

Documentos

ISSN 0104-6187

Número, 121

Dezembro/2000



**Organização e Manutenção da Coleção de Bactérias
Diazotróficas do CNPAB – I. Dados referentes ao
período de janeiro de 1994 a dezembro de 1999.**

Embrapa

***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Agrobiologia
Ministério da Agricultura e do Abastecimento***

República Federativa do Brasil

Presidente

Fernando Henrique Cardoso

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Ministro

Marcus Vinicius Pratini de Moraes

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Diretor Presidente

Alberto Duque Portugal

Diretores

Elza Ângela Battaggia Brito da Cunha

Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

Embrapa Agrobiologia

Chefe Geral

Maria Cristina Prata Neves

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Sebastião Manhães Souto

Chefe Adjunto Administrativo

Vanderlei Pinto

DOCUMENTO Nº 121

ISSN 0104-6187

Dezembro/2000

**Organização e Manutenção da Coleção de Bactérias
Diazotróficas do CNPAB – I. Dados referentes ao
período de janeiro de 1994 a dezembro de 1999.**

Rosa Maria Pitard

***Seropédica - RJ
2000***

Exemplares desta publicação podem ser solicitadas à:

Embrapa **Agrobiologia**

Caixa Postal: 74505

23851-970 – Seropédica – RJ

Telefone: (021) 682-1500

Fax: (021) 682-1230

e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Expediente:

Revisor e/ou ad hoc: Bruno José Rodrigues Alves

Tiragem: 50 exemplares

Comitê de Publicações: Sebastião Manhães Souto (Presidente)

José Ivo Baldani

Norma Gouvêa Rumjanek

José Antonio Ramos Pereira

Robert Michael Boddey

Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

PITARD, R.M. **Organização e Manutenção da Coleção de Bactérias Diazotróficas do CNPAB – I. Dados referentes ao período de janeiro de 1994 a dezembro de 1999.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 2000. 13p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 121).

ISSN 0104-6187

1. Bactéria. 2. Diazotrófica. I. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). II. Título. III. Série.

CDD 633.851

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	4
2. RESULTADOS	7
3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	13

FIGURAS:

- Figura 1 – Distribuição das culturas de bactérias diazotróficas na Coleção da Embrapa Agrobiologia.....	10
- Figura 2 – Distribuição de culturas de bactérias diazotróficas para o Brasil e para o exterior.....	11
- Figura 3 – Tela inicial de identificação dos microrganismos da Base de Dados da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia.....	12

Organização e Manutenção da Coleção de Bactérias Diazotróficas do CNPAB – I. Dados referentes ao período de janeiro de 1994 a dezembro de 1999. ¹

Rosa Maria Pitard ²

1. Resumo

A incorporação de novas áreas para a produção de alimentos e o crescente desenvolvimento tecnológico observado nos últimos 50 anos, trouxeram grande depredação do meio ambiente com perda da biodiversidade. Com isso, a conscientização para a preservação do patrimônio ecológico, incentivou a comunidade científica a desenvolver tecnologias eficientes na produção de alimentos, visando ao desenvolvimento de uma agricultura sustentável. Os microrganismos fixadores de nitrogênio, associados às leguminosas e gramíneas, contribuem para a produção de alimentos sem degradação do meio ambiente, representando importante fonte genética a ser mantida para uso futuro.

A Embrapa Agrobiologia é o Centro de referência para bactérias diazotróficas da Embrapa possuindo uma extensa coleção de rizóbios para leguminosas arbóreas, adubação verde, forrageiras, leguminosas de grãos e de bactérias diazotróficas associadas às gramíneas e outras espécies vegetais não leguminosas de interesse econômico. As culturas, mantidas na coleção da Embrapa Agrobiologia, são provenientes dos diversos levantamentos da ocorrência de bactérias diazotróficas realizados em diferentes regiões do Território Nacional, devido a necessidade constante de se melhorar o aproveitamento destas espécies nos diversos sistemas produtivos. A Coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia está listada no WFCC-MIRCEN - World Data Center on Microorganisms, com o número 364, sendo reconhecida pela identificação BR em suas culturas.

