

Diversidade Morfológica de Rizobactérias Obtidas de Solos Sob Distintos Manejos de Cultivo da Região Oeste do Paraná¹

Deisi Navroski², Thaís Luft da Silva³, Anderson Jose Scherer⁴, Renan José Casarotto Appel⁴, Amanda Favetta², Marco Antonio Bacellar Barreiros⁵, Luciana Grange⁶.

¹Aceito para publicação no 2º Trimestre de 2015

²Graduanda em Agronomia – Universidade Federal do Paraná. deisnavroski@gmail.com, favetta.amanda@gmail.com

³Graduada em Tecnologia em Biotecnologia pela Universidade Federal do Paraná. luft.thais@gmail.com

⁴Graduandos em Tecnologia em Biotecnologia pela Universidade Federal do Paraná. ander.j.scherer@gmail.com, renanappel@gmail.com

⁵Professor da Universidade Federal do Paraná – DBC - Setor Palotina. marcob_07@yahoo.com.br

⁶Professora da Universidade Federal do Paraná – DCA - Setor Palotina. lucianagrange@gmail.com

Resumo

As bactérias diazotróficas encontradas na rizosfera apresentam características fenotípicas distintas e mutáveis dependendo do meio ambiente em que estão inseridas. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo isolar e caracterizar a morfologia de colônias de bactérias presentes em amostras de solo coletadas de diferentes manejos de cultivo da região oeste do estado do Paraná. Os manejos contemplados para o estudo foram Sistema Agropastoril

(M1), Horticultura (M2), Pastagem (M3), Soja 1 (M4), Mata nativa (M5) e Soja 2 (M6). As amostras de solo foram analisadas em laboratório diluindo-as em solução salina 0,85% até a diluição de trabalho 10^{-3} a qual foi plaqueada em meio de cultura sólido. Após três dias de crescimento em B.O.D á 27°C as colônias foram classificadas morfológicamente de acordo com o protocolo estabelecido por Fonseca et al. (2000). Os dados processados após a classificação revela que foram obtidos 136 isolados bacterianos, que foram selecionados para a construção dos agrupamentos obtendo o total de 29 grandes grupos (GG), sendo o manejo M5 (mata nativa) o que teve um maior número de representantes.

Palavras-chave: rizosfera, biodiversidade, RPCP.

MORPHOLOGICAL DIVERSITY OF RHIZOBACTERIA OBTAINED FROM SOILS UNDER DIFFERENT CULTIVATION MANAGEMENT IN THE WESTERN PARANÁ

Abstract

The diazotrophic bacteria found in the rhizosphere show phenotypic characteristics different and changeable depending on the environment in which they are inserted. In this context, the present work aims to isolate and characterize the morphology of colonies of bacteria present in soil samples collected from different management cultivation in the Western region of Paraná State. The management comprised in this study were Agricultural System (M1), Horticulture (M2), pasture (M3), soybeans 1 (M4), native forest (M5) and soy 2 (M6). The soil samples were analyzed in the laboratory by diluting them in 0.85% saline solution to the working dilution of 10^{-3} , which was inoculated in solid culture medium. After three days of growth in a B.O.D incubator at 27°C , colonies were classified morphologically according to the protocol established by Fonseca et al. (2000). The processed data after the classification shows that it were obtained 136 bacterial isolates, which were selected for the construction of the clusters, resulting in the total of 29 large groups (GG), being the M5 management (native forest) which showed the highest number of representatives.

Introdução

O solo é um recurso natural vital para o funcionamento e regulação do ecossistema terrestre, representando um balanço entre os fatores físicos, químicos e biológicos. Uma pequena amostra de solo apresenta um número extraordinário de microhabitats, e a variação de elementos físico-químicos, como temperatura, umidade e nutrientes dentro de cada um desses microhabitats aumenta ainda mais a diversidade de nichos disponíveis para as populações microbianas (ROESCH et al., 2007).

