

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

Milena Machado de HOLANDA<sup>1</sup>; Luiz Augusto Gomes de SOUZA<sup>2</sup>; Haroldo Silva RODRIGUES<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; <sup>2</sup>Orientador CPCA/INPA; <sup>3</sup>Colaborador PIBIC/CNPq/INPA

## 1. Introdução

Na pesquisa básica conduzida para a agricultura sustentável, às coleções microbianas de trabalho tem importância para o uso aplicado de inoculante na agricultura, tanto para controle biológico como para fixação de nitrogênio. Com o crescimento teórico da Agroecologia, cada vez mais para os sistemas agrícolas são propostas práticas sustentáveis de manejo de agroecossistemas de forma sustentável fundamentados no manejo regenerativo dos ecossistemas naturais (biodiversidade, solos e água). O uso de microrganismos úteis como os rizóbios podem ser um componente importante nestes sistemas, 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 família botânica das Fabaceae (Leguminosae) é economicamente de importância global (Allen e Allen, 1981), seja para produção de madeira, alimento, óleo, lenha, resina ou outros produtos. A associação entre a planta hospedeira e as bactérias resulta na formação de nódulos radiculares, sítio onde ocorrem reações bioquímicas que permitem a fixação simbiótica do nitrogênio. O uso de bactérias na forma de inoculantes nos cultivos das leguminosas é importante para a sustentabilidade dos agroecossistemas em nitrogênio e, têm potencial para reduzir ou excluir a demanda por adubos nitrogenados.

As primeiras estirpes de Rhizobia da coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo do INPA/CPCA foram isoladas em 1979, e esta é a única coleção do gênero existente na Amazônia. A preservação da coleção atualmente é por replicagem periódica das estirpes em meio sólido, e através de duplicatas mantidas em câmara fria, imersas em óleo mineral. O processo implica em perdas gradativas e pode pôr em risco a sobrevivência das estirpes.

Na coleção de rizóbios do INPA, foi observada ampla diversidade de padrões de proteína celular total entre estirpes diferentes em muitos casos das espécies e gêneros conhecidos de rizóbios (Moreira, 1991). Culturalmente as estirpes são muito diversificadas predominando as de crescimento lento e alcalinizadoras do meio de cultivo. Atualmente, com o advento de técnicas de biologia molecular sabe-se que geneticamente os rizóbios estão abrigados em oito famílias microbianas e classificados em 13 gêneros: família Rhizobiaceae (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Allorhizobium*); família Bradyrhizobiaceae (*Bradyrhizobium*, *Blastobacter*); família Xanthobacteraceae (*Azorhizobium*); família Hyphomicrobiaceae (*Devosia*); família Phyllobacteriaceae (*Phyllobacterium*, *Mesorhizobium*); família Methylobacteriaceae (*Methylobacterium*); família Brucellaceae (*Ochrobactrum*); e, na família Burkholderiaceae (*Burkholderia*, *Ralstonia*), conforme Moreira (2008).

Atualmente a coleção vem sendo submetida a estudos descritivos e de avaliação da sua eficiência, priorizando-se a seleção dos rizóbios nos hospedeiros que lhes deram origem, para avaliar os efeitos da presença conjunta da espécie e da bactéria compatível empregada como inoculante.

Nos últimos anos a coleção de rizóbios do INPA tem aumentado consideravelmente 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. As atividades deste projeto de pesquisa estão diretamente relacionadas com a organização, manutenção, utilização, disponibilização de informações e preparo de inoculante microbiano para uso como inoculante de leguminosas, e se propõem a contribuir para este fim.

## 2. Material e Métodos

Os trabalhos experimentais foram conduzidos no Setor de solos, Laboratório de Microbiologia do Solo - LMS, na Coordenação de Pesquisas em Ciências Agrônomicas do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - CPCA-INPA, em Manaus, AM, entre 2009 e 2010.

As estirpes incorporadas na coleção de rizóbio estão preservadas em caixas de madeira compartimentadas, acondicionadas em armários de aço, a temperatura de ar condicionado ( $\pm 20^\circ\text{C}$ ). Inicialmente foi feita uma sistematização das informações sobre as estirpes atualizando arquivos de informações já digitados com os registros efetuados em livro de atas sobre dados da espécie hospedeira que originou o isolado bacteriano, o ano de isolamento e o histórico dos tubos disponíveis para cada estirpe. A identificação dos tubos da coleção é composta de três informações que constam de forma permanente em cada tubo: o número da estirpe na coleção, o número do tubo e a data de estocagem do material puro.

Na avaliação inicial das gavetas com os tubos de vidro com tampa rosqueáveis em que a coleção está preservada, foram descartados e quantificados os tubos ressequidos ou contaminados visualmente por

fungos, algas ou bactérias, registrando-se as perdas no livro de ata. Os tubos puros remanescentes foram incubados em placas de Petri, para avaliação de sobrevivência e grau de pureza das estirpes da coleção. As observações de viabilidade e pureza das estirpes foram feitas em meio de cultura YMA, pH 6,0 sem corante (Vincent, 1970, adaptado). Para o preparo do meio de crescimento de rizóbios a constituição do meio de cultura é: 0,2 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,1 g de NaCl, 10,0 g do açúcar Manitol, 0,4 g de Extrato de Levedura, 0,4 g de  $KH_2PO_4$ , 0,1 g de  $K_2HPO_4$  e 15g de agar. Após a combinação dos componentes, o pH é ajustado para 6,0 em potenciômetro, seguindo-se a autoclavagem por 20 minutos em pressão de 1,5 atm, e distribuição do meio estéril em câmara de fluxo laminar, 20 mL de meio por placa.

