

CAPÍTULO X

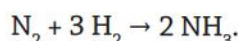
ISOLAMENTO DE RIZÓBIOS DE RAÍZES DE LEGUMINOSAS

*Jair Alves Dionísio
Ida Chapaval Pimentel
Diana Signor*

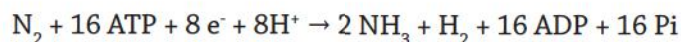
O nitrogênio é um nutriente requerido em grandes quantidades pelas plantas, representando 78 % da composição da atmosfera, porém encontra-se na forma elementar (N_2), utilizável apenas por determinadas espécies de micro-organismos procarióticos. Para assegurar a utilização pelos vegetais, é necessária que ocorra a redução deste elemento para a forma de amônia (NH_3), por meio do processo denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN).

A FBN, uma reação bioquímica extraordinária que ocorre por ação da enzima nitrogenase, ocorre em micro-organismos diazotróficos e é o segundo processo biológico mais importante do planeta, perdendo apenas para a fotossíntese (SIQUEIRA; FRANCO, 1988). Pode ser realizada de forma simbiótica, definida por associações mutualistas entre micro-organismos fixadores de nitrogênio e espécies vegetais, quanto assimbiótica, promovida por micro-organismos fixadores de vida livre.

A quebra da tripla ligação covalente, presente na molécula de N_2 , demanda grande quantidade de energia e pode ser feita industrialmente ou por micro-organismos diazotróficos. O processo industrial é conhecido como reação de Haber-Bosch e utiliza temperaturas que variam de 400 a 600 °C e pressões superiores a 10^7 Pascal (de 100 a 200 atm), com utilização de energia de derivados de petróleo (HUNGRIA et al., 1994, 2006). A reação industrial é representada por:



Quando ocorre a FBN (N_2 reduzido a NH_3), também há um grande custo energético para o organismo que realiza a fixação. No entanto, devido à ação da nitrogenase, a reação pode ocorrer à temperatura e pressão atmosférica ambiente, com consumo de trifosfato de adenosina (ATP) e é representada por (HUNGRIA et al., 1994):



Os micro-organismos diazotróficos simbiotes com leguminosas pertencem à Ordem Proteobacteria, Classe Alphaproteobacteria, Família Rhizobiaceae: *Allorhizobium* spp., *Rhizobium* spp., *Ensifer* spp., Família Bradyrhizobiaceae: *Bradyrhizobium* spp., Família Phyllobacteriaceae: *Mesorhizobium* spp., Família Hyphomicrobiaceae: *Azorhizobium* spp., outros: *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Devosia*, *Herbaspirillum*, etc. Uma importante diferença entre eles é a espécie vegetal com a qual realizam simbiose. O gênero *Rhizobium*, por exemplo, associa-se com plantas de feijão e o *Bradyrhizobium* com plantas de soja. A simbiose caracteriza-se pela formação de nódulos, diferentemente da galha, causada por nematoides fitoparasitas. Em algumas culturas como soja, ervilha e trevo, leguminosas forrageiras, arbóreas e adubos verdes, o uso de inoculante comercial substitui a adubação nitrogenada.

O tempo de formação dos nódulos nas leguminosas e o início da atividade da nitrogenase são variáveis, dependendo das espécies leguminosas e do rizóbio. A nitrogenase é sensível ao oxigênio, que pode destruí-la ou inativá-la irreversivelmente, sendo assim, cada organismo desenvolveu uma estratégia diferente para livrar-se do excesso de O_2 . No caso da simbiose rizóbio-leguminosas, a planta é induzida a produzir a leghemoglobina, que representa um sistema tampão para o O_2 , pois o transporta mantendo concentrações suficientes ao metabolismo aeróbio dos bacteroides e à síntese do ATP necessários à fixação, sem prejudicar a nitrogenase (NEVES; RUMJANECK, 1992).

