

AGR-05

PRESERVAÇÃO, MULTIPLICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO CULTURAL DE ESTIRPES BACTERIANAS DA COLEÇÃO DE RIZÓBIOS DO INPA.

Silvana Lima Martins⁽¹⁾ & Luiz Augusto Gomes de Souza⁽²⁾

⁽¹⁾Bolsista CNPq/INPA; ⁽²⁾Pesquisador INPA/CPCA

Os rizóbios são bactérias que ocorrem naturalmente nos solos e associam-se com plantas da família das Leguminosas, formando estruturas especializadas em suas raízes, os nódulos, sítios onde ocorrem reações bioquímicas e enzimáticas que permitem a fixação de nitrogênio. Importante para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas regionais em nitrogênio, o uso de bactérias como inoculante nos cultivos das leguminosas tem potencial para reduzir ou excluir a demanda por adubos nitrogenados nos sistemas de produção agrícola.

As primeiras estirpes de Rhizobia da coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo – LMS, do INPA/CPCA foram isoladas no ano de 1979, de feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), e esta é a única coleção do gênero existente na Amazônia (Souza, 1996). É uma coleção importante comparada às outras existentes no país, porque possui estirpes de rizóbio isoladas de gêneros pouco conhecidos por sua habilidade nodulífera, como *Acosmium*, *Dioclea* e *Pterocarpus*, entre outros. Halliday (1984) recomendou a regionalização das coleções de rizóbios, devido a fatores ecológicos e adaptativos, para otimizar a busca por estirpes de alta eficiência fixadora de N₂, capazes de suprir a demanda das plantas por nitrogênio.

Este trabalho teve como objetivo organizar, multiplicar, preservar e descrever as características coloniais das estirpes que compõem a coleção de rizóbios do Laboratório de Microbiologia do Solo do INPA.

As atividades foram conduzidas no Laboratório de Microbiologia do Solo do INPA/CPCA, em Manaus, AM, Campus do INPA V-8. O meio de cultura base utilizado para desenvolvimento das estirpes foi o YMA sólido (Yeast Mannitol Agar), modificado de Vincent (1970). O pH do meio foi ajustado para 6,0 antes da autoclavagem, feita a 1,5 atm, por 30 minutos, sem o uso de corantes.

As estirpes, preservadas em tubos rosqueáveis, preenchidos com meio de cultura, que compõem a coleção, foram repicadas para placas de Petri com meio YMA sólido, para avaliação do seu grau de pureza. Nos casos onde foi constatada contaminação, foram adotadas técnicas de purificação que consistiram na repicagem de alíquotas não contaminadas das culturas, preferencialmente colônias oriundas de células individuais, para novas placas com

meio de cultivo. Após a repicagem para placas, as estirpes foram incubadas em estufa, a temperatura de 26°C, por períodos que variaram entre dez (*Rhizobium*) a vinte dias (*Bradyrhizobium*).

Após o desenvolvimento das estirpes, avaliou-se o seu grau de pureza pelo aspecto visual das colônias. Quando puras, as estirpes foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio YMA sólido inclinado, de forma a totalizar seis tubos por estirpe, caracterizando a renovação do lote na coleção. Os tubos renovados foram identificados com a data, número de série e número de registro na coleção.

Para descrição das características coloniais, as estirpes foram incubadas em meio sólido, seguindo-se os descritores propostos por Somasegaran & Hoben (1985), aos 10 e 20 dias de incubação. Foram registrados, na data da descrição, o diâmetro máximo da colônia individual, a forma, a cor, a elevação, a consistência, a coalescência, a produção de goma e a densidade ótica. A habilidade de alterar o pH do meio foi testada utilizando-se o indicador de pH azul de bromotimol (0,04%). Ao pH 6,0, o indicador tem a cor verde. Quando o pH é acidificado, a cor torna-se amarela; quando é alcalinizado, torna-se azul, estabelecendo-se assim os dois principais grupos de rizóbios: *Rhizobium* e *Bradyrhizobim*, respectivamente, para estirpes que acidificam e alcalinizam o meio de cultivo (Jordan, 1984). Os dados de morfologia das colônias foram agrupados em uma ficha individual. Na medida em que as estirpes eram renovadas na coleção, foram recebendo um número definitivo, em substituição aos códigos adotados no isolamento.

Até o momento, foram avaliadas 67 estirpes, isoladas de 21 hospedeiros (Tabela 1). Sete das espécies estudadas possuem somente uma estirpe na coleção, o que demanda novas atividades de isolamento para aumentar a variabilidade de estirpes disponíveis para estas espécies. O grupo mais numeroso foi o de *Chamaecrista nictitans*, que tem 12 estirpes.

Nos trabalhos de renovação da coleção, constatou-se uma perda de 15% dos tubos disponíveis (n=44) por ressecamento, e uma perda de 17% por contaminação por fungos (n=49), totalizando 93 tubos perdidos. Coleções de rizóbio armazenadas por repicagens de culturas sofrem perdas ao longo do tempo. Esta técnica exige incubação periódica das estirpes, para que seja possível uma avaliação do seu grau de pureza. A maior parte das coleções de rizóbio existentes no Brasil são mantidas por repicagem de cultura, como ocorre com a coleção do INPA. Manter uma cópia sob baixa temperatura auxilia a preservação da viabilidade das estirpes que compõe a coleção.

