

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIOS DE LEGUMINOSA ARBÓREA EM TERRAS BAIXAS DE CLIMA SUBTROPICAL

THEIS, Joan da Silva¹; GALARZ, Liane Aldrighi²; MATTOS, Maria Laura Turino³

¹Universidade Católica de Pelotas, Estudante de Biologia; ²Embrapa Clima Temperado, Assistente; ³Embrapa Clima Temperado, Pesquisadora. maria.laura@cpact.embrapa.br

1 INTRODUÇÃO

A prospecção de novas espécies de rizóbios é importante para a busca de bactérias com maior capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) em terras baixas de clima subtropical, onde a cultura da soja está sujeita ao estresse de encharcamento. Essa condição pode afetar a eficiência de estirpes na FBN em simbiose com a cultura da soja, reduzindo a produtividade em condições de alagamento do solo.

As bactérias dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* destacam-se pelo papel que exercem no crescimento de plantas, pois são capazes de converter o N₂ em uma forma utilizável às plantas. Esses microrganismos infectam as plantas de leguminosas formando nódulos nas raízes, estabelecendo uma relação simbiótica entre a planta hospedeira e o microssimbionte. (TORTORA; FUNKE; CASE, 2003). Assim, os rizóbios proporcionam grandes benefícios à agricultura, tornando-se relevantes as pesquisas que visam identificar espécies eficientes e competitivas desse grupo de bactérias (HUNGRIA, 1994, citado por HUNGRIA e ARAÚJO, 1994).

Existem relatos de Campêlo e Döbereiner (1969), citados por Moreira et al. (2007), sobre a FBN em espécies arbóreas, relatando a especificidade hospedeira das bactérias junto às plantas e vice-versa. Assim, a prospecção em leguminosas arbóreas, nativas de ambientes alagados, com capacidade de nodulação torna-se importante na busca de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio.

O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar rizóbios de nódulos de leguminosa arbórea presente em solo de várzea subtropical, visando obter acessos adaptados à condição de encharcamento para a inoculação da cultura da soja.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no laboratório de Microbiologia Agrícola e Ambiental da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. A planta leguminosa arbórea utilizada está presente na Estação Experimental Terras Baixas (ETB) da Embrapa Clima Temperado. Realizou-se o isolamento de microrganismos de nódulos presentes nas raízes dessa planta conforme o protocolo descrito por Hungria (1994), citado por Hungria e Araújo (1994). Coletaram-se porções de raízes com solo que foram acondicionadas em sacos plásticos e transportadas em caixas de isopor ao laboratório. O excesso de solo foi retirado e as raízes foram lavadas sobre uma peneira, visando evitar a perda de nódulos durante esse processo. Secaram-se as raízes com papel toalha e separaram-se aproximadamente 20 nódulos em condição asséptica, com o auxílio de uma pinça e de uma tesoura.

O processo de isolamento dos microrganismos foi realizado em câmara de fluxo laminar utilizando-se material estéril. Selecionaram-se nove nódulos, sendo isolados três a cada etapa. Imergiram-se os nódulos em álcool 95% por três minutos, transferindo-se com uma pinça para solução de hipoclorito de sódio por

mais três minutos. Os nódulos foram lavados, em água destilada estéril, por cinco vezes e colocados em placa de Petri, onde foram macerados com bastão de vidro. Obteve-se uma suspensão, macerando três nódulos por vez, em 1,0 mL de solução salina a 85%, agitando-se a suspensão em *Vortex*. Aplicou-se a técnica de espalhamento em superfície para a recuperação de bactérias presentes nos nódulos. Inocularam-se 100 µL da suspensão bacteriana em placas de Petri, em triplicata, contendo meio 79 acrescido de corante Vermelho Congo. As placas foram incubadas a 28 °C durante sete dias.

Selecionaram-se as colônias morfológicamente diferentes, por meio da técnica do palito estéril, repicando-se para placas de Petri contendo Agar Nutritivo (AN) e incubando-se a 28°C por 48 horas. Procedeu-se a purificação em placas de Petri contendo meio AN. Após, as colônias selecionadas foram purificadas em meio AN por meio da técnica do esgotamento, obtendo-se os acessos puros.