As bactérias são o grupo mais importante de micro-organismos do solo, no qual, em condições favoráveis, atingem números elevados de representantes (DOBBELAERE *et al.*, 2003). A rizosfera é considerada o maior ecossistema da Terra (BUCHENAUER, 1998; BOTTFNER et al., 1999), é a zona do solo ao redor da raiz que se encontra sob influência imediata do sistema radicular. Nesta exígua camada de solo, rica em nutrientes, devido ao acúmulo de uma variedade de compostos orgânicos liberados pelas raízes é que encontram-se as bactérias diazotróficas, ou RPCP (no inglês PGPR - Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Este grupo de bactérias apresenta ampla diversidade, o que garante não só a resiliência dos processos que estes micro-organismos de solo mediam em um determinado ecossistema como, por exemplo, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) mas também a ocorrência destes nos mais diferentes habitats terrestres conferindo-lhes alta capacidade de adaptabilidade fenotípica e genética (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

As características fenotípicas de um determinado micro-organismo não são estáveis, sofrendo alterações dependendo do meio ambiente, podendo haver diferenças em cada meio de cultivo (HUNGRIA e SILVA, 2011). Porém, ainda assim, a caracterização morfológica de colônias bacterianas para a avaliação de diversidade serve como um complemento importante para as análises genéticas, uma vez que possibilita a construção de agrupamentos de indivíduos morfológicamente semelhantes. Portanto, a seleção de representantes dos grupos permitirá nas etapas posteriores de caracterização, trabalhar com um número menor de isolado (FONSECA et

al. 2000). Na análise morfológica se estuda as mais diversas características do micro-organismo, para o caso de bactérias caracteriza-se a morfologia das colônias de acordo com seu tamanho, forma, coloração dentre outros parâmetros.

Portanto o presente estudo teve como objetivo isolar e caracterizar morfológicamente as colônias bacterianas a fim de avaliar a diversidade morfológica nos diferentes manejos. Além disso, espera-se selecionar *clusters* para posterior análises moleculares.

Materiais e métodos

Coleta de solos: Para a coleta dos solos, selecionou-se 6 diferentes áreas identificadas com a letra “M” seguida de um número, cada qual composta por um manejo distinto, dos quais 5 correspondem a áreas agricultáveis e um representando a área mata nativa. Os manejos foram identificados como: Sistema Agropastoril (M1), Horticultura (M2), Pastagem (M3), cultivo sob revolvimento mínimo do solo (M4), Mata nativa (M5) e plantio convencional (M6).

Os solos foram coletados em quatro repetições diferentes, com auxílio de um trado holandês, em uma profundidade aproximada entre 10 e 20 cm, local do solo que concentra a maior parte do sistema radicular ativo e maior atividade microbiana (ANDRADE e HAMAKAWA, 1994).

Cada área de coleta foi dividida em cinco transeptos paralelos, denominados como transepto A, B, C, D e E, traçados diagonalmente de acordo com o declive e direção do curso de água, homogeneidade do terreno, fertilidade do solo, derivação de agroquímicos, entre outros. Levou-se em consideração o efeito bordadura, desconsiderando-se, portanto, uma borda de aproximadamente 50 metros na transição entre lavoura-mata ciliar e mata ciliar-rio (FIGURA 1)(NEIVERTH, 2012).

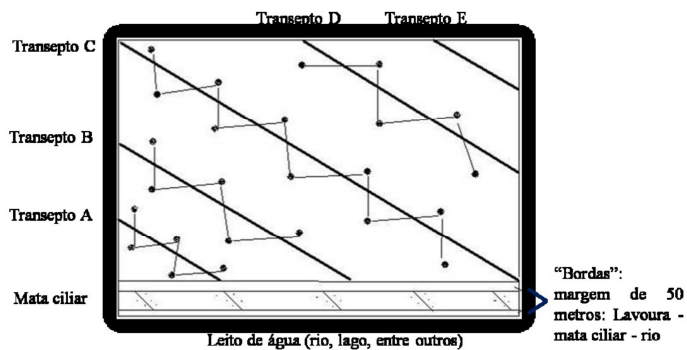


FIGURA 2. Distribuição estatística dos pontos de coleta de solo referentes às sub-amostras por repetição em relação à gleba (tipo de manejo), utilizados para obtenção dos isolados.

Os transeptos passaram a ser denominados de repetições (repetição 1, 2, 3, 4), sendo cada uma constituída por cinco sub-amostras. Estas foram coletadas a partir de uma linha imaginária em “zigue-zague” traçada sobre o transecto, promovendo uma maior homogeneidade dentro da repetição. Após a coleta das cinco sub-amostras por repetição, estas foram homogeneizadas, separando uma amostra deste solo, devidamente etiquetado e mantido em gelo durante a coleta (BUCKLAND *et al.*, 2001).