A eficiência da fixação simbiótica do nitrogênio pode ser avaliada pelo aspecto do nódulo, levando-se em conta: forma, tamanho, cor interna e a maneira como eles se distribuem no sistema radicular da planta. Nódulos eficientes são relativamente grandes, pouco numerosos, de superfície rugosa, presentes na raiz principal e secundárias de primeira ordem e de coloração interna rósea-avermelhada (KUSDRA, 2002). A soja, quando bem nodulada, apresenta de 15 a 30 nódulos ou de 100 mg a 200 mg de nódulos secos por planta (HUNGRIA et al., 1994).

De forma resumida, as etapas do processo de formação do nódulo, segundo Freire (1992), podem ser assim compreendidas:

- 1) Liberação dos flavonoides pelas raízes das plantas;
- 2) Quimiotaxia do rizóbio em direção à superfície das raízes;
- 3) Aderência do rizóbio às raízes;
- 4) Encurvamento do pelo radicular e formação da via de infecção;

- 5) Múltipla infecção das células do nódulo e crescimento do nódulo;
- 6) Crescimento do nódulo e diferenciação dos bacteroides; e,
- 7) Começo da fixação simbiótica.

Diversos fatores podem interferir na FBN, atuando de forma limitante, reduzindo a eficiência do processo. Dessa forma, segundo Siqueira e Franco (1988), destacam-se os fatores bióticos (gens “nif”, especificidade hospedeira, capacidade competitiva), climáticos (temperatura, umidade e aeração), a fertilidade do solo (acidez e nutrientes minerais) e o uso de agrotóxicos.

Para que a soja alcance produtividade aproximada de 4.000 kg ha⁻¹ é necessário que seja utilizado um inoculante capaz de fornecer 1.200.000 células por semente, tratadas com fungicidas menos tóxicos, não seja aplicado nitrogênio mineral e os micronutrientes cobalto e molibdênio sejam fornecidos nas doses de 2,0 a 3,0 g ha⁻¹ e de 20,0 a 30,0 g ha⁻¹, respectivamente (EMBRAPA, 2009).

PROTOCOLO VIII

ISOLAMENTO DE RIZÓBIO DE RAÍZES DE PLANTAS LEGUMINOSAS

1. Material

- Raízes de plantas recém-colhidas, com nódulos frescos;
- Vidraria: placas de Petri, tubos de ensaio, bastão de vidro e lâminas;
- Equipamentos: microscópio fotônico, estufa de esterilização, estufa de incubação, capela de fluxo laminar, autoclave, peagâmetro, esterilizador infravermelho ou bico de Bunsen ou lamparina;
- Soluções: meio de cultura extrato de levedura-manitol-ágar-YMA (Tabela 11); e,
- Outros: bico de Bunsen ou lamparina, gás butano, pinça, peneira número 10 (abertura de 2,00 mm) pá, saco plástico, papel toalha e luva de proteção (nitrílica descartável).

Tabela 11. Meio de extrato de levedura-manitol-ágar-YMA (FRED; WAKSMAN, 1928) com adição do corante azul de bromotimol¹.

Reagente	Quantidade (g L ⁻¹)
Manitol	10,0
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
Extrato de levedura	0,5
Ágar	15,0
Água destilada q.s.p.	1.000,0

Obs.: Ajustar o pH final para 6,8; ¹Acrescentar azul de bromotimol (5 mL L⁻¹ de meio de cultura, Anexo 1)

2. Metodologia

2.1. Coleta de nódulos

- a) Selecionar a planta leguminosa;
- b) Demarcar um círculo ao redor da planta, correspondente à área do sistema radicular;
- c) Para leguminosas herbáceas como soja, feijão e guandu, recomenda-se fazer um círculo, em volta da planta, com cerca de 15 cm de raio;
- d) Para arbóreas, são necessários dois círculos: um próximo à raiz principal e outro mais distante, que se aproxime das raízes secundárias;
- e) Cavar a uma profundidade de 30 cm para plantas herbáceas e a uma profundidade maior para arbóreas;
- f) Remover a terra cuidadosamente para não danificar o sistema radicular; e,
- g) Retirar o excesso de solo com as mãos sobre uma peneira, cuidando para que os nódulos não se percam.

