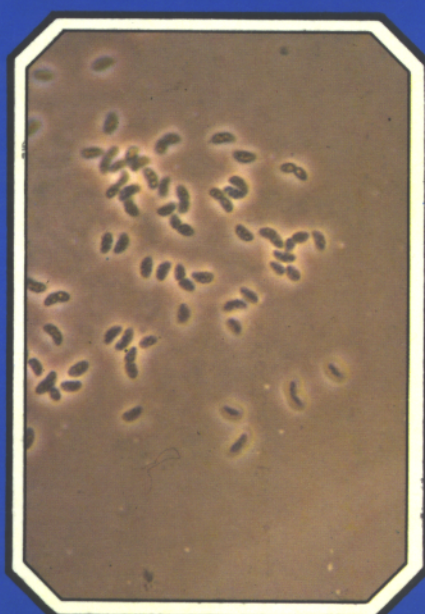
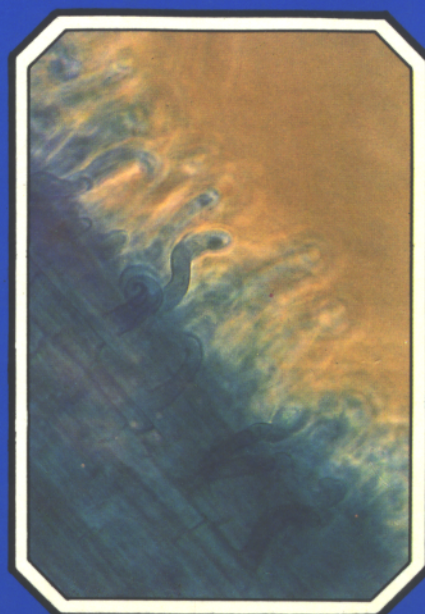



MANUAL DE MÉTODOS EMPREGADOS EM ESTUDOS DE MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA



Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária
 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA
Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão - CNPAF
Centro Nacional de Pesquisa de Soja - CNPSo

MANUAL DE MÉTODOS EMPREGADOS EM ESTUDOS DE MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA

Editores:

Mariangela Hungria

Ricardo S. Araujo

EMBRAPA
Serviço de Produção de Informação
Brasília, DF
1994

Comitê de Publicações

Pedro A. Arraes Pereira (CNPAF/Presidente)

Carlos Caio Machado (CNPSO/Presidente)

Editoração e Programação Visual

Antônio Carlos Naves (CNPAF/Consultoria)

Danilo Estevão (CNPSO/Desenhos)

Hélvio B. Zemuner (CNPSO/Fotografias)

Lígia M. de O. Chueire (CNPSO/Revisão)

Moisés de Aquino (CNPSO/Digitação)

Sebastião José de Araújo (CNPAF/Capa)

Simone E. Grosskoph (CNPSO/Datilografia)

Sinábio de Sena Ferreira (CNPAF/Digitação)

Temis R. Bohrer (CNPSO/Digitação)

Normatização Bibliográfica

Ademir Benedito A. de Lima (CNPSO/Coordenação)

Ana Lúcia D. de Faria (CNPAF/Catálogo na Fonte)

Tiragem: 1.000 exemplares.

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.

Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola / Editores Mariangela Hungria, Ricardo S. Araujo ; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão, Centro Nacional de Pesquisa de Soja. - Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 542p. - (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 46).

ISSN 0101-9716

1. Microbiologia agrícola. 2. Solos - Microrganismos. I. Hungria, Mariangela. II. Araujo, Ricardo S. III. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (Goiânia, GO). IV. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Londrina, PR). V. Série.

CDD 631.46

©EMBRAPA, 1994

APRESENTAÇÃO

Os trabalhos de pesquisa sobre microbiologia do solo dependem da precisão e da aplicabilidade dos métodos de estudo. Seja na análise de comunidades microbianas, seja no estudo de processos específicos, muitos dos métodos empregados foram e ainda são adaptados de situações semelhantes vividas no exterior, ou não se aplicam diretamente às nossas condições.

Este manual representa um esforço no sentido de compilar em um só volume, e em português, os métodos e técnicas empregados nos estudos dos microrganismos do solo de importância agrícola. O objetivo de sua elaboração foi facilitar a consulta e o trabalho realizado nos laboratórios que se dedicam a esse importante ramo da ciência do solo.

Homero Aidar
Chefe do CNPAF

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	3
INTRODUÇÃO	
<i>Mariangela Hungria & Ricardo S. Araujo</i>	19
PARTE I.	
PRINCÍPIOS BÁSICOS EM UM LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA	
Capítulo 1. Segurança, Equipamentos e Técnicas em um Laboratório de Microbiologia do Solo	
<i>Mariangela Hungria; Ricardo S. Araujo; Fábio F. de Araújo & Euan James</i>	21
1.1. Segurança	21
1.1.1. Regras Básicas	21
1.1.2. Segurança no Laboratório	22
1.1.3. Contaminação por Microrganismos	22
1.1.4. Contaminação por Produtos Químicos	24
1.1.5. Contaminação por Produtos Radioativos	24
1.2. Equipamentos e Material de Consumo	25
1.2.1. Equipamentos	25
1.2.2. Material de Consumo	33
1.3. Técnicas Básicas em um Laboratório de Microbiologia	35
1.3.1. Esterilização e Desinfestação	35
1.3.1.1. Esterilização	35
1.3.1.2. Desinfestação	38
1.3.2. Técnicas de Inoculação de Bactérias	38
1.3.3. Microscopia	41
1.3.3.1. Microscópio óptico	41
1.4. Considerações Finais	42
1.5. Referências Bibliográficas	43
PARTE II.	
ESTUDOS SOBRE A ASSOCIAÇÃO RIZÓBIO-LEGUMINOSAS	
Capítulo 2. Coleta de Nódulos e Isolamento de Rizóbios	
<i>Mariangela Hungria</i>	45
2.1. Introdução	45
2.2. A Planta Hospedeira	46
2.3. O Microssimbionte	49
2.4. Princípio do Isolamento	51
2.5. Coleta de Nódulos	52
2.6. Isolamento do Rizóbio	54
2.7. Verificação do Crescimento	55

2.8. Autenticação do Rizóbio	57
2.9. Considerações Finais	59
2.10. Referências Bibliográficas	59
Capítulo 3. Estimativa do Número de Células de Rizóbio no Solo e Inoculantes por Infecção em Planta	
<i>Diva de Souza Andrade & Paulo José Hamakawa</i>	63
3.1. Introdução	63
3.2. Amostragem	64
3.2.1. Amostragem	64
3.2.2. Instrumentos para Amostragem	64
3.2.3. Profundidade de Amostragem	64
3.2.4. Cuidados Durante a Coleta e o Armazenamento.	64
3.2.4.1. Desinfestação	64
3.2.4.2. Identificação da amostra	65
3.3. Preparo da Amostra de Solo e Inoculante	65
3.3.1. Peneiramento do Solo	65
3.3.2. Determinação da Umidade da Amostra.	65
3.4. Diluições Sucessivas e Inoculação	66
3.4.1. Preparo da Solução Diluente	66
3.4.2. Seleção, Desinfestação e Pré-Germinação das Sementes	66
3.4.2.1. Seleção	66
3.4.2.2. Desinfestação	66
3.4.2.3. Pré-germinação	67
3.4.2.4. Sementes pequenas	67
3.4.2.5. Sementes grandes	68
3.4.3. Preparo das Diluições	71
3.4.4. Condições de Cultivo	74
3.4.5. Inoculação	75
3.5. Avaliação da Nodulação	75
3.6. Estimativa do Número mais Provável (NMP)	75
3.6.1. Princípios Estatísticos do Método	76
3.6.2. Tabela de Números Mais Prováveis	77
3.6.3. Exemplo	91
3.6.4. Comentários	91
3.7. Considerações Finais	92
3.8. Referências Bibliográficas	92
Capítulo 4. Produção de Biomassa Celular de Rizóbio	
<i>Luiz C. Urenha; José G. C. Pradella; Margarette S. Oliveira & Antônio Bonomi</i>	95
4.1. Exigências Nutricionais	95
4.1.1. Características Gerais dos Gêneros <i>Bradyrhizobium</i> e <i>Rhizobium</i>	95
4.1.2. Formulação de Meios de Cultura.	95
4.1.3. Fontes de Carbono	98

4.1.4. Fontes de Nitrogênio	99
4.1.5. Fatores de Crescimento	100
4.1.6. Soluções de Micronutrientes	100
4.1.7. Meios de Cultura para <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	102
4.1.7.1. Recuperação do liofilizado	102
4.1.7.2. Manutenção em meio líquido ou sólido (meio YM)	102
4.1.7.3. Meio para cultivo em fermentador	103
4.1.8. Meios de Cultura para <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>phaseoli</i>	103
4.1.8.1. Recuperação do liofilizado e manutenção	103
4.1.8.2. Meio para cultivo em fermentador	103
4.1.9. Meios de Cultura Para Outros Rizóbios	103
4.2. Medidas de Crescimento	104
4.2.1. Em Meio Líquido	104
4.2.1.1. Contagem em câmara de Petroff-Hausser	104
4.2.1.2. Estimativa da concentração celular por transmitância	105
4.2.1.3. Determinação de células viáveis - unidades formadoras de colônias (UFC)	105
4.2.1.4. Determinação da massa celular	106
4.2.2. Em meio sólido	106
4.3. Cinética de Crescimento	107
4.3.1. Fases de Crescimento	107
4.3.2. Influência da Agitação e da Aeração	111
4.3.3. Influência do pH e da Temperatura	112
4.3.4. Influência de Componentes do Meio de Cultura	113
4.4. Produção de Biomassa	115
4.4.1. Cultivo Descontínuo	115
4.4.2. Cultivo Descontínuo-Alimentado.	118
4.4.3. Cultivo Contínuo	119
4.5. Veiculação	127
4.5.1. Inoculantes Agrícolas	127
4.5.2. Seleção de Linhagens	127
4.5.3. Veiculação	129
4.5.4. Veiculação em Suportes Sólidos	129
4.5.5. Outros tipos de veiculação	131
4.6. Controle de Contaminação no Produto	132
4.7. Referências Bibliográficas	135
Capítulo 5. Preservação de Cultura de Rizóbio	
<i>Luiziana F. da Silva & Margarette S. Oliveira</i>	139
5.1. Introdução	139
5.2. Subcultivo	141
5.3. Suspensão em Água	141
5.4. Liofilização	142
5.5. Criopreservação	144
5.6. Considerações Finais	146
5.7. Referências Bibliográficas	146

Capítulo 6. Cultivo em Escala Comercial	
Fábio F. de Araújo	149
6.1. Introdução	149
6.2. Componentes Essenciais para Produção de Inoculantes	149
6.2.1. O Veículo ou Substrato	149
6.2.2. Meios de Cultura	150
6.2.3. Estirpes de <i>Rhizobium</i> e <i>Bradyrhizobium</i>	150
6.3. Fermentação em Escala Comercial.....	150
6.3.1. Cultivo	151
6.3.2. Controle de Qualidade do Caldo.....	152
6.4. Mistura do Caldo ao Veículo (turfa)	152
6.5. Armazenamento e Prazo de Validade	153
6.6. Controle de Qualidade do Inoculante	153
6.7. Comercialização	154
6.8. Considerações Finais	154
6.9. Referências Bibliográficas	155
Capítulo 7. Caracterização Morfológica, Fisiológica e Bioquímica do Rizóbio	
Ricardo S. Araujo	157
7.1. Introdução	157
7.2. Características Morfológicas	157
7.2.1. Tamanho das Células	157
7.2.2. Forma da Célula	158
7.2.3. Motilidade.....	159
7.2.4. Flagelos.....	160
7.2.5. Forma das Colônias.....	160
7.2.6. Inclusões Celulares.....	163
7.2.7. Microscopia de Contraste de Fase	163
7.3. Características Fisiológicas	163
7.3.1. Taxa de crescimento.....	163
7.3.2. Absorção de Corantes	163
7.3.3. Modificação do pH do Meio de Cultura.....	164
7.3.4. Crescimento em Meios Modificados.....	164
7.3.5. Resistência Intrínseca a Antibióticos	165
7.4. Características Bioquímicas	168
7.4.1. Coloração de Gram	168
7.4.2. Outras Características Bioquímicas.....	169
7.5. Considerações Finais	170
7.6. Referências Bibliográficas	170
Capítulo 8. Identificação Sorológica de <i>Bradyrhizobium/Rhizobium</i>	
Catalina Y. M. Nishi	171
8.1. Introdução	171
8.2. Conceitos Básicos de Algumas Reações Sorológicas.....	171

8.2.1. Aglutinação Direta	171
8.2.2. Imunodifusão	172
8.2.3. Imunofluorescência	173
8.2.4. Ensaio de Imunoadsorção Ligado à Enzima (ELISA, Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay)	175
8.3. Produção de Antisoro para <i>B. japonicum</i>	175
8.3.1. Preparo de Antígenos Somáticos para a Técnica de Aglutinação.	175
8.3.2. Imunização do Coelho.	177
8.3.3. Sangria para Determinação do Título dos Anticorpos.	177
8.3.4. Sangria	178
8.3.5. Doses de Reforço e Sangrias	178
8.4. Ensaio de Aglutinação em Placa Rígida de Poliestireno em "U".	178
8.4.1. Utilizando os Nódulos como Antígenos	178
8.4.2. Utilizando Cultura de Células como Antígeno	179
8.5. Considerações Finais	179
8.6. Referências Bibliográficas	179
Capítulo 9. Caracterização das Estirpes por Técnicas Moleculares: O Uso dos Métodos de PCR e RAPD	
<i>Maria de Fátima Loureiro</i>	183
9.1. Introdução	183
9.2. Métodos Moleculares	184
9.2.1. RFLP e Isoenzimas	184
9.2.2. PCR (Polymerase Chain Reaction)	184
9.2.2.1. A amplificação do DNA através de PCR	185
9.2.2.2. Aperfeiçoamento do processo de PCR	186
9.2.3. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	190
9.3. Uso da Técnica RAPD em Estirpes de Rizóbio	190
9.3.1. Protocolo	190
9.3.2. Comentários	192
9.3.2.1. Eficiência da amplificação de DNA a partir de células rompidas	192
9.3.2.2. Preparo de <i>Rhizobium</i> e extrato de nódulo para a amplificação direta do DNA (método de Harrison et al., 1992)	193
9.3.2.3. Oligonucleotídeos	194
9.3.2.4. Análise dos dados	194
9.4. Considerações Finais	197
9.5. Referências Bibliográficas	197
Capítulo 10. Introdução de Genes em <i>Rhizobium</i>	
<i>Leif Skot & Ricardo S. Araujo</i>	201
10.1. Introdução	201
10.2. Meios de Cultura	202
10.3. Plasmídeos	205
10.3.1. Géis "Rápidos" para Visualização de Plasmídeos em <i>Rhizobium</i>	205
10.3.1.1. Meios, tampões e soluções	205

10.3.1.2. Preparação do <i>Rhizobium</i>	206
10.3.1.3. Preparação do gel	207
10.3.1.4. Isolamento de plasmídeos de <i>Rhizobium</i>	207
10.3.2. Plasmídeos de Amplo Espectro para Estudos Genéticos de <i>Rhizobium</i>	209
10.3.3. Transferência de Genes para o <i>Rhizobium</i>	211
10.4. Extração de DNA de <i>Rhizobium</i>	214
10.5. Detecção de Produtos Gênicos em <i>Rhizobium</i>	216
10.5.1. Extração das proteínas do <i>Rhizobium</i>	217
10.5.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) e Análise “Immunoblot” de Proteínas em <i>Rhizobium</i>	218
10.6. Considerações Finais	222
10.7. Referências Bibliográficas	222
Capítulo 11. Geração e Análise de Mutantes de <i>Rhizobium</i> e <i>Bradyrhizobium</i> <i>Ricardo S. Araujo</i>	227
11.1. Introdução	227
11.2. Métodos Básicos em Genética	229
11.3. Tipos de Agentes Mutagênicos	230
11.3.1. Agentes Químicos	230
11.3.2. Antibióticos	232
11.3.3. Transposons	233
11.4. Bibliotecas Genômicas	235
11.5. Análise de Complementação ou Restauração Fenotípica	235
11.6. Considerações Finais	236
11.7. Referências Bibliográficas	236
Capítulo 12. Quantificação da Competitividade Nodular de <i>Rhizobium</i> e <i>Bradyrhizobium</i> <i>Ricardo S. Araujo</i>	239
12.1. Introdução	239
12.2. O Modelo de Beattie et al. (1989).	240
12.3. Aplicações do Modelo para os Estudos com Estirpes Isogênicas	240
12.4. Aplicação do Modelo para Estudos de Competitividade no Solo	246
12.5. Considerações Finais	247
12.6. Referências Bibliográficas	248
Capítulo 13. Metabolismo do Carbono e do Nitrogênio nos Nódulos <i>Mariangela Hungria</i>	249
13.1. Assimilação Inicial da Amônia nos Nódulos	249
13.1.1. Introdução	249
13.1.2. Coleta dos Nódulos	250
13.1.3. Extração das Enzimas	250
13.1.3.1. Soluções de extração e homogeneização	250
13.1.3.2. Procedimento para a extração das frações do nódulo	252
13.1.4. Atividade da Glutamina Sintetase	253

13.1.4.1. Ensaio da GS transferase	253
13.1.4.2. Ensaio semibiossintético	256
13.1.5. Atividade da Glutamato Sintase (GOGAT)	257
13.1.5.1. GOGAT-NADH (E.C. 1.4.1.14), método de Hungria et al. (1991)	257
13.1.5.2. GOGAT-NADH, método de Farden & Robertson (1980)	258
13.1.5.3. GOGAT-dependente de ferredoxina (E.C. 1.4.7.1.)	258
13.2. Outras Enzimas Envolvidas na Assimilação do N nos Nódulos	258
13.2.1. Glutamato Desidrogenas ϵ (GDH, NAD ⁺ , E.C. 1.4.1.2; NAD(P) ⁺ , E.C. 1.4.1.3; NADP ⁺ , E.C. 1.4.1.4)	259
13.2.2. Alantoinase (E.C. 3.5.2.5)	260
13.3. Análise de Teor Protéico	261
13.4. Análise dos Compostos Nitrogenados da Seiva do Xilema	262
13.4.1. Introdução	262
13.4.2. Coleta da Seiva do Xilema	262
13.4.3. Análise do N-ureído	264
13.4.4. Análise do N-Amônio	267
13.4.5. Análise do N-Amida	268
13.4.5.1. N-amida segundo Thomas et al. (1979)	268
13.4.5.2. N-amida segundo Boddey et al. (1987)	269
13.4.6. Análise do N-Amino	269
13.4.7. Análise do N-Nitrato	270
13.4.8. Análise do N Total	271
13.5. Análise do N-ureído nos tecidos	271
13.5.1. Análise em Tecido Seco	271
13.5.2. Análise em Tecido Fresco	272
13.6. Carboidratos nos Nódulos	272
13.6.1. Introdução	272
13.6.2. Determinação do Teor de Carboidratos Solúveis e Insolúveis	274
13.6.2.1. Extração	274
13.6.2.2. Determinação dos açúcares solúveis	274
13.6.2.3. Determinação do amido	275
13.7. Atividade da Fosfoenol Piruvato Carboxilase (PEP carboxilase)	277
13.7.1. Introdução	277
13.7.2. Avaliação da Atividade da PEP carboxilase	278
13.8. Considerações Finais	278
13.9 Referências Bibliográficas	279

Capítulo 14. Identificação de Parâmetros Relacionados com a Eficiência e Capacidade Competitiva do Rizóbio

Mariangela Hungria; Milton A. T. Vargas; Allert A. R. Suhet; José Roberto R. Peres & Iêda C. Mendes

14.1. Introdução	285
14.2. Atividade da Dinitrogenase	286
14.2.1. O Método da Atividade da Redução do Acetileno (ARA)	286
14.2.2. ARA <i>in Vitro</i>	287

14.2.3. ARA em Nódulos Destacados	289
14.2.4. ARA em Raízes Destacadas	291
14.3. Menor Perda de Elétrons pela Evolução do H ₂	293
14.3.1. Detecção dos Genes da Hidrogenase (<i>hup</i>)	294
14.3.2. Expressão da Atividade da Hidrogenase <i>in vitro</i>	294
14.3.3. Expressão da Hidrogenase em Simbiose	298
14.3.3.1. Evolução do hidrogênio pelos nódulos	298
14.3.3.2. Atividade da hidrogenase <i>in vivo</i>	299
14.4. Fosfoenol Piruvato Carboxilase	300
14.5. Sensibilidade à Asparagina em Meio de Cultura	300
14.6. Teor de Leghemoglobina nos Nódulos	301
14.7. Atividade da Glutamina Sintetase e Glutamato Sintase	301
14.8. Transporte de Ureídos na Seiva do Xilema	302
14.9. Precocidade para Nodulação e Fixação do N ₂	302
14.10. Senescência Tardia dos Nódulos	303
14.11. Isolamento de Estipes mais Competitivas	303
14.11.1. Teste de Isolados Contra uma Estirpe de Capacidade Competitiva Elevada	303
14.11.2. Identificação das Estipes Presentes no Solo em Maior Porcentagem pelo Perfil Protéico (Segundo R. S. Araujo)	305
14.11.3. Avaliação da Capacidade Competitiva pela Mudança nos Fenótipos Radiculares	306
14.12. Espécies de Rizóbio mais Eficientes	308
14.12.1. Nodulação da Soja: <i>Bradyrhizobium japonicum</i> X <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	308
14.12.1.1. Conhecimento atual	308
14.12.1.2. Características, <i>in vitro</i> , para diferenciar as duas espécies	310
14.12.1.2.1. Resistência intrínseca a níveis elevados de alguns antibióticos	310
14.12.1.2.2. Síntese de ácido indolacético (AIA)	311
14.12.1.2.3. Expressão da hidrogenase	311
14.12.1.2.4. Composição dos polissacarídeos extracelulares	312
14.12.1.3. Características, <i>in vivo</i> , para diferenciar as duas espécies	312
14.12.1.3.1. Expressão da hidrogenase	312
14.12.1.3.2. Bioensaio de toxidez de rizobiotoxina em alfafa	312
14.12.1.3.3. Bioensaio de toxidez de rizobiotoxina em soja	313
14.12.1.3.4. Restrição da nodulação pelo alelo <i>Rj</i> ₁	313
14.12.1.3.5. Repressão da nodulação pelo par de alelos <i>rj</i> ₁ <i>rj</i> ₁	314
14.12.2. Nodulação do feijão: <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> X <i>Rhizobium tropici</i> X <i>Rhizobium etli</i>	314
14.12.2.1. Conhecimento atual	314
14.12.2.2. Testes para a Classificação das Espécies	315
14.13. Considerações Finais	316
14.14. Referências Bibliográficas	316

Capítulo 15. Técnicas de Melhoramento da Planta Hospedeira para Incrementar a Fixação Biológica do Nitrogênio: o Caso do Feijoeiro	
<i>Pedro A. Arraes Pereira</i>	327
15.1. Introdução	327
15.2. Técnicas de Hibridação do Feijoeiro	328
15.2.1. Método do Retrocruzamento Modificado	330
15.2.2. Método da Descendência Única e suas Variações	330
15.3. Critérios de Seleção	332
15.3.1. Métodos Diretos	333
15.3.2. Métodos Indiretos	333
15.4. Referências Bibliográficas	334

PARTE III.

