

Diferenciação Metabólica de Isolados de Bactérias Diazotróficas Através do Sistema BIOLOG

Ivanildo E. Marriel⁴, Amanda L. Borges¹, Fernanda M. S. Adelário² e Antônio C. Oliveira³

^{1,2}Bolsista, EMBRAPA Milho e Sorgo, CEP 35701-970, CP 151, Sete Lagoas-MG. ¹amandalimp@yahoo.com.br ²fernandamarcele@yahoo.com.br ^{3,4}Pesquisador, EMBRAPA Milho e Sorgo ³oliveira@cnpms.embrapa.br ⁴imarriel@cnpms.embrapa.br.

Palavras-chave: fixação biológica de nitrogênio, diazotróficas, perfil metabólico

O aumento da produção agrícola, necessário para atender ao crescimento da demanda de grãos, tem sido tradicionalmente alcançado com a incorporação de novas áreas de cultivo, além de ganhos em produtividade. A cultura do milho tem avançado principalmente em solos de cerrado, que apresentam nível de fertilidade inadequado para a nutrição das plantas, exigindo o uso de fertilizantes químicos, principalmente nitrogênio.

O nitrogênio é um dos nutrientes exigidos em maiores quantidades pelas plantas e representa parcela importante dos custos de produção agrícola, além de sua baixa eficiência de aproveitamento pelas plantas, que implica em riscos potenciais para o ambiente. Esses fatos justificam o interesse crescente de vários grupos de pesquisa em estudos sobre a fixação biológica de nitrogênio associada à gramíneas, inclusive milho e sorgo, para substituir, pelo menos, parte da adubação nitrogenada nestas culturas.

Atualmente, vários gêneros e espécies de bactérias têm sido isolados e caracterizados como bactérias fixadoras de nitrogênio, bactérias diazotróficas, em associação com gramíneas, com destaques para *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Paenibacillus*, *Burkholderia* etc. (BALDANI et al., 1986; BALDANI et al., 1997; DOBEREINER, 1990; SELDIN et al., 1984). Entretanto, a detecção de variações intra e interespecíficas entre isolados de bactérias diazotróficas associativas, através de provas taxonômicas clássicas, são tediosas e apresentam limitações técnicas para a sua identificação segura. O sistema biolog, utilizando microplacas GN2, introduzido inicialmente para identificação de bactérias gram-negativas, tem sido utilizado para caracterização de bactérias, através de fingerprints metabólicos gerados pelo padrão de utilização de diferentes substratos de carbono (GARLAND and MILLS, 1991; ZAK et al., 1994). O princípio deste método consiste na habilidade de um microrganismo utilizar e oxidar uma quantidade pré-selecionada de diferentes fontes de carbono. A utilização de cada substrato é detectada pela redução do tetrazolium, o qual produz uma cor púrpura característica (BRADLEY et al., 2006; GARLAND and MILLS, 1991; KONOPKA et al., 1998).

O presente trabalho teve por objetivo comparar o perfil metabólico de bactérias fixadoras de nitrogênio, através do Sistema Biolog, oriundas da coleção de bactérias diazotróficas do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo da EMBRAPA Milho e Sorgo.

Foram selecionados e analisados 30 isolados de bactérias diazotróficas (Tabela 1), com características fenotípicas distintas, obtidos à partir de amostras de solo, raiz e seiva de plantas de milho e sorgo, cultivadas sob diferentes sistemas de manejo. O perfil metabólico

desses isolados foi determinado de acordo com Zak et al. (1994), utilizando-se microplacas Biolog GN2 (Biolog, Inc. Hayward; A; USA). Os isolados foram testados quanto à pureza e cultivados em caldo de soja triplicaseína (TSB), sob agitação, centrifugados e ressuspendidos em solução salina, 0,85%. Após nova centrifugação, diluiu-se 2ml da suspensão em 18ml de solução salina. Alíquotas de 100µl da suspensão final foram transferidas para cada cavidade das microplacas Biolog GN2. Após incubação de 72 horas, efetuou-se a leitura de absorbância das reações em um leitor de placas (Labstems, Multiskan, MS), a 405 nm. Os dados obtidos foram transformados em dados binários, sendo atribuídos os valores de 1 ou 0 de acordo com a utilização ou não de cada fonte de carbono, para a construção de uma matriz; o algoritmo UPGMA e o Coeficiente de Jaccard (J) para geração de um dendograma de similaridade fenotípica, utilizando-se o programa NTSYS-pc.

Os resultados obtidos para atividade total para cada isolado testado equiivale à soma das atividades observadas em cada microplaca GN2 utilizada, que possui 95 fontes de carbono. Considerando-se o maior valor encontrado igual a 100%, estimou-se a eficiência relativa dos isolados (Figura 1).

