

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS ESTIRPES DE RIZÓBIOS DA COLEÇÃO DO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO DO INPA-CPCA

Milena Machado de HOLANDA¹; Luiz Augusto Gomes de SOUZA²

¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA milinhaholanda@hotmail.com; ²Orientador, INPA

1. Introdução

A simbiose entre bactérias do solo e espécies das Fabaceae (leguminosas) são o mecanismo mais evoluído para fixação biológica de N₂- FBN, com implicações no suprimento de nitrogênio nos agroecossistemas, contribuindo para aumento da produção agrícola. Na pesquisa básica conduzida para a agricultura sustentável, às coleções microbianas tem importância para o uso aplicado de inoculante, empregando microrganismos de interesse agrícola. O INPA possui uma coleção de rizóbios cuja eficiência agrônômica em leguminosas nativas vem sendo avaliada ao longo do tempo. Com o crescimento teórico da Agroecologia o uso de microrganismos úteis, podem ser um componente importante nos sistemas de produção, onde as leguminosas são selecionadas na combinação de espécies exploradas nas propriedades, reduzindo a dependência por recursos externos.

Os rizóbios são bactérias que ocorrem naturalmente nos solos e a associação entre a planta leguminosa hospedeira e a bactéria resulta na formação de nódulos radiculares, sítio onde ocorrem reações bioquímicas e fisiológicas que permitem a FBN. No Brasil, o melhor exemplo do sucesso dessa tecnologia biológica é o cultivo da soja inoculada com rizóbios, praticamente sem o emprego de fertilizantes nitrogenados. Dada a diversidade de espécies de Fabaceae, o que também inclui uma grande variedade de hábitos de crescimento, há ainda um interesse muito grande em expandir o emprego de inoculantes para outras espécies onde essa tecnologia não é explorada.

Relativo ao outro par simbiote, a taxonomia de Rhizobia tem sido acrescida de numerosos registros recentes, favorecidos por novas técnicas de biologia molecular, que permitem a classificação dos rizóbios em várias famílias de bactérias. Segundo Moreira (2008), os registros de gêneros e espécies de bactérias fixadoras de N₂ que nodulam Fabaceae são: na Família Rhizobiaceae os gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Allorhizobium*; na família Bradyrhizobiaceae, os gêneros *Bradyrhizobium* e *Blastobacter*; na família Xanthobacteraceae o gênero *Azorhizobium*; na família Hyphomicrobiaceae o gênero *Devosia*, na família Phyllobacteriaceae os gêneros *Phyllobacterium* e *Mezorhizobium*; na família Methylobacteriaceae, o gênero *Methylobacterium*; na família Brucellaceae o gênero *Ochrobactrum* e, finalmente, na família Burkholderiaceae os gêneros *Burkholderia* e *Ralstonia*. A existência de 13 gêneros de bactérias fixadoras de N₂, reconhecida em anos recentes sugere que este número ainda está em elevação, o que será comprovado por novas descrições originais.

Nos últimos anos a coleção de rizóbios do INPA tem aumentado com novos isolamentos de nódulos de leguminosas da Amazônia, demandando medidas de re-organização de suas informações, bem como a multiplicação de replicatas das estirpes com o propósito de assegurar sua preservação. O objetivo deste trabalho foi contribuir para a organização, manutenção, utilização, disponibilização de informações e preparo de inoculante microbiano para avaliação de sua eficiência em leguminosas.

2. Material e Métodos

A coleção de rizóbios do INPA é mantida no Laboratório de Microbiologia do Solo – LMS, em Manaus, AM. As estirpes incorporadas estão preservadas em tubos rosqueáveis com meio de cultura específico, dispostos em caixas de madeira compartimentadas, acondicionadas em armários de aço, a temperatura de (± 20°C), com seis replicatas. Na identificação dos tubos da coleção registra-se: o número da estirpe, o número do tubo e a data de estocagem do material puro.

Na avaliação inicial, foram descartados preliminarmente os tubos ressequidos ou contaminados e estes foram quantificados. Os tubos puros remanescentes foram incubados em placas de Petri para avaliação de sobrevivência, observação do grau de pureza e a descrição fenotípica das estirpes. Nas observações de viabilidade e pureza empregou-se o meio de cultura YMA, pH 6,0 sem corante (Vincent, 1970, adaptado). A composição do meio YMA é: 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 g de NaCl, 10,0 g de Manitol, 0,4 g de Extrato de Levedura, 0,4 g de KH_2PO_4 , 0,1 g de K_2HPO_4 e 15 g de agar. Após a combinação dos componentes, o pH é ajustado para 6,0, seguindo-se a autoclavagem por 20 min em pressão de 1,5 atm.