DIAZOTRÓFICOS ASSOCIATIVOS

Capítulo 16. Métodos de Isolamento e Identificação de Microrganismos Associativos Fixadores de N ₂	
<i>Fátima Maria de S. Moreira</i>	337
16.1. Introdução	337
16.2. Métodos de Isolamento e Identificação	339
16.2.1. <i>Azotobacter paspali</i>	339
16.2.2. <i>Derxia</i> sp.	340
16.2.3. <i>Beijerinckia</i> spp.	340
16.2.4. <i>Azospirillum</i> spp. (<i>A. lipoferum</i> , <i>A. brasilense</i> e <i>A. amazonense</i>) e <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	343
16.2.4.1. Cultura de Enriquecimento	345
16.2.4.2. Isolamento de <i>A. brasilense</i> e <i>H. seropedicae</i>	345
16.2.4.3. Isolamento de <i>A. lipoferum</i> e <i>A. amazonense</i>	346
16.2.5. <i>Acetobacter diazotrophicus</i> (Cavalcante & Döbereiner, 1988)	347
16.2.6. <i>Pseudomonas</i>	348
16.2.7. <i>Bacillus</i>	349
16.3. Contagens	350
16.4. Referências Bibliográficas	351

PARTE IV.

OUTRAS BACTÉRIAS DO SOLO

Capítulo 17. Microrganismos Amonificadores e Nitrificadores	
<i>Diva de Souza Andrade; Mario Miyazawa & Paulo José Hamakawa</i>	355
17.1. Introdução	355
17.2. Estimativa da População de Microrganismos Amonificadores	356
17.2.1. Amostragem do Solo e Preparo das Amostras	356
17.2.2. Preparo das Diluições	356
17.2.3. Preparo do Meio de Cultura e Avaliação	357
17.3. Medidas da Amonificação	359

17.3.1. Taxa de Amonificação em Amostras Incubadas de Solo	359
17.3.2. Taxa de Amonificação em Solo com Adição de N Orgânico	359
17.3.3. Determinação do $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ pelo Sistema de Análise por Fluxo (Flow Injection Analysis) - FIA.	360
17.3.3.1. Princípio do método de FIA	360
17.3.3.2. Procedimento	360
17.4. Estimativa das Bactérias Nitrificadoras	362
17.4.1. Preparo das Diluições da Amostra de Solo	362
17.4.2. Meios de Cultura	362
17.4.3. Inoculações	363
17.4.4. Avaliações	363
17.4.5. Teste para Avaliação dos Microrganismos Oxidantes do Amônio (NH_4^+)	363
17.4.6. Teste para Avaliação dos Microrganismos Oxidantes do Nitrito (NO_2^-)	363
17.5. Potencial Nitrificante do Solo	364
17.5.1. Procedimento	364
17.6. Taxa de Nitrificação	365
17.7. Considerações Finais	365
17.8. Referências Bibliográficas	366
Capítulo 18. Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCPs)	
<i>Sueli dos Santos Freitas</i>	369
18.1. Introdução	369
18.2. Histórico	369
18.3. Métodos Utilizados no Estudo de RPCPs	370
18.3.1. Identificação	371
18.3.2. Isolamento	372
18.3.3. Colonização Radicular	372
18.3.4. Testes de Antagonismo	373
18.4. Referências Bibliográficas	374
Capítulo 19. Co-inoculação de Bactérias: <i>Rhizobium</i> e <i>Bacillus</i>	
<i>Fábio F. Araújo</i>	377
19.1. Introdução	377
19.2. Interação do <i>Bacillus</i> com <i>Rhizobium</i>	377
19.3. <i>Bacillus</i> como Agente de Controle Biológico	379
19.4. Procedimento Utilizado nos Estudos sobre Co-inoculação de <i>Bacillus</i> com Rizóbio	380
19.4.1. Efeito na Nodulação e Ocupação dos Nódulos	380
19.4.2. Efeito da Inoculação com <i>Bacillus</i> nos Fenótipos Radiculares	380
19.5. Referências Bibliográficas	381

PARTE V.

MICORRIZAS

Capítulo 20. Micorrizas Arbusculares

<i>Arnaldo Colozzi-Filho & Élcio L. Balota</i>	383
20.1. Introdução	383
20.2. Critérios para Amostragem, Coleta e Armazenamento de Propágulos	385
20.2.1. Amostragem	385
20.2.2. Coleta	385
20.2.3. Armazenamento	386
20.3. Estabelecimento e Manutenção de Banco de Inóculo Básico de Fungos Micorrízicos Arbusculares	387
20.4. Taxonomia de Fungos MA	390
20.5. Avaliação de Propágulos e Recuperação de Esporos do Solo	396
20.6. Avaliação da Colonização Micorrízica	402
20.6.1. Clareamento e Coloração das Raízes	402
20.6.2. Determinação da Colonização Micorrízica	402
20.6.2.1. Métodos não sistemáticos	407
20.6.2.2. Métodos sistemáticos	408
20.7. Alguns Procedimentos para Estudos <i>in Vitro</i>	409
20.8. Referências Bibliográficas	412

PARTE VI.

BIOMASSA MICROBIANA

Capítulo 21. Metodologia para Quantificação da Biomassa Microbiana do Solo

<i>David A. Wardle</i>	419
21.1. Introdução	419
21.2. Preparo das Amostras	419
21.3. Microscopia Direta e Técnicas de Observação	420
21.3.1. Bactérias	421
21.3.2. Fungos	421
21.4. Fumigação-Incubação	422
21.5. Fumigação-Extração	425
21.6. Respiração Induzida pelo Substrato	426
21.7. Componentes Celulares	429
21.8. Parâmetros Derivados das Estimativas da Biomassa do Solo	429
21.9. Referências Bibliográficas	431

PARTE VII.

TÉCNICAS AUXILIARES NOS ESTUDOS DE MICROBIOLOGIA DO SOLO

Capítulo 22. O Método da Redução do Acetileno

<i>Frank R. Minchin</i>	437
22.1. Introdução	437
22.2. Aplicação do Ensaio Tradicional em Plantas Cultivadas em Vasos	439

22.3. Aplicação do Ensaio Tradicional em Plantas Cultivadas no Campo	442
22.4. Considerações Finais	443
22.5. Referências Bibliográficas	445
Capítulo 23. Métodos de Determinação do Nitrogênio em Solo e Planta	
<i>Bruno J.R. Alves; Júlio César F. dos Santos; Segundo Urquiaga & Robert M. Boddey.</i>	449
23.1. Introdução	449
23.2. Nitrogênio Total do Solo	449
23.2.1. Técnica da Combustão em Alta Temperatura (Dumas)	449
23.2.2. Técnica de Digestão Úmida	450
23.2.2.1. Técnica de Kjeldahl	450
23.2.2.2. Inclusão de nitrato e nitrito	453
23.3. N Total em Material Vegetal	454
23.3.1. Técnica da Combustão em Alta Temperatura (Dumas)	454
23.3.2. Técnica de Digestão Úmida (Kjeldahl)	454
23.4. Nitrogênio Mineral	455
23.4.1. Determinação por Destilação a Vapor	456
23.4.2. Determinação Colorimétrica	458
23.4.2.1. Nitrato em plantas	458
23.4.2.1.1. Extração alcoólica em material fresco (Fernandes, 1983)	458
23.4.2.1.2. Extração de material seco (Peoples et al., 1989)	459
23.4.2.1.3. Determinação de nitrato	459
23.4.2.2. Determinação colorimétrica do amônio através do FIA (Alves et al., 1993).	460
23.4.2.3. Determinação colorimétrica do nitrato através do FIA.	462
23.5. N Potencialmente Mineralizável	464
23.5.1. Método Biológico (incubação anaeróbica)	465
23.5.2. Método Químico	466
23.6. Considerações Finais	467
23.7. Referências Bibliográficas	467
Capítulo 24. Quantificação da Fixação Biológica de Nitrogênio Associada a Plantas Utilizando o Isótopo ^{15}N	
<i>Robert M. Boddey; Bruno J. R. Alves & Segundo Urquiaga</i>	471
24.1. Introdução	471
24.2. A Técnica de $^{15}\text{N}_2$	472
24.3. A Técnica de Diluição Isotópica de ^{15}N	473
24.3.1 Princípio Básico	473
24.3.2. Premissa Básica	474
24.3.3. A Marcação do N do Solo com ^{15}N	474
24.3.4. Erros Associados ao Uso da Aplicação Simples de Fertilizante Marcado.....	475
24.3.5. Estratégias para o Uso da Técnica de Diluição Isotópica de ^{15}N para Obter Estimativas Confiáveis da Contribuição da FBN às Plantas.	476

24.3.5.1. Marcação do solo de maneira que as variações temporais do enriquecimento do N mineral do solo com ¹⁵ N sejam as menores possíveis.	476
24.3.5.2. Uso de diversas plantas-controle.	480
24.3.5.3. Uso de dois métodos de aplicação de ¹⁵ N.	480
24.3.5.4. Avaliações do enriquecimento de ¹⁵ N da planta ao longo do tempo.	481
24.3.6. Estimativa por Modelagem sem a Necessidade de Planta-controle.	481
24.3.7. Uma Palavra sobre Grandes Contribuições da FBN.	483
24.3.8. Nitrogênio da Semente.	483
24.4. A Técnica de Abundância Natural de ¹⁵ N.	485
24.5. Referências Bibliográficas.	487
Capítulo 25. Métodos de Determinação de Fósforo no Solo e nos Tecidos <i>Júlio César F. dos Santos & Bruno J. R. Alves</i>	495
25.1. Introdução	495
25.2. Métodos de Extração	496
25.2.1. Fósforo Total no Solo	496
25.2.1.1. Método de digestão	496
25.2.2. Fósforo Orgânico do Solo	497
25.2.3. Fósforo Disponível	498
25.2.3.1. Fósforo extraível em resina aniônica (Raij & Quaggio, 1983).....	499
25.2.3.2. Fósforo solúvel em ácido clorídrico e sulfúrico diluídos(Mehlich-1)(Nelson et al., 1953)	502
25.2.3.3. Fósforo solúvel em fluoreto ácido diluído (Bray-1) (Bray & Kurtz, 1945).....	502
25.2.3.4. Fósforo solúvel em bicarbonato de sódio (Olsen) (Olsen et al., 1954)	503
25.2.3.5. Fósforo solúvel em CaCl ₂ 0,01 M	504
25.3. Métodos de Preparo de Amostras de Tecidos	504
25.3.1. Digestão Nitroperclórica	504
25.3.2. Incineração Via Seca	505
25.4. Procedimentos para a Análise de Fósforo em Extratos de Solo e Planta.	505
25.4.1. Introdução	505
25.4.2. Métodos de Determinação	506
25.4.2.1. Método de Murphy & Riley (1962)	506
25.4.2.2. Método de Murphy & Riley (1962) modificado por Raij & Quaggio (1983).....	506
25.4.2.3. Método de Braga & Defelipo (1974).....	507
25.4.2.4. Método de Sarruge & Haag (1974)	507
25.4.2.5. Método verde-malaquita (Ohno & Zibilske, 1991)	508
25.5. Considerações Finais	508
25.6. Referências Bibliográficas	509
Capítulo 26. Análise do Carbono nos Estudos da Matéria Orgânica do Solo <i>Bruno J.R. Alves; Júlio César F. dos Santos; Segundo Urquiaga & Robert M. Bodley.</i>	513
26.1. Introdução	513
26.2. Determinação do Carbono Total	513
26.3. Determinação de Carbono Orgânico (técnicas rápidas)	517

26.4. Fracionamento da Matéria Orgânica do solo	519
26.4.1. Introdução	519
26.4.2. Metodologia de Separação Granulométrica	520
26.4.3. Extração Química e Purificação das Frações Húmicas	521
26.5. Considerações Finais	524
26.6. Referências Bibliográficas	524

ANEXOS

1. Lista de Figuras	529
2. Lista de Tabelas	533

APÊNDICES

1. Abreviações e símbolos de unidades	537
2. Alguns prefixos utilizados no sistema internacional de unidades	538
3. Alguns fatores de conversão	538
4. Algumas constantes matemáticas	538
5. Informações úteis para o preparo de soluções	539
6. Medidas e informações úteis para os trabalhos com DNA	539
7. Propriedades das soluções comerciais concentradas de ácidos e bases e volume necessário para fazer uma solução de 1 N	540
8. Preparo de tampão fosfato, 0,1 M, com diversos pH, a partir de duas soluções-estoque	541
9. Preparo de tampão acetato, 0,1 M, tampão citrato-fosfato, 0,05 M, e tampão Tris, 0,1 M	542

INTRODUÇÃO

Mariangela Hungria¹

Ricardo S. Araujo²

Nos últimos anos, tem-se observado um interesse crescente pelos estudos dos microrganismos do solo que contribuem, direta ou indiretamente, para a produtividade agrícola. A tomada de consciência, por parte dos cientistas do solo e, sobretudo, dos produtores rurais, sobre a importância da atividade biológica para a manutenção da fertilidade do solo, tem demandado a criação e adaptação de técnicas que permitam inferências mais precisas sobre a importância da microbiota do solo para o desenvolvimento e sustentabilidade da agricultura. Essas técnicas serão as responsáveis, direta ou indiretamente, pela geração e adoção de tecnologias adaptadas às condições da agricultura brasileira.

No Brasil, em quase todos os laboratórios onde se realizam atividades de pesquisa em microbiologia do solo, existe um corolário de métodos empregados rotineiramente, muitos dos quais são adaptados de técnicas utilizadas em laboratórios do exterior, às vezes trazidas por consultores. Muitas dessas metodologias são, conseqüentemente, desconhecidas ou indisponíveis para outros pesquisadores.

A idéia de elaborar este manual partiu da necessidade de se compilar técnicas e métodos encontrados em cadernos pessoais e em manuais elaborados no exterior e que são, comprovadamente, úteis para os estudos dos microrganismos do solo de importância agrícola. Infelizmente, a curta disponibilidade de tempo para a elaboração do manual não permitiu uma abordagem completa de todas as técnicas, mas pretendeu apresentar diversas metodologias empregadas na rotina de um laboratório de microbiologia do solo. Espera-se, porém, ampliar este manual, quando houver a oportunidade para uma nova edição.

O manual está dividido em seções, visando agrupar as técnicas por assunto ou área de pesquisa. Assim, são abordados aspectos como a segurança nos laboratórios, a aquisição de equipamentos adequados, procedimentos de rotina na higiene e manutenção das instalações, os estudos sobre as

¹ Pesquisadora, Ph.D., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), Cx. Postal 1061, CEP 86001-970, Londrina, PR.

² Pesquisador, Ph.D., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP), Cx. Postal 179, CEP 74001-970, Goiânia, GO.

associações rizobio x leguminosas, microrganismos associativos fixadores de nitrogênio, micorrizas, biomassa microbiana e outras metodologias auxiliares aplicadas a diversos campos de estudo dentro da microbiologia do solo. Em cada uma dessas seções, são apresentadas técnicas tradicionais e modernas, sobretudo aquelas que foram adaptadas a esses estudos após o advento da biologia molecular e da engenharia genética. Acredita-se que este manual venha a preencher a lacuna da inexistência de um texto, como este, em português.

Agradece-se a colaboração de todos os autores de capítulos, partilhando suas técnicas e métodos, sem esconder sequer os detalhes pessoais introduzidos em cada situação. Agradece-se, também, a presteza no fornecimento das informações e na edição deste manual. Espera-se que seus objetivos sejam alcançados, facilitando o trabalho de pesquisadores e estudantes da microbiologia do solo. Mas, sobretudo, espera-se que este livro incentive jovens pesquisadores a iniciar experimentos e prosseguir com os estudos no fascinante mundo dos microrganismos do solo.

PARTE I. PRINCÍPIOS BÁSICOS EM UM LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

CAPÍTULO 1

SEGURANÇA, EQUIPAMENTOS E TÉCNICAS BÁSICAS EM UM LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO

Mariangela Hungria¹

Ricardo S. Araujo²

Fábio F. de Araújo³

Euan James⁴

1.1. Segurança

1.1.1. Regras Gerais

Para conduzir trabalhos nos laboratórios de microbiologia, é necessário seguir alguns princípios básicos, essenciais para o bom desempenho do trabalho e para a segurança dos que conduzem os ensaios:

- lavar as mãos antes e depois de terminar um trabalho;
- usar avental e, quando necessário, luvas estéreis descartáveis;
- limpar e desinfestar as bancadas e capelas no início e no final do trabalho;
- não pipetar com a boca;
- não colocar na boca, qualquer material que tenha estado em contato com os agentes potencialmente perigosos (incluindo lápis e caneta);
- ser cuidadoso com materiais que possam causar ferimentos na pele, como seringas, pipetas Pasteur e vidros em geral;
- colocar qualquer material contendo contaminantes em um recipiente que permita a sua esterilização;
- ler atentamente as especificações sobre os produtos químicos que vão ser utilizados;
- fazer o descarte apropriado de materiais microbiológicos, químicos e radioativos;
- não ingerir alimentos ou fumar no laboratório.

¹ Pesquisadora, Ph.D., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), Cx. Postal 1061, CEP 86001-970, Londrina, PR.

² Pesquisador, Ph.D., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa em Arroz e Feijão (CNPAPF), Cx. Postal 179, CEP 74001-970, Goiânia, GO.

³ Engenheiro-agrônomo, curso de pós-graduação em Microbiologia na Universidade Estadual de Londrina e EMBRAPA-CNPSo.

⁴ Pesquisador, Ph.D., University of Dundee, Department of Biological Sciences, Dundee, DDI-4HN, Escócia.

1.1.2. Segurança no Laboratório

Os acidentes que ocorrem em laboratórios são muitos e, nos de microbiologia, compreendem tanto infecções devido à manipulação de microrganismos, como acidentes com produtos químicos.

O controle dos laboratórios de microbiologia, no Brasil, é pequeno, mas em países onde o controle é mais rígido ainda são relatadas centenas de infecções adquiridas no local de trabalho. De um modo geral, as vítimas desses acidentes são os pesquisadores, auxiliares ou alunos, por falta de conhecimento, falta de proteção ou por descuido no trabalho. O treinamento adequado de todos os que trabalham no laboratório, incluindo trabalhadores esporádicos, como o pessoal de limpeza, pode prevenir a maioria dos acidentes.

1.1.3. Contaminação por Microrganismos

Para evitar a contaminação por microrganismos deve-se conhecer:

a) conhecimento do perigo potencial dos materiais e organismos que estão sendo manipulados:

Os microrganismos que podem causar infecções são divididos em quatro grupos de risco ou classes, ordenadas de 1 a 4. A classe 1 inclui microrganismos que não oferecem nenhum perigo ou oferecem perigo mínimo ao trabalhador ou à comunidade; 2 - microrganismos que oferecem risco considerável aos que trabalham no laboratório e que provavelmente não oferecem nenhum risco à comunidade; 3- microrganismos que oferecem algum risco ao trabalhador e podem ser disseminados à comunidade; e 4- microrganismos que oferecem riscos sérios aos trabalhadores do laboratório e à comunidade.

De um modo geral, nos estudos de microbiologia do solo, os microrganismos não são patogênicos ao homem. Contudo, deve-se considerar que os meios de cultura utilizados, extremamente ricos em nutrientes, podem permitir o crescimento de microrganismos potencialmente perigosos que existem no solo, na água ou no ar. Além disso, cuidados especiais devem ser tomados com os microrganismos modificados geneticamente, pois pouco se sabe sobre os riscos potenciais que oferecem. A transferência natural de plasmídeos de microrganismos inócuos para patogênicos ao homem não é provável, mas não pode ser descartada.

Uma das maneiras mais fáceis de evitar a contaminação é pela limpeza constante do laboratório. Alguns cuidados, porém, devem ser tomados pelos que realizam essa limpeza. Meios de cultura já utilizados, pipetas ou quaisquer outros materiais que estiveram em contato com microrganismos que ofereçam algum risco devem ser esterilizados antes da lavagem. Aventais e luvas também são importantes para a proteção do trabalhador.

b) conhecimento das vias de infecção

Os microrganismos podem infectar o homem pela boca (ingestão), pelos pulmões (inalação) e pela pele, particularmente por ferimentos e pelos olhos.

A ingestão pode ocorrer durante o processo de pipetagem e pela contaminação pelos dedos ou quaisquer materiais contaminados do laboratório. Por isso o material do laboratório deve ser restrito ao material de trabalho, obedecendo-se a regra básica de JAMAIS INGERIR ALIMENTOS OU FUMAR no laboratório. Deve-se procurar, ainda, restringir a área de trabalho e proceder continuamente à limpeza e desinfestação. A higiene após o trabalho e o uso de luvas e câmara de fluxo, quando for necessário, não devem ser esquecidos.

A contaminação pela inalação de partículas liberadas durante o trabalho é, com certeza, uma fonte de difícil controle; pode ocorrer através do trabalho com alças de platina, seringas, pipetas, centrífugas, ou durante os processos de homogeneização e abertura de tubos de cultura, entre outros.

A contaminação pela pele pode ser através de injeção, por seringas ou material quebrado, entre outros e, no caso de ferimentos na pele, a entrada de microrganismos é facilitada. Espirrar materiais nos olhos é, freqüentemente, a causa de muitas infecções.

c) métodos para evitar que esses microrganismos tenham acesso às vias de infecção

Para evitar a contaminação por microrganismos devem ser utilizadas algumas barreiras:

- barreiras primárias, ao redor dos microrganismos, para evitar a sua dispersão. Isso inclui, cuidados com pipetagem, com materiais que fiquem na área de contaminação, limpeza da capela e local de trabalho após a manipulação de microrganismos e descarte adequado de materiais
- barreiras secundárias, ao redor do trabalhador, como o uso de aventais e luvas
- barreiras terciárias, para impedir que os microrganismos se espalhem na comunidade, relacionadas principalmente com o descarte dos materiais contaminados.

No planejamento do laboratório, para trabalhar com as classes de microrganismos comumente estudadas nos laboratórios de microbiologia do solo, é essencial que as instalações sejam fáceis de limpar e desinfestar e resistentes aos produtos químicos utilizados. As bancadas devem ser preferencialmente lisas, com altura confortável para o técnico e um local especial deve ser destinado a aparelhos que ofereçam algum risco, como autoclave. O chão deve ser de material que permita a desinfestação constante, mas que não seja escorregadio. A luz e temperatura devem ser adequados, para permitir conforto durante o trabalho. A pia para lavagem das mãos deve ser diferente daquela em que se lavam os materiais de laboratório. Também deve haver um local que permita a estocagem de materiais esterilizados, como meios de cultura e demais acessórios.

Devem ter acesso ao laboratório somente as pessoas que realmente trabalham ali. Essas pessoas, sendo bem treinadas, saberão quais os microrganismos potencialmente perigosos do laboratório e as técnicas para evitar sua disseminação, além de saber como manter o laboratório limpo para evitar contaminação de todos os trabalhos ali conduzidos.