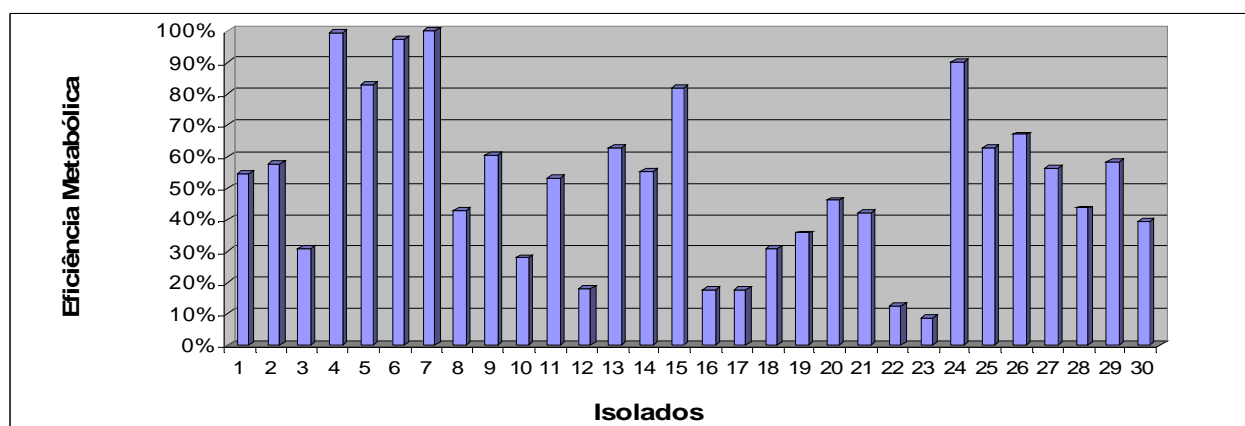


Figura 1: Eficiência metabólica equivalente à soma das atividades dos isolados, para cada substrato, considerando o maior valor encontrado igual a 100%.

As fontes de carbono existentes nas placas podem ser classificadas nos seguintes grupos: Polímeros (5), Carboidratos (28), Ác. Carboxílicos (27), Aminoácidos (20), Aminas (6) e Diversos (fosfatados, nucleotídeos e outros) (9). O grupo de carboidratos foi o mais utilizado, sendo metabolizado por mais de 81% dos isolados. Já o grupo diversos foi o menos utilizado, 51,48%. Comparando os isolados (dados não mostrados), observou-se que dentre o grupo de polímeros, a dextrina foi o substrato que obteve maior utilização (93,33%), já sua forma cíclica, α -ciclodextrina, foi a menos utilizada (33,33%). Dentre os carboidratos, L-arabinose, D-frutose, L-fucose, D-galactose, gentiobiase e D-manose foram utilizados por todos os isolados, sendo o i-erythritol o menos utilizado (33,33%). No grupo dos Ác. Carboxílicos, o éster metílico do ác. pirúvico e o ác. D-glucurônico foram utilizados por todos isolados, sendo o menos utilizado o ác. α -ceto-valérico (26,67%). Nos Aminoácidos, o ác. α -glutâmico e o glicil- α -glutâmico foram utilizados por todos isolados, sendo a D-serina a menos utilizada (20%). Nas aminas, a glucuronamida foi utilizada por todos e a feniletilamina foi metabolizada por apenas

33,33% dos isolados. Nos substratos diversos, mais de 80% dos isolados utilizaram a α -D-glicose-1-fosfato, sendo a timidina utilizada apenas por 10%. A timidina, entre todos os 95 substratos, foi a fonte de carbono utilizada pelo menor número de isolados (1, 4 e 7).

O número de substratos utilizados pelas amostras pode ser descrito como Riqueza de Substrato (S) (ZAK et al., 1994). Em relação a S, os isolados 4, 5, 6, 7 e 15 obtiveram maior número, tendo estes utilizados mais de 85 substratos. Já os isolados 12 e 22 utilizaram baixo número de substratos, 24 e 26, respectivamente.

