, química e biológica. Apresentando precipitações pluviométricas baixas (250 e 500 mm) e irregulares, a região semiárida do nordeste brasileiro também evidencia elevadas temperaturas e solos rasos com pouca drenagem superficial (CIRILO, 2008). Estes fatores contribuem para existência de solos pouco resistentes e com baixa produção de fitomassa (MAIA *et al.*, 2006).

Os solos constituem um ambiente heterogêneo que abriga a maior biodiversidade do planeta (HINSINGER *et al.*, 2009). Composto essa diversidade de organismos e desempenhando funções de grande relevância encontram-se as bactérias. Esses micro-organismos apresentam importante variedade metabólica responsável pela ciclagem de elementos necessários (C, N, P), além de estabelecerem interações associativas benéficas que contribuem na incorporação desses elementos na cadeia alimentar, afetando dessa forma na estrutura e nas funções ecossistêmicas dos solos (VINHAL-FREITAS *et al.*, 2010; AISLABIE & DESLIPE, 2013).

Dentre estes micro-organismos, destacam-se as bactérias diazotróficas como os rizóbios, que podem estar livres no solo ou associadas a raízes de plantas (SABINO *et al.*, 2012) realizando a fixação biológica de nitrogênio atmosférico. A interação rizóbio-leguminosa é responsável por suplementar de 80 a 90% do total de nitrogênio requerido pela planta (KUMARI *et al.*, 2010) sendo de suma importância para o desenvolvimento vegetal. Nesse processo, os rizóbios necessitam de enzimas hidrolíticas capazes de degradar componentes da parede celular das células vegetais, promovendo assim, a infecção radicular, processo comumente referido como nodulação (OLIVEIRA *et al.*, 2006; KUMARI *et al.*, 2010).

As enzimas microbianas presentes no solo, provenientes do seu catabolismo extracelular, favorecem processos importantes de ciclagem de nutrientes, além de atuarem no controle do ciclo global de carbono (MAKOI; NDAKIDEMI, 2008; SINSABAUGH; SHAH, 2012), constituindo-se elementos importantes para manutenção dos seres vivos em ambientes com condições restritivas, como o de locais semiáridos.

Assim sendo, a presença de enzimas hidrolíticas no solo, secretadas pela atividade extracelular de sua microbiota, se torna crucial para processos ecológicos fundamentais como a incorporação de nitrogênio nos seres vivos, assim como, a disponibilização de compostos orgânicos necessários para recuperação da bioenergia dos sistemas naturais (VINHAL-FREITAS *et al.*, 2010). Nesse sentido, torna-se relevante analisar a atividade enzimática de alguns grupos microbianos, como os rizóbios, de modo a compreender sua contribuição na degradação de compostos orgânicos abundantes no solo como amido e celulose, uma vez que esses polissacarídeos são estruturalmente complexos e de elevada contribuição energética, sendo relevantes para ambientes semiáridos que apresentam baixa disponibilidade de nutrientes e condições abióticas limitantes (KAVAMURA *et al.*, 2013).

Neste contexto, o presente trabalho objetivou quantificar a atividade enzimática de rizóbios isolados da região rizosférica de leguminosas do Parque Nacional de Ubajara-Ce, quanto a produção de enzimas amilolíticas e celulolíticas.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

As 26 cepas de rizóbios analisadas no presente estudo foram isoladas de amostras de solo rizosférico de leguminosas do Parque Nacional de Ubajara (PNU), uma unidade de conservação federal de proteção integral localizada no planalto da Ibiapaba, região norte do Estado do Ceará a 320 km de Fortaleza (ICMBio, 2016).

A atividade amilolítica e celulolítica das 26 cepas de rizóbios (LAMAB-83, LAMAB-84, LAMAB-85, LAMAB-86, LAMAB-87, LAMAB-89, LAMAB-90, LAMAB-91, LAMAB-92, LAMAB-93, LAMAB-94, LAMAB-95, LAMAB-96, LAMAB-97, LAMAB-98, LAMAB-99, LAMAB-100, LAMAB-101, LAMAB-102, LAMAB-103, LAMAB-104, LAMAB-105, LAMAB-107, LAMAB-108, LAMAB-109 e LAMAB-110) foi avaliada através da inoculação das cepas na forma de spot e em quadruplicata em meio de cultivo ágar-amido (ALARIYA *et al.*, 2013) e meio ágar suplementado com carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1977).