Juntamente com a coleta dos solos foi realizado um levantamento das áreas de coleta, as quais apresentam o seguinte histórico (QUADRO 1).

Quadro 1: Descrição do histórico das áreas de coleta de solos.

	Manejo	Local	Descrição
M1	Soja 1	Palotina	Plantio direto sob palha de milho desde 2008, com cultivo principal de soja para grão sucedido por milho na época seca.
M2	Horticultura	Toledo	Área cultivada com olerícolas Adubação exclusivamente orgânica (esterco de galinha). 4 anos de implantação
M3	Pastagem	M.C.Rondon	Pastagem plantada de Tifton de longo uso, sob pastejo rotacionado de gado leiteiro em regime extensivo e aplicações de resíduos de suinocultura.
M4	Sistema Agropastoril	Francisco Alves	Área com plantio de soja na safra e milho safrinha. Entressafra inverno/verão alocação de bovinos para corte densidade 4,95 ~5animais/ha (dependendo da palhada de milho disponível) . Sistema implantado á 3 anos.
M5	Mata nativa	Parque São Camilo – Palotina	Floresta Estacional Semidecidual, apresenta estágios intermediários de sucessão vegetal.
M6	Soja 2	Margarida – M.C.Rondon	Plantio convencional de longa duração com uso de grade pesada, arado, desde ano de 1970 com cultivo de soja em sucessão com milho.

Obtenção das colônias isoladas: As análises das amostras de solo foram realizadas no laboratório de Química e Fertilidade da Universidade Federal do Paraná- Setor Palotina no período de agosto a dezembro de 2014. Pesou-se 10 gramas de solo de cada repetição dos diferentes manejos de cultivo e diluídas em 90 mL de solução salina 0,85% em frascos contendo pérolas de vidro, previamente autoclavados, obtendo dessa forma uma diluição 10-1 Os frascos foram mantidos em um agitador mecânico horizontal por 30 minutos. A partir daí, uma chamada diluição seriada foi realizada, transferindo-se 1 mL da diluição 90ml+solo para um novo frasco contendo 9 mLde solução salina 0,85% proporcionando a diluição de 10-2, segundo Vincent (1970). Da diluição 10-2 retirou-se 1ml que foi transferido para um novo frasco contendo 9 mLde solução salina 0,85% proporcionando a diluição de 10-3. Em seguida 100µl da diluição 10-3 foi plaqueado em duplicata em meio de cultura Digs sólido com pH ajustado para 6,5 e incubado por

72 horas em estufa a 27°C. Este meio é composto 2,0 g de glicose; 2,0 g de ácido málico; 1,5 g de peptona bacteriológica; 2,0 g de extrato de levedura; 0,5 g de K₂HPO₄; 0,5g MgSO₄.7H₂O; 1,5 g de ácido glutâmico e seu volume ajustado para um litro. Adicionou-se 13g de ágar bacteriológico e depois foi autoclavado a 120°C por 20 minutos.

Caracterização morfológica de colônias: O crescimento bacteriano foi avaliado pelo método de Unidades Formadoras de Colônias (u. f. c.), em que a quantificação é dada pela contagem do número de células viáveis presentes em uma suspensão. O método em placas tem como princípio que cada colônia surgida é originária de uma única célula viável e leva em consideração a diluição e inoculação realizadas corretamente (HUNGRIA e ARAÚJO, 1994).

Para a classificação morfológica das colônias bacterianas usou-se o protocolo estabelecido por Fonseca *et al.* (2000), sendo considerados os seguintes aspectos: tamanho (>2 mm, 1-2mm, puntiforme), forma (circular ou irregular), borda (lisa ou ondulada), homogeneidade (homogênea ou heterogênea), cor (amarelo, amarelo claro, amarelo esverdeado, amarelo forte, creme e branco), transparência (transparente ou opaca), elevação (presença ou ausência), muco (pouco, médio e muito) e tempo de crescimento dos isolados.