Tabela 1. Origem dos isolados, riqueza de substrato (S) e utilização relativa de diferentes grupos de fonte de carbono em 30 estirpes de bactérias diazotróficas.

| Isolados | Origem | S | Polímeros | Carboid. | Ác. Carbox. | Aminoác | Aminas | Diversos |
|----------|----------------------|----|-----------|----------|-------------|---------|--------|----------|
| 1 | Seiva de Sorgo | 81 | 100% | 100% | 77,78% | 80% | 100% | 88,89% |
| 2 | Seiva de Sorgo | 59 | 60% | 71,43% | 59,26% | 55% | 100% | 44,44% |
| 3 | Seiva de Sorgo | 53 | 60% | 50% | 66,67% | 60% | 50% | 44,44% |
| 4 | Seiva de Milho | 87 | 100% | 92,86% | 92,59% | 100% | 100% | 88,89% |
| 5 | Seiva de Milho | 88 | 80% | 96,43% | 96,3% | 100% | 100% | 88,89% |
| 6 | Seiva de Milho | 85 | 80% | 89,29% | 96,3% | 100% | 100% | 77,78% |
| 7 | Raiz de Sorgo | 88 | 80% | 96,43% | 96,3% | 100% | 100% | 100% |
| 8 | Raiz de Sorgo | 72 | 100% | 82,14% | 88,89% | 65% | 66,67% | 44,44% |
| 9 | Raiz de Sorgo | 77 | 100% | 92,86% | 81,48% | 75% | 83,33% | 44,44% |
| 10 | Raiz de Sorgo | 55 | 40% | 60,71% | 51,85% | 85% | 33,33% | 55,56% |
| 11 | Raiz de Sorgo | 64 | 80% | 75% | 66,67% | 70% | 50% | 66,67% |
| 12 | Raiz de Milho | 24 | 20% | 35,71% | 29,63% | 15% | 16,67% | 11,11% |
| 13 | Raiz de Milho | 67 | 80% | 85,71% | 77,78% | 65% | 50% | 44,44% |
| 14 | Raiz de Milho | 69 | 60% | 96,43% | 59,26% | 80% | 50% | 55,56% |
| 15 | Raiz de Milho | 90 | 100% | 96,43% | 100% | 100% | 100% | 66,67% |
| 16 | <i>A. brasilense</i> | 63 | 100% | 82,14% | 55,56% | 65% | 83,33% | 22,22% |
| 17 | Grão de Milho | 48 | 60% | 71,43% | 51,85% | 35% | 50% | 11,11% |
| 18 | Estigma de Milho | 74 | 80% | 89,29% | 85,19% | 80% | 50% | 44,44% |
| 19 | Raiz de Milho | 44 | 100% | 78,57% | 29,63% | 35% | 33,33% | 22,22% |
| 20 | Seiva de Milho | 65 | 100% | 92,86% | 55,56% | 55% | 66,67% | 44,44% |
| 21 | <i>A. lipoferum</i> | 42 | 60% | 60,71% | 40,74% | 25% | 50% | 33,33% |
| 22 | Raiz de Milho | 26 | 20% | 32,14% | 29,63% | 30% | 16,67% | 11,11% |
| 23 | Seiva de Milho | 39 | 80% | 50% | 48,15% | 25% | 16,67% | 33,33% |
| 24 | Seiva de Sorgo | 82 | 100% | 100% | 74,07% | 95% | 83,33% | 88,89% |
| 25 | Seiva de Milho | 71 | 60% | 100% | 55,56% | 90% | 66,67% | 66,67% |
| 26 | Seiva de Milho | 84 | 80% | 100% | 85,19% | 95% | 83,33% | 88,89% |
| 27 | Raiz de Milho | 54 | 20% | 96,43% | 33,33% | 65% | 33,33% | 33,33% |
| 28 | Raiz de Sorgo | 55 | 80% | 89,29% | 51,85% | 50% | 16,67% | 22,22% |
| 29 | Raiz de Trigo | 72 | 80% | 96,43% | 70,37% | 80% | 50% | 44,44% |
| 30 | Solo de Cerrado | 73 | 60% | 89,29% | 77,78% | 85% | 50% | 55,56% |

Os resultados para índice de similaridade entre os isolados, obtidos com base nos dados de utilização das fontes de carbono, estão apresentados na Figura 2. Observa-se que os 30 isolados foram distribuídos em 8 grupos, sendo o grupo A formado por 18 isolados; grupos B e C formados por apenas 1 isolado; e os grupos restantes (D,E,F,G e H) formados por 2 isolados. No grupo A, constituído por 12 subgrupos, estão os isolados com maior similaridade com a

espécie de *Azospirillum lipoferum* e os demais mais próximos de *Azospirillum brasilense*. Estas duas estirpes foram incluídas como referências no estudo. A distribuição dos isolados nos diferentes grupos e subgrupos ocorreu independentemente da origem dos isolados e evidência diversidade metabólica elevada entre as bactérias testadas.