A observação após a incubação reportou-se ao grau de viabilidade de cada tubo. Para as estirpes que não tiverem o número teto de segurança de seis tubos viáveis, tubos estoques complementares foram preparados, estabelecendo-se o número mínimo de seis tubos. Nos trabalhos de monitoramento da viabilidade, a incubação foi procedida no escuro em temperatura ambiente de laboratório (23-26 °C) por 10-25 dias.

Para descrição das características fenotípicas das estirpes foram aplicados os descritores propostos por Somasegaran & Hoben, (1985). Para tanto, estas foram incubadas em meio de cultura YMA, pH 6,0 sem a adição de corante. Após o crescimento foi registrado o tempo de crescimento, forma e coloração das colônias, habilidade em modificar o pH do meio, produção de goma, tendência a coalescência, diâmetro máximo, elevação, bordadura, consistência e densidade ótica. A modificação de pH do meio de cultivo foi determinada em azul de bromotimol.

A ampliação das informações atuais disponíveis da coleção também incluiu o acréscimo de estirpes que foram isoladas nos últimos anos nos trabalhos do LMS. Na Figura 1, está ilustrado o processo de isolamento de rizóbios, e a forma de preservação dos tubos.

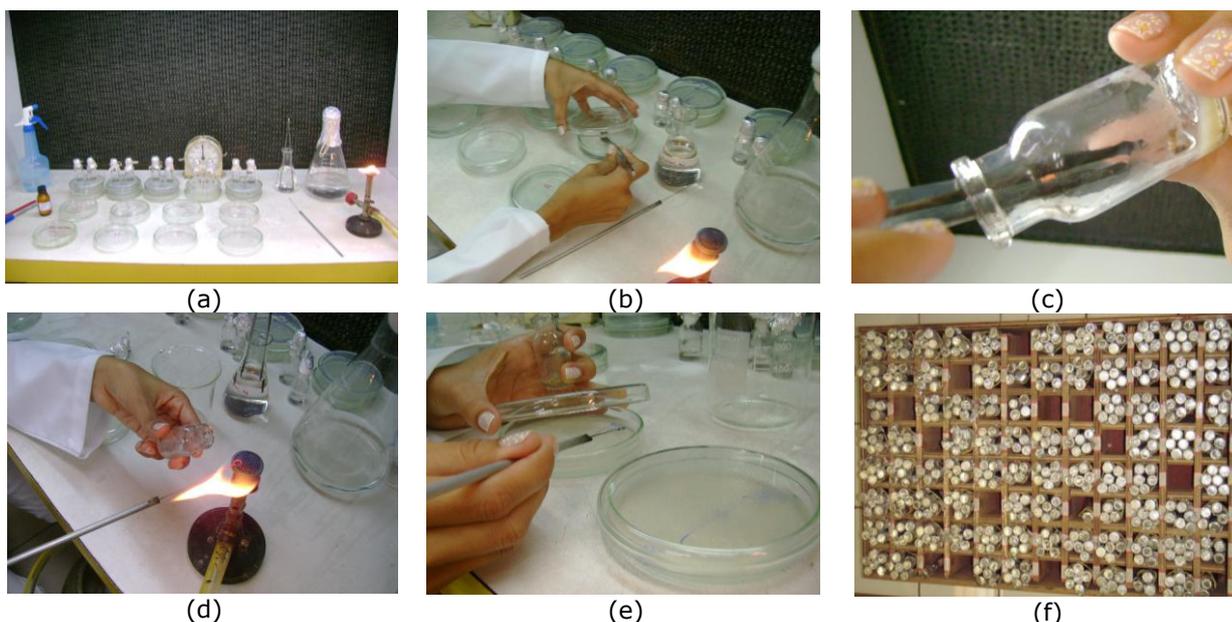


Figura 1 - Procedimentos para isolamento de rizóbios: (a) materiais utilizados; (b) lavagem dos nódulos em água destilada; (c) maceração do nódulo; (d) esterilização da alça; (e) riscagem da suspensão em placas de Petri; (f) preservação dos tubos da Coleção.

3. Resultados e Discussão

Nas atividades de manutenção da coleção foram analisadas 561 estirpes, e destas 130 foram perdidas. Para as demais foi providenciada a renovação dos tubos, para manter um número seguro de amostras. No total foram analisados 1878 tubos. Na Figura 2, estão reunidas informações sobre as atividades desenvolvidas para a manutenção da coleção.