No caso de manipulação de microrganismos potencialmente perigosos à comunidade, deve-se procurar orientação junto aos órgãos de saúde, que saberão especificar os procedimentos para cada caso.

1.1.4. Contaminação por Produtos Químicos

É importante criar o hábito de, na chegada de cada reagente novo ao laboratório, ler o folheto do fabricante ou o rótulo com as especificações do produto. Constam, ali, informações sobre a temperatura de estocagem do material, tempo de validade do princípio ativo e cuidados que devem ser tomados durante a sua manipulação. Vários produtos empregados nos estudos de microbiologia do solo são tóxicos, cancerígenos ou teratogênicos. É sempre recomendável manter as especificações dos produtos em um local de fácil acesso, pois ali estão incluídos os procedimentos que devem ser tomados em caso de acidentes.

Deve-se preocupar, ainda, com a contaminação do meio ambiente. Na medida do possível, produtos como o bicloreto de mercúrio, algumas vezes recomendado para a desinfestação de sementes, podem ser substituídos por outros desinfetantes, como o hipoclorito de sódio. No caso de produtos como o próprio bicloreto de mercúrio, fenólicos, solventes orgânicos e outros, que podem contaminar os lençóis freáticos, rios e lagos, infelizmente hoje, no Brasil, o controle ambiental depende do discernimento dos responsáveis pelos laboratórios. Nos Estados Unidos e na Europa, vários desses produtos são acondicionados em recipientes adequados e existe um departamento de segurança ambiental encarregado de fiscalizar o seu descarte. Como o Brasil não dispõe de regras para o descarte, um procedimento racional é o de procurar diluir ao máximo possível compostos que ofereçam algum perigo ao ambiente antes de descartá-los e, no caso de materiais altamente poluentes e tóxicos, deve-se providenciar um reservatório para o seu armazenamento.

1.1.5. Contaminação por Produtos Radioativos

O trabalho com radioisótopos exige que o laboratório se enquadre nas normas exigidas pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN). A autorização para o trabalho com radioisótopos e a fiscalização também estão sob responsabilidade da CNEN e, portanto, o assunto não será abordado aqui, mas convém lembrar apenas os princípios básicos, ou seja:

- quando estiver utilizando material radioativo, fontes seladas ou equipamento que emite radiação ionizante, os cuidados devem ser redobrados;
- o transporte de material radioativo deve ser planejado com antecedência, tomando-se as precauções necessárias. Todo o material radioativo deve ser mantido e transportado em pelo menos dois recipientes pois, no caso de um deles quebrar, haverá uma barreira à contaminação;
- o material radioativo ou em contato com ele deve ser guardado em um local separado no laboratório, com avisos sobre a sua natureza;
- a área de trabalho deve ser restrita e, de preferência, forrada com papel absorvente ou plástico especial. No caso de contaminação do local, isolá-lo e proceder à limpeza cuidadosa;
- o laboratório deve ser continuamente monitorado quanto aos níveis de radioatividade;
- o descarte de material deve obedecer às normas vigentes da CNEN.

1.2. Equipamentos e Material de Consumo

1.2.1. Equipamentos

Um laboratório de microbiologia do solo necessita alguns equipamentos básicos, que serão descritos a seguir. A inspeção e cuidados periódicos com os equipamentos impedem que eles ofereçam problemas de segurança aos que ali trabalham e aumentam a vida útil do equipamento. Outro ponto importante a ser considerado é o de que, no Brasil, a voltagem é instável. Quase todos os equipamentos são especificados para países que apresentam oscilações menores. Conseqüentemente, JAMAIS ECONOMIZAR em filtros de linha, estabilizadores de voltagem e tomadas com fio terra. é comum observar, em diversos laboratórios, que milhares de dólares são gastos em equipamentos, mas algumas dezenas são economizadas em proteção contra oscilações de voltagem.

Microscópios

Os microscópios são grandes aliados dos microbiologistas, não só para a identificação das características morfológicas dos microrganismos com os quais o laboratório trabalha rotineiramente, como também para a execução dos trabalhos de pesquisa que envolvem avaliação e documentação fotográfica de eventos microscópicos.

Os microscópios podem ser dos seguintes tipos:

a) Microscópio estereoscópico

Mais conhecido como lupa. Apesar de simples e com poder de resolução inferior ao dos microscópios ópticos, é útil em diversos estudos como, por exemplo, nas alterações dos fenótipos das raízes causadas por microrganismos, detalhes de morfologia de colônias de bactérias e fungos em placas, observações de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares, etc. Um bom microscópio estereoscópico deve possuir oculares com capacidade e aumento de 10X (dez vezes) e lentes com aumentos variáveis de 0,8X a 5X.

b) Microscópio óptico (comum, contraste de fase e fluorescência) (Figura 1.1)

No cotidiano, não há necessidade de microscópios ópticos sofisticados, mas alguns requisitos mínimos são essenciais:

- oculares com capacidade de aumento de, pelo menos, 10X;
- objetivas secas de baixa magnificação (10X e 40X);
- objetiva acromática ou “planacromática” (planachromatic) para óleo de imersão (90X a 100X);
- estativa móvel;
- condensador;
- fonte de luz, preferencialmente com ajuste da intensidade luminosa.

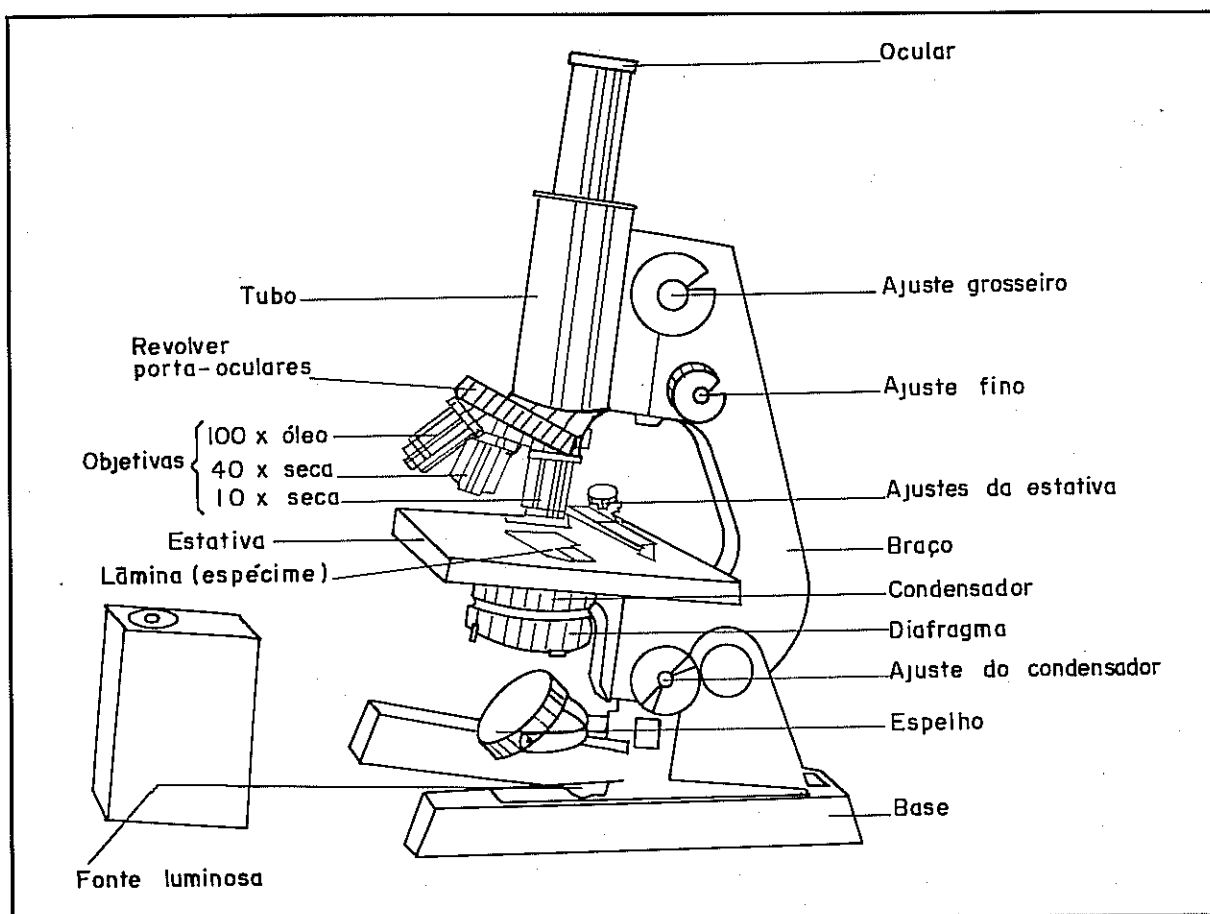


FIGURA 1.1. Representação esquemática das partes de um microscópio óptico.

As instruções para operação dos microscópios dependem de cada modelo. Alguns acessórios podem melhorar o poder de observação do microscópio, tais como os dispositivos para contraste de fase, com condensador e objetivas (10X, 40X e 100X) específicas. Podem ser acoplados, ainda, acessórios como contraste de fase, contraste por interferência diferencial, polarização, câmara clara para desenho microscópico, iluminador e filtros para epifluorescência, equipamento fotográfico, etc. Com esses acessórios, pode-se ter os seguintes tipos de microscópio:

b.1) microscópio de fluorescência

O microscópio de fluorescência é um microscópio óptico comum, mas com uma lâmpada capaz de excitar o comprimento de onda necessário. Um filtro primário, também conhecido como filtro de excitação, é colocado entre a fonte de luz e o espécime, permitindo a excitação dos comprimentos de onda necessários. Um segundo filtro é colocado entre o espécime e o observador, transmitindo somente os comprimentos de onda emitidos pelo corpo fluorescente. A vantagem desse método é que os compostos fluorescentes podem ser detectados em baixas concentração; além disso, alguns tecidos vivos, como os cloroplastos, são autofluorescentes, facilitando a visualização.

b.2) microscópio de contraste de fase

O princípio deste método é o contraste entre o limite de visibilidade do microscópio e o limite de resolução, isto é, a capacidade de distinguir formas e dimensões. O contraste avalia, então, a razão entre a intensidade do fundo (background) e a intensidade do objeto. A principal vantagem desse método é que permite a resolução de estruturas que ainda não são visíveis no microscópio óptico comum por falta de contraste com o fundo, bem como permite a visualização de certas estruturas sem corantes.

c) microscópio eletrônico

Os microscópios mais sofisticados são os eletrônicos, que podem ser de varredura e de transmissão. Mais recentemente foram criados os de tunelamento. Os microscópios eletrônicos permitem análises rigorosas dos mais variados espécimes, mas, devido ao custo elevado, não são acessíveis a muitos laboratórios.

c.1) microscópio eletrônico de transmissão

O princípio de funcionamento desse microscópio consiste no aquecimento de um filamento e da aceleração dos elétrons para o anodo. O feixe intenso de elétrons com alta energia passa pelo sistema do condensador, sendo então focado no espécime. Os elétrons que passam pelo espécime são focados pela objetiva e lentes de projeção e formam uma imagem numa tela fluorescente.

c.2) microscópio eletrônico de varredura

Nesse microscópio, um feixe fino de elétrons passa pela superfície do espécime (“varre” a superfície do espécime), em sincronização com a luz de um túnel de raios catodos. Um detector monitora a intensidade do sinal secundário do espécime e a luminosidade dos raios que passam pelo túnel. Se, por qualquer razão, a intensidade do sinal secundário alterar enquanto os elétrons estiverem “varrendo” o espécime, a imagem do contraste aparecerá.

Incubadoras

Existem diversos modelos de incubadoras, com vários tamanhos e diversas aplicações. As incubadoras menores estão sujeitas a maiores flutuações de temperatura do que os modelos maiores, principalmente quando a incubadora necessita ser constantemente aberta.

Nos trabalhos de microbiologia do solo, as temperaturas para o crescimento dos microrganismos são muito variáveis, de menos de 0° C a mais de 50° C. Incubadoras para temperaturas superiores à ambiental são ajustadas mais facilmente do que quando se necessitam temperaturas inferiores havendo, nesta última, necessidade de um mecanismo adicional de refrigeração. Nos casos em que é necessário manter o nível de umidade, a água pode ser uma fonte de contaminação, particularmente com fungos.

Banhos-maria

São empregados para os mais diversos fins no laboratório. Deve-se cuidar para que o nível da água no banho-maria esteja sempre no nível do líquido no recipiente. Alguns equipamentos modernos possuem agitadores elétricos, termostatos e superfícies internas revestidas com poliestireno para evitar perdas de calor. Alguns aparelhos são acoplados a sistemas de refrigeração para a obtenção de temperaturas mais baixas; neste caso, existe um reservatório adicional de água, com sistema de resfriamento e fluxo contínuo.

Centrífugas

a) Centrífugas comuns

De um modo geral, uma centrífuga para tubos de 15 mL a 50mL e velocidade de 4000 rpm é adequada. Os tubos devem ser fechados, para maior segurança, mas devem permitir a passagem dos aerossóis desprendidos durante a centrifugação. Os equipamentos devem, também, possuir travas automáticas que não permitam a abertura do rotor antes do término da operação.

A colocação dos tubos na centrífuga, normalmente feitos de plástico, vidro ou alumínio, deve obedecer a posições ortogonais balanceadas em termos de peso. Eles devem estar posicionados em pares opostos, sendo conveniente marcar cada par para facilitar o reconhecimento.

As instruções gerais para o uso da centrífuga são:

- selecionar dois tubos de mesmo tamanho e espessura, adicionando o líquido a ser centrifugado em um tubo e água (ou outra amostra líquida) no outro tubo, equilibrando os pesos;
- colocar os tubos na centrífuga em posições opostas;
- fechar a centrífuga e regular a velocidade e tempo desejados. Algumas centrífugas exigem um aumento gradual de velocidade, evitando sobrecargas ao motor no início da operação. Nesse caso, o tempo de centrifugação deve ser recalculado.

b) Ultracentrífuga

Alguns trabalhos exigem uma centrífuga que atinja velocidades maiores, permitindo a separação de partículas menores (baixo peso molecular). Para esses casos, existem ultracentrífugas, que atingem velocidades de até 80.000 rpm. A refrigeração nessas centrífugas é obrigatória, evitando o superaquecimento, mas também permite a manutenção de temperaturas baixas que são necessárias em alguns ensaios. Ultracentrífugas, porém, exigem maiores cuidados no uso e inspeções periódicas. Uma planilha de uso auxilia no planejamento do tempo necessário para a inspeção.

Observações gerais sobre o uso de ultracentrífugas:

- verificar, para a velocidade pretendida e tipo de centrifugação, qual o rotor e tubos apropriados; para isso, consultar a tabela de especificações que acompanha a ultracentrífuga;
- nessas tabelas, é fornecido o campo de centrifugação relativo (RCF, relative centrifugal field), que representa a aceleração centrífuga em relação ao padrão de aceleração da gravidade ($g=9.807\text{mm/s}^2$), na velocidade máxima do rotor (esta, por sua vez, determinada pelo raio do rotor). Constam, ainda, as velocidades em rpm (revoluções por minuto) e g (aceleração da gravidade). A relação entre g e rpm pode ser vista na Figura 1.2.

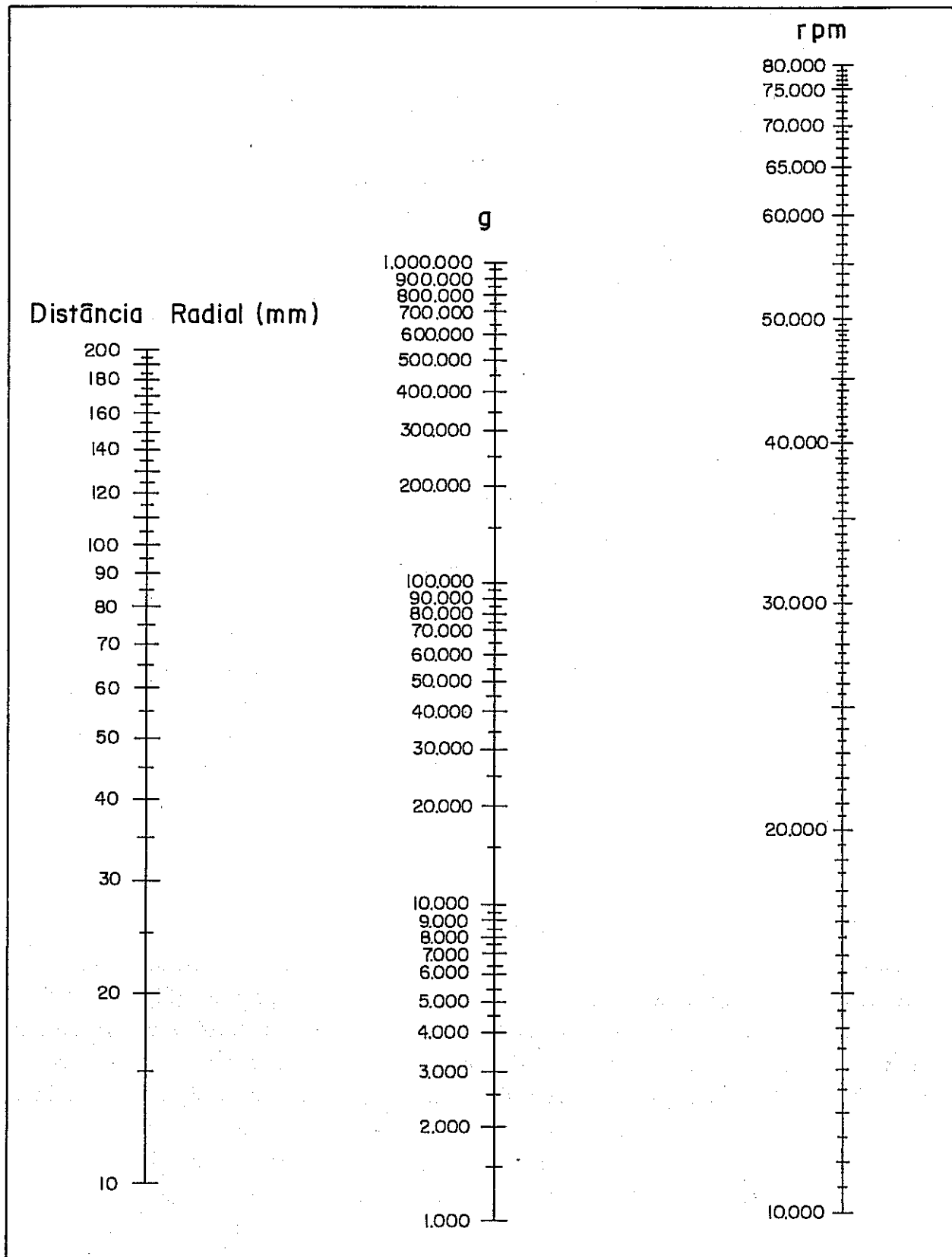


FIGURA 1.2. Relação entre o diâmetro do rotor e os valores de g e rpm em ultracentrífugas.

- a velocidade máxima permitida para cada rotor é indicada pelo seu nome (por exemplo, o rotor SW55Ti permite 55.000 rpm);
- JAMAIS exceder a velocidade máxima recomendada para o rotor;
- o tempo recomendado para a centrifugação é considerado a partir do momento em que o rotor atinge a velocidade desejada;
- se a trava da ultracentrífuga apresentar algum problema, esperar o rotor parar completamente antes de abri-la.

c) Microcentrífuga

Hoje, a maioria dos laboratórios possui, também, uma microcentrífuga. Esse equipamento permite a centrifugação de pequenos volumes (os tubos têm capacidade de 0,5 mL a 2,0 mL) a velocidades entre 10.000 rpm a 12.000 rpm. Essas centrífugas são práticas e permitem a manipulação de um grande número de amostras.

Câmaras de segurança microbiológica

Estas câmaras são utilizadas para capturar e reter partículas do ar durante as manipulações, diminuindo a contaminação do material manipulado. No caso de organismos patogênicos, as câmaras têm por finalidade, ainda, proteger os técnicos do laboratório contra infecções devido à inalação.

Existem modelos diferentes de câmaras para a manipulação microbiológica; esses equipamentos utilizam o princípio de fluxo contínuo, sendo por isso também denominados de câmaras de fluxo laminar, caracterizadas pela circulação constante de ar dentro do equipamento.

Existem, basicamente, dois tipos de fluxos laminares: fluxo vertical e fluxo horizontal.

a) Câmaras de fluxo laminar vertical

Possuem filtros de ar na parte superior e um difusor, além de uma proteção frontal para o técnico (Figura 1.3). Devido à maior proteção, esse tipo de equipamento é recomendado para manipulações com organismos patogênicos.

b) Câmara de fluxo laminar horizontal

Nesse tipo de câmara, os filtros de ar também estão localizados na parte superior, mas os difusores estão em posição frontal ao operador, expelindo o ar filtrado para fora (Figura 1.4). Como não há proteção frontal na câmara, o manipulador é exposto à inalação do fluxo remanescente e, por isso, esse equipamento não deve ser utilizado durante a manipulação de organismos patogênicos.

As câmaras normalmente vêm equipadas com fontes de luz ultravioleta, para facilitar a desinfestação. Uma proteção contra a luz ultravioleta pode ser adquirida diretamente do fabricante, mas também pode-se colocar qualquer material que bloqueie a passagem dos raios ultravioleta; todas as pessoas do laboratório devem ser avisadas sobre o perigo da exposição a esses raios. Uma inspeção periódica dos filtros de ar e do fluxo é necessária, devendo-se proceder, periodicamente, à troca dos filtros. Uma planilha com o número de horas de uso na capela auxilia o planejamento da época de inspeção.

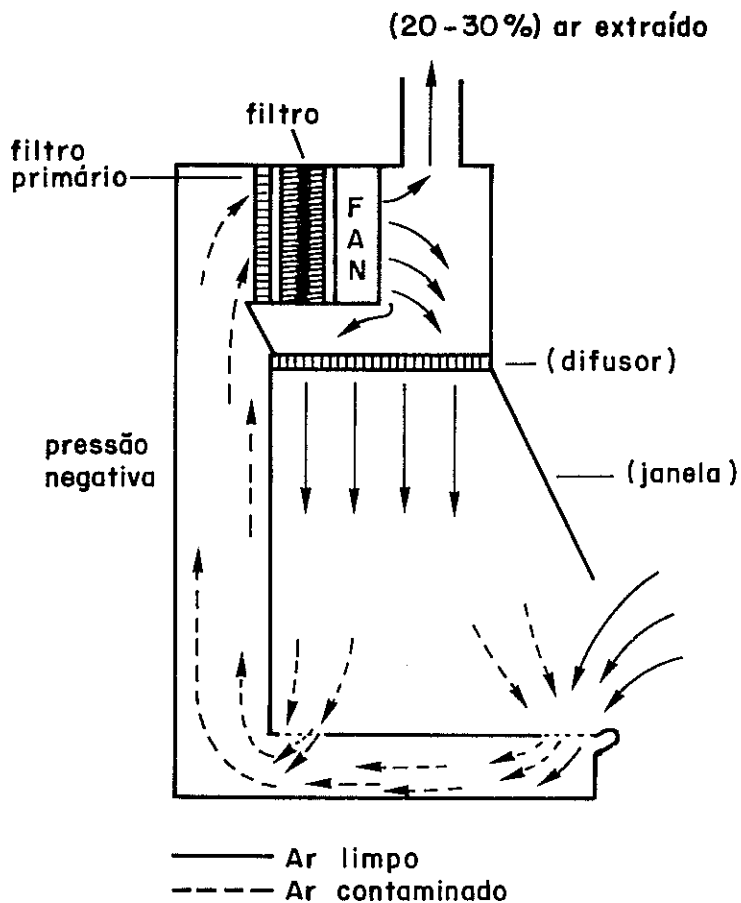


FIGURA 1.3. Representação esquemática de uma câmara de fluxo vertical.