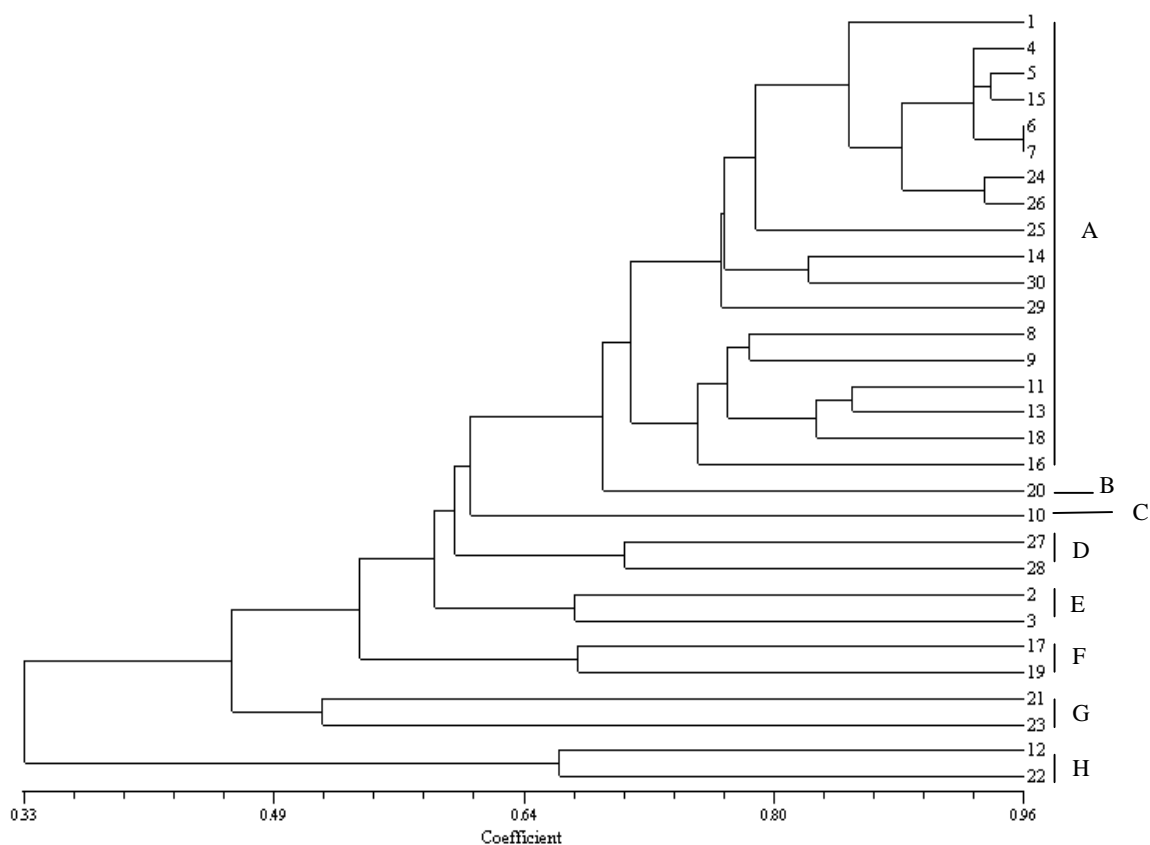


Figura 2: Dendrograma de similaridade construído de acordo com o perfil metabólico dos 30 isolados de bactérias diazotróficas, utilizando-se algoritmo UPGMA e o Coeficiente de Jaccard.

Em geral, todos substratos foram metabolizados, porém em diferentes intensidades e por diferentes isolados. Assim como, todos isolados utilizaram pelo menos um substrato de cada grupo. Conclui-se que o padrão de utilização de substratos evidência elevada diversidade metabólica entre bactérias diazotróficas associativas isoladas de plantas de milho e sorgo e permite a diferenciação entre isolados pertencentes às espécies de *A. lipoferum* e de *A. brasilense*.

Referências bibliográficas

- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, V.L.D. et al. Bactérias fitopatogênicas fixadoras de N₂ em associação com plantas. Seropédica, 1997. Documentos EMBRAPA Agrobiologia. 26 p. ISSN 0104-6187.
- BRADLEY, R.L; SHIPLEY, B.; BEAULIEU, C. Refining numerical approaches for analyzing soil microbial community catabolic profiles based on carbon source utilization patterns. *Soil Biol. Biochem.* 38: 629-632, 2006.
- DOBEREINER, J. Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica de nitrogênio no Brasil. *Estud. av.* , São Paulo, v. 4, n. 8, 1990 .
- GARLAND, J.L.; MILLS, A.L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology*. 57. 2351-2359. 1991.
- KONOPKA, A.; OLIVER, L.; TURCO Jr., R.F. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. *Micro. Ecol.* 35, 103-115. 1998.
- SELDIN, L.; VAN ELSAS, J. D.; PENIDO, E. G. C. *Bacillus azotofixans* sp. nov., a nitrogen-fixing species from Brazilian soils and grass roots. *Int J Syst Bacteriol* 34, 451-456. 1984.
- ZAK, J.C. et al. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biol. Biochem.* 26:1101-1108, 1994.