Para cada estirpe, inicialmente o número de tubos riscados por placa corresponderá ao número de tubos disponíveis em cada célula da coleção que pode variar entre 1 e 6 tubos. A observação após a incubação se reportará ao grau de viabilidade individual de cada tubo. Para as estirpes que não tiverem o número teto de segurança de seis tubos viáveis, tubos estoques complementares estão sendo preparados, estabelecendo-se para todas elas o número mínimo de seis tubos nesta fase de atualização de informações e manutenção da coleção. Para as estirpes com mais de seis tubos estes foram identificados como tubos extras, disponíveis em caso de perdas por manipulação ou contaminação. Nos trabalhos de monitoramento da viabilidade, a incubação foi procedida no escuro em temperatura ambiente de laboratório (23-26°C) por dez dias para estirpes de crescimento rápido e por 25 dias para as de crescimento lento. Está sendo efetuado nesta fase o registro fotográfico de estirpes puras com crescimento típico, com fins de documentação.

Os tubos identificados como contaminados após o período de incubação foram eliminados e separados para limpeza. Quando necessário e houver risco de perda de estirpes e de registros da coleção de rizóbios, técnicas de purificação de estirpes serão aplicadas, replicando-se alíquotas de áreas não contaminadas para novas placas com meio de cultura YMA, diluindo-se o crescimento da estirpe até que seja possível identificar o crescimento puro. Para replicatas de novos tubos somente placas sem contaminação servirão como fonte dos propágulos.

No registro da coleção em meio digital foi atualizada a planilha Word já existente, que reúne dados do hospedeiro de origem dos nódulos e o histórico de multiplicação de tubos da coleção, bem como de suas perdas.

A ampliação das informações atuais disponíveis da coleção também incluirá o acréscimo de várias estirpes de rizóbios que foram isoladas nos últimos anos nos trabalhos do LMS, atualmente identificadas somente pelo código de isolamento, que receberão um número de registro na coleção. Para disponibilizar os dados atualizados da coleção para um público maior foi feito um levantamento do material disponível com seu respectivo número de registro, e as informações da espécie hospedeira foram agrupadas por subfamília, gênero e espécies.

### 3. Resultados e Discussão

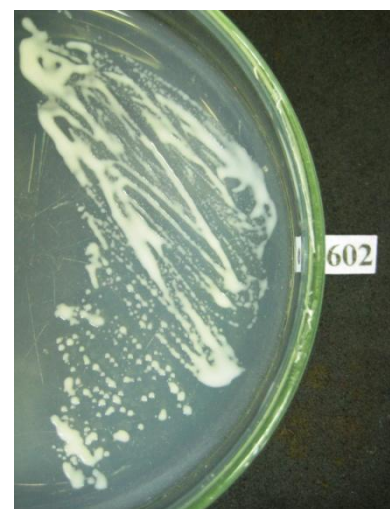
Nos trabalhos desenvolvidos, 25 novos registros foram adicionados a coleção de rizóbios, provenientes de isolamentos efetuados em anos anteriores para nódulos obtidos das Fabaceae de São Gabriel da Cachoeira, AM. Atualmente a coleção abriga 420 estirpes de rizóbios, representativos de 76 espécies de leguminosas abrigadas em 40 gêneros. Na Figura 1, está ilustrado o aspecto geral da coleção, bem como o registro da morfologia colonial de estirpes nela mantidas.



(A) Coleção de rizóbios do INPA, acondicionada em caixas segmentadas



(B) Estirpe 523, isolada de *Platymiscium paraense* (macacaúba)



(C) Estirpe 602, isolada de *Enterolobium maximum* (faveira da várzea)

Figura 1. Aspecto da Coleção de Rizóbios do INPA (A) e do registro da morfologia colonial de estirpes de rizóbios (B, C), para documentação.

Foi verificado na coleção uma maioria de espécies pertencentes a subfamília Faboideae (64,5 % - 49 espécies), seguido por Mimosoideae (32,9 % - 25 espécies) e em escala menor as Caesalpinoideae, com somente 2,6 %, ou seja duas espécies do gênero *Chamaecrista* (*C. nictitans* com 12 estirpes e *C. mimosoides* com 8 estirpes). 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 cateniiformis* (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 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), *Diploptropis 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 laeviscarpa* (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 a diversidade genérica das estirpes o gênero com maior número de espécies é o *Inga* (7 espécies), seguido de *Clitoria* e *Ormosia*, com 5 espécies, *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 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).

Os estudos de avaliação da compatibilidade e eficiência destas estirpes vêm sendo conduzidos com seus pares homólogos ou genéricos, nos últimos anos, especialmente para leguminosas de interesse agroecológico, para adubação verde e composição de espécies nos sistemas agroflorestais propostos para a região tropical. Nestes estudos há evidências experimentais do potencial de substituição de adubos minerais nitrogenados pela fixação simbiótica de N<sub>2</sub>.

#### **4. Conclusão**

São apresentados dados atualizados da disponibilidade de estirpes na Coleção de Rizóbios do INPA, constituída por 420 registros, distribuídos em 76 espécies classificadas em 40 gêneros das leguminosas, predominando as Faboideae.

#### **5. Referências**

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

Moreira, F.M.S. 1991. *Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de Leguminosae introduzidas ou nativas da Amazônia e mata Atlântica*. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 160p.

Moreira, F.M.S. 2008. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosae. In: Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O.; Brussaard, L. (Eds.) *Biodiversidade do Solo em Ecossistemas brasileiros*. Editora da UFLA, Lavras, MG, p. 621-680.

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