Para mensurar a atividade enzimática de cada cepa foi utilizada a seguinte equação: IE (Índice Enzimático) = D_h (diâmetro do halo de hidrólise)/ D_c (Diâmetro da colônia) (CHARBONNEAU *et al.*, 2012). O IE foi medido em milímetros utilizando-se um paquímetro digital.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando a versão ASSISTAT 7.7 BETA (SILVA; AZEVEDO, 2009). O conjunto de dados de cada atividade foi submetido ao teste de normalidade Shapiro-Wilk a 5% de probabilidade. Os dados que não seguiram uma distribuição normal foram avaliados pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis. O teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade foi aplicado para comparar as médias dos IEs de cada cepa de rizóbio.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Atividade Amilolítica

A presença de regiões amareladas ao redor das colônias foi considerada como indicativo da hidrólise de amido pelas cepas de rizóbios avaliadas no presente estudo, como exemplificado na figura 1 para as cepas LAMAB-94 (A) e LAMAB-101 (B).

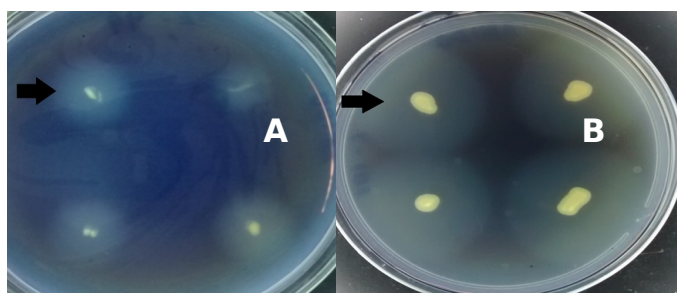


Figura 1 – Indicação da presença de halos de hidrólise de amido nas cepas de rizóbios LAMAB-94 (A) e LAMAB-101 (B).

Das 26 cepas avaliadas, aproximadamente 66% (17) demonstraram síntese de enzimas amilolíticas, enquanto que um percentual também significativo de 34% (9) não exibiu atividade para a referida enzima (LAMAB-84, LAMAB-86, LAMAB-91, LAMAB-93, LAMAB-98, LAMAB-99, LAMAB-100 e LAMAB-107). A análise estatística demonstrou que houve variação

significativa entre os índices enzimáticos apresentados ($p < 0,05$), sendo que as cepas LAMAB-95 e LAMAB-101, apresentaram as maiores variações com relação as demais cepas, exibindo IEs de 3,77 e 4,98, respectivamente (Figura 2).