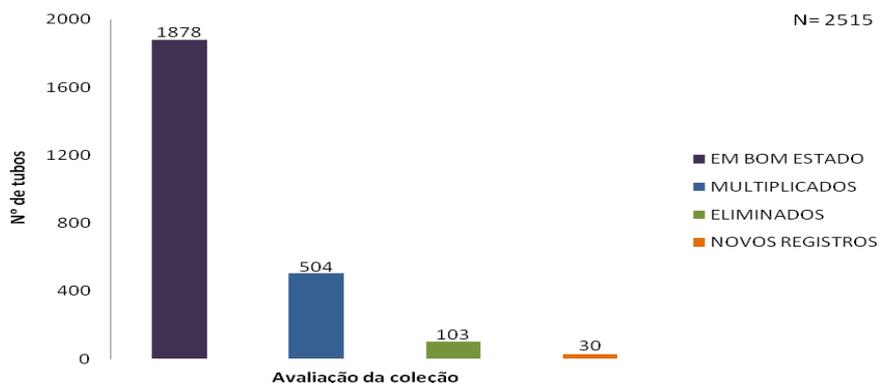


Figura 2 - Quantificação do número de tubos manipulados nas atividades de manutenção da Coleção de Rizóbios do INPA.

Nos trabalhos desenvolvidos, 30 novos registros foram adicionados a Coleção, provenientes de isolamentos efetuados de anos anteriores para nódulos obtidos das Fabaceae de São Gabriel da Cachoeira, AM. Atualmente a coleção abriga 430 estirpes de rizóbios, representativos de 76 espécies de leguminosas classificadas em 40 gêneros. A listagem completa dos registros disponíveis está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Identificação taxonômica da Fabaceae hospedeira, cujos nódulos deram origem as estirpes, e, dos registros das estirpes existentes na Coleção de Rizóbios do Laboratório de Microbiologia do Solo do INPA-CPCA.

Abrus pulchellus tenuiflorus (673), *Acacia mulpinnata* (563), *Acosmium nitens* (682, 683, 684, 685), *Acosmium tomentellum* (686, 687, 688, 689), *Albizia saman* (520, 541, 589, 590, 639, 640, 646), *Alysicarpus ovalifolium* (716, 717, 718, 719), *Anadenanthera peregrina* (690, 691, 692, 693, 694), *Andira inermis* (678), *Andira parviflora* (695), *Calopogonium mucunoides* (696, 697, 698, 699, 700, 701, 743), *Cedrelinga cateniformis* (643, 702, 703, 704, 705, 882, 892), *Centrolobium paraense* (632), *Centrosema* sp. (542, 572, 575, 611), *Centrosema triquetrum* (914, 915, 916), *Chamaecrista mimosoides* (619, 642, 654, 823, 824, 825, 826, 905), *Chamaecrista nictitans* (534, 603, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715), *Clathrotropis macrocarpa* (977, 978, 979, 980), *Clitoria fairchildiana* (938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 969), *Clitoria amazonum* (605, 606, 628, 650), *Clitoria falcata* (1010, 1011, 1012, 1013, 1014, 1015, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912), *Clitoria leptostachya* (747, 748, 749, 761, 762, 781, 782, 783, 785, 789, 1027, 1028, 1029, 1030, 1031, 1032, 1033), *Clitoria* sp. (521, 522), *Crotalaria micans* (997, 999, 1000, 1001, 1002, 1005, 1006, 1007, 1009), *Dalbergia inundata* (775, 776, 777), *Dalbergia nigra* (501, 503), *Dalbergia* sp. (549, 551, 568, 786, 787, 788), *Desmodium incanum* (515), *Desmodium scorpiurus* (1019, 1020, 1021, 1022, 1023, 1024, 1025, 1026), *Desmodium tortuosum* (1034, 1035, 1036, 1037, 1038, 1039, 1040, 1041), *Dioclea bicolor bicolor* (675), *Dioclea glabra* (964, 966, 967, 968, 970, 971, 972, 973, 818, 820, 821, 819, 816), *Dioclea guianensis* (742, 746, 750, 751, 752, 753, 754), *Dioclea* sp. (901, 895), *Diploctropis martiusii* (896, 902, 903, 904), *Entada polyphylla* (657, 658), *Enterolobium cyclocarpum* (617), *Enterolobium maximum* (600, 602), *Erythrina fusca* (887, 890, 894, 880), *Galactia jussiaeana* (547, 576, 577, 618), *Gliricidia sepium* (883), *Hymenolobium excelsum* (663, 664, 670), *Hymenolobium pulcherrimum* (1042, 1043, 1044, 1045, 1046, 1047), *Inga cinnamomea* (722, 803, 804, 806, 807, 809, 810, 812, 881, 884), *Inga edulis* (827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 852, 853), *Inga laurina* (917, 918, 919, 920), *Inga macrophylla* (723, 724, 725, 726, 727, 728), *Inga nobilis* (622), *Inga pezizifera* (974, 976), *Inga* sp. (550, 571, 573, 614), *Leucaena leucocephala* (729, 730, 731, 732, 791, 879, 885, 897, 898, 899, 900, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937), *Lonchocarpus glabrescens* (681, 676), *Lonchocarpus negrensis* (1016, 1017, 1018), *Machaerium quinatum* (553), *Macrosamanea discolor* (780, 784), *Mimosa debilis* (763, 764, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 778, 779), *Mimosa polydactyla* (989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996), *Ormosia coarctata* (579), *Ormosia excelsa* (511, 610), *Ormosia macrophylla* (855, 856, 857, 858, 861, 860, 859), *Ormosia nobilis* (854, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869), *Ormosia paraensis* (649, 744, 745, 755, 756, 757, 758, 765, 766, 767, 774), *Platymiscium paraense* (523, 526, 528), *Rhynchosia minima* (565), *Sesbania exasperata* (872, 875, 876, 877),