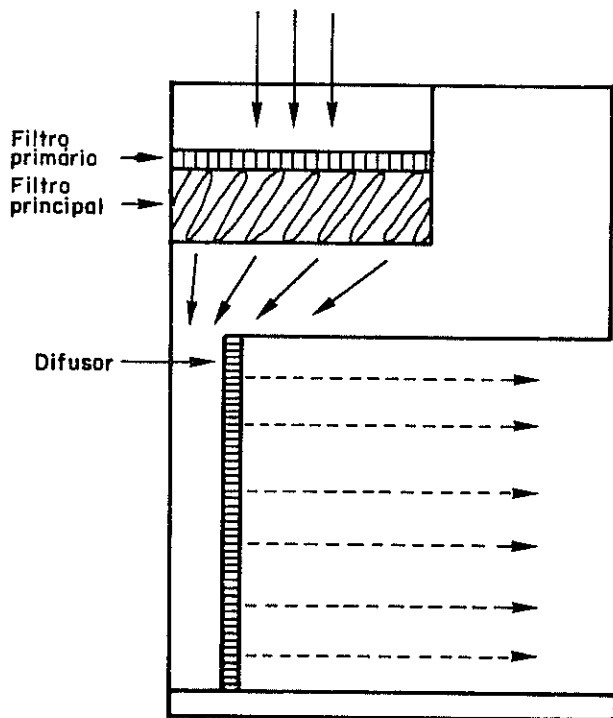


FIGURA 1.4. Representação esquemática de uma câmara de fluxo horizontal.

Recomenda-se desinfestar a câmara e ligá-la cerca de 10 minutos antes de usá-la; após cada etapa de manipulação, convém esperar de dois a três minutos, para que os aerossóis desprendidos possam ser filtrados novamente. A eficiência das câmaras depende também da localização correta e manutenção do equipamento, devendo-se evitar locais próximos a portas e janelas. Recomenda-se o posicionamento em locais mais reservados, livres de movimentação constante de pessoas ou equipamentos e correntes de ar.

Na falta desse equipamento, desde que não se trabalhe com microrganismos patogênicos, pode-se improvisar uma câmara, conforme ilustrado na Figura 1.5.

Autoclaves

Dois tipos de autoclave são utilizados em laboratórios de microbiologia: autoclave tipo “panela de pressão” e os modelos automáticos.

O princípio de funcionamento das autoclaves do tipo “panela de pressão” é o da fervura da água sob pressão. O equipamento possui válvula de segurança, manômetro e válvula de descarte de ar e vapor (Figura 1.6). Após o aquecimento da água por queimadores externos, serpentina ou aquecedor elétrico, o vapor entra na câmara interna da autoclave. Deve-se permitir que esse vapor remova todo o ar do interior da câmara, antes de fechar a válvula de escape. O tempo e pressão desejadas são estabelecidos e, ao fim do processo, a fonte de aquecimento é desligada, permitindo-se o resfriamento da autoclave. Quando o manômetro indicar pressão zero (o que, na verdade, indica a pressão ambiente), a válvula de descarga deve ser cuidadosamente aberta, permitindo a saída do excesso de vapor. Deve-se dar atenção a essa última etapa, pois se a autoclave ainda estiver sob pressão, pode haver explosão de líquidos, queima de papel, derramamento de líquidos, etc. **VÁRIOS ACIDENTES, COM QUEIMADURAS SÉRIAS, SÃO RELATADOS CONSTANTEMENTE PELO USO INADEQUADO DE AUTOCLAVES.** Ainda que com pressão nula, os vapores de gases e líquidos quentes podem causar acidentes.

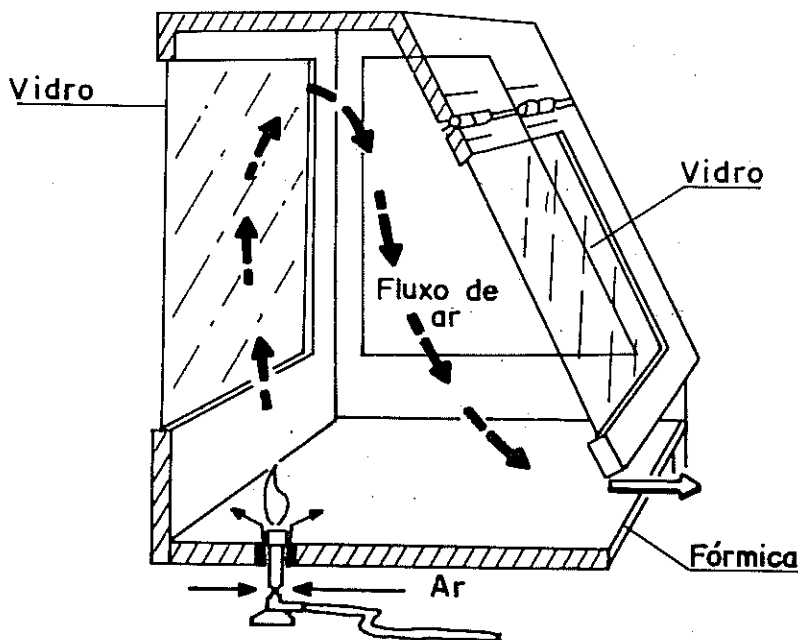


FIGURA 1.5. Câmara asséptica que pode ser construída no laboratório.

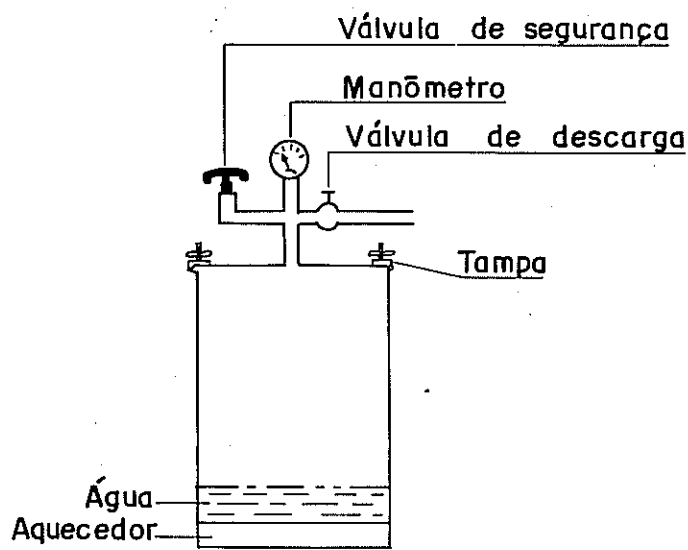


FIGURA 1.6. Esquema representativo de uma autoclave do tipo "panela de pressão".

Nas autoclaves automáticas, a descarga de vapor são controlados automaticamente, mas o princípio é o mesmo.

Existem dois tipos de autoclavagem: o de exaustão lenta, para líquidos em geral e o de exaustão rápida, para vidraria fechada, filtros de papel, etc.

Outros equipamentos

Para o armazenamento de microrganismos, congeladores a -80°C , liofilizadores ou tambor para nitrogênio líquido são os mais indicados, e mais detalhes serão dados no capítulo 5 da seção III.

Nos trabalhos de rotina em microbiologia utiliza-se, constantemente, outros equipamentos como: balança analítica, potenciômetro, bomba de vácuo, chapa de aquecimento, espectrofotômetro, entre outros. Estes equipamentos facilitam a rotina do laboratório.

Hoje, com os avanços nos estudos de biologia molecular, outros equipamentos foram incorporados à rotina de um laboratório de microbiologia: fonte de eletroforese, transiluminador com câmera fotográfica tipo Polaroid, sonicador, termociclador, concentrador a vácuo, entre outros.

1.2.2. Material de Consumo

Alças de platina para inoculação

As alças mais utilizadas para a inoculação de meios de cultura são as de platina, que podem ser compradas ou confeccionadas no próprio laboratório. Para isso, utiliza-se um cabo onde são inseridas as extremidades de um fio de platina 28-G. O fio é torcido várias vezes, deixando-se um círculo aberto em sua extremidade (Figura 1.7). Outros metais menos nobres podem ser utilizados, mas não são recomendados.

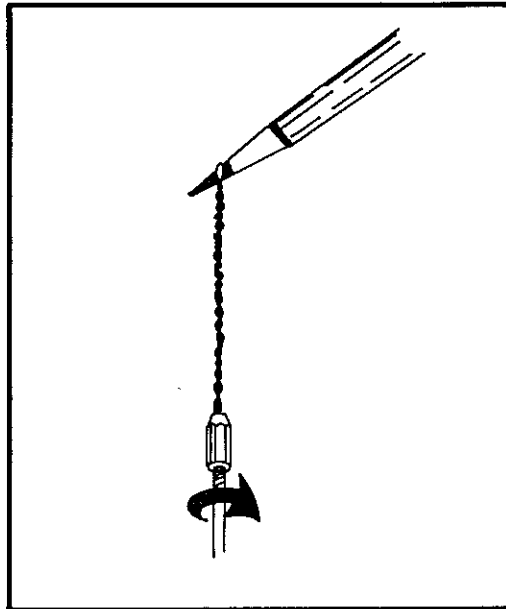


FIGURA 1.7. Esquema de confecção de uma alça de platina.

Bastão de vidro para espalhar o inóculo líquido

Também pode ser comprada ou confeccionada no próprio laboratório. Neste último caso, utiliza-se um bastão com espessura aproximada de 4 mm, torneado ao fogo (Figura 1.8).

Vidraría

A vidraría empregada nos laboratórios deve ser, preferencialmente, de “borossilicato”. As placas de Petri, de diversos tamanhos, podem ser esterilizadas inúmeras vezes. Essa esterilização é normalmente feita com ar quente, embrulhando-as em papel resistente. Existem, também, placas descartáveis de plástico, que facilitam muitos trabalhos.

Tubos de ensaio e pipetas

Existem tubos de ensaio de diversos tamanhos, fabricados com vidro refratário, alguns com tampa rosqueável. São disponíveis, também, diversos tipos de pipetas graduadas, pipetas tipo Pasteur e pipetas automáticas de um ou mais canais, com capacidade de 1 μL a 50 mL.

Outros tipos de vidraría

No laboratório é necessário ter, ainda: béqueres, erlenmeyers, provetas, “kitasatos” e outros tipos de vidraría, que são utilizadas em diversas etapas do trabalho rotineiro do laboratório.

Bico de Bunsen

Este equipamento é muito utilizado no dia a dia do laboratório de microbiologia, sendo utilizado para a esterilização rápida de instrumentos de vidro e metal, principalmente alças de platinas.

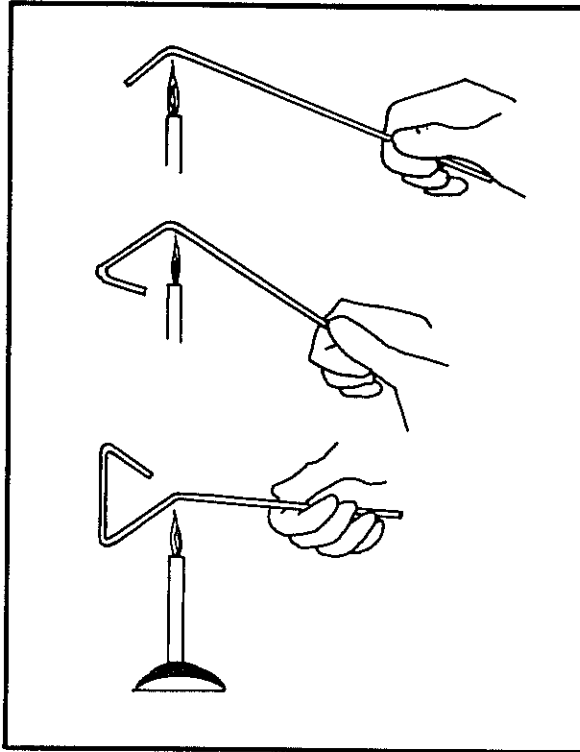


FIGURA 1.8. Esquema de confecção de um bastão de vidro para espalhar inóculo líquido.

1.3. Técnicas Básicas em um Laboratório de Microbiologia

1.3.1. Esterilização e Desinfestação

Através da esterilização, procura-se eliminar completamente todos os organismos vivos, incluindo esporos. Já o termo desinfestar significa “tirar o que infesta”, devendo-se dar preferência a esse termo em relação a outros como desinfecionar e desinfetar, que significam “fazer desaparecer a infecção”. Pela desinfestação, todos os organismos em estado vegetativo são eliminados o que não inclui, necessariamente, os esporos.

1.3.1.1. Esterilização

A esterilização expressa a probabilidade estatística de produzir um sobrevivente e os métodos empregados devem apresentar uma probabilidade inferior a 10^{-6} de permitir a sobrevivência de um organismo. Diversos estudos foram conduzidos procurando determinar o tempo necessário para eliminar os microrganismos e, exceto pela filtração, os outros métodos avaliam a taxa de mortalidade do processo. O valor D representa o tempo necessário, em uma determinada temperatura, para causar uma redução decimal (90%) da população microbiana. De um modo geral, a temperatura necessária é indicada como um subscrito, por exemplo, D_{100} . Esse valor D é estimado pela regressão gráfica ou matemática entre o tempo de esterilização e o número logarítmico dos sobreviventes. Para o cálculo desse valor D, podem ser utilizados esporos resistentes ao calor ou o organismo a ser estudado. No caso de indústrias, os estudos devem ser feitos, preferencialmente, com esporos incluindo-se, pelo menos, três repetições.

Os métodos de esterilização são:

Pelo fogo

Utilizada principalmente para a esterilização de instrumentos, como alça de platina e bastões de vidro.

Vapor sob pressão (autoclavagem)

É o método mais comumente empregado nos laboratórios de microbiologia do solo. Serve para esterilizar meios de cultura, equipamentos e vidraria. No caso de líquidos, deve-se observar que o tempo de esterilização depende do volume, conforme pode ser visto na Tabela 1.1.

Para meios de cultura, os tempos de esterilização normalmente utilizados são:

até 500 mL	20 minutos
1000 mL	30 minutos
2000 mL a 4000 mL	40 minutos
5000 mL a 8000 mL	60 minutos

Calor seco (ar quente)

Método utilizado amplamente em hospitais e diversos laboratórios, particularmente para a esterilização de vidraria, equipamento metálico e materiais que não podem ser esterilizados por calor úmido, como algumas graxas. O princípio de esterilização é o de morte por oxidação dos componentes intracelulares, mas os esporos são mais resistentes. O tempo necessário para a esterilização por calor seco é maior do que o necessário para esterilização por calor úmido (Tabela 1.2).

TABELA 1.1. Tempo necessário para atingir a temperatura de 121° C, em uma autoclave, em função do volume de líquido e do número de recipientes, considerando uma temperatura inicial de 26° C a 28° C. Segundo Phillips & Miller (1975).

Volume do Líquido (L)	Número de Recipiente	Tempo para Atingir 121° C (min)	Tempo Total do Ciclo (min)
0,5	30	19	29
1,0	20	34	44
2,0	10	37	47
3,0	8	43	53
4,0	5	52	62
5,0	5	60	70
6,0	4	62	72

TABELA 1.2. Tempo necessário para a esterilização pelo método calor seco (com ar quente).

Temperatura (° C)	Tempo de Esterilização (h)
170	1,0
160	2,0
150	2,5
140	3,0

Vapor sem pressão (Tyndallização)

Consiste de uma caixa de metal com água e uma fonte de aquecimento na parte inferior; a esterilização é feita pelo calor liberado durante a evaporação da água, que é posteriormente condensada. Esse processo é extremamente lento, mas pode ser empregado para a esterilização de alguns meios que sofrem hidrólise em temperaturas elevadas.

Gases

A esterilização por gases é recomendada para os materiais que não podem ser esterilizados por outros métodos, como alguns equipamentos cirúrgicos. Os gases empregados normalmente são o óxido de etileno e o formaldeído.

Filtragem

A filtragem é utilizada para emulsões e soluções que podem ser desnaturadas em altas temperaturas como, por exemplo, soluções de antibióticos e vitaminas. Existem dois tipos de filtro, os filtros de profundidade, que permitem a filtragem de volumes maiores e os filtros de membrana, muito eficientes, mas capazes de filtrar apenas pequenos volumes. Esses últimos são os mais empregados nos laboratórios de microbiologia. Existem porta-filtros, de diversos diâmetros, mas os mais comuns são os de 25 mm e 47 mm. Internamente são colocados os filtros e o conjunto é esterilizado. Para a filtragem de bactérias deve-se utilizar filtros com poros $< 0,2 \mu\text{m}$, de material compatível com o solvente.

Radiação

A radiação, empregada nos processos de esterilização, pode ser ionizante ou não ionizante e a sua eficácia depende da dose absorvida e do material a ser esterilizado.

Radiação ionizante

Inclui as partículas beta ou elétrons e as radiações eletromagnéticas, com radiação gama ou raios X. As doses de radiação são expressas em rad, que é equivalente à energia de absorção de 100 ergs/g, sendo normalmente expressas em Mrad (10^6 rad). A esterilização por elétrons, conseguida através de aceleradores, apresenta baixo poder de penetração dos elétrons e não é empregada nos estudos de microbiologia do solo no Brasil. Os raios ultravioleta são utilizados em desinfestações, conforme exposto anteriormente, mas o seu uso em larga escala é dificultado pelo baixo poder de penetração. Os raios X são mais utilizados nas indústrias de alimentos e seu uso é limitado, pois frequências diferentes podem ser necessárias para eliminar microrganismos diferentes.

O método de esterilização por radiação mais utilizado na área de microbiologia do solo é pelo uso de raios gama, havendo diversos estudos sobre o seu emprego na esterilização da turfa para inoculantes. De um modo geral 2,5 Mrad são suficientes para matar os organismos mais resistentes mas, no caso da turfa, diversos trabalhos indicam que pelo menos 5,0 Mrad são necessários para se conseguir um bom nível de desinfestação. Com o aumento da venda de inoculantes em turfa esterilizada o emprego dos raios gama pode aumentar consideravelmente.

1.3.1.2. Desinfestação

Diversos produtos químicos são utilizados para a desinfestação e os mais comumente empregados são o álcool e o hipoclorito. Os hipocloritos são efetivos contra bactérias em estado vegetativo, esporos e fungos. As concentrações normalmente empregadas na rotina do laboratório de variam de 1:40 a 1:100 (peso:volume) e, no caso de hipoclorito comercial (água sanitária), as diluições empregadas variam de 1:10 a 1:25. No Brasil, o álcool é muito utilizado na forma comercial, que normalmente apresenta uma concentração de 90%.

Para a esterilização de incubadoras ou ambientes fechados, o formaldeído pode ser utilizado, embora cause irritação nos olhos. Para a desinfestação das bancadas de trabalho, pode-se empregar desinfetantes domésticos diluídos em água conforme as recomendações dos fabricantes.

1.3.2. Técnicas de Inoculação de Bactérias

Para que a inoculação ou semeadura de um meio de cultura seja bem sucedida, algumas regras básicas devem ser obedecidas: a alça de platina precisa ser flambada antes e depois de cada inoculação, todo o material contendo meio de cultura deve ser aberto perto do bico de Bunsen, as bocas dos tubos de ensaio devem passar pela chama do bico antes e depois da retirada do material e a tampa nunca deve ser colocada sobre o balcão de trabalho, devendo ser mantida presa na altura do dedo mínimo.

Inoculação em tubos ou frascos com meio líquido, semi-sólido e sólido

A inoculação é feita pela transferência do inóculo com alça de platina ou com pipeta para o meio líquido. No caso da inoculação em meio semi-sólido (com 1,8 a 2,0 g de ágar/L), a alça de

platina ou ponta da pipeta são introduzidas a uma profundidade de 0,5 a 1,0 cm de profundidade, para as bactérias que precisam de uma pressão de oxigênio mais baixa. No caso de transferência para meio sólido (15 a 20 g de ágar/L), preferencialmente inclinado, deve-se fazer estrias na superfície do meio (Figura 1.9). No caso de bactérias anaeróbias, é recomendada a transferência profunda em meio sólido.

Inoculação em placa com meio sólido

Também conhecida como técnica de esgotamento. Consiste em espalhar um inóculo inicial de modo sucessivo, de modo a obter colônias isoladas, existindo basicamente dois tipos de riscagem de placa (Figura 1.10). A riscagem da Figura 1.10a é mais utilizada em isolamentos iniciais e a representada na Figura 1.10b é empregada na obtenção de colônias isoladas (Figura 1.11). Alguns cuidados básicos recomendados para a riscagem representada na Figura 1.10b são: flambar a alça depois de cada movimento, esfriando-a no ágar na extremidade das placas; as placas devem ser invertidas antes da incubação, evitando a contaminação por gotículas de água que condensam na parte interna da tampa da placa.

Inoculação por plaqueamento

Essa técnica é mais conhecida pela denominação de “pour plate”, sendo utilizada para a obtenção de culturas isoladas ou para a contagem de colônias em placas. Uma alíquota de inóculo líquido é transferida para placas estéreis e, em seguida, 15 mL a 20 mL de meio sólido fundido (mantido à temperatura de 40° C a 45° C) é colocado sobre o inóculo. As placas são rodadas suavemente para misturar o inóculo com o meio. Após a solidificação, elas são invertidas e incubadas.

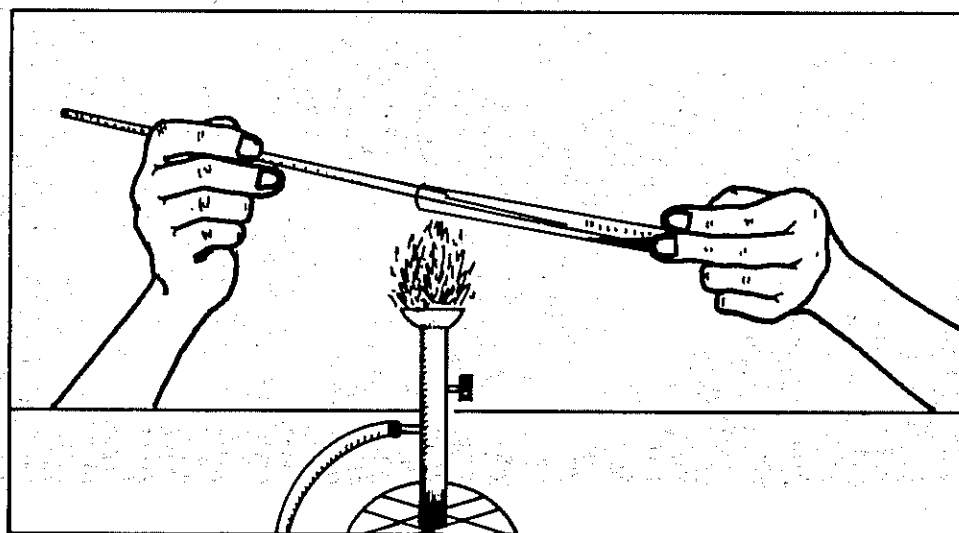


FIGURA.1.9. Inoculação em um tubo contendo meio sólido.