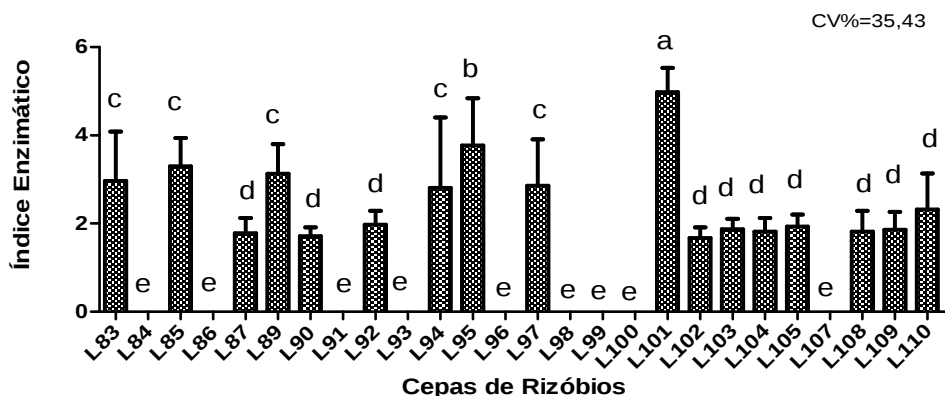


Figura 2 – Índice amilolítico de cepas de rizóbios isoladas de solo rizosférico de leguminosas do Parque Nacional de Ubajara – CE. Os valores representam a média de duas repetições \pm desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra entre as cepas de rizóbios não diferem significativamente pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Esses resultados evidenciam o potencial enzimático desse grupo bacteriano na síntese de amilases, assim como demonstrado por Fernandes Jr. *et al.* (2012) que ao avaliarem a produção de enzimas amilolíticas por 27 cepas de rizóbios isolados de raízes de plantas de feijão-guandu (*Cajanus cajan*), constatou que todas as cepas foram produtoras de amilases, mas que apenas quatro apresentaram alta capacidade amilolítica com IEs variando entre 1,5 e 4,0. Já Oliveira *et al.* (2006) ao observarem a produção de hidrólise de amido em 67 cepas de rizóbios da Amazônia Central, verificou que apenas 22 cepas (32%) foram amilase positiva. Kumari *et al.* (2010) ao analisarem aspectos de nodulação em cinco espécies de *Indigofera* pertencentes a família *Fabaceae*, verificou que apenas uma cepa de rizóbio, das cinco avaliadas, foi capaz de expressar síntese amilolítica.

Acredita-se que algumas enzimas como uréases, proteases, amilases e gelatinases sejam importantes no processo de nodulação realizado pelos rizóbios (KUMARI *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2007), dessa forma a presença dessas enzimas extracelulares produzidas pela população microbiana dos solos (KAVAMURA *et al.*, 2013) são fundamentais na incorporação biológica de nitrogênio. No entanto, vale ressaltar que assim como identificado no presente trabalho e observado na corrente literatura sobre o assunto, a síntese de amilase pelas cepas de rizóbios não foi significativa, uma vez que a maioria das cepas produtoras de amilase apresentaram $1,5 \leq IE < 2$, sendo indicadas como moderadamente produtoras de enzimas amilolíticas conforme classificação sugerida por Silva *et al.* (2015).

As amilases são amplamente produzidas por fungos e bactérias (DEVI *et al.*, 2010), sendo que a maioria dos estudos que avaliam a capacidade de síntese dessas enzimas ocorrem com bactérias do gênero *Bacillus* (OLIVEIRA *et al.*, 2007; DEVI *et al.*, 2010). De acordo com Freitas *et al.* (2014), alguns fatores podem influenciar a síntese de amilases por micro-organismos, dentre os quais são citados o tipo de substrato e fatores físico-químicos, esses fatores somados as condições particulares de ambientes semiáridos podem interferir na produção de amilases por rizóbios, afetando não apenas na disponibilização de nutrientes, assim como também intervindo na assimilação de nitrogênio pelos seres vivos.

3.2 - Atividade Celulolítica

(83) 3322.3222

contato@conidis.com.br

www.conidis.com.br

Quanto a capacidade de hidrolisar compostos celulolíticos, as cepas de rizóbios do presente estudo apresentaram potencial reduzido na síntese de celulases, apenas cerca de 12% (LAMAB-84, LAMAB-91 e LAMAB-96) das cepas de rizóbios foram produtoras de celulases. Dentre as cepas produtoras de celulase os IEs apresentaram pouca variação, sendo que estes valores variaram apenas de 1,78 para cepa LAMAB-84 a 1,66 para LAMAB-96 (Figura 3).

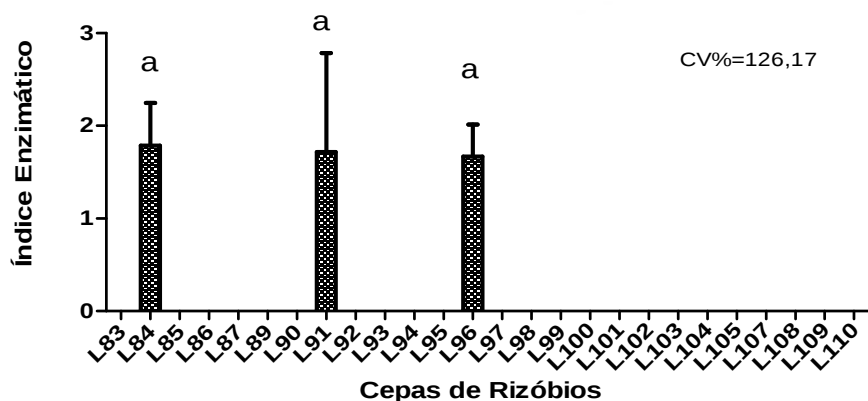


Figura 3 – Índice celulolítico de cepas de rizóbios isoladas de solo rizosférico de leguminosas do Parque Nacional de Ubajara – CE. Os valores representam a média de duas repetições \pm desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra entre as cepas de rizóbios não diferem significativamente pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

