

## **Caracterização de rizóbios através de perfis de crescimento em carboidratos.** Luciana M. de Hollanda<sup>1</sup>, Heitor L.C. Coutinho<sup>2</sup> e Gilson P. Manfio<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Fundação Tropical de P.T. André Tosello, Rua Latino Coelho 1301, Campinas - SP;

<sup>2</sup>CNPMA-EMBRAPA, Rod. SP-340 Km 127, Jaguariúna - SP. (heitor@bdt.org.br)

Palavras-chave: rizóbio, taxonomia microbiana, crescimento, carboidratos, diversidade

### **Introdução**

Dentre os microrganismos de solos de grande importância para a agricultura estão aqueles capazes de fixar o nitrogênio atmosférico, aumentando a disponibilidade deste nutriente para as plantas. A fixação biológica de nitrogênio talvez seja o processo mais relevante dentro da ciclagem global de nitrogênio (Ishizuka, 1992), além de ser fundamental para sistemas de agricultura sustentável, já que em alguns casos, como a soja, pode suprir todo o nitrogênio requerido para a obtenção de alta produtividade sem a necessidade de insumos químicos, reduzindo os danos ambientais causados pela lixiviação dos nitratos (Boddey *et al.*, 1984).

As bactérias fixadoras de nitrogênio mais estudadas pertencem à família Rhizobiaceae (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*; referidos genericamente como rizóbios), e são capazes de estabelecer uma relação de simbiose com espécies de leguminosas. Este processo simbiótico caracteriza-se pela formação de nódulos nas raízes ou caules das leguminosas infectadas pelas bactérias, onde estas passam a reduzir o nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) para amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), forma assimilável pela planta. Esta simbiose apresenta a característica da especificidade, ou seja, cada espécie de leguminosa é capaz de ser nodulada por determinadas espécies ou estirpes de rizóbios.

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) através da simbiose rizóbio-leguminosa tem sido amplamente usada e estudada na agricultura, sendo que muitas linhagens de rizóbio já estão disponíveis para inoculação de plantações de interesse comercial como soja, grão-de-bico, ervilha-de-vaca, amendoim, tremoço, alfafa, trevo (Döbereiner & Duque, 1980; Dreyfus *et al.*, 1988).

A diversidade destes microrganismos constitui importante fonte de recurso genético para seleção de linhagens a serem usadas como novos inoculantes, não apenas em plantações comerciais como também na revegetação de solos de baixa fertilidade, erodidos ou degradados. Estudos recentes, embora escassos, têm demonstrado a enorme diversidade de rizóbios presentes em solos tropicais. Ahmad *et al.* (1981) empregaram técnicas de imunologia para examinar 53 linhagens de rizóbios isolados de leguminosas em três regiões diferentes da África Ocidental. Os resultados encontrados demonstraram grande diversidade de serotipos de rizóbios nas populações naturais das três regiões. Já Zhang *et al.* (1991) usaram taxonomia numérica para estudar a diversidade de linhagens de rizóbios isoladas de leguminosas arbóreas, *Acacia senegal* e *Prosopis chilensis*, no Sudão. Os resultados evidenciaram um alto grau de diversidade entre os rizóbios arbóreos do Sudão, os quais mostraram-se todos de crescimento rápido. Num estudo mais amplo, 171 linhagens de rizóbios, das quais 120 de crescimento lento, foram analisadas através de eletroforese de proteínas totais em gel de poliacrilamida-SDS (Moreira *et al.*, 1993). Estas linhagens foram selecionadas de um total de 800, isoladas de leguminosas tropicais da

Floresta Amazônica e Mata Atlântica no Brasil, de maneira a representar tipos culturais diferentes de grupos de divergência diferentes de Leguminosae. Linhagens tipo e referência apropriadas e também 7 linhagens tropicais isoladas de *Phaseolus vulgaris* foram incluídas nas análises para comparação. Vinte e três grupos eletroforéticos foram obtidos, sendo que a maioria dos isolados de crescimento lento (92 de 120) formou um grupo que continha a linhagem tipo de *B. japonicum*. Portanto, os perfis de proteínas dos rizóbios de crescimento rápido evidenciaram uma diversidade genética maior que a encontrada para os rizóbios de crescimento lento. Os autores não observaram nenhuma correlação entre os grupos eletroforéticos obtidos e os grupos de divergência de Leguminosae dos quais as linhagens foram isoladas. Resultado semelhante foi observado em padrões de bandas resultantes de análises de RAPD (Coutinho *et al.*, não publicado). Quarenta destas linhagens foram selecionadas para sequenciamento de um fragmento de seus rDNA 16S. Foi constatado o potencial para a descrição de novas espécies de rizóbio a partir destas linhagens, havendo, para isso, a necessidade de caracterizações mais diversificadas, abrangendo características fisiológicas, como a capacidade de metabolizar fontes diferenciadas de carbono e nitrogênio (F. Moreira, inf. pessoal).

## Metodologia

Sessenta e cinco linhagens de rizóbio das 171 caracterizadas por Moreira *et al.* (1993) foram selecionadas para estudo, incluindo as linhagens-tipo e referência das espécies já descritas na literatura.