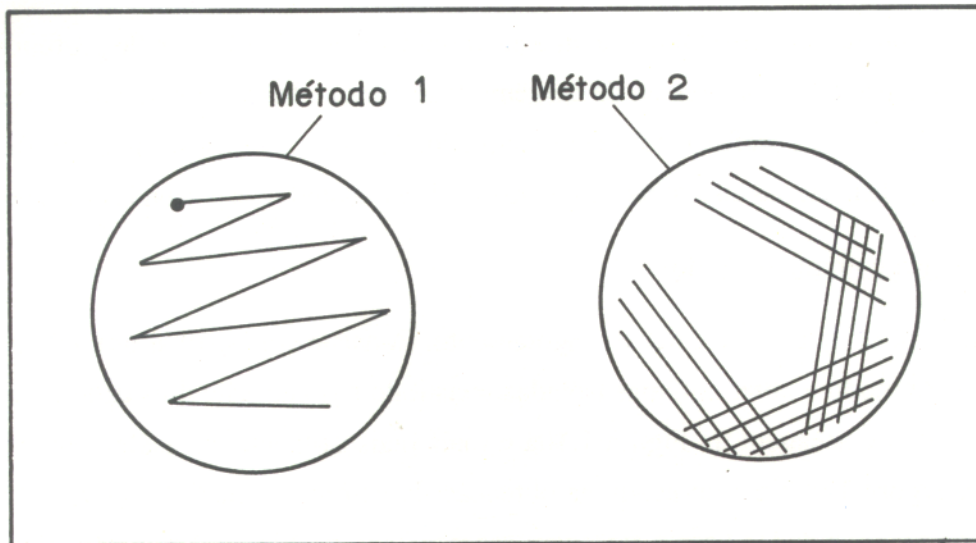


FIGURA. 1.10 Representação esquemática da riscagem em placas com meio sólido. À esquerda, a técnica mais utilizada em isolamentos iniciais e à direita, a técnica recomendada para a obtenção de colônias isoladas.

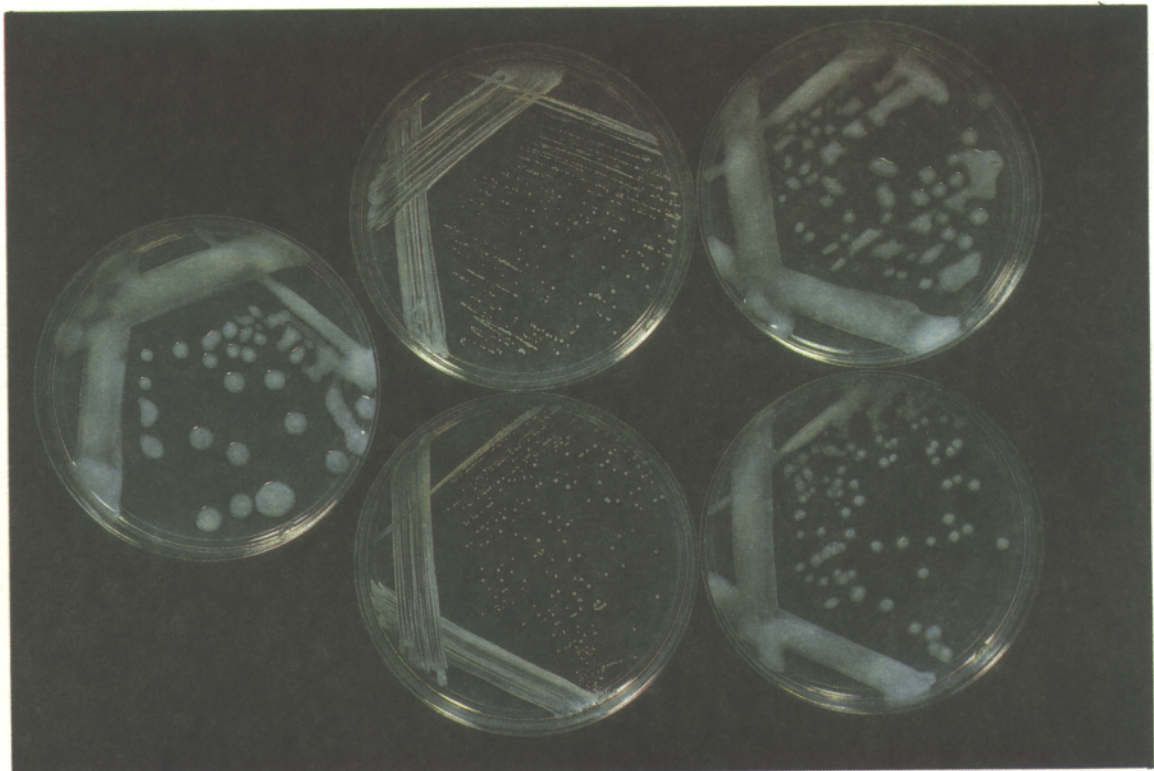


FIGURA 1.11. Colônias isoladas obtidas pela técnica de semeadura em placa com meio sólido.

1.3.3. Microscopia

1.3.3.1. Microscópio óptico

Permite uma série de estudos, devido ao poder de resolução maior em relação ao olho humano (Tabela 1.3)

Coloração do material para o microscópio óptico

O objetivo da coloração nos microscópios ópticos é o de melhorar o contraste dos espécimes, o que permite a diferenciação de diversos elementos histoquímicos. Alguns corantes empregados estão listados na Tabela 1.4.

TABELA 1.3. Comparação entre o tamanho de diversas partículas e o poder de resolução do olho humano e dos microscópios.

Partícula/Microscópio	Tamanho ou Poder de Resolução
Mitocôndria	0,1 - 1,0 μm
Membranas intracelulares	5,0 - 10,0 nm
Molécula de hemoglobina	5,0 nm
Ribossomo citoplasmático	19,0 - 26,0 nm
Olho humano	100,0 - 200,0 μm
Microscópio óptico	0,2 - 0,4 μm
Microscópio eletrônico	1,0 - 2,0 nm
Espessura de cortes para microscópio óptico	1,0 - 10,0 μm
Espessura de cortes para microscópio eletrônico	< 100,0 nm

TABELA 1.4. Coloração adquirida após a preparação de tecidos com corantes empregados nos estudos de microscopia óptica.

Corante	Partícula	Cor
Azul de toluidina	RNA	roxo
	DNA	azul
	polifosfatos	vermelho
	ácidos policarboxílicos	vermelho
	polifenóis	verde ou azul-esverdeado
Reagente de Schiff	lignina	verde ou azul-esverdeado
	amido	vermelho
	polissacarídeos da parede celular	vermelho
Negro Sudão (Sudan black)	calose	sem coloração
	celulose	sem coloração
	cutículas	preto
	suberina	preto
	parede celular	vermelho
	amido	vermelho

No preparo de materiais para o microscópio de transmissão, são utilizados corantes contendo metais pesados, tais como:

- acetato de urânio (uranyl acetate) - os tecidos são colocados em uma solução saturada de acetato de urânio por 20 a 40 min., sendo então lavados com água destilada;
- citrato de chumbo (lead citrate) - os tecidos são colocados em uma solução aquosa a 0,2%, por 1 a 10 min., procurando-se evitar a contaminação com CO₂ pelo uso de hidróxido de sódio (NaOH); após esse período, procede-se à lavagem com água destilada.

Nenhuma técnica preserva a natureza *in vivo* do material estudado, mas deve-se procurar manter a sua estrutura. Para isso, na técnica de microscopia de varredura, deve-se procurar: estabilidade mecânica, remoção ou imobilização da água e o direcionamento dos elétrons. Isso pode ser conseguido pela fixação do material por congelamento, seguida por fixação, desidratação e revestimento. Os procedimentos geralmente incluem: 1- a fixação em glutaraldeído; 2- desidratação em etanol e/ou acetona; 3- emprego do ponto de congelamento crítico; 4- revestimento com um filme de metal pesado, como ouro ou paládio. Certamente os que tiverem acesso a um microscópio eletrônico terão acesso também ao treinamento necessário, por isso não serão dados mais detalhes.

Hoje, existem inúmeras variações e centenas de estudos sobre microscopia óptica e eletrônica, alguns dos quais são citados a seguir:

- imunocitoquímica - consiste do uso de anticorpos marcados que atuam como reagentes específicos, localizando determinados constituintes do tecido (os antígenos) *in situ*. Têm sido utilizados em ensaios enzimáticos (peroxidase, fosfatase alcalina), localização de partículas fluorescentes, etc.;
- marcação imunológica com ouro (immunogold labelling) - utiliza partículas de 5 nm a 20 nm de diâmetro, permitindo a visualização em microscópio eletrônico;
- incremento, pela prata, da marcação imunológica com ouro (silver enhancement) - através de uma segunda camada de prata, permite a visualização das partículas do item anterior em microscópio óptico;
- uso de anticorpos monoclonais - uso de anticorpos que reconhecem somente um epítipo (epitope) do antígeno sendo, portanto, bastante específicos. Essa técnica tem sido empregada para reconhecer componentes específicos das bactérias, nódulos, etc.

Mais detalhes sobre os tópicos aqui descritos podem ser obtidos em outros livros, como Gerhardt et al. (1984); Collins et al. (1989) e Ribeiro & Soares (1993).

1.4. Considerações Finais

Antes de iniciar um trabalho em um laboratório de microbiologia, é essencial receber um treinamento sobre os princípios básicos de funcionamento, incluindo segurança, principais equipamentos e técnicas utilizadas. As atividades poderão ser, então, maximizadas, sem oferecer quaisquer riscos a quem as conduz.

1.5. Referências Bibliográficas

- COLLINS, C. H.; LYNE, P. M.; GRANGE, J. M. **Collins and Lyne's Microbiological Methods**. 6th ed. Oxford: Butterworth Heinemann, 1989. 407p.
- GERHARDT, P.; MURRAY, R. G. E.; COSTILOW, R. N.; NESTER, E. W.; WOOD, W. A.; KRIEG, N. R.; PHILLIPS, G. B. **Manual of Methods for General Bacteriology**. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1984. 524p.
- PHILLIPS, G. B.; MILLEE, W. S. **Remington's Pharmaceutical Sciences**. 15th ed. Easton: Mack Publishing, 1975. p.1398-1404.
- RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R. **Microbiologia prática: roteiro e manual, bactérias e fungos**. São Paulo: Atheneu, 1993. 112p.

PARTE II. ESTUDOS SOBRE A ASSOCIAÇÃO RIZÓBIO-LEGUMINOSAS

CAPÍTULO 2

COLETA DE NÓDULOS E ISOLAMENTO DE RIZÓBIO

Mariangela Hungria¹

2.1. Introdução

O nitrogênio é um nutriente requerido em grande quantidade para o crescimento das plantas. As fontes fornecedoras desse N são: 1- nitrogênio do solo, proveniente principalmente da decomposição da matéria orgânica; 2- nitrogênio fornecido por fertilizantes; e 3- nitrogênio fornecido pelo processo da fixação biológica do nitrogênio atmosférico (N_2).

O N_2 é abundante na natureza, constituindo quase 80% do gás atmosférico. Mas somente algumas bactérias aeróbias, dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*, possuem um complexo enzimático, denominado dinitrogenase, capaz de quebrar a tripla ligação entre os dois átomos de N_2 e transformá-lo em uma forma utilizável pelas plantas. Esse processo ocorre em estruturas típicas e altamente específicas, os nódulos, que são formados após o estabelecimento da simbiose entre o microssimbionte e a planta hospedeira e o processo é conhecido por fixação biológica do N_2 .

Apesar do processo de fixação biológica do N_2 estar sendo estudado intensivamente há mais de 100 anos, desde que Beijerinck isolou as bactérias de rizóbio dos nódulos de ervilha (Wilson, 1940; Burris, 1974; Evans & Burris, 1992), o nosso conhecimento sobre diversos aspectos da simbiose ainda é precário. Algumas áreas de estudo, como a da genética e bioquímica da bactéria, evoluíram bastante, mas o desconhecimento de fatos básicos, como o número de espécies de leguminosas capazes de se associar ao rizóbio, ainda persiste. Por muitos anos ainda teremos, com certeza, dezenas de trabalhos relatando descobertas de nodulação em espécies de leguminosas. Mas, mesmo para as espécies conhecidas e de grande importância econômica, como a soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), o isolamento de bactérias, nos últimos anos, permitiu a identificação de novas espécies (*R. tropici*, para o feijoeiro e *R. fredii*, para a soja) e dezenas de novas bactérias mais eficientes e competitivas. A coleta de nódulos e o isolamento das bactérias, portanto, são de grande importância nos estudos de rizobiologia.

¹ Pesquisadora, Ph.D., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), Cx. Postal 1061, CEP 86001-970, Londrina, PR.

2.2. A Planta Hospedeira

A família Leguminosae possui cerca de 750 gêneros e 18.000 espécies conhecidas (Allen & Allen, 1981). A família está dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae (flores normalmente com cinco pétalas e radialmente simétricas), Mimosoideae (inflorescência composta, com pétalas reduzidas) e Papilionoideae (flores como a do feijão, Figura 2.1).



FIGURA 2.1. Flores de *Phaseolus coccineus*, típicas da subfamília Papilionoideae.

Diversos hábitos de crescimento são encontrados nessa família: árvores, arbustos, herbáceas. Na década passada, Delorit & Gunn (1986) propuseram a subdivisão da família Leguminosae, criando a família Fabacea. Existe, ainda, muita controvérsia taxonômica mas, de um modo geral, ainda prevalece a classificação dessas plantas na família Leguminosae. Também há controvérsias quanto à nomenclatura da subfamília Papilionoideae, alguns preferindo a nomenclatura Faboideae ou, ainda, Lotoideae. Na Tabela 2.1, estão listadas as leguminosas hospedeiras mais estudadas em relação a diversos aspectos da fixação biológica. Descrições detalhadas sobre as diversas espécies e sua capacidade de fixação do N_2 foram compiladas por Giller & Wilson (1993).

TABELA 2.1. Nome vulgar e científico das leguminosas mais estudadas quanto à fixação do N₂.

Nome Vulgar ¹	Gênero ou Espécie ²
acácia (black wattle)	<i>Acacia mearnsii</i> , <i>Acacia</i> spp.
asquenomene (aeschynomene)	<i>Aeschynomene scabra</i> , <i>Aeschynomene</i> spp.
amendoim (peanut, groundnut)	<i>Arachis hypogaeae</i> , <i>Arachis</i> spp.
calopogônio (calopogonium, calopo)	<i>Calopogonium mucunoides</i> , <i>Calopogonium</i> spp.
centrosema (centrosema)	<i>Centrosema macrocarpum</i> , <i>Centrosema</i> spp.
grão-de-bico (ckickpea, garbanzo)	<i>Cicer arietinum</i>
crotalaria (Indian hemp, sunnhemp)	<i>Crotalaria juncea</i> , <i>Crotalaria</i> spp.
desmódio (greenleaf)	<i>Desmodium ovalifolium</i> , <i>Desmodium</i> spp.
eritrina (erythrina)	<i>Erythrina variegata</i> , <i>Erythrina</i> spp.
soja (soybean, soyabean)	<i>Glycine max</i>
lablab (hyacinth bean)	<i>Lablab purpureus</i>
ervilha-de-cheiro, chícaro (grasspea, blue vetchling, ckickling pea)	<i>Lathyrus sativus</i>
lentilha (lentil)	<i>Lens culinaris</i> , <i>Lens esculenta</i>
leucena (leucaena)	<i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Leucaena</i> spp.
cornichão (lotus)	<i>Lotus corniculatus</i> , <i>Lotus</i> spp.
tremoço (lupin)	<i>Lupinus mutabilis</i> , <i>Lupinus</i> spp.
siratro (siratro)	<i>Macroptilium atropurpureum</i>
alfafa (alfalfa, lucerne)	<i>Medicago sativa</i>
melilotu (white meliloti)	<i>Melilotus alba</i> , <i>Melilotus</i> spp.
mucuna (velvet bean)	<i>Mucuna cochinchensis</i> , <i>Mucuna</i> spp.
serradela	<i>Ornithopus</i> spp.
feijão (bean, common bean, bush bean, red kidney, navy bean, haricot bean)	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Phaseolus</i> spp. ³
ervilha (garden pea, field bean)	<i>Pisum sativum</i>
algaroba	<i>Prosopis juliflora</i> , <i>Prosopis</i> spp.
puerária, kudzu tropical (tropical kudzu, puero)	<i>Pueraria phaseoloides</i> , <i>Pueraria</i> spp.
sesbânia (sesbania)	<i>Sesbania rostrata</i>
estilosantes (stylo)	<i>Stylosanthes guianensis</i> , <i>Stylosanthes</i> spp.
trevo, trifólio (white clover) (outros trevos: red, crimson, red, scarlet)	<i>Trifolium repens</i> , <i>Trifolium</i> spp.
gatonha (fenugreek)	<i>Trigonella foenum-graecum</i>
fava (faba bean, field bean, tick bean)	<i>Vicia faba</i>
ervilhaca (vicia)	<i>Vicia sativa</i>
caupi (cowpea)	<i>Vigna unguiculata</i> , <i>Vigna</i> spp. ⁴

¹ Entre parênteses, o nome vulgar em inglês.² No caso de várias espécies importantes, o nome de uma delas é citado, e as demais, apenas com o gênero e spp.³ Os estudos com feijão são muito importantes no Brasil e outras espécies estudadas são: *Phaseolus acutifolius*, *P. coccineus* e *P. lunatus*.⁴ Os estudos com *Vigna* spp. também são muito importantes no Brasil, e outras espécies citadas são: *Vigna aconitifolia*, *V. angularis*, *V. mungo*, *V. radiata*, *V. subterranea*, *V. trilobata* e *V. umbellata*.

Até 1981, somente 15% das espécies da família *Leguminosae* haviam sido investigadas quanto à sua capacidade de nodular (Allen & Allen, 1981). De um modo geral, das 1300 espécies da subfamília *Caesalpinioideae* até agora estudadas, menos de 30% nodulam, enquanto que aproximadamente 90% das espécies nas subfamílias *Mimosoideae* e *Papilionoideae* são nodulíferas. Nesse levantamento realizado em 1981, a grande maioria das espécies florestais da região tropical ainda não havia sido investigada quanto à nodulação. Hoje, o número de espécies conhecidas aumentou substancialmente, devendo-se salientar a grande contribuição dos pesquisadores brasileiros. Levantamentos realizados na Amazônia e na Mata Atlântica, por exemplo, revelaram a capacidade de nodular em 210 espécies e 25 gêneros que ainda não haviam sido pesquisados em relação a esta característica (Siqueira et al., 1994).

A maior parte dos nódulos é formada no sistema radicular. Alguns hospedeiros, porém, são capazes de formar nódulos no caule, particularmente sob condições de alagamento. Esses nódulos ocorrem no gênero *Aeschynomene*, em várias espécies e *Sesbania* (na espécie *S. rostrata*). Também foram observados nódulos no caule de *Neptunia oleracea*, mas posteriormente foi confirmado que esses nódulos, na verdade, se formam em raízes adventícias que aparecem sob condições de alagamento (Giller & Wilson, 1993). Recentemente, nódulos no caule de um novo gênero, *Discolobium*, foram encontrados na região do Pantanal matogrossense (Loureiro et al., 1993) (Figura 2.2). Existem inúmeros livros de taxonomia de plantas que poderão ser consultados para maiores esclarecimentos sobre as características principais da família *Leguminosae*, pois não serão dados maiores detalhes.



FIGURA 2.2. Nódulos no caule de *Discolobium*, na região do Pantanal Mato-grossense. Cortesia da Dra. Maria de Fátima Loureiro.

2.3. O Microsmbionte

Há descrições do gênero *Rhizobium* por Kirchner, em 1886 e Frank, em 1889. Em 1932, as bactérias capazes de nodular leguminosas foram classificadas no gênero *Rhizobium* e subdivididas num critério baseado, principalmente, nos grupos de inoculação cruzada entre o microsmbionte e a planta hospedeira (Fred et al., 1932). Outras características fisiológicas, bioquímicas e genéticas, além da inoculação cruzada e da taxa de crescimento lento e produção de álcali ou ácido *in vitro* passaram a ser consideradas nas décadas subseqüentes e permitiram a divisão de *Rhizobium* em dois grupos, de crescimento rápido e de crescimento lento. As bactérias, porém, continuaram a ser classificadas no gênero *Rhizobium* (Jordan & Allen, 1974; Buchanan, 1980). A partir de 1982, as bactérias da espécie *Rhizobium japonicum*, que nodulam a soja e as de *Rhizobium* sp., também denominadas de *Rhizobium* promíscuo, que nodulam diversas espécies de leguminosas, foram reclassificadas em um novo gênero, *Bradyrhizobium*. O nome *Bradyrhizobium* é alusivo às taxas de crescimento dessa bactéria, pois “bradus” vem do grego, significando lento e *Rhizobium* é o nome genérico da bactéria (Jordan, 1982, 1984). É interessante observar, porém, que a divisão de rizóbio em duas classes, de acordo com a taxa de crescimento, já havia sido sugerida por Löhnis & Hansen (1921).

Mais recentemente, um novo gênero foi definido, *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988), com bactérias que nodulam o caule e raízes de *Sesbania* sp. e que são capazes de fixar N₂ *in vitro*, em meio de cultura sem qualquer fonte de nitrogênio combinado. As principais diferenças entre esses três gêneros estão compiladas na Tabela 2.2.

TABELA 2.2. Principais diferenças entre os gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*. Segundo Giller & Wilson (1993).

Característica	<i>Rhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Azorhizobium</i>
Taxa de crescimento	crescimento rápido; colônias com 1 mm em dois dias; tempo de geração de 2,4 h a 4,0 h	crescimento lento; colônias com 1 mm em seis a 10 dias; tempo de geração de 7,0 h a 13,0 h	crescimento rápido; colônias com 1 mm em dois dias; tempo de geração de 5,0 h
Flagelos	flagelos peritríquios	um flagelo polar ou subpolar	flagelos peritríquios
%GC do DNA	59 - 64	62 - 66	66
Fixação <i>in vitro</i>	não	detectada em algumas bactérias em condições microaerofílicas, mas os produtos não podem ser assimilados	ocorre sem qualquer suplementação exógena de N e os produtos são assimilados
Metabolismo do carboidrato	Possuem a 6-fosfogluconato desidrogenase ligada a NADP (6-PGD).	Não possuem a 6-PGD e usam a desidrogenase Entner-Doudoroff	Não assimilam açúcares, exceto glicose

A taxonomia do rizóbio vem sendo constantemente alterada. Novas espécies são relatadas, subdivididas, reclassificadas, e “retiradas da classificação” (isto é, quando a comunidade científica não aceita uma nova classificação, como aconteceu com o gênero *Sinorhizobium*, descrito por Chen et al., 1988, e que foi refutado por Jarvis et al., 1992). A situação atual da classificação dessas espécies está exposta na Tabela 2.3.