As celulases possuem papel muito importante na ciclagem global do polímero de maior abundância, a celulose (MAKOI; NDAKIDEMI, 2008), no entanto sabe-se que atividade celulolítica é bastante complexa e que micro-organismos como bactérias, fungos e actinomicetos são capazes da bioconversão desse polissacarídeo (SHAIKH *et al.*, 2013).

Entretanto, poucos estudos indicam a presença de atividade enzimática por rizóbios, especialmente quanto a capacidade de síntese de enzimas hidrolíticas capazes de solubilizar substratos celulolíticos (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Como verificado pelo presente trabalho as cepas de rizóbios não demonstraram perfil celulolítico significativo, haja vista que cerca de 88% (23) das cepas não foram produtoras de celulase. Resultados similares foram reportados por Oliveira *et al.* (2006) ao analisarem a atividade enzimática de cepas de rizóbios nativas da Amazônia Central, no qual foi constatado que de 67 cepas, apenas seis (9%) exibiram a produção de celulases.

Embora a atividade celulolítica não seja expressiva para cepas de rizóbios, Robledo *et al.* (2012) afirmam que a presença de enzimas celulolíticas auxilia na quebra da parede celular das células das raízes e facilita o processo de nodulação dos rizóbios. Dessa forma, a ineficiência na produção dessas enzimas pode comprometer o processo de fixação de nitrogênio e inviabilizar a permanência dessas populações microbianas em solos semiáridos, uma vez que a produção desses compostos enzimáticos pelas referidas cepas parece ser limitada.

Diversos estudos demonstram potencial celulolítico de outros grupos microbianos em regiões semiáridas, como fungos e actinobactérias (LUZ *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2015), o que sugere que embora o potencial celulolítico das cepas de rizóbios do presente estudo não tenha sido significativo, a presença no solo de outras populações microbianas capazes de solubilizar eficientemente compostos celulósicos pode contribuir na manutenção das cepas de rizóbios em ambientes semiáridos, uma vez que a atividade microbiana é muito importante para os processos biológicos e bioquímicos do solo influenciando diretamente a transformação de nutrientes e auxiliando na manutenção da diversidade da microbiota local (VINHAL-FREITAS *et al.*, 2010).

4 - CONCLUSÃO

As cepas de rizóbios isoladas de leguminosas do Parque Nacional de Ubajara-Ce, apresentaram moderado potencial enzimático para produção de amilases, enquanto que foram pouco expressivas na síntese de celulases.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AISLABIE, J.; DESLIPPE, J. R. Soil microbes and their contribution to soil services. **Ecosystem services in New Zealand: conditions and trends**, p. 143-161, 2013.

ALARIYA, S. S.; SETHI, S.; GUPTA, S.; GUPTA, B. L. Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil. **Archives of Applied Science Research**, v.5, p.15-24, 2013.

CIRILO, J. A. Public water resources policy for the semi-arid region. **Estudos Avançados**, v.22, n.63, p.61-82, 2008.

CHARBONNEAU, D. M.; MEDDEB-MOUELHI, F.; BOISSINOT, M.; SIROIS, M.; BEAUREGARD, M. Identification of thermophilic bacterial strains producing thermotolerant hydrolytic enzymes from manure compost, **Indian Journal Microbiology**, v. 52, n.1, p.41-47, 2012.

DEVI, L. S.; KHAUND, P.; JOSHI, R. S. Thermostable α -amylase from natural variants of *Bacillus* spp. prevalent in eastern Himalayan Range. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n.23, p. 2534-2542, 2010.