¹ Trabalho referente a resultados alcançados no período de execução do subprojeto 02.0.94.008-03, Organização e Manutenção da Coleção de Bactérias Diazotróficas do CNPAB.

² Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia, Curadora da Coleção de Culturas; Caixa Postal 74.505, CEP.: 23.851-970, Seropédica-RJ.

As culturas microbianas mantidas nessa Coleção, não só representam um acervo de extrema importância para a Embrapa, como também para a sociedade em geral. Além disso, essa Coleção tem como uma de suas funções primordiais não somente a avaliação e a preservação de seu acervo em um estado viável, geneticamente estável e livre de contaminação, como também o fornecimento de culturas para a pesquisa em diversas Instituições no Brasil e no exterior. Nessa Coleção estão preservadas as estirpes de rizóbio para a produção de inoculantes, não disponíveis no mercado.

Todas as culturas de bactérias diazotróficas, isoladas de diferentes espécies hospedeiras, são preservadas tanto em tubos de ensaio, contendo meios de cultivo próprios para seu desenvolvimento, como na forma liofilizada. No processo da liofilização, as células são desidratadas a baixa temperatura sob vácuo, reduzindo ao mínimo seu metabolismo e mantendo sua efetiva viabilidade e estabilidade genética a longo prazo. Em placas de Petri, contendo meio de cultivo apropriado e sob condições adequadas de temperatura e umidade, as culturas bacterianas são avaliadas quanto a sua pureza e caracterizadas morfológica e fisiologicamente. Neste tipo de caracterização, as culturas bacterianas são observadas quanto ao seu tipo de crescimento; a quantidade e consistência de muco produzido; cor, transparência, tamanho, forma, borda, elevação e superfície da colônia e variação do pH do meio de cultivo. Também são feitos testes bioquímicos, em que se verifica, entre outras coisas, a utilização pela bactéria de outras fontes de carbono; observação microscópica da célula, para verificação de sua motilidade e microscopia eletrônica de transmissão, para observação da localização dos flagelos. A partir destas observações, cadastradas na forma de fichas, e com a utilização de técnicas biomoleculares são desenvolvidos trabalhos de pesquisa, nos quais podem ocorrer a reclassificação das culturas bacterianas e mesmo descrição de novas espécies.

A Coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia possui um acervo de aproximadamente 8000 culturas, em que cerca de 21% (1671 culturas) já está caracterizado morfofisiologicamente, tendo recebido a identificação BR. Deste total, 67% é constituído por culturas de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium* e *Sinorhizobium*, isoladas de diversas espécies de leguminosas de grãos (principalmente feijoeiro, soja e caupi), de leguminosas utilizadas para

adubação verde, forrageiras e de espécies arbóreas (provenientes da Mata Atlântica e da Amazônia). As culturas de *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, isoladas de trigo, arroz, sorgo, dendê, abacaxizeiro e bananeira, de *Acetobacter* isoladas de cana-de-açúcar e de batata-doce, além de culturas de *Azotobacter*, *Azoarcus*, *Beijerinckia* e outras, obtidas através do intercâmbio entre coleções, constituem 28% dos isolados. Cerca de 5% dos isolados são culturas de bactérias modificadas geneticamente. Em um levantamento feito no cadastro de clientes da Coleção, especificamente constituído por pesquisadores de Universidades e Institutos de Pesquisa brasileiros e do exterior, verificou-se que através das 269 solicitações atendidas para o envio de culturas, durante o período de duração deste subprojeto (janeiro de 1994 a dezembro de 1999), foram enviadas 1411 culturas, sendo que 60,50% das solicitações foram de rizóbios, mais pesquisados no Brasil, e 39,50% foram de bactérias associadas a gramíneas e outras espécies não leguminosas, mais pesquisadas no exterior. A coleção tem servido ainda como base para a produção de inoculantes para leguminosas, tendo sido produzidas 5373 unidades de inoculantes para atendimento aos agricultores e aos mais diferentes projetos de pesquisa.