TABELA 2.3. Espécies de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* e principais hospedeiros.

Espécie	Hospedeiro Representativo	Referência
<i>Rhizobium leguminosarum</i>		
biovar <i>trifolii</i>	<i>Trifolium repens</i>	Jordan (1984)
biovar <i>viceae</i> ¹	<i>Vicia sativa</i>	Jordan (1984)
biovar <i>phaseoli</i> ²	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Jordan (1984); Young et al. (1993)
<i>Rhizobium tropici</i> ³	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Martínez-Romero et al. (1991)
<i>Rhizobium etli</i> ⁴	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Segovia et al. (1993)
<i>Rhizobium meliloti</i>	<i>Melilotus alba</i> , <i>Medicago sativa</i>	Jordan (1984)
<i>Rhizobium loti</i>	<i>Lotus corniculatus</i>	Jordan (1984)
<i>Rhizobium fredii</i> ⁵	<i>Glycine max</i> , <i>Glycine soja</i>	Scholla & Elkan (1984)
<i>Rhizobium galegae</i>	<i>Galega orientalis</i>	Lindström (1989)
<i>Rhizobium huakii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	Chen et al. (1991)
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234 ⁶	mais de 30 gêneros de leguminosas e a não-leguminosa <i>Parasponia</i>	Trinick (1980); Trinick & Gabraith (1980)
<i>Rhizobium</i> BTAi 1 ⁷	<i>Aeschynomene indica</i>	Eaglesham et al. (1990)
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus et al. (1988)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine max</i>	Jordan (1984)
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Glycine max</i>	Kuykendall et al. (1992)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ⁸	<i>Vigna</i> , <i>Lupinus</i> , <i>Arachis</i> , etc.	Jordan (1984)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Parasponia</i>)	<i>Parasponia</i> (não-leguminosa)	Trinick & Hadobas (1988)

¹ Essa espécie foi denominada “*viceae*” por Jordan (1984), talvez por um problema de erro tipográfico. Por isso, muitos autores preferem o termo “*viciae*”.

² Segundo Young et al. (1993), a designação *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* deve ser usada somente para as estirpes que estejam estreitamente relacionadas com os genes cromossômicos dos outros biovars desta espécie, como, por exemplo, a estirpe J18002.

³ Inclui estirpes como a CIAT899 e a CFN299.

⁴ Inclui estirpes como a CFN 42. Diferenças entre as espécies *R. tropici* e *R. etli* são dadas no capítulo 13.

⁵ Chen et al. (1988) reclassificaram *R. fredii* em um novo gênero com duas espécies, *Sinorhizobium fredii* e *Sinorhizobium xinjiangensis*. Diferenças que justificassem um novo gênero, porém, não foram encontradas por Jarvis et al. (1992), razão pela qual a nova nomenclatura não é recomendada (Young et al., 1993).

⁶ NGR (New Guinea *Rhizobium*); ainda não classificada no manual de taxonomia (Jordan, 1984), embora provavelmente seja *R. fredii* (J. P. W. Young, comunicação pessoal).

⁷ Estritamente aeróbio, mas apresenta propriedades fotossintéticas, tendo sido sugerido o nome *Photorhizobium thompsonianum* (Eaglesham et al., 1990). Young (1992), porém, não recomenda essa nomenclatura, e sugere o nome *Bradyrhizobium* sp. *Aeschynomene*. Embora os estudos de sequência de DNA tenham mostrado que BTAi 1 apresenta semelhanças com o gênero *Bradyrhizobium* (Young et al., 1991), essa estirpe apresenta características fisiológicas intermediárias entre *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (Eaglesham et al., 1990). Nodula o caule e raízes de *Aeschynomene*.

⁸ Estes microrganismos não são divididos em espécies ou biovars e a convenção é de que sejam designados como *Bradyrhizobium* sp., com o nome da planta hospedeira entre parênteses.

O manual de taxonomia de Bergey (Jordan, 1984) classifica os gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* no reino *Procaryotae* e na família *Rhizobiaceae*. Esses gêneros foram agrupados devido à sua habilidade em fixar N_2 , pois na verdade são muito distintos entre si, estando mais próximos de outros gêneros não-fixadores de N_2 . *Bradyrhizobium japonicum*, por exemplo, apresenta semelhanças genéticas com *Rhodospseudomonas palustris*, bactéria fototrófica púrpura não-sulfurosa. Com base nos estudos empregando técnicas moleculares, tem-se utilizado cada vez mais a classificação filogenética, na qual as bactérias ficam posicionadas como *Proteobacteria* na subdivisão alpha. Mais detalhes sobre taxonomia de *Rhizobium/Bradyrhizobium/Azorhizobium* podem ser conseguidos nos trabalhos de (Young et al., 1991; Young, 1992). Cabe salientar, aqui, que essas bactérias costumam ser chamadas, genericamente, de rizóbio, independente do gênero a que pertencem. Deve-se evitar o uso de termos como bradirizóbio ou azorizóbio.

Aqui também não serão dados detalhes sobre a associação simbiótica com *Frankia*. O gênero *Frankia* é classificado como uma bactéria da ordem dos actinomicetos (alguns pesquisadores não aceitam a classificação como bactérias). Ao contrário do rizóbio, essas bactérias são Gram-positivas e apresentam crescimento micelial, semelhante ao de fungos, além de esporângios como estrutura reprodutiva. Além disso, *Frankia* apresenta vesículas, onde fica o complexo da dinitrogenase. Essas bactérias conseguem nodular hospedeiros de diversas famílias de angiospermas, como *Alnus* spp., *Datisca cannabina*, *Myrica gale*, *Casuarina* sp., dentre outros. Mais detalhes sobre essas associações podem ser obtidos em Giller & Wilson (1993).

2.4. Princípio do Isolamento

Os processos iniciais da associação rizóbio-leguminosa são muito semelhantes aos da invasão das plantas por patógenos, existindo uma corrente de rizobiologistas que defende a origem comum entre o processo de nodulação e o processo de infecção das raízes por bactérias patogênicas. De qualquer modo, no processo de coleta de nódulos, isolamento e autenticação do rizóbio, devem ser obedecidos os postulados de Koch, que são amplamente utilizados como prova de fitopatogenicidade. Esses postulados foram descritos pelo alemão Robert Koch, em 1882, que publicou um trabalho sobre tuberculose. Desde então, suas recomendações sobre isolamento de agentes causadores de doenças são utilizadas nas mais diversas áreas da biologia. Esses postulados recomendam as seguintes etapas:

- a) o organismo causador da doença deve estar sempre presente no hospedeiro quando a "doença" ocorrer;
- b) o provável causador da doença deve ser isolado do hospedeiro e crescido em cultura pura;
- c) o organismo obtido na cultura pura, quando inoculado de uma maneira maciça no hospedeiro, deve produzir a mesma doença;
- d) o organismo que se acredita ser o causador da doença deve ser isolado novamente, crescido em cultura pura e comparado com o organismo inicial.

Na simbiose rizóbio-leguminosa, o organismo é o rizóbio e a "doença" é o nódulo.



2.5. Coleta de Nódulos

O conhecimento de taxonomia das plantas é essencial para o levantamento de espécies nodulíferas. O recomendável é que um taxonomista, com conhecimento das plantas locais, acompanhe o microbiologista em seu levantamento. Na impossibilidade do acompanhamento de um taxonomista, recomenda-se escolher uma planta representativa, incluindo flores e frutos, secá-la sob pressão e enviar para um herbário qualificado.

Para a coleta de nódulos deve-se, inicialmente, identificar diversas plantas da espécie a ser estudada, escolhendo-se uma ou algumas representativas desse estudo. Cuidadosamente, demarcar um círculo ao redor da planta, correspondente à área do sistema radicular. No caso de leguminosas herbáceas, um círculo de cerca de 15 cm é suficiente mas, no caso arbóreas, podem ser necessários dois círculos, um próximo à raiz principal e um mais distante, para as raízes secundárias. Para leguminosas herbáceas, cavar a uma profundidade aproximada de 30 cm. No caso de espécies arbóreas, há relatos de nódulos em profundidades maiores. A terra deve ser removida cuidadosamente, para não danificar o sistema radicular. A amostra deve incluir o sistema radicular secundário onde, muitas vezes, estão diversos nódulos. Retirar o excesso de solo, cuidadosamente, com as mãos, de preferência sobre uma peneira, para verificar se os nódulos não estão sendo perdidos. Colocar a planta ou as raízes num saco plástico. No caso de leguminosas que estão sendo investigadas quanto à capacidade de nodulação, coletar todo o tipo de material que possa ser útil aos taxonomistas, como flores, frutos e sementes. As sementes são particularmente importantes, para a autenticação da capacidade nodulífera tanto da espécie hospedeira como do microssimbionte.

Deve-se observar, cuidadosamente, qualquer material aderido às raízes, lembrando-se sempre que os nódulos das espécies florestais apresentam as mais diversas formas. Em relação às bactérias que nodulam o caule de determinadas espécies, os nódulos podem não estar presentes o ano todo, mas somente no período em que houver alagamento. Nas Figuras 2.3 e 2.4, são mostrados alguns nódulos de leguminosas.

No caso de coletas em locais distantes, deve-se levar um recipiente para guardar os nódulos até o retorno ao laboratório. O mais comum é levar um tubo contendo algum material dessecante no fundo, geralmente cloreto de cálcio anidro ou sílica gel. O material dessecante é coberto com algodão e, acima deste, colocam-se os nódulos. O frasco deve, preferencialmente, ter tampa rosqueável, que é de fácil manipulação e permite um bom sistema de vedação. O dessecante tem por finalidade remover a água dos nódulos, rapidamente, e mantê-los secos, para impedir o crescimento de outros microrganismos. Inúmeros pesquisadores enviam nódulos para outros continentes sem quaisquer problemas. Recomenda-se que os nódulos guardados dessa maneira sejam isolados no período de seis a 12 meses, mas há relatos de isolamentos bem sucedidos que foram realizados em nódulos guardados por períodos mais longos.



FIGURA 2.3. Raiz nodulada de soja.



FIGURA 2.4. Raiz nodulada de *Crotalaria mucronata*.

Quando o material coletado for levado ao laboratório, lavar cuidadosamente as raízes, sobre uma peneira, para evitar a perda de nódulos que se desprendam durante o processo de lavagem. Secar as raízes em papel toalha e retirar os nódulos, deixando-se um pedaço de raiz, de aproximadamente 0,5 cm, para facilitar a manipulação do nódulo e diminuir as chances de danificá-lo durante o isolamento. Os nódulos frescos podem ser guardados por cerca de dois dias no refrigerador. Não se deve congelar os nódulos, pois cristais internos formados pelo congelamento podem matar os bacteróides.

2.6. Isolamento do Rizóbio

Os nódulos dessecados devem ser, inicialmente, reidratados. Normalmente eles são colocados em frascos com água, por uma noite, em refrigerador. Se os nódulos ficaram dessecados por um período curto de tempo, apenas uma ou duas horas, à temperatura ambiente, são suficientes para a reidratação.

O método mais utilizado para o isolamento consiste em imergir os nódulos, por cerca de 5 a 10 segundos, em álcool a 90% - 95%. A função do álcool não é desinfectar os nódulos, mas quebrar a tensão superficial e remover bolhas de ar no tecido. A seguir, os nódulos são transferidos para uma solução a 3% ou 5% de hipoclorito de sódio ou cálcio, podendo-se utilizar hipoclorito de sódio comercial diluído. Os nódulos devem, então, ser lavados pelo menos cinco vezes em água destilada e esterilizada. Toda a manipulação deve ser feita em câmara asséptica ou perto do fogo, com fórceps estéril. Na transferência do álcool para o hipoclorito, deve-se flambar o fórceps. Para a esterilização pode-se usar, ainda, o bicloreto de mercúrio a 0,1% (peso/volume) por um minuto ou peróxido de hidrogênio por três minutos. O bicloreto de mercúrio, porém, deve ser evitado, por problemas de toxidez, e o peróxido de hidrogênio é mais caro do que o hipoclorito. Para facilitar a transferência dos nódulos nos diversos líquidos, recomenda-se que todas as soluções e a água esterilizada sejam colocadas em placas de Petri, mas qualquer recipiente, desde que seja esterilizado e de manipulação fácil, pode ser empregado. Após a última lavagem, amassar o nódulo com o fórceps ou, se tiverem sido utilizados tubos, esmagá-los com um bastão de vidro, mas sempre cuidando-se para utilizar material estéril.

O material deve, então, ser riscado em placas ou tubos contendo meio de extrato de levedura-manitol-ágar:

Composição do meio de extrato de levedura-manitol (EM ou YM) (também denominado meio YM, do inglês yeast-manitol, ou meio 79), segundo Vincent (1970):

Manitol	10,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Extrato de levedura	0,5 g
Água destilada	1 litro
Ajustar o pH a 6,8	

- No caso de meio sólido, acrescentar 15 g a 20 g de ágar por litro. Se o ágar for de boa qualidade, 15 g são suficientes.
- Normalmente as quantidades de extrato de levedura utilizadas variam de 0,4 g a 1,0 g por litro.

Para facilitar a identificação do rizóbio, o meio de cultura pode receber substâncias corantes, como o vermelho-congo e o azul de bromotimol. O vermelho-congo é utilizado para facilitar a observação de contaminantes, que absorvem a cor vermelha, enquanto que colônias de rizóbio não absorvem ou absorvem muito pouco esse corante, especialmente se forem novas. Culturas mais velhas e alguns rizóbios tropicais de crescimento lento, porém, podem absorver o corante. O azul de bromotimol deixa o meio esverdeado em pH 6,8. Se as bactérias acidificarem o meio, este adquirirá a cor amarelada, mas se as bactérias alcalinizarem o meio, a coloração ficará azulada.

Preparo dos corantes

Azul de bromotimol

Solução estoque	0,5 g/L
Adicionar 5 ml do estoque/L de meio EM	
Concentração final	25 g/L

Vermelho Congo

Solução estoque	0,25 g/100 mL
Adicionar 10 mL do estoque/L do YM	
Concentração final	25 g/L

A riscagem em meio sólido foi descrita no capítulo 1. Outro método utilizado para isolamentos é o da agulha, mas que só é recomendado no caso de nódulos com pelo menos dois milímetros de diâmetro. Nesta técnica, o processo de esterilização, bem como as recomendações gerais, são as mesmas, mas o nódulo, depois de esterilizado, é colocado sobre um papel de filtro estéril. Com um fórceps, segurar o nódulo e cortá-lo com um escalpelo esterilizado. A seguir, introduzir uma agulha ou uma alça no nódulo, e riscá-la diretamente na placa contendo meio de cultura. Pode-se, ainda, fazer uma diluição em série e inocular a suspensão pela técnica de plaqueamento (pour plate), conforme especificado no capítulo 1.

As placas devem ser incubadas de 25°C a 30°C, ou na temperatura ideal para a leguminosa da qual se o nódulo foi coletado.

2.7. Verificação do Crescimento

O crescimento do rizóbio deve ser verificado diariamente. Rizóbio de crescimento rápido normalmente leva de três a cinco dias, enquanto que os de crescimento lento levam de sete a 10 dias (Tabela 2.2). Às vezes, se o rizóbio foi mantido dessecado por muito tempo, o crescimento pode ser mais lento do que o normal.

Para uma comprovação inicial, podem ser feitas preparações para a visualização no microscópio. As bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* têm a forma de bastonetes e movem-se através de flagelos. Um dos passos iniciais para a autenticação do rizóbio é o teste da coloração de Gram, que é um dos métodos mais simples e básicos para diferenciar as bactérias em dois grandes grupos, o das Gram-positivas (+) e o das Gram-negativas (-). Através dessa técnica, são detectadas diferenças fundamentais na estrutura da parede celular das bactérias, particularmente na concentração de lipídeos complexos (ácidos graxos e ceras), pela coloração com cristal violeta e safranina. Todas as espécies de rizóbio são Gram-negativas e absorvem o regente de safranina. O procedimento é bastante fácil, e os reagentes não são caros.

Preparo dos reagentes para o teste de coloração de Gram

Solução de cristal violeta

Violeta cristal	110 g
Oxalato de amônio	4 g
Etanol (ou álcool absoluto)	100 mL
Água destilada	400 mL

Solução de iodo ou solução de lugol

Iodo	1 g
Iodeto de potássio	2 g
Etanol (álcool absoluto)	25 mL
Água destilada	100 mL

Solução de descoloração

Álcool	95 ml
Água destilada	5 mL
ou	
Álcool	75 mL
Acetona	25 mL

Solução de fucsina (ou fucsina de Ziehl)

Fucsina	2,5 g
Água destilada	90 mL
Etanol (álcool absoluto)	100 mL

- os corantes devem ser estocados em frasco de vidro âmbar, em temperatura de 20°C a 25° C e sem umidade;

- o preparo da solução de violeta cristal pode ser facilitado se o cristal for triturado num gral de vidro acrescentando, aos poucos, o álcool, até obter uma mistura homogênea. Deixar em repouso por cerca de 24 horas e filtrar em papel de filtro;
- com o tempo, pode haver precipitação na solução de violeta cristal, afetando a qualidade do corante. Neste caso, levar o frasco, com a tampa aberta, a um banho-maria a 37° C, até a solução aquecer, fechar, agitar e o precipitado dissolverá;
- a solução de iodo deteriora facilmente, particularmente se receber calor e luz. Não deve ser mantida por mais de três meses, devendo ser descartada assim que se observar perda de coloração;
- para a receita da fucsina carbólica, freqüentemente utilizada para o rizóbio, ver capítulo 7.

Procedimento para o teste da coloração de Gram

- a) colocar as bactérias numa lâmina;
- b) secá-las (sem ar quente);
- c) cobrir com a solução de violeta cristal e deixar por aproximadamente um minuto;
- d) remover o excesso de corante e lavar levemente com água destilada;
- e) retirar o excesso de água e mergulhar a lâmina na solução de iodo. Deixar por pelo menos um minuto;
- f) retirar o excesso de solução de iodo com água e aplicar cuidadosamente a solução de descoloração, somente até que não esteja mais sendo lavada nenhuma solução colorida do esfregaço. Este passo é crítico, devendo-se cuidar para não fazer um excesso de descoloração;
- g) retirar o excesso de água e aplicar a solução de safranina por, aproximadamente, um minuto;
- h) lavar a lâmina com água e examinar ao microscópio.

Resultado

- bactérias Gram-positivas - retêm a cor violeta, indicando absorção do violeta cristal;
- bactérias Gram-negativas - retêm a cor vermelha, indicando que absorveram a safranina.

2.8. Autenticação do Rizóbio

Esse é o passo final e essencial de um isolamento. é muito importante determinar se o isolado é uma cultura pura de rizóbio, capaz de formar nódulos no hospedeiro. Por isso o isolado deve ser novamente inoculado no hospedeiro. Esse passo é dificultado no caso das essenciais florestais das quais não se dispõe de sementes, ou cujo ciclo de crescimento é muito longo. Nestes casos, às vezes são utilizadas outras espécies de florestais para testar a habilidade de nodulação, desde que muitas delas são de nodulação promíscua.

Um primeiro indicativo de eficiência das bactérias é dado pela coloração rósea interna dos nódulos, devido à presença de uma leghemoglobina. A cor rósea já é evidente em nódulos nos estádios iniciais da fixação do N₂ (Figura 2.5), se acentuando na época do florescimento (Figura 2.6).

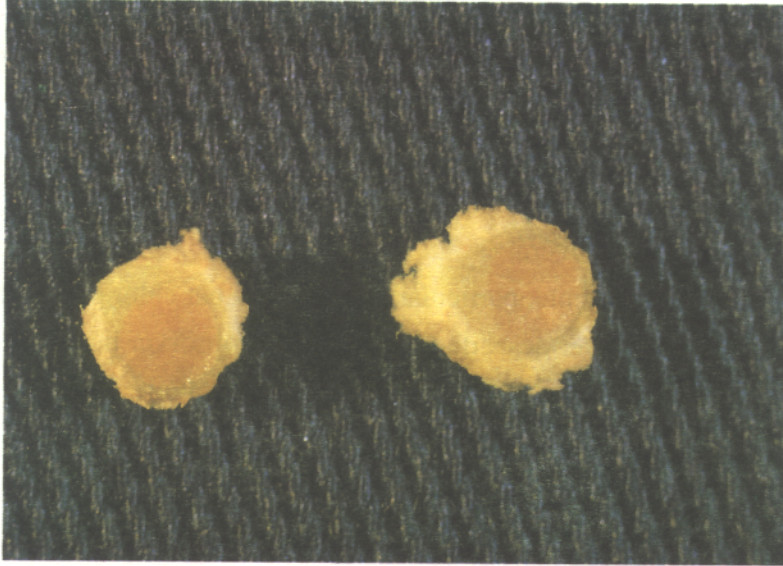


FIGURA 2.5. Corte de nódulos de soja aos 15 dias após a emergência.

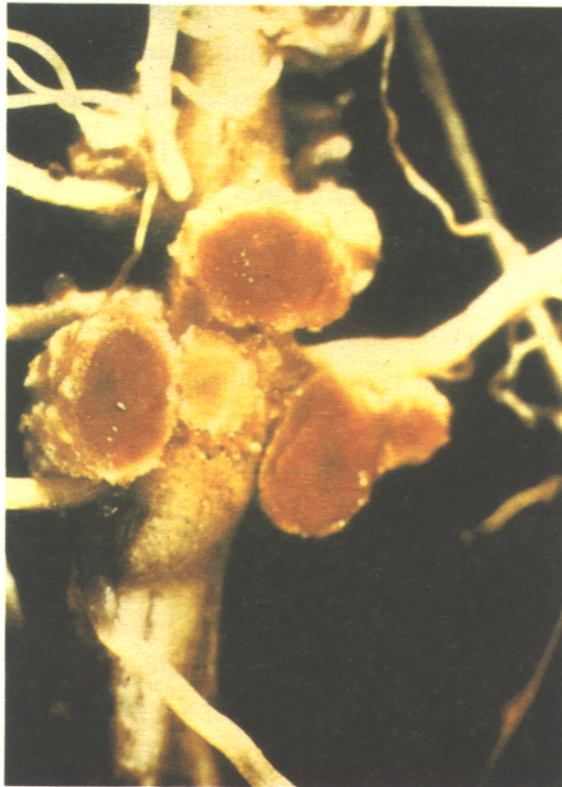


FIGURA 2.6. Raiz nodulada de soja, na época do florescimento, mostrando a coloração interna rósea dos nódulos.