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; LIMA, A. A.; PASSOS, S. R.; GAVA, C. A. T.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Phenotypic diversity and amylolytic activity of fast growing rhizobia from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. **Brazilian Journal of Microbiology**, p.1604-1612, 2012.

FREITAS, L. S.; MARTINS, E. S.; FERREIRA, O. E. Produção e caracterização parcial de α -amilase de *Syncephalastrum racemosum*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 12, n. 4, p. 226-232, 2014.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect cellulase activity of microorganisms. **Journal of General Microbiology**, v. 98, p. 109-115, 1977.

HINSINGER, P.; BENGOUGH, A. G.; VETTERLEIN, D.; YOUNG, I. M. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. **Plant Soil**, v. 321, p.117-152, 2009.

ICMBio. **Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade Parque Nacional de Ubajara**, 2016. <http://www.icmbio.gov.br/parnaubajara/quem-somos.html>. Acesso: 06 jan. 2016.

KAVAMURA, V. N.; SANTOS, S. N.; SILVA, J. L.; PARMA, M. M.; ÁVILA, L. A.; VISCONTI, A.; ZUCCHI, T. D.; TAKETANI, R. G.; ANDREOTE, F. D.; MELO, I. S. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v. 168, p.183-191, 2013.

KUMARI, B. S.; RAM, M. R.; MALLAIAH, K. V. Studies on nodulation, biochemical analysis and protein profiles of *Rhizobium* isolated from *Indigofera* species. **Malaysian Journal of Microbiology**, v.6, p.133-139, 2010.

LUZ, J. S.; SILVA, R. L. O.; SILVEIRA, E. B.; CALVALCANTE, U. M. T. Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo. **Revista Caatinga**, v.19, n.2, p.128-134, 2006.

MAIA, S. M. F.; XAVIER, F. A. S.; OLIVEIRA, T. S.; MENDONÇA, E. S.; ARAÚJO FILHO, J. A. Impactos de sistemas agroflorestais e convencional sobre a qualidade do solo no semi-árido cearense. **Revista Árvore**, v. 30, p.837-848, 2006.

MAKOI, J. J. R.; NDAKIDEMI, P. A. Selected soil enzymes: Examples of their potential roles in the ecosystem. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n.3, p. 181-191, 2008.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central, Amazonas, Brasil. **Ciência, Tecnologia e Alimentos**, v. 26, p. 853-860, 2006.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JÚNIOR, A. F. Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. **Ciência, Tecnologia e Alimentos**, v. 27, n.1, p. 61-66, 2007.

ROBLEDO, M.; RIVERA, L.; JIMENEZ-ZURDO, J. I.; RIVAS, R.; DAZZO, F.; VELAZQUEZ, E.; MARTINEZ-MOLINA, E.; HIRSCH, A. M.; MATEOS, P. F. Role of *Rhizobium* endoglucanase CelC2 in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n.125, p. 1-12, 2012.

SABINO, D. C. C.; FERREIRA, J. S.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, V. L. D. Bactérias diazotróficas como promotoras do desenvolvimento inicial de plântulas de arroz. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8. N. 15, p. 2337-2345, 2012.

SHAIKH, N. M.; PATEL, A. A.; METHA, S. A.; PATEL, N.D. Isolation and screening of cellulolytic bacteria inhabiting different environment and optimization of cellulase production. **Universal Journal of Environmental Research and Technology**, v. 3, p. 39-49, 2013.

SILVA, F. A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In:WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2009.

SILVA, V. M. A.; BRITO, F. A. E.; RAMOS, K. A.; SILVA, R. M.; MARTINS, C. M.; MARTINS, S. C. S. Atividade de Actinobactérias do Semiárido. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v.8, n. especial, p.560-572, 2015.

SINSABAUGH, R. L.; SHAH, J. J. F. Ecoenzymatic Stoichiometry and Ecological Theory. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 43, p.313–343, 2012.



VINHAL-FREITAS, I. C.; WANGEN, D. R. B.; FERREIRA, A. S.; CORRÊA, G. F.; WENDLING, B. Microbial and enzymatic activity in soil after organic composting. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p.757-764, 2010.