Está sendo implementada uma Base de Dados informatizada da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia, atualmente com 91 acessos. Foram introduzidas melhorias no programa, tais como: a introdução de fotos das culturas em placas com meio de cultivo e o fornecimento do relatório completo dos dados solicitados, o qual pode ser impresso, inclusive com as fotos, havendo uma opção de consulta através de busca por hospedeiro. O programa está sendo implementado para permitir outros tipos de consultas, que auxiliarão os trabalhos relacionados ao estudo destes microrganismos.

2. Resultados

Os diferentes isolados de bactérias diazotróficas associadas a diversas espécies vegetais hospedeiras, foram caracterizados morfofisiologicamente nos meios de crescimento específicos. No caso de estirpes de rizóbio selecionadas para incorporação na coleção de culturas, a caracterização é realizada em meio levedura-

manitol-ágar (YMA), onde são observadas: 1) sua habilidade de provocar a variação do pH do meio (qualitativamente observado pela adição de azul de bromotimol ao meio de cultura); 2) tipo de crescimento (Rápido: 2-3 dias; Intermediário: 4-5 dias; Lento: 6-9 dias; Muito Lento: 10 dias ou mais); 3) elevação das colônias (plana; lenticular; convexa ou pulvinada); 4) forma das colônias (puntiforme; circular ou irregular); 5) borda das colônias (inteira ou ondulada); 6) detalhes ópticos (transparentes; translúcidas; opacas ou brilhantes); 7) quantidade de crescimento (escassa, moderada ou abundante); 8) consistência da massa de crescimento (viscosa; pegajosa; butírica; seca; aquosa ou gomosa) e 9) cor das colônias (branca; amarela; rosa; vermelha, etc.). Posteriormente será realizada esta caracterização morfofisiológica descrita para os isolados de bactérias diazotróficas associativas.

Estas culturas, isoladas das diversas espécies de leguminosas, estão sendo preservadas tanto pelo método de tubos contendo meio de cultura coberto com vaselina líquida esterilizada quanto pelo da liofilização. Os isolados de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas e outras espécies vegetais não leguminosas também estão sendo preservados pelos mesmos métodos utilizados para rizóbio, com exceção dos isolados de *Acetobacter diazotrophicus*. Para esta espécie, o modo de preservação preferencial é pela liofilização, sendo esta a melhor forma de manter sua viabilidade por um longo período.

Em relação a Base de Dados da Coleção de Culturas, esta foi inicialmente elaborada pela Embrapa Informática Agropecuária (CNPTIA). Após a migração do programa utilizado – DELPH para o ACCESS, foram importados todos os dados já existentes de PARADOX para o MDB. Desta maneira, foi possível viabilizar a introdução de fotos das culturas padrão ou das características típicas da espécie do microrganismo (Figura 3) e a elaboração dos campos do relatório completo, contendo todas as informações de cada cultura, com a possibilidade de impressão. Também foi disponibilizada a opção de consulta sobre as culturas existentes na Coleção, através de busca por hospedeiro. Porém, nos testes efetuados, foram detectados alguns problemas, e medidas foram tomadas para que sejam realizados os ajustes necessários, além da inserção de outros tipos de consultas. Estas modificações deverão ser implementadas dentro do novo projeto da Coleção.

Desde o início deste subprojeto, foram purificadas, caracterizadas e estocadas, pelos dois métodos de preservação, 1856 estirpes de rizóbio obtidas de diferentes espécies de leguminosas e 496 associadas a gramíneas e a outras espécies vegetais não leguminosas (Tabela 1). Foram enviadas 1411 estirpes atendendo a 269 solicitações feitas por diversas instituições, tanto do Brasil como do exterior, para trabalhos de pesquisa (Tabela 2). Em um levantamento feito no cadastro de clientes da Coleção, especificamente constituído por pesquisadores de Universidades e Institutos de Pesquisa brasileiros e do exterior, verificou-se que através das solicitações atendidas para o envio de culturas, foi possível observar que 60,50% das solicitações foram de rizóbios, mais pesquisados no Brasil, e 39,50% foram de bactérias associadas a gramíneas e outras espécies não leguminosas, mais pesquisadas no exterior (Figura 2). Estes dados foram publicados em trabalhos apresentados para divulgação em diversos congressos e simpósios no Brasil (Pitard & Franco, 1995; Pitard & Franco, 1997 a; Pitard & Franco, 1997 b; Pitard, 1999).

A Coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia possui um acervo de aproximadamente 8000 culturas, das quais 1671 culturas já se encontram caracterizadas e catalogadas (Figura 1), sendo que 67% deste total é constituído por culturas de rizóbio, pertencentes a diferentes gêneros (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium* e *Sinorhizobium*), isoladas de diversas espécies de leguminosas, provenientes da Mata Atlântica, Amazônia, Pantanal e do Sertão e Agreste Nordeste. As culturas de *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, isoladas de trigo, arroz, sorgo, dendê, abacaxizeiro e bananeira, de *Acetobacter*, isoladas de cana-de-açúcar e de batata-doce, além de culturas de *Azotobacter*, *Azoarcus*, *Beijerinckia* e outras, obtidas através do intercâmbio entre coleções, constituem 28% dos isolados. Cerca de 5% dos isolados são de culturas de bactérias modificadas geneticamente.

Tabela 1. Estirpes purificadas, caracterizadas e estocadas pelos dois métodos.

	Isolados Novos						Avaliação de Culturas já existentes						Total
	1994	1995	1996	1997	1998	1999	1994	1995	1996	1997	1998	1999	
Leguminosas	634	97	272	93	08	21	278	137	107	83	75	51	1856
Gram. e não Leguminosas	19	41	43	40	54	04	39	41	114	17	38	46	496
Total	653	138	315	133	62	25	317	178	221	100	113	97	2352

Tabela 2. Culturas de bactérias diazotróficas distribuídas a diversas Instituições de Pesquisa, no Brasil e no Exterior.

	Rizóbio						Bactérias Diazotróficas Associativas						Total
	1994	1995	1996	1997	1998	1999	1994	1995	1996	1997	1998	1999	
SNPA	44	75	42	16	56	06	04	17	30	30	8	00	328
Univ.-Brasil	50	154	44	11	105	59	07	04	15	30	17	22	518
Univ.-Exter. Inst. Pesq.- Exterior	20	27	25	02	09	11	36	31	76	29	27	08	301
	17	52	11	16	01	01	68	21	28	17	09	23	264
Total	131	308	122	45	171	77	115	73	149	106	61	53	1411

Figura 1 – Distribuição das culturas de bactérias diazotróficas na Coleção da Embrapa Agrobiologia.