O agrupamento dos isolados quanto às características morfológicas foi gerado a partir do programa Past (Paleontological Statistics) (Hammer *et al.*, 2001), pelo uso do algoritmo Ward e cálculo da Distância Euclidiana. Para a análise de agrupamento e obtenção dos clusters foi utilizado o coeficiente de similaridade de Pearson e para a construção do dendograma foi escolhido o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*).

Resultados e discussão

Foram obtidos 136 isolados bacterianos a partir dos solos sob diferentes manejos de cultivo (M). Estes foram agrupados por similaridade morfológica resultando em um total de 29 grupos (G), conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos isolados provenientes de áreas sob diferentes manejos, segundo a classificação em grupos (G) da tipagem obtida pela análise das características morfológicas segundo Fonseca et al. (2000).

Grupos	Manejos de Cultivo						TOTAL
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	
G1	2	1	0	0	2	2	7
G2	0	1	1	2	1	1	6
G3	0	1	1	0	1	0	3
G4	0	0	1	0	0	1	2
G5	1	0	3	2	1	0	7
G6	0	2	1	0	0	0	3
G7	0	1	2	0	0	1	4
G8	1	2	2	0	4	2	11
G9	3	4	1	2	1	0	11
G10	0	0	0	2	2	1	5
G11	1	0	0	2	0	0	3
G12	0	0	2	1	2	0	5
G13	1	1	1	0	3	0	6
G14	0	1	4	1	0	0	6
G15	0	2	0	1	2	3	8
G16	1	1	0	1	1	1	5
G17	1	0	0	0	0	0	1
G18	1	0	0	1	0	0	2
G19	1	0	2	3	1	2	9
G20	0	0	0	0	1	1	2
G21	0	0	0	1	0	2	3
G22	4	0	0	1	1	1	7
G23	0	1	1	0	1	0	3
G24	2	0	2	2	0	2	8
G25	0	0	0	0	1	0	1
G26	0	0	0	1	1	1	3
G27	0	0	1	0	2	0	3
G28	0	0	1	0	0	0	1
G29	0	0	0	0	1	0	1
TOTAL	19	18	26	23	29	21	136

* Grupos obtidos a partir dos agrupamentos morfológicos, representados no ANEXO A. M1 – Sistema Agropastoril; M2 – Horticultura; M3 – Pastagem; M4 –Soja 1 ; M5 – Mata Nativa; M6 – Soja 2.

Destaca-se com maior número de unidades formadoras de colônias o manejo M5 (mata nativa) com 29 isolados e o manejo M3 (Pastagem) com 26 isolados. O terceiro maior número refere-se ao manejo M4 (Soja 1) com 23 isolados, seguido do manejo M6 (Soja 2) com 21 isolados. Já os manejos M1 (sistema agropastoril), M2 (horticultura), apresentaram o menor número de isolados com 19 e 18 isolados, respectivamente.

Em um agroecossistema a abundância microbiana sofre variações ao longo das estações do ano, havendo a cada estação a predominância de uma comunidade microbiana acompanhada de outras pouco abundantes (TORSVIK e ØVREAS, 2002). Tais variações estão relacionadas ao índice pluviométrico e ao clima da região, ao teor e à qualidade dos resíduos vegetais, à estrutura e aos manejos agrícolas adotados em cada agroecossistema (ROGERS e TATE III, 2001; TIEDJE et al., 2001), e a planta hospedeira presente (diferentes espécies, genótipos, estádios de desenvolvimento e exsudatos radiculares) (PICARD e BOSCO, 2008).

O maior número de isolados encontrados nas áreas de mata nativa (M5) e pastagem (M3) pode ser explicado sob dois pontos, o primeiro é que o M5 é um ambiente natural e a comunidade microbiana nestes apresenta-se estável durante as estações do ano, o segundo ponto é que em ambos os manejos havia a presença do vegetal de cobertura no momento da coleta das amostras de solo, pode ter proporcionado a liberação, pelas raízes, de diferentes exsudatos possibilitando a seleção de número maior de micro-organismos presentes na região rizosférica do solo, de onde as amostras foram retiradas (COELHO, 2006).

Outro ponto relevante converge no fato de nestas áreas (M5 e M3), o período de entressafra é muito curto, portanto a presença da planta permite a deposição de rejeitos vegetais constantemente no solo proporcionando uma maior manutenção da composição da serrapilheira, o que estimula a presença de uma série de micro-organismos envolvidos na formação da matéria orgânica e também nas relações associativas com vegetais (TIEDJE et al., 2001).