2.9. Considerações Finais

O isolamento de rizóbio de nódulos é uma etapa importante nos estudos da simbiose rizóbio-leguminosa. Muitas leguminosas ainda precisam ser investigadas quanto à capacidade de formar nódulos. Além disso, o isolamento de estirpes mais eficientes e competitivas, a partir de populações estabelecidas no solo, é um processo contínuo cuja importância vem sendo intensificada.

2.10. Referências Bibliográficas

- ALLEN, O. N.; ALLEN, E. K. **The Leguminosae. A Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation.** London: Macmillan, 1981.
- BUCHANAN, R. E. Approved lists of bacterial names. In: SKERMAN, V. B. D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P. H. A. **International Journal of Systematical Bacteriology**, 1980. p.225-240.
- BURRIS, R. H. Biological nitrogen fixation, 1924-1974. **Plant Physiol.**, v.54, p.443-449, 1974.
- CHEN, W. X.; YAN, G. H.; LI, J. L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **Int. J. System. Bacteriol.**, v.38, p.393-397, 1988.
- CHEN, W. X.; LI, G. H.; QI, Y. L. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.41, p.275-280, 1991.
- DELORIT, R. J.; GUNN, C. R. **Seeds of continental United States legumes (Fabaceae).** Park Falls: Weber and Sons, 1986. (Lithographers).
- DREYFUS, B.; GARCIA, J. L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov, a stem-nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **Int. J. System. Bacteriol.**, v.38, p.89-98, 1988.
- EAGLESHAM, A. R. J.; ELLIS, J. M.; EVANS, W. R.; FLEISCHAM, D. E.; HUNGRIA, M.; HARDY, R. W. F. The first photosynthetic nitrogen-fixing *Rhizobium* : Characteristics. In: GRESSHOFF, P. M.; ROTH, L. E.; STACEY, G.; NEWTON, W. E. ed. **Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives.** New York: Chapman & Hall, 1990. p.805-811.
- EVANS, H. J.; BURRIS, R. H. Highlights in biological nitrogen fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. ed. **Biological Nitrogen Fixation.** New York: Chapman & Hall, 1992. p.1-42.
- FRED, E. B.; BALDWIN, I. L.; MCCOY, E. **Root Nodule Bacteria of Leguminous Plants.** Madison: The University of Wisconsin Press, 1932. 343p.

- GILLER, K. E.; WILSON, K. J. **Nitrogen Fixation in Cropping Systems**. Wallingford: C.A.B International, 1991. 313p.
- JARVIS, B. D. W.; DOWNER, H. L.; YOUNG, J. P. W. Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and assignment of *Rhizobium fredii*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.42, p.93-96, 1992.
- JORDAN, D. C. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: KRIEG, N. R. ; HOLT, J. G. ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore-London: Williams & Wilkins Co., 1984. p.235-244.
- JORDAN, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root-nodule bacteria from leguminous plants. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.32, p.136-139, 1982.
- JORDAN, D. C.; ALLEN, N. O. Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: BUCHNAN, R. E.; GIBBONS, N. E. ed. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore-London: Williams & Wilkins Co., 1974. p.235-244.
- LINDSTRÖM, K. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.39, p.365-367, 1989.
- LÖHNIS, F. ; HANSEN, R. Nodule bacteria of leguminous plants. **J. Agric. Res.**, v.20, p.543-556, 1921.
- LOUREIRO, M. de F.; FARIA, S. M. de; BALDANI, J. I.; FRANCO, A. A. Morphological and symbiotic characteristics of stem nodules of *Discolobium* spp. and its rhizobia. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W. E. ed. **New horizons in nitrogen fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p.628.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; GRAHAM, P.; PARDO, M. A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.41, p.417-426, 1991.
- SCHOLLA, M. H. & ELKAN, G. H. *Rhizobium fredii* sp nov, a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.34, p.484-486, 1984.
- SEGOVIA, L.; YOUNG, J. P. W.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.43, p.374-377, 1993.
- TRINICK, M. J.; GALBRAITH, J. The *Rhizobium* requirements of the non-legume *Parasponia* in relation to the cross inoculation group concept of legumes. **New Phytol.**, v.86, p.17-26, 1980.

- TRINICK, M. J.; HADOBAS, P. A. Biology of the *Parasponia-Bradyrhizobium* symbiosis. **Pl. Soil.** v.110, p.177-185, 1988.
- TRINICK, M. J. Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. **J. Appl. Bacteriol.**, v.49, p.39-53, 1980.
- VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria.** Oxford: Blackwell, 1970. 164p.
- WILSON, P. W. **The Biochemistry of symbiotic fixation.** Madison: The University of Wisconsin Press, 1940.
- YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. ed. **Biological nitrogen fixation.** New York: Chapman & Hall, 1992. p.43-86.
- YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the phototropic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **J. Bacteriol.**, v.173, p.2271-2277, 1991.
- YOUNG, P.; MARTÍNEZ, E.; BARNET, Y.; COOPER, J.; LINDSTRÖM, K. Report from the taxonomy meeting, subcommittee on *Agrobacterium* and *Rhizobium*. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W. E. ed. **New horizons in nitrogen fixation.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p.777-778.

CAPÍTULO 3

ESTIMATIVA DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE RIZÓBIO NO SOLO E EM INOCULANTES POR INFECCÃO EM PLANTAS

Diva de Souza Andrade¹

Paulo José Hamakawa¹

3.1. Introdução

Para avaliação da população de rizóbio no solo, ou em inoculante em veículo não estéril, é essencial utilizar um método que apresente exatidão, precisão, rapidez e baixo custo. Isto porque estas avaliações são práticas rotineiras na maioria dos laboratórios de microbiologia do solo, tanto nos estudos da ecologia de populações de rizóbio como no controle de qualidade de inoculantes. Quando a contagem direta de células viáveis de rizóbio de uma amostra, em mistura com outras bactérias, for difícil, a alternativa é montar um arranjo experimental onde se possa fazer, indiretamente, uma estimativa. Do ponto de vista matemático, isto está associado a uma probabilidade de ocorrência.

Os métodos usuais de plaqueamento não são aplicáveis para a determinação do rizóbio em amostras de solo ou inoculantes em turfa não-estéril porque: 1) em diluições onde o rizóbio se encontra em minoria, pode sofrer antagonismo por outros microrganismos; 2) não existe um meio suficientemente seletivo para excluir outros microrganismos presentes (Date & Vincent, 1962), embora existam alguns meios de cultura, suplementados com agentes microbianos, que permitem o desenvolvimento exclusivo de determinadas estirpes de rizóbio e reduzem outros microrganismos (Graham, 1969; Pattison & Skinner, 1974; Barber, 1979; Bushby, 1981) e, mais recentemente, o uso de técnicas de separação imunomagnética (Dye, 1994). Para a contagem de rizóbio em material contaminado com outros microrganismos, ainda continua sendo aplicado o método de infecção em planta proposto por Wilson (1926) e variações deste têm apenas procurado adaptar as condições de crescimento da planta (Weaver & Frederick, 1974; Wollum II, 1982; Montange & Macary, 1983; Toomsan et al., 1984, Araujo et al., 1986).

O método a ser descrito consiste, essencialmente, da inoculação de leguminosas hospedeiras específicas (plantas-teste) crescendo, em ambiente microbiologicamente controlado, com alíquotas de uma série de diluições de uma amostra (Vincent, 1970; Brockwell, 1982). O princípio básico do método parte da suposição que, existindo ao menos uma única célula de rizóbio, ocorrerá a multiplicação nas proximidades do sistema radicular, com a formação de nódulos na planta hospedeira. O número de células viáveis de rizóbio é, então, estimado a partir da proporção de plantas-teste que formaram ou que não formaram nódulos.

¹ Pesquisadores, M.Sc., Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), Cx. Postal 1331, CEP 86001-970, Londrina, PR.

3.2. Amostragem

3.2.1. Amostragem

Todo processo de análise tem a amostragem como uma etapa crítica. Um procedimento adequado de amostragem e manuseio da amostra de solo, ou do inoculante, é fundamental para o êxito da estimativa da população de rizóbio. Primeiro porque, em geral, a amostragem não pode ser repetida no tempo e uma amostra mal coletada não revela, pelo seu aspecto, se é ou não representativa e se mantém as características do momento da amostragem. Para avaliar a importância dessa operação, basta lembrar que o tamanho da amostra é relativamente pequeno, devendo representar toda a área em estudo (Guerra, 1988) e que, também, a atividade dos microrganismos é um processo dinâmico ao longo do tempo, tornando difícil a reprodução das condições da amostra no instante da coleta. Entretanto, durante o tempo que vai da coleta até a avaliação no laboratório, deve-se tentar manter a amostra em condições idênticas às do local em que foi coletada.

Para estudos de populações de rizóbio no solo, cada amostra, para preparo e inoculação, necessita satisfazer às seguintes condições: (a) massa mínima de 100 gramas; (b) homogeneidade; e (c) ser representativa da área (ou parcela experimental) em estudo, além dos (d) requisitos básicos da estatística, quais sejam (d.1) independência espacial das amostras; (d.2) mesma variância; e (d.3) desvios com distribuição normal e média nula (Pimentel Gomes, 1987).

Para que essas exigências sejam satisfeitas, o número de amostras depende do tamanho da área que cada uma delas representará. Contribuirá para isso, o conhecimento anterior que o pesquisador tiver do espaço amostral, para decidir o número de amostras ou de subamostras que comporá a amostra principal. Em Parkinson et al. (1971), encontra-se uma descrição mais detalhada de procedimentos de amostragens de solo para análise microbiológica.

3.2.2. Instrumentos para Amostragem

- trado, pá
- balde, sacos plásticos
- etiquetas, cordões de algodão, canetas, lápis, etc.

3.2.3. Profundidade de Amostragem

A escolha da profundidade de amostragem do solo depende dos objetivos propostos no trabalho. Frequentemente é realizada na camada de 0 cm a 20 cm, onde se concentra a maior parte do sistema radicular ativo e, também, a maior atividade microbiana.

3.2.4. Cuidados Durante a Coleta e o Armazenamento

3.2.4.1. Desinfestação

Os instrumentos de amostragem devem ser desinfestados com álcool a 95% e flambados. Esse procedimento deve ser repetido entre as amostragens que não admitem contaminação como, por exemplo, diferentes profundidades, parcelas experimentais e amostras de inoculantes.

3.2.4.2. Identificação da amostra

Após a identificação da amostra, os sacos plásticos devem ser fechados (sem selamento) com um cordão e colocados à sombra. No laboratório, recomenda-se anotar, em um caderno, o número de identificação, local, data e outras informações adicionais.

O transporte das amostras de solo ou inoculante deve ser feito evitando a incidência direta da luz solar e altas temperaturas, que podem causar a morte das células do rizóbio. Se possível, fazer o transporte em caixas com gelo e no mesmo dia.

Armazenar as amostras de inoculantes a 4° C e fazer o teste de contagem dentro de um período máximo de sete a oito dias após a coleta (Speidel & Wollum II, 1980). Embora as amostras de solo possam ser armazenadas por até 15 dias, quando em refrigerador entre 2° e 5°C (Parkinson et al., 1971), recomenda-se que as amostragens sejam programadas de maneira que o preparo e inoculações ocorram num prazo máximo de 48 horas após a coleta e sem necessidade de refrigerar as amostras. Esse procedimento visa minimizar alterações na população do rizóbio na amostra de solo, o que provavelmente também ocorra em condições de refrigeração.

3.3. Preparo da Amostra de Solo e Inoculante

3.3.1. Peneiramento do Solo

Uma triagem grosseira é feita para eliminar pedregulhos e pedaços de vegetais maiores, homogeneizando a amostra. Utiliza-se, normalmente, o peneiramento em malha de 4 mm. Uma malha mais fina não é desejável, porque pode eliminar colônias de rizóbio localizadas no interior dos agregados do solo.

Os cuidados, nesta etapa, para evitar contaminação entre amostras, são os mesmos descritos para os instrumentos de amostragem do solo.

3.3.2. Determinação da Umidade da Amostra

Para uniformizar os dados obtidos, de número de células viáveis de rizóbio, pode-se expressar os resultados por unidade de massa de solo ou turfa. é importante que o resultado seja expresso em base de solo ou turfa seca em estufa à temperatura de 105° a 110° C, por ser invariável quando atingido o equilíbrio entre teor de água e temperatura.

A umidade pode ser determinada tomando-se uma pequena alíquota da amostra original de solo ou turfa, num recipiente. Inicialmente, avalia-se a massa inicial (m_i) colocando-a, em seguida, numa estufa entre 105° e 110° C, até atingir a massa final (m_f), que é constante.

$$U = \frac{m_i - m_f}{m_f - \text{tara recipiente}}$$

3.4. Diluições Sucessivas e Inoculação

3.4.1. Preparo da Solução Diluente

A composição da solução diluente é um critério definido pelo pesquisador. Pode-se utilizar água de torneira ou destilada sem afetar os valores relativos observados, desde que as operações de preparo e inoculações sejam feitas, no máximo, em 30 minutos. Entretanto, deve-se tomar algumas precauções, pois determinadas águas não são adequadas para essa finalidade (Vincent, 1970). Existe, ainda, um possível risco de morte das células de rizóbio em função da diferença no potencial osmótico. Estudos mais especializados indicam que diversas soluções diluentes podem ser satisfatoriamente utilizadas (Vincent, 1970; Speidel & Wollum II, 1980; Wollum II, 1982):

- a) solução fisiológica: dissolver 8,5 g de NaCl em 1000 mL de água destilada (alguns autores preferem utilizar 5,5 g NaCl/1000 mL);
- b) solução de Ringer: dissolver 2,15 g de NaCl; 0,075 g de KCl; 0,12 g de CaCl_2 e 0,5 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, em 1000 mL de água destilada. Ajustar a pH 7,3, usando uma solução de NaOH ou de HCl, 0,1 N.
- c) solução de peptona: dissolver 1,0 g de peptona em 1000 mL de água destilada;
- d) solução tampão de fosfato: dissolver 8,0 g de NaCl; 0,34 g de KH_2PO_4 e 1,21 g de K_2HPO_4 em 1000 mL de água destilada. Ajustar a pH 7,3 usando uma solução de NaOH ou HCl, 0,1N;
- e) água de extrato de levedura: diluir o extrato de levedura 1:10.

3.4.2. Seleção, Desinfestação e Pré-Germinação das Sementes

3.4.2.1. Seleção

As sementes da leguminosa a serem utilizadas devem ser pré-selecionadas por tamanho uniforme e ausência de ataque de pragas ou doenças. Se possível, recomenda-se fazer um teste do poder germinativo e vigor antes de iniciar o ensaio.

3.4.2.2. Desinfestação

Nesta etapa, o importante é retirar, superficialmente, a maioria dos microrganismos, inclusive o rizóbio sem reduzir, significativamente, a germinação da semente. Existem vários procedimentos para a desinfestação de sementes (Speidel & Wollum II, 1980) e qualquer um pode ser recomendado, desde que elimine a contaminação superficial da semente sem, contudo, afetar o poder germinativo.

Para as sementes duras (exemplo, leucena, soja perene) pode-se fazer, simultaneamente, a desinfestação e a escarificação, usando ácido sulfúrico ou água quente. No primeiro caso, as sementes são imersas em ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, durante dois a cinco minutos (dependendo da espécie) e, após drenar todo o excesso do ácido (para evitar uma reação química altamente exotérmica, que prejudicaria a germinação), lavar as sementes com água estéril, pelo menos 12 vezes. No segundo procedimento, as sementes são imersas em água quente, a 80°C (exatos, para não prejudicar a viabilidade germinativa das sementes). Deixar as sementes dentro da água por, no mínimo, três horas.

As sementes selecionadas que não exigem quebra de dormência (exemplo, feijão, soja comum, alfafa, ervilha) são, inicialmente, colocadas em imersão no álcool (70 % a 95 %) por um a três minutos. O álcool funcionará como um surfactante, modificando a tensão superficial. Após drenar o álcool, as sementes são imersas em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% ou hipoclorito de cálcio [Ca(OCl)₂] a 3% durante três a quatro minutos. Outra opção é usar peróxido de hidrogênio (H₂O₂), a 3%, 5%, 10% ou 15%, durante dois a 10 minutos. Lavar as sementes, em água previamente esterilizada (em autoclave a 1,5 atm e 121°C durante 30 minutos), até não sentir odor de cloro ou de peróxido de hidrogênio (não menos do que sete vezes), para não prejudicar a germinação.

3.4.2.3. Pré-germinação

Após o processo de desinfestação, as sementes são colocadas para germinar, em papel absorvente, (normalmente utilizam-se folhas de papel de 28 cm X 38 cm), previamente umedecido em água estéril. As sementes são colocadas em filas, separadas por 2 cm a 3 cm e com uma distância de 10 cm entre filas (aproximadamente três filas em cada folha). As sementes são cobertas com uma folha do mesmo papel absorvente fazendo-se, então, rolos, que são colocados em sacos plásticos, semi-fechados, para evitar o ressecamento, e incubados durante 24 a 48 horas à temperatura entre 20° e 25° C, no escuro.

3.4.2.4. Sementes pequenas

Para sementes pequenas (exemplo, trevos, alfafa, soja perene) o teste de infecção em plantas pode ser feito em tubos de ensaio, com diâmetro em torno de 2,5 cm e 3,5 cm e altura de 15 cm a 25 cm, contendo solução nutritiva “agarizada” (Tabela 3.1), ou pode-se utilizar qualquer solução nutritiva completa para o crescimento de plantas, desde que seja isenta de nitrogênio. A literatura cita diversas composições (Vincent, 1970; Norris & Date, 1976; Speidel & Wollum II, 1980; Weaver & Frederick, 1982)

Da solução estoque, deve-ser retirada a alíquota determinada (quarta coluna da Tabela 3.1), que é adicionada a 1000 mL de água destilada. A seguir, deve-se adicionar o ágar a 1,0% ou 1,5% (10 g a 15 g/L), e aquecer em banho-maria, autoclave aberta ou forno de microondas (em potência baixa), até liqüefação. Se for utilizado aquecimento direto (bico de Bunsen ou fogão), agitar a solução constantemente e usar calor brando, para evitar a queima do ágar no fundo do frasco. Ajustar o pH para 6,2 com uma solução KOH ou HCl, 0,1 N, antes de colocar a “solução agarizada” nos tubos para a esterilização.

Utilizar um repipetador automático, bureta ou um simples funil, para facilitar a distribuição da solução “agarizada” nos tubos (15 mL a 30 mL/tubo), tapando-os com algodão. Os tampões de algodão têm a finalidade de filtrar os contaminantes e permitir as trocas gasosas. Autoclavar a 120°C e 1,5 atm durante 15 min. a 25 minutos. Após baixar a pressão da autoclave, retirar os tubos, colocando-os para esfriar à temperatura ambiente. Para o resfriamento, recomenda-se que os tubos sejam colocados inclinados, a aproximadamente 75° em relação ao plano horizontal, para facilitar o transplante das sementes.

TABELA 3.1. Solução nutritiva para crescimento de plantas (Norris & Date, 1976).

Solução Estoque	Produto Químico	Concentração g/L	mL da Sol. Estoque/L da Sol. Final
1.	KCl	29,8	2,5
2.	KH ₂ PO ₄	4,35	2,5
3.	MgSO ₄ .7H ₂ O	98,6	2,5
4.	micronutrientes:		
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,078	0,5
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22	
	MnSO ₄ .4H ₂ O	2,03	
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,01	
	H ₃ BO ₃	1,43	
	citrato férrico	1,795	1,0
	CaSO ₄ .2H ₂ O	68,0	1,0

Ajustar para pH 6,5 com uma solução de KOH, 1 N.

A semeadura é feita com auxílio de uma pinça estéril (flambada), transportando-se as sementes pré-germinadas, colocando-as próximas à parede do tubo. A semente deve ser colocada cuidadosamente, de modo que a radícula fique orientada para baixo.

Após semeadura, deve-se envolver a parte do tubo que contém a solução nutritiva “agarizada” com um papel opaco (exemplo, folha de alumínio), com o objetivo de impedir a transmissão de luz na região das raízes. O processo de transplante deve ser feito respeitando as condições de assepsia e os tubos são, então, transportados para uma câmara de crescimento. A inoculação pode ser realizada entre um a cinco dias após a semeadura.

3.4.2.5. Sementes grandes

Para sementes grandes (exemplo, feijão, soja comum, leucena, etc), o teste de infecção em plantas pode ser feito em “vasos de Leonard” (Vincent, 1970), onde as plantas são cultivadas em areia grossa lavada mais carvão vegetal ou vermiculita e solução nutritiva completa sem nitrogênio (Figura 3.1).

No caso de areia e vermiculita, a proporção normalmente utilizada é de 1:2, (v:v), respectivamente. Outra opção são os sacos de polietileno resistentes à autoclavagem (Weaver & Frederick, 1982), onde se utiliza papel absorvente como suporte das plantas e, também, solução nutritiva sem nitrogênio.

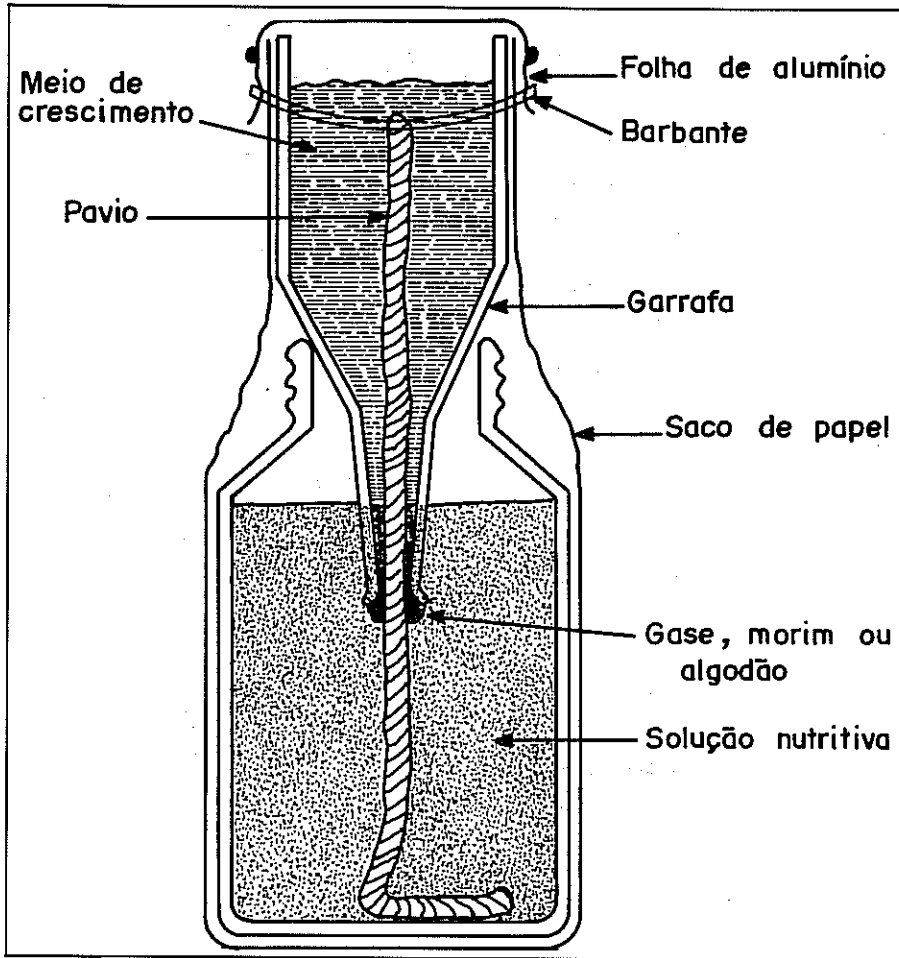


FIGURA 3.1. Esquema de um vaso de Leonard modificado. Segundo Somasegaran & Hoben (1985).