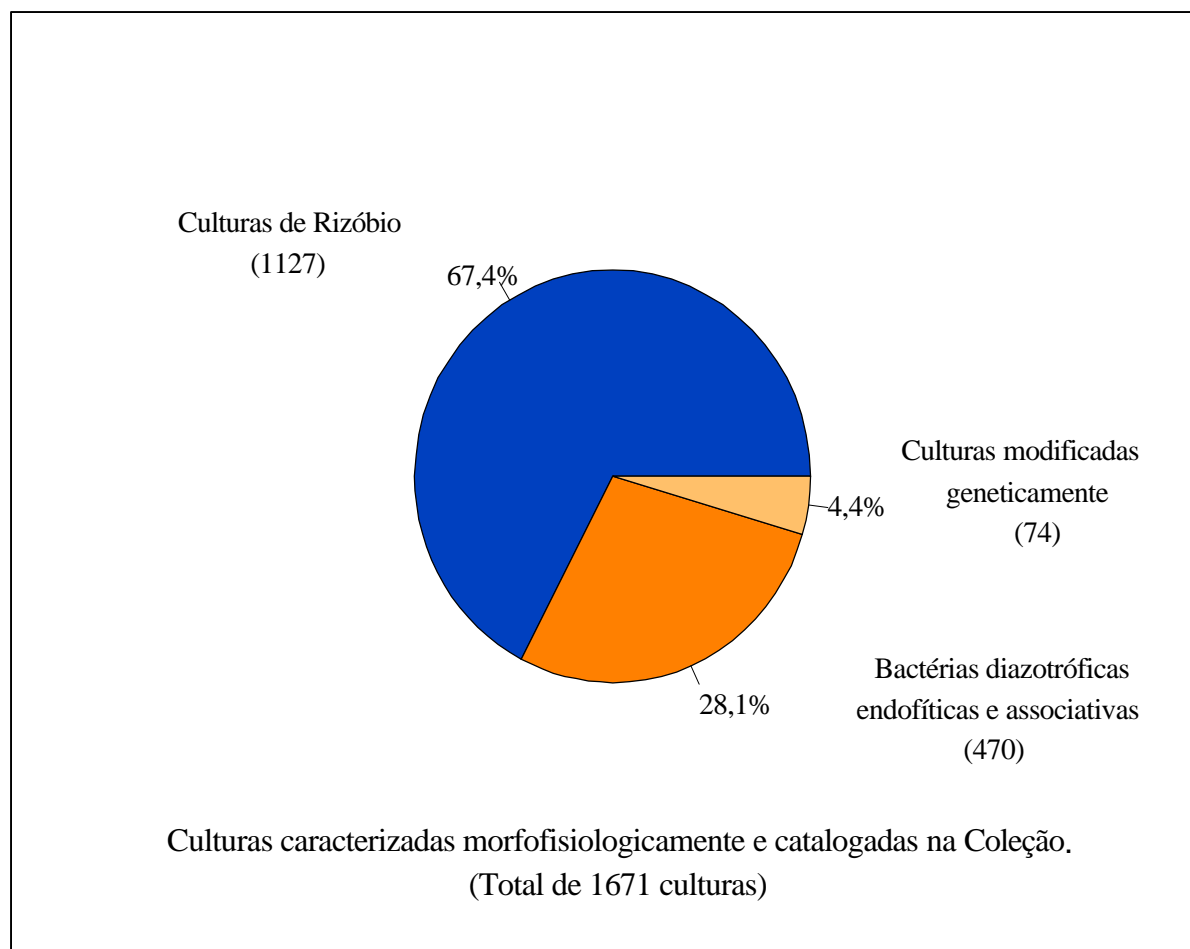


Figura 2 – Distribuição de culturas de bactérias diazotróficas para o Brasil e para o exterior (Total = 1411 culturas; Período: jan. 1994 a dez 1999)