Tabela 1. Estirpes de rizóbios renovadas na coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo do INPA/CPCA.

HOSPEDEIROS	NOME POPULAR	Nº. DE	
		ESTIRPES	CÓDIGO DAS ESTIRPES
<i>Abrus tenuiflorus</i>	Juquiriti	1	673
<i>Acacia mearnsii</i>	Acácia negra	1	6189
<i>Acacia multipinnata</i>	Rabo de camaleão	1	563
<i>Acosmium nitens</i>	Taboarana	4	682, 683, 684, 685
<i>Acosmium tomentellum</i>	Itaubarana	4	686, 687, 688, 689
<i>Albizia lebbek</i>	Ébano oriental	2	16, 63
<i>Anadenanthera peregrina</i>	Angico vermelho	5	690, 691, 692, 693, 694
<i>Andira parvifolia</i>	Sucupira chorona	1	695
<i>Andira sp.</i>	Manga brava	1	678
<i>Calopogonium mucunoides</i>	Enxada verde	6	696, 697, 698, 699, 700, 701
<i>Cedrelinga catenaeformis</i>	Cedrorana	3	702, 721, 643
<i>Clitoria amazonum</i>	Faveira preta	3	605, 606, 628
<i>Clitoria fairchildiana</i>	Palheteira	4	14, 46, 85, 140
<i>Crotalaria spectabilis</i>	Guizo de cascavel	3	703, 704, 705
<i>Centrolobium paraense</i>	Pau Rainha	1	632
<i>Centrosema sp.</i>	Centro	5	542, 572, 575, 611, 621
<i>Chamaecrista mimosoides</i>	Cássia de impingem	3	619, 642, 654
<i>Chamaecrista nictitans</i>	Pariri	12	534, 603, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715
<i>Desmodium incanum</i>	Beijo de boi	1	515
<i>Desmodium ovalifolium</i>	Desmódio	4	716, 717, 718, 719
<i>Dioclea bicolor</i>	Bico de pato	2	675, 720

67

As perdas por ressecamento, normalmente são atribuídas a uma vedação ineficiente do tubo, o que, ao longo do tempo, resulta em trocas gasosas que aos poucos ressecam o meio de cultura. A contaminação por fungos é mais difícil de controlar, já que hifas ou esporos podem entrar nos tubos, e, em seu desenvolvimento, podem, muitas vezes, conviver com o rizóbio ou então matá-lo. Há técnicas de purificação que podem ser aplicadas neste caso, especialmente utilizando-se substâncias anti-fúngicas, como o “actidione” (ciclohexamida), que impedem o crescimento do fungo contaminante. Entretanto, o ideal é sempre possuir um número elevado de replicatas quando se trabalha na preservação das estirpes, para que os tubos ressecados ou contaminados por fungos sejam descartados, mantendo-se na coleção somente estirpes puras.

Uma das estirpes registradas, IPAGRO 6189, cujo hospedeiro é acácia negra (*Acacia mearnsii*), não foi isolada na Amazônia e pertence à coleção da Secretaria de Agricultura do

Rio Grande do Sul, Instituto de Pesquisas Agropecuárias, identificada como IPAGRO, material este que também se encontra preservado na coleção do INPA.

Para destacar como os descritores coloniais foram aplicados em algumas das estirpes, a Tabela 2 reúne informações sobre as características culturais de estirpes obtidas de três espécies hospedeiras.

Tabela 2. Aspectos da morfologia colonial de três estirpes da coleção de rizóbios do INPA.

Estirpe	693	673	687
Hospedeiro	<i>Anadenanthera peregrina</i>	<i>Abrus tenuiflorus</i>	<i>Acosmium tomentellum</i>
Coloração das colônias	Branco gelo	Branco	Branco leite
Diâmetro máximo	0,7 mm	<0,5 mm	<0,5 mm
Forma	Circular	Circular	Puntiforme
Elevação	Convexa	Pulvinada	Convexa
Consistência	Butirosa	Gomosa	Butirosa
Coalescência	Média	Média	Média
Produção de goma	Média	Média	Média
Alterações do pH	Acidifica	Acidifica	Alcaliniza
Densidade óptica	Opaca	Opaca	Translúcida
Grupo de rizóbio	<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>

Os trabalhos foram desenvolvidos em apoio ao Programa de Coleções Científicas do INPA, dentro da curadoria de rizóbios, e abrangeram 67 estirpes. Como o total de estirpes da coleção esta hoje estimado em 415 estirpes, esta atividade correspondeu a 16,1% do total de estirpes em estágio de renovação e purificação.

Halliday, J. 1984. Integrated approach to nitrogen fixing tree germoplasm development. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 19 (s/nº): 91-117.

Jordan, D.C. 1984. Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938, 321^{AL}. In: HOLT, J.G. & KRIEG, N.R. (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic bacteriology*. Baltimore, London, Williams & Wilkins. v. 1: 234-256.

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

Souza, L.A.G. 1996. A coleção de rizóbios do Laboratório de Microbiologia do Solo do INPA/CPCA. *Boletim da ALAR*, Campinas, v. 13 (1): 4-8.

Vincent, J.M. 1970. *A manual for the practical study of root nodule bacteria*. IBP, Handbook 15, Blackwells, Oxford.