As linhagens, mantidas em meio YMA (manitol-ext. de levedura) foram inicialmente inoculadas em meio TY(triptona-levedura), para crescimento até a fase logarítmica. As células coletadas e lavadas foram resuspendidas em meio MOPS com concentração celular padronizada, na ausência de qualquer açúcar, para ocorrer a derepressão de todas as vias metabólicas.

Os testes de utilização de fontes de carbono foram realizados em placas multipoços do tipo “Elisa” com os seguintes açúcares:

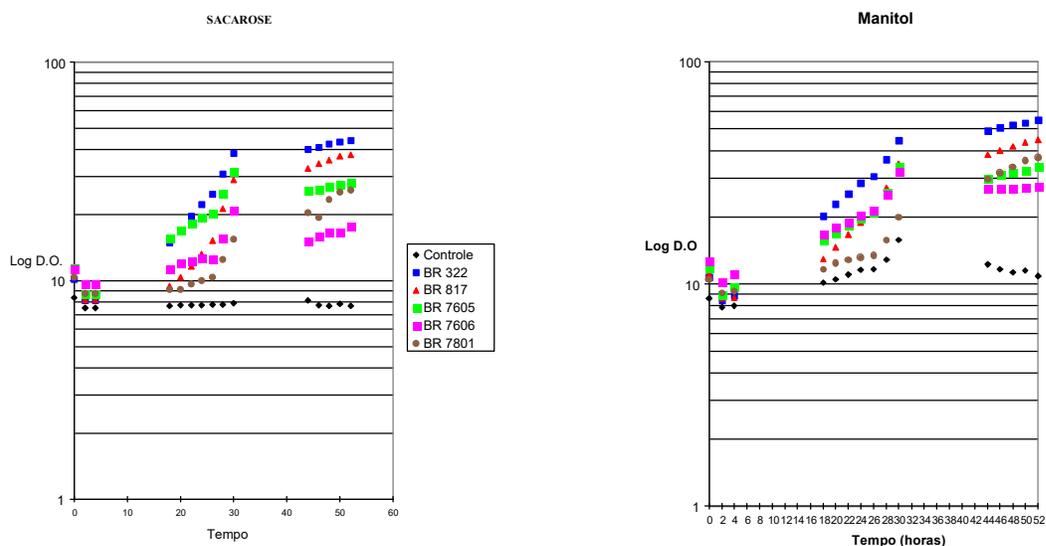
Manitol	Celobiose
Glicose	Adonitol
Sacarose	Acetato de sódio
Lactose	Citrato
Arabinose	Sorbose
Frutose	Glicerol
Galactose	Maltose
Inusitol	

As linhagens foram inoculadas em duplicata nos diferentes açúcares com um controle sem fonte de carbono. Cada açúcar também correspondeu a um controle sem inoculação. As placas foram incubadas a 28°C durante todo o tempo de análise. As leituras foram feitas pelo leitor de placas automatizado 340 ATTC (STI). Para cada poço foi desenhada uma curva de crescimento que foram então comparadas quanto a: 1) utilização do açúcar; 2) velocidade de crescimento; e 3) alcalinização ou acidificação do meio (através do uso do indicador de pH azul de bromotimol).

## Resultados e Conclusão

Os resultados obtidos com as curvas de crescimento (Figura 1) foram utilizados para elaborar um dendrograma de similaridade entre as linhagens. A utilização de fontes de carbono não foi suficiente para discriminar as linhagens a nível intra-específico sendo nestes casos relevante a determinação da inclinação da curva de crescimento (velocidade de crescimento). Na figura 1, note como é possível agrupar as estirpes BR322 e BR817 em função de suas velocidades de crescimento, com as estirpes BR7605 e BR7606 formando outro grupo de velocidade menor. Foi possível a análise de até 6 linhagens e 7 açúcares por placa, o que simplificou todo o processo. O uso do leitor automatizado de placas possibilitou a construção das curvas de crescimento das 6 linhagens por placa simultaneamente.

Figura 1. Crescimento de 5 linhagens de *Rhizobium* em duas fontes de carbono (manitol e sacarose).



Numa abordagem polifásica, os resultados serão comparados com as caracterizações previamente realizadas para estas mesmas linhagens (RAPD, MLEE, perfil de resistência à antibióticos, SDS-PAGE, e caracterização morfológica).

## Referências Bibliográficas

- Ahmad, M.H. *et al.* (1981). *Archives of Microbiology* 130:281-287.
- Boddey, R.M. *et al.* (1984). *Soil Biology and Biochemistry* 16:583-589.
- Dreyfus, B. *et al.* (1988). *International Journal of Systematic Bacteriology* 38:89-98.
- Ishizuka, J. (1992). *Plant and Soil* 141:197-209.
- Moreira, F.M.S. *et al.* (1993). *Systematic and Applied Microbiology* 16:135-146.
- Zhang, X. *et al.* (1993). *International Journal of Systematic Bacteriology* 41:104-113.