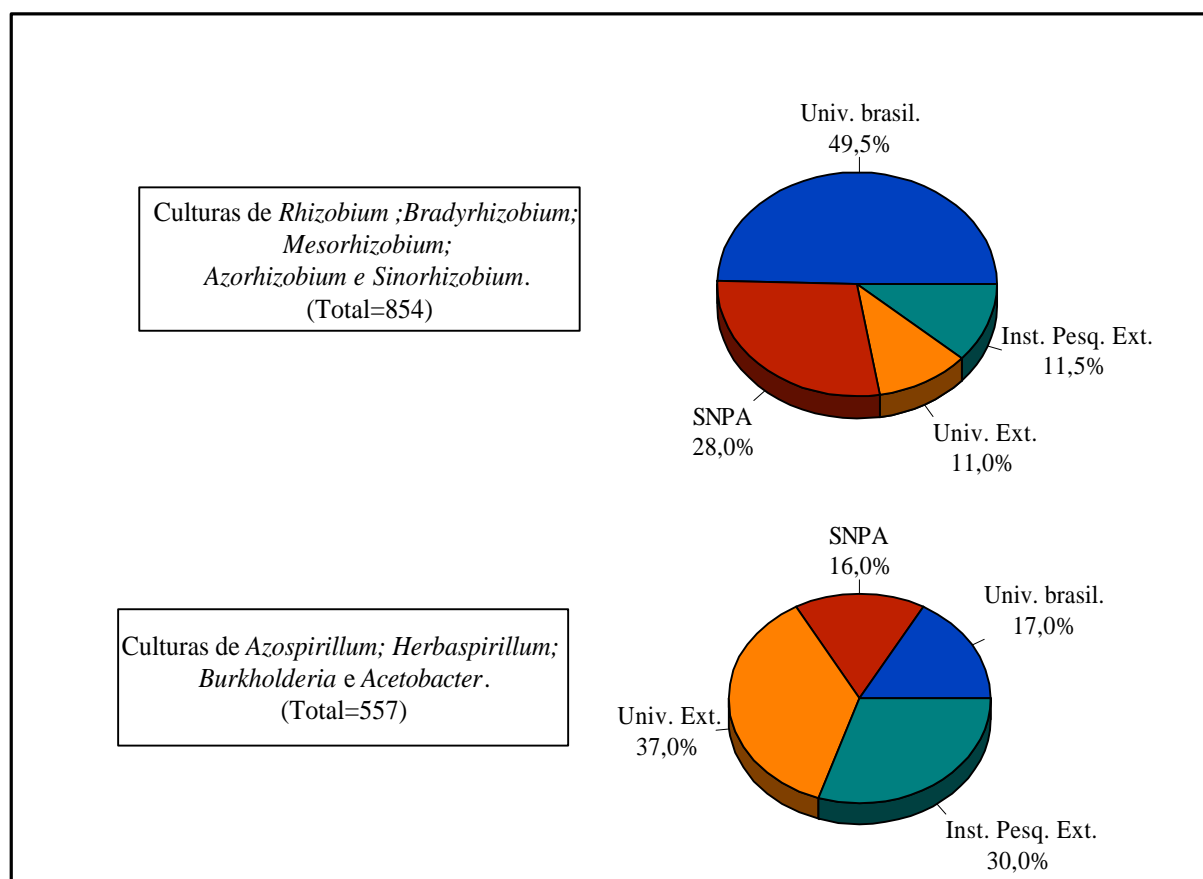


Figura 3 – Tela inicial de identificação dos microrganismos da Base de Dados da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia.

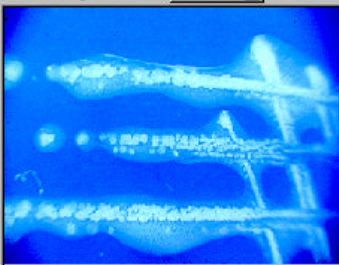
CCBD - Coleção de Cultura de Bactérias Diazotróficas

Arquivo Editar Inserir Registros Janela Ajuda

Microrganismo

Procurar Microrganismo

Identificação BR



Outras Designações

Classificação

Gênero

Espécie

Subespécie

Complemento

Caracterização Genética

%G + C

Identificação Confirmada por

Hospedeiro original

Escolha o Hospedeiro Hospedeiro

Outras Coleções

<input type="text" value="SEMA"/>	<input type="text" value="5019"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Novo Microrganismo Editar Excluir Salvar

Coleta Isolamento Fisiologia Coleção Bibliografia Outros Hospedeiros

Registro: de 91

Número da estirpe (microrganismo) na coleção da Embrapa Agrobiologia NUM

Iniciar Explorando - Ccbd CCBD - Coleção de C... 13:39

4. REFERÊNCIAS

- PITARD, R.M. The diazotrophic Culture Collection of Embrapa Agrobiologia. In: 12th INTERNATIONAL CONGRESS ON NITROGEN FIXATION, september 1999, Foz do Iguaçu, PR. **Resumos...** Foz do Iguaçu: Embrapa/UFPR, 1999. p. 59.
- PITARD, R. M.; FRANCO, A. A. Embrapa-CNPAB diazotrophic microbial culture collection. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS – THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995. **Abstracts...** Angra dos Reis: Embrapa-CNPAB; UFRRJ; The Brazilian Academy of Sciences, 1995. p. 95-96.
- PITARD, R. M.; FRANCO, A. A. Coleção de culturas de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26., jul. 1997, Rio de Janeiro, **Resumos...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1997a. Seção Temática 3. 1 CD-ROM.
- PITARD, R. M.; FRANCO, A. A. Coleção de culturas de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia In: SEMINÁRIO BIENAL DE PESQUISA, 8., NOV. 1997, Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro: UFRRJ, 1997b.