Os grandes grupos G8 e G9 ambos apresentaram maior número de representantes (11), com isolados advindos de todos os manejos, exceto o M4 (soja 1) e M6 (soja 2).

Conclusões

Pela tipagem morfológica foi possível estabelecer agrupamentos por similaridade entre as bactérias obtidas dos solos sob diferentes manejos de cultivo. Os resultados demonstraram a

ocorrência de uma alta diversidade nas áreas de coleta resultando em 29 grandes grupos quanto à caracterização morfológica.

Referências

ANDRADE, D. S.; HAMAKAWA, P. J. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (Eds). Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília: **EMBRAPA-SPI**, p.63-94, 1994.

BOTTNER, P.; PANSU, M.; SALLIH, Z. Modeling the Effect of Active Roots on Soil Organic Matter Turnover. **Plant Soil**, v. 216, p. 15-25, 1999.

BRINGHURST, R. M.; CARDON, Z. G.; GAGE, D. J. Galactosides in the rhizosphere: Utilization by *Sinorhizobium meliloti* and development of a biosensor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.98, n.8, p.4540-4545, 2001.

BUCHENAUER, H. Biological control of soilborne diseases by rhizobacteria. **Journal of Plant Disease and Protection**, v. 105, n. 4, p. 329-348, 1998.

BUCKLAND, S. T.; ANDERSON, D. R.; BURNHAM, K. P.; LAAKE, J. L.; BORCHERS, D. L.; THOMAS, L. Introduction to distance sampling-estimating abundance of biological populations. **Oxford University Press**. Oxford: 432 p., 2001.

COELHO, L. F. In: Interação de *Pseudomonas spp.* e de *Bacillus spp.* com diferentes rizosferas. **IAC – Instituto Agrônômico**. Campinas – SP. 2006.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.

FONSECA, M. C. C.; ZAGO, V. C. P.; FERREIRA, E. P. B.; CÂMARA, A. F. S.; RUMJANEK, N. G. Isolamento e caracterização morfológica de *Pseudomonas spp.* fluorescentes nativas em sistemas de produção agrícola. **Comunicado Técnico**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Agrobiologia. Seropédica, Rio de Janeiro: n.43, p. 1-4, 2000.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, 2001.

- HUNGRIA, M.; ARAUJO, R., S. (Ed.) Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola, Brasília: **EMBRAPA-CNPAF**, 542p., 1994.
- HUNGRIA, M.; SILVA, K. Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Rizóbios e Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal. Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2011.
- KUSS, A. V. **Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado**. Santa Maria, 2006, 109p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo), Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria, 2006.
- MOREIRA, F. M. S., SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**, 2^a ed. UFLA, Lavras, Brasil. 2006, 729 p.
- NEIVERTH, W. Diversidade morfológica e genética de rizobactérias endofíticas obtidas de solos de diferentes classes e manejos de cultivo. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 105 p., 2012.
- PICARD, C.; BOSCO, M. Genotypic and phenotypic diversity in populations of plantprobiotic *Pseudomonas* spp. colonizing roots. **Naturwissenschaften**, vol. 95, n.1, p.1-16, 2008.
- ROESCH, L.F.W.; FULTHORPE, R.R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A.K.M.; KENT, A.D.; DAROUB, S.H.; CAMARGO, F.A.O.; FARMERIE, W.G.; TRIPLETT, E.W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *International Society for Microbial Ecology*, v.1, p.283-290, 2007.
- ROGERS, B. F.; TATE III, R. L. Temporal analysis of the soil microbial community along a toposequence in Pineland soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, vol. 33, n. 10, p. 1389-1401, 2001.
- TIEDJE, J. M.; CHO, J. C.; MURRAY, A.; TREVES, D.; XIA, B.; AHOU, J. Soil teeming with life: new frontiers for soil science. In: REES, R. M.; BALL, B. C.; CAMPEBELL, C. D.; WATSON, C. A. (Org.). **Sustainable management of soil organic matter**. Wallingford: CAB International, p. 393-412, 2001.
- TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, vol. 5, n. 3, p. 240–245, 2002.

VINCENT, J.M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**, Oxford: Blackwell, 164p, 1970.