Stryphnodendron adstringens (510), *Stryphnodendron guianense* (797, 796, 795, 794, 793, 792), *Stryphnodendron microstachyum* (985, 986, 987, 988), *Stylosanthes* sp. (815), *Swartzia laevicarpa* (554, 581, 591, 594, 609, 624), *Swartzia polyphylla* (798, 801, 802), *Vigna* sp. (799, 800, 805, 808, 811, 814, 817), *Vigna unguiculata* (1048, 1049, 1050, 1051, 1052, 1053, 1054, 1055, 1056), *Zygia cauliflora* (733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 759, 760, 913), *Zygia inaequale* (641), *Zygia latifolia* (558, 561, 562), *Zygia racemosa* (981, 982, 983, 984).

Quanto à diversidade genética dos hospedeiros que abrigavam as estirpes o gênero com maior número de espécies é o *Inga* (7 espécies), seguido de *Clitoria* e *Ormosia*, com 5 espécies e *Dioclea* e *Zygia*, com 4 espécies. Os gêneros *Dalbergia*, *Desmodium* e *Stryphnodendron*, têm 3 espécies. Trinta e dois gêneros das leguminosas constituem a coleção de rizóbios do INPA com uma ou duas espécies. Quanto ao número de estirpes, o gênero melhor representado é o *Clitoria* com 63 estirpes de rizóbios, principalmente para a espécie *Clitoria fairchildiana* (palheteira), que possui 27 estirpes homólogas. No gênero *Inga* são mantidas 53 estirpes, 26 delas para *Inga edulis* (ingá cipó). Em seguida, o gênero *Ormosia*, com 30 estirpes, predominando *Ormosia paraensis* (tento) que possui 11 estirpes preservadas. No gênero *Dioclea* e *Leucaena* há 23 registros cada – para esta última exclusivamente de *Leucaena leucocephala*, e nos demais, os números são inferiores aos valores já citados. Dentre as espécies hospedeiras bem representadas na coleção estão também: *Clitoria leptostachya* (17 estirpes), *Clitoria falcata* var. *falcata* e *Dioclea glabra* (ambas com 13 estirpes), *Chamaecrista nictitans* (12 estirpes) e *Inga cinnamomea*, *Mimosa debilis* e *Zygia cauliflora* (com dez estirpes). No processo de formação desta coleção, novas informações científicas foram geradas e Souza (2010), recentemente sistematizou os conhecimentos sobre a habilidade nodulífera de Fabaceae da região Amazônica.

Uma das formas mais simples de se identificar bactérias é através de características morfológicas. Na Figura 3, estão ilustrados alguns aspectos morfológicos das colônias bacterianas típicas de estirpes que constituem a Coleção de rizóbios.