Realizaram-se observações fenotípicas para caracterizar os acessos e identificar os rizóbios. Verificou-se o crescimento em placas de Petri contendo meio 79 com corante Vermelho Congo, como indicador, em triplicata, observando-se a coloração conforme Hungria (1994), citado por Hungria e Araújo (1994): rizóbios não absorvem a cor do corante. As placas foram incubadas a 28°C pelo período de 1 a 10 dias. Avaliou-se o tempo de crescimento das colônias conforme Stroschein (2007), classificando-os em: (1) crescimento muito rápido (1 dia de incubação); (2) crescimento rápido (2 a 3 dias de incubação); (3) crescimento intermediário (4 a 5 dias de incubação); (4) crescimento lento (6 a 10 dias de incubação) e, (5) crescimento muito lento (acima de 10 dias de incubação). A reação Gram foi realizada conforme Urenha et al. (1994), citado por Hungria e Araújo (1994), utilizando-se reagentes Merck.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolaram-se 28 acessos dos nódulos das raízes da leguminosa arbórea (CMM 567, CMM 568, CMM 569, CMM 570, CMM 571, CMM 572, CMM 573, CMM 574, CMM 575, CMM 576, CMM 577, CMM 578, CMM 579, CMM 580, CMM 581, CMM 582, CMM 583, CMM 584, CMM 585, CMM 586, CMM 587, CMM 588, CMM 589, CMM 590, CMM 591, CMM 592, CMM 593, CMM 594) que estão preservados na Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Clima Temperado. Somente quatro acessos (CMM 567, CMM 580, CMM 585 e CMM 594) apresentaram as características de bactérias de rizóbios (Tabela 1): (1) não absorvem a cor vermelha do corante; (2) absorvem o reagente safranina e são Gram-negativas; (3) possuem células em formato de bastonetes (HUNGRIA, 1994, citado por HUNGRIA e ARAÚJO, 1994).

Observou-se uma variação na velocidade de crescimento das bactérias: (1) crescimento rápido com dois dias de incubação (CMM 567 e CMM 580); (2) crescimento lento com seis dias de incubação (CMM 585 e CMM 594). Segundo Hungria e Araújo (1994), as observações do crescimento do rizóbio devem ser feitas diariamente.

Tabela 1 - Características fenotípicas de acessos isolados de nódulos de raízes de planta leguminosa arbórea. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. 2011.

Acessos	Morfologia Celular	Reação Gram	³ Absorção do corante
CMM 567	Bastonetes	- ¹	-
CMM 568	Cocos	-	+
CMM 569	Cocos	-	-
CMM 570	Bastonetes	-	+
CMM 571	Cocos	-	+
CMM 572	Bastonetes	-	+
CMM 573	Cocos	-	+
CMM 574	Cocos	-	-
CMM 575	Cocos	-	-
CMM 576	Cocos	-	-
CMM 577	Cocos	+ ²	-
CMM 578	Cocos	+	-
CMM 579	Cocos	+	+
CMM 580	Bastonetes	-	-
CMM 581	Cocos	+	-
CMM 582	Bastonetes	+	+
CMM 583	Bastonetes	-	+
CMM 584	Bastonetes	-	+
CMM 585	Bastonetes	-	-
CMM 586	Cocos	+	-
CMM 587	Bastonetes	-	+
CMM 588	Cocos	+	-
CMM 589	Bastonetes	+	+
CMM 590	Cocos	+	+
CMM 591	Cocos	-	-
CMM 592	Bastonetes	-	+
CMM 593	Cocos	+	-
CMM 594	Bastonetes	-	-

¹ Negativo ² Positivo ³ Crescimento em meio 79 com corante Vermelho Congo Coeficiente de Variação (C.V. %) < 5,0

4 CONCLUSÃO

Os acessos CMM 567, CMM 580, CMM 585 e CMM 594 apresentam características de rizóbios, representando 14,3 % das bactérias isoladas dos nódulos das raízes de uma planta leguminosa arbórea. Estudos complementares são necessários para a autenticação desses rizóbios e avaliação da sua eficiência como fixadores biológicos de nitrogênio na cultura da soja, sujeita ao estresse de encharcamento em terras baixas subtropicais.

5 REFERÊNCIAS

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. São Paulo: Artmed, 2003. cap. 27, p. 120-121.

HUNGRIA, M. Coleta de nódulos e isolamento de rizóbios. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. 542p. (Embrapa, Documentos, 46).

MOREIRA, F. M. S.; FARIA, S. M. de Identificação e recomendação de bactérias eficientes na fixação de nitrogênio para leguminosas arbóreas. In: CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Anais da XII reunião da rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbianos de interesse agrícola (RELARE). Londrina: Embrapa Soja, 2007. 212p. (Embrapa Soja, Documentos, 290).

STROSCHEIN, M. R. D. **Caracterização de bactérias fixadoras de nitrogênio em *Lupinus albus***. 2007. Dissertação. Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007. 83 p.

URENHA, L. C.; PRADELLA, J. G. C.; OLIVEIRA, M. S.; BONOMI, A. Produção de biomassa celular de rizóbio. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa, 1994. 542p.