2.2. Isolamento do rizóbio

- a) Colocar as plantas ou raízes em sacos plásticos;
- b) Levar o material ao laboratório e lavar com água da torneira, com cuidado, sobre uma peneira (malha de 2,0 mm), para evitar que as raízes e os nódulos se percam;
- c) Secar as raízes com papel toalha e retirar os nódulos, deixando-se 0,5 cm de raiz para facilitar a manipulação do nódulo e diminuir as chances de danificá-lo durante o isolamento;
- d) Na capela de fluxo laminar, os nódulos dessecados devem ser reidratados, ficando de molho em frascos com água por 30 a 40 minutos;
- e) Imergir os nódulos por um período de 5 a 10 segundos em álcool 90-95 %, para quebrar a tensão superficial e remover bolhas de ar do tecido;
- f) Transferir os nódulos para uma solução de hipoclorito de sódio ou cálcio a 5,0 % (Anexo 1);
- g) Lavar os nódulos pelo menos cinco vezes em água destilada e esterilizada;
- h) Após a última lavagem, macerar os nódulos com bastão de vidro, aproveitando a água da última lavagem;

- i) Riscar o material em placas de Petri contendo meio de extrato de levedura-manitol-ágar-YMA;
- j) Incubar a 25-30 °C ou na temperatura ideal para a leguminosa da qual o nódulo foi coletado; e,
- k) Verificar diariamente o crescimento das colônias de rizóbio.

3. Resultados

Algumas características morfológicas e culturais do rizóbio em meio de cultura YMA com azul de bromotimol.

3.1. Características morfológicas das células de rizóbio (GILLER; WILSON, 1993)

- a) Realizar o teste de Gram, em solubilidade com KOH, para confirmar que os rizóbios são Gram negativos. Realizar observações ao microscópio fotônico com aumento de 1.000 vezes, para confirmar que são bastonetes curtos; e,
- b) Confirmar a presença de flagelos conforme WANG et al. (2008):
 - Polar ou subpolar. Ex.: *Bradyrhizobium*;
 - Peritríquios. Ex.: *Rhizobium* e *Azorhizobium*.

3.2. Características dos rizóbios relacionadas ao pH do meio de cultivo YMA com azul de bromotimol (MARTINS et al., 1997)

- Alcalinização, coloração azul do meio de cultivo e rizóbio de crescimento lento. Ex.: *Bradyrhizobium japonicum*;
- Acidificação, coloração amarela do meio de cultivo e crescimento rápido. Ex.: *Rhizobium tropici*; e,
- Inalteração, coloração verde do meio de cultivo e crescimento rápido. Ex.: *Albizia lebbek*.

3.3. Características culturais em meio de cultura YMA com azul de bromotimol

O rizóbio em meio rico de nutrientes não absorve o corante, diferenciando-se dos contaminantes.

- a) Tempo de crescimento das colônias incubadas em placas de Petri a 28 °C:
- Rápidas: até 3 dias;
 - Intermediárias: até 5 dias;
 - Moderadas: até 9 dias; e,
 - Lentas: igual ou superior a 10 dias.
- b) Diâmetro, aspecto e formato das colônias em meio de cultura YMA com azul de bromotimol:
- Inferior a 1,0 mm: opacas e puntiforme; e,
 - Superior a 1,0 mm: translúcidas com brilho, circulares no início do crescimento e irregulares quando mais velhas.

Obs.: Para a confirmação que o isolado é rizóbio, deve ser realizada a inoculação na leguminosa hospedeira, observando-se a formação de nódulos, ou a identificação por biologia molecular.