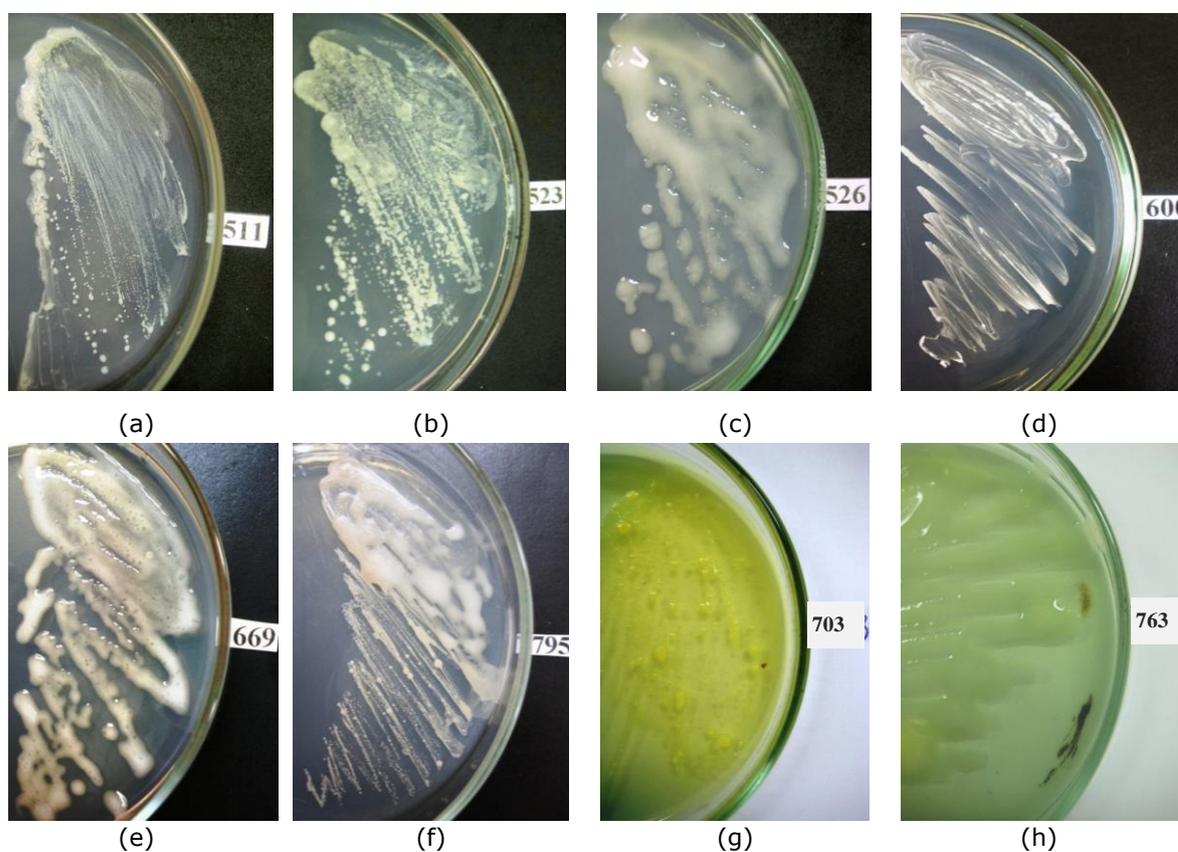


Figura 3 - Aspectos da morfologia colonial típica de estirpes de rizóbio da coleção do INPA (a) crescimento do tipo puntiforme; (b) colônias que apresentam viscosidade; (c) colônias aquosas; (d) colônias secas; (e) colônias gomosas; (f) colônias butirosas; (g) acidificação do meio de cultura; (h) alcalinização do meio de cultura.

4. Conclusão

Os trabalhos de manutenção da coleção de rizóbios do INPA permitiram quantificar a viabilidade atual de 430 estirpes, representativas de 76 espécies de leguminosas hospedeiras, classificadas em 40 gêneros. Os gêneros de Fabaceae mais representados na coleção são o *Inga*, *Clitoria*, *Ormosia*, *Dioclea* e *Leucaena*.

5. Referências

Allen, O.N. & Allen, E.K. 1981. *The Leguminosae: a source book of characteristics, uses and nodulation*. The University of Wisconsin Press, 812p.

Moreira, F.M.S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosae. In: Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros. Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O. & Brussaard, L. (Eds.), Lavras, UFLA, 2008, p.621-680.

Somasegaran, P. & Hoben, H.J. 1985. *Methods in legume-Rhizobium Technology*. Univ. do Hawaii, NifTAL, 367p, p. 33-35.

Souza, L.A.G. 2010. Levantamento da habilidade nodulífera e fixação simbiótica de N₂ nas Fabaceae da região amazônica. Enciclopédia Biosfera, Goiânia, v. 6 (10): 1-11.

Vincent, J.M. 1970. *A manual for the practical study of root-nodules bacteria*. London Burgess, 164p.