Os “vasos de Leonard” apresentam alguns inconvenientes, como tempo gasto no preparo, maior risco de contaminações sendo, às vezes, necessária a reposição da solução nutritiva. Brockwell (1982) cita, também, o risco da subestimativa do número de rizóbio, devido à presença de espaços vazios. As “bolsas de crescimento” de polietileno, contendo solução nutritiva, têm como desvantagens a necessidade de reposição da solução nutritiva diariamente, o risco de contaminações e a falta de uma proteção contra o aquecimento.

Uma alternativa é a utilização de uma adaptação das “bolsas de crescimento”, isto é, o uso de frascos de vidro contendo solução nutritiva e papel absorvente (poroso) como suporte das plantas (Figura 3.2).

Os frascos permitem usar uma proteção de papel opaco contra a incidência direta da luz solar. A solução nutritiva não precisa ser repostada durante a condução do ensaio, evitando riscos de contaminação e trabalho extra. Outras vantagens são a possibilidade de avaliação prévia da presença de nódulos sem destruição do sistema, e a possibilidade de realizar isolamentos de estirpes mais eficientes.



FIGURA 3.2. Vasos esterilizados adaptados com frascos de vidro com solução nutritiva e papel absorvente (poroso) como suporte das plantas. Foto de Edino Ferreira da Silva (IAPAR).

Pode-se utilizar qualquer frasco. Para culturas como o feijão e a soja, um volume de aproximadamente 400 mL a 600 mL é suficiente para suprir as exigências da planta até a formação dos nódulos, sem necessidade de reposição da solução nutritiva. Normalmente são utilizados frascos com diâmetro aproximado de 7 cm a 8 cm e altura de 15 cm a 20 cm. A solução nutritiva pode ser a descrita na Tabela 3.2. Após a diluição, ajustar o pH para 6,8 com KOH, 0,1 N, antes da distribuição nos frascos e da autoclavagem. Observações:

- a) o papel absorvente, utilizado como suporte, deve ter 5 cm a mais do que a altura do frasco e, de largura, 15 cm a mais. A folha de papel dobrada deve ter duas abas fixadas às bordas do frasco com o auxílio de um látex com 100% de elástico ou cordão de algodão. A parte superior do papel também deve ter um canal para segurar a semente pré-germinada, que crescerá entre as duas folhas do papel. Um esquema da dobradura do papel pode ser visto na Figura 3.3. A ordem de confecção de todo o sistema é o seguinte: 1) fazer a dobradura do papel; 2) colocar a solução nutritiva nos frascos; 3) inserir o papel já dobrado dentro do frasco; 4) cobrir o frasco com uma folha de papel alumínio; e 5) fixar as duas abas do papel absorvente e as bordas do papel alumínio ao frasco utilizando o látex ou cordão de algodão;

- b) esterilizar os frascos preparados (solução nutritiva, papel suporte com um pequeno furo, e coberto com papel de alumínio) em autoclave a 121° C e 1,5 atm durante 30 minutos;
- c) após o resfriamento, fazer um pequeno orifício no papel alumínio, na mesma posição do já existente no papel absorvente, onde será colocada a semente pré-germinada;
- d) os frascos devem ser envoltos com papel opaco para evitar a transmissão de luz na região de desenvolvimento das raízes (Figura 3.2);
- e) a inoculação das diluições das suspensões das amostras de solo ou inoculante é realizada conforme será descrito adiante.

3.4.3. Preparo das diluições

- a) colocam-se 95 mL da solução diluente escolhida em frascos de 250 mL com “pérolas de vidro”, opcionalmente, para facilitar a dispersão das células de rizóbio. Em vez de “pérolas de vidro”, pode ser adicionado um dispersante;
- b) em cada tubo de vidro de 20 mL a 25 mL colocam-se 9 mL da solução diluente. O número de tubos varia com o material a ser avaliado (densidade da população de rizóbio):
 - para inoculantes - 10 tubos;
 - solos com população elevada - sete a oito tubos;
 - solos com baixa população - quatro a cinco tubos. Para determinar o número de tubos, é necessário ter algum conhecimento prévio do material a ser analisado. O esquema experimental de preparo das diluições é demonstrado na Figura 3.4.

TABELA 3.2. Solução nutritiva para crescimento de plantas (Somasegaran & Hoben, 1985).

Elemento	Produto Químico	Concentração (g/L)
Cálcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	294,1
Fósforo	KH ₂ PO ₄	136,1
Ferro	FeEDTA	4,47
	Citrato-Fe	6,70
Magnésio	MgSO ₄ .7H ₂ O	123,3
Potássio	K ₂ SO ₄	87,0
Manganês	MnSO ₄ .H ₂ O	0,338
Micronutrientes	H ₃ BO ₃	0,247
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,288
	CuSO ₄ .7H ₂ O	0,100
	CoSO ₄ .7H ₂ O	0,056
	NaMoO ₃ .2H ₂ O	0,048

Usar 100 mL de cada solução estoque em 10 litros de água destilada, ajustar o pH para 6,6-6,8 e usar 500 mL desta solução em cada 10 litros da solução final.

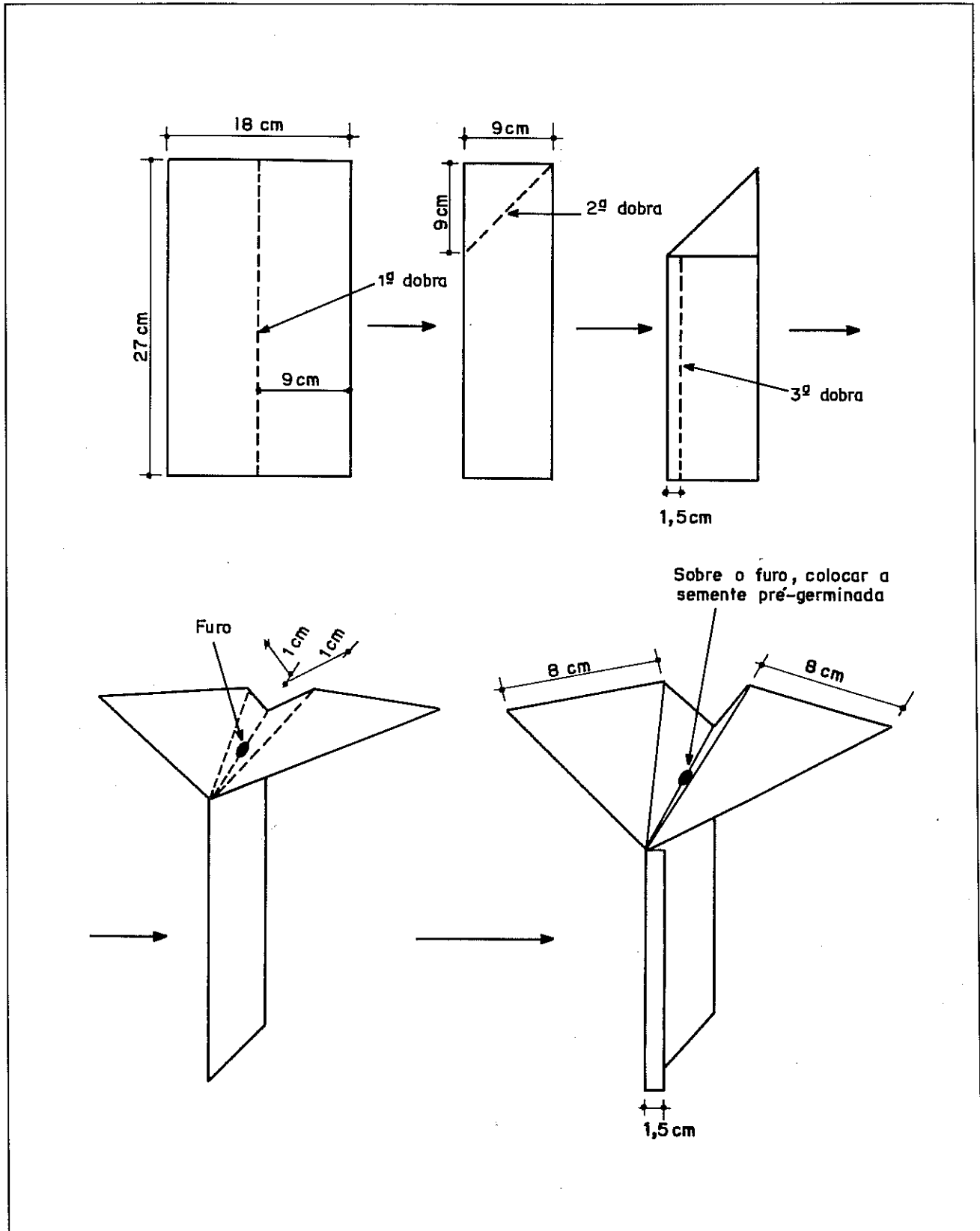


FIGURA 3.3. Esquema de dobradura do papel para os vasos adaptados para condução de experimentos sob condições estéreis.

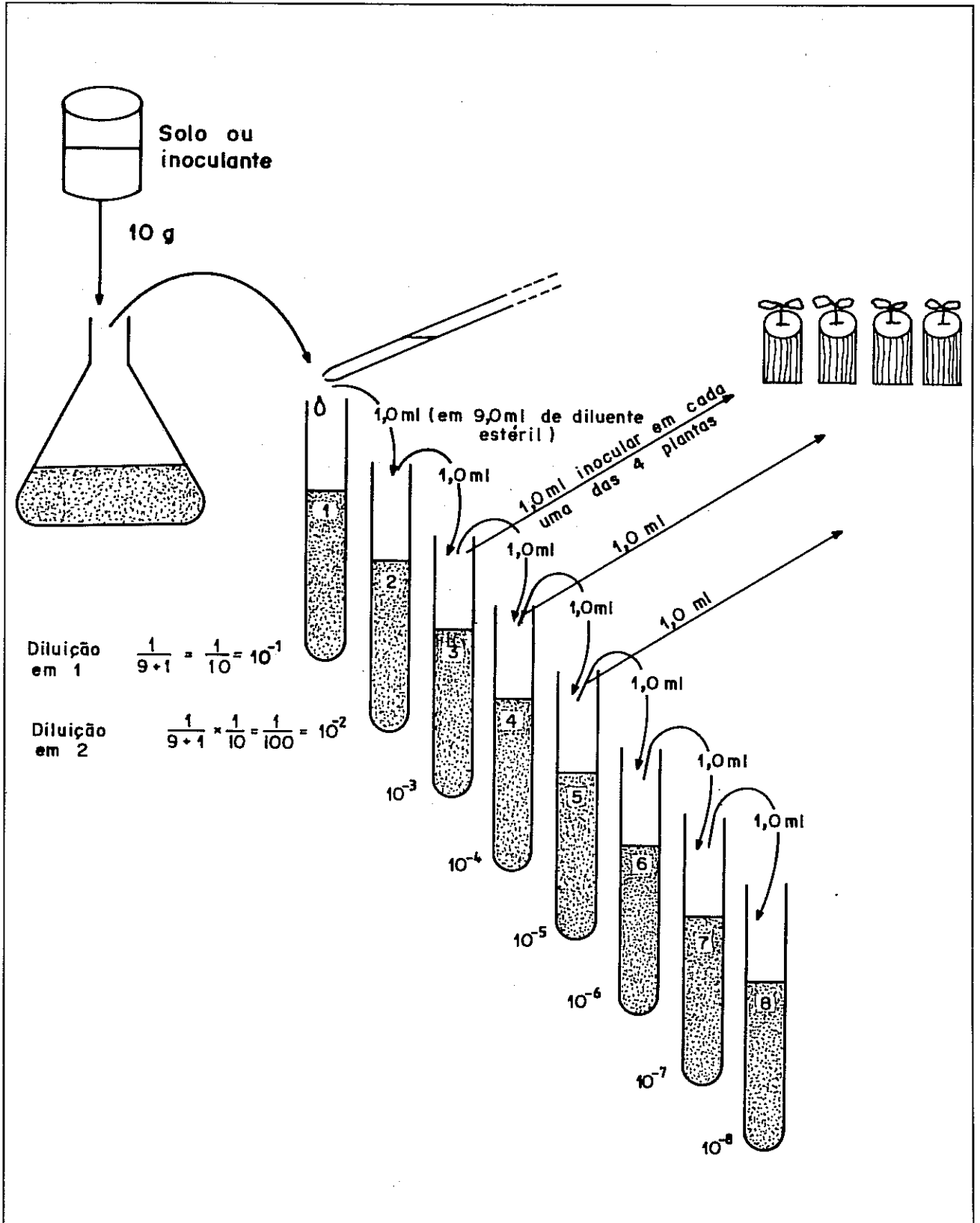


FIGURA 3.4. Esquema representativo do procedimento das diluições em série para a estimativa do número mais provável (NMP) de rizóbio, pelo teste de infecção em plantas.

- c) autoclavar os frascos e tubos descritos nos itens (a) e (b) a 121°C, e 1,5 atm, durante 30 minutos. Autoclavar, também, as pipetas utilizadas nas transferências da solução entre os tubos e para as inoculações;
- d) adicionar ao frasco, contendo a solução diluente, 10 g de amostra de inoculante turfoso, ou de solo preparado;
- e) agitar a suspensão, durante 30 minutos, em agitador mecânico, horizontal, a 170 ciclos a 200 ciclos por minuto;
- f) para a diluição, transferir 1 mL da suspensão para um tubo de vidro contendo 9 mL da solução diluente esterilizada;
- g) agitar o tubo contendo a suspensão diluída (10^{-1}), em agitador individual de tubo tipo “vórtex”, durante 30 segundos, ou fazer esta operação manualmente, antes de realizar as transferências das alíquotas;
- h) para fazer a diluição seguinte (10^{-2}), transferir 1 mL da suspensão diluída 10^{-1} para um tubo contendo 9 mL da solução diluente, e agitar durante 30 segundos, antes de realizar a próxima diluição. Repetir a operação até obter as diluições desejadas. Em geral, para inoculantes, a série de diluições vai de 10^{-1} a 10^{-10} e, para solos com população elevada de rizóbio, varia de 10^{-1} a 10^{-7} ;
- i) recomendações na Figura 3.4.

Brockwell (1982) sugere que, antes da transferência das alíquotas da suspensão de solo ou inoculante de um recipiente a outro, deve-se aspirar e expirar em torno de seis vezes a suspensão no interior da pipeta, para diminuir os riscos da não uniformidade na distribuição das células de rizóbio na pipeta, porque as células apresentam uma tendência de aderir à superfície de vidro (Koch, 1981).

As condições de assepsia devem ser observadas (exemplo, trocar as pipetas a cada diluição). As transferências devem ser realizadas, se possível, em câmaras assépticas (fluxo laminar, ou similar). Procurar fazer a série de diluições e transferências, em um período máximo de 60 minutos, para manter a viabilidade das células.

3.4.4. Condições de cultivo

São necessárias algumas condições de luminosidade e temperatura para que as plantas possam desenvolver adequadamente, permitindo a nodulação. Observações:

- a) para sementes pequenas (tubos com solução agarizada), recomenda-se a utilização simultânea de lâmpadas incandescentes e fluorescentes, com intensidade luminosa variando entre 500 lúmens a 1000 lúmens. O regime de luminosidade e temperatura depende da espécie da leguminosa, variando entre 10 h a 14 horas de luz e uma temperatura entre 12°/20°C a 25°/28°C (noite/dia). Justifica-se o uso simultâneo das lâmpadas incandescentes e fluorescentes, pelo espectro de emissão, que é contínuo nas primeiras e descontínuo nas últimas. As incandescentes são qualitativamente similares à luz solar tendo, entretanto, eficiência de emissão menor do que as fluorescentes e, quando o sistema de resfriamento do ambiente não for eficiente, podem provocar um aquecimento não desejável.

b) para semente grandes (“frascos de Leonard”, frascos com solução nutritiva), o cultivo das plantas, pode ser em casa de vegetação, construída com material transparente (vidro). Os “telados”, que são construídos com tela e cobertura de telhas translúcidas, apresentam o inconveniente do risco de maior contaminação e, na maioria das vezes, esses “telados” não permitem a transmissão de luz solar, sendo necessária iluminação suplementar.

Os princípios de assepsia devem ser respeitados, como limpeza completa, não se conduzindo outros ensaios com solo no mesmo local. Cuidar para que não hajam respingos de água da chuva, provenientes de goteiras e janelas de ventilação.

3.4.5. Inoculação

Quando as plântulas estiverem estabelecidas, aproximadamente um a dois dias após a semeadura, deve-se proceder à inoculação. Esta operação é feita transferindo-se uma alíquota da suspensão das diluições desejadas (Figura 3.4) para os frascos que contêm as plântulas. A inoculação pode ser realizada no local de condução do ensaio. O número de repetições de cada diluição inoculada varia com a disponibilidade de material de laboratório (pipetas, frascos, solução), porém, não se recomenda um número inferior a três. Para certificar das condições de assepsia, deve-se deixar pelo menos alguns frascos ou tubos com plantas sem inocular. A inoculação deve ser feita com pipeta estéril, que deve ser trocada a cada tratamento e diluição. No caso de não se ter pipetas suficientes, pode-se usar a mesma dentro do mesmo tratamento, contanto que se inicie a inoculação pela diluição mais alta (mais diluída).

Transferir uma alíquota de cada diluição da suspensão da amostra para a região da radícula, sendo 0,1 mL para sementes pequenas (tubos com solução nutritiva “agarizada”) e 1,0 mL para sementes grandes (frascos com solução nutritiva ou “vasos de Leonard”).

3.5. Avaliação da Nodulação

As avaliações visuais da presença ou ausência de nódulos nas plantas inoculadas podem ser realizadas, em geral, duas a três semanas após a inoculação. Cada planta é referida como positiva (sucesso), quando estão presentes um ou mais nódulos, e negativa (insucesso), quando nenhum nódulo tenha sido formado.

3.6. Estimativa do Número mais Provável (NMP)

A partir dos resultados positivos e negativos em cada uma das diluições das suspensões inoculadas, pode-se estimar, na acepção matemática, o número de células viáveis de rizóbio na amostra. Esses valores são encontrados em tabelas (Koch, 1981; Alexander, 1982; Brockwell, 1982; Somasegaram & Hoben, 1985).

Os pontos que devem ser ressaltados são que a utilização de uma tabela restringe a execução ao arranjo experimental imposto pelos pré-requisitos dados pela tabela. O método, ao contrário, apresenta larga amplitude na sua execução. Essa amplitude, infelizmente, traz consigo o inconveniente de fornecer resultados, dos chamados números mais prováveis, diferentes. Esse aparente contrasenso será discutido adiante.

3.6.1. Princípios Estatísticos do Método

A estimativa da densidade de células viáveis de rizóbio na amostra baseia-se em duas premissas (Cochran, 1950):

- 1- os organismos na solução têm distribuição homogênea e aleatória;
- 2- não existe interação entre os mesmos (por exemplo, formação de colônias).

Admitindo que as premissas são satisfeitas, da suspensão original (se esta for muito concentrada), pode-se fazer uma pré-diluição. Esta solução pré-diluída será chamada solução matriz. Entretanto, ao se obter o valor de densidade, ou número mais provável, deve-se lembrar de corrigir esse valor conforme a diluição realizada. Normalmente, toma-se o mesmo número de repetições para cada volume, e volumes regularmente espaçados (por exemplo, 1 mL; 0,1 mL; 0,01 mL; ou 1,0 mL; 0,5 mL; 0,25 mL). Mas essa regularidade não é pré-requisito, nem metodológico experimental nem estatístico.

É fácil perceber que, após o procedimento experimental, supondo "k" representando diferentes volumes, o resultado será:

$$\sum_{i=1}^k S_i V_i + \sum_{i=1}^k F_i V_i = \sum_{i=1}^k N_i V_i \quad (1)$$

onde:

i é o número de diluições, ou de volumes diferentes;

N_i é o número de repetições com volume V_i ;

V_i é o volume retirado na diluição i reportado à solução matriz;

S_i é o número de sucessos (positivos) na diluição i;

F_i é o número de fracassos (negativos) na diluição i.

Quando a solução ou suspensão é diluída, a probabilidade de não haver nenhum organismo viável na amostra com volume V_i é dada aproximadamente, por:

$$p(F_i) = e^{-V_i d} \quad (2)$$

onde d é a densidade de organismos na solução matriz.

Desenvolvendo-se a equação (1) e nela substituindo a equação (2), chega-se à equação proposta por Cochran (1950):

$$\sum_{i=1}^k F_i V_i = \sum_{i=1}^k \frac{S_i V_i e^{-V_i d}}{1 - e^{-V_i d}} \quad (3)$$

Esta equação não tem solução analítica, mas pode ser encontrado o valor de “d” por iteração. Outra forma de se chegar a essa resolução é lembrar que a equação (2) aproxima-se da função distribuição de probabilidades de Poisson, que é caso particular da função distribuição de probabilidades binomial, onde a probabilidade de ocorrência dos eventos de sucessos $S_1, S_2, S_3, \dots, S_k$, para uma solução matriz será dada por:

$$p(S_1, S_2, S_3, \dots, S_k) = \sum_{i=1}^k \binom{N_i}{S_i} (1 - e^{-V_i d})^{S_i} (e^{-V_i d})^{N_i - S_i} F_i \quad (4)$$

Também por iteração, os valores de “d” obtidos por (3) e (4) igualam-se quando a probabilidade for máxima. Daí, o valor de “d” ser denominado “Número Mais Provável, NMP”.

É fácil perceber, a partir de (4), que os resultados experimentais, para uma determinada série de diluições, deverão submeter-se a duas condições:

- a) ao menos em um caso ocorrer desenvolvimento microbiano;
- b) ao menos em um caso não ocorrer desenvolvimento microbiano.

3.6.2. Tabela de Números Mais Prováveis

TABELA 3.3. Números Mais Prováveis para uso com diluições decimais e três tubos, probabilidades de ocorrência e limites mínimo e máximo do intervalo de confiança (IC) a 95%.¹

1	0,1	0,01	NMP	Prob. (%)	IC (mín.)	IC (máx.)
1	0	0	0,357	39,203	0,087	2,058
2	0	0	0,917	31,927	0,288	3,773
3	0	0	2,312	34,098	0,871	12,822
0	1	0	0,305	3,365	0,074	1,698
1	1	0	0,736	6,445	0,228	2,762
2	1	0	1,469	11,963	0,535	4,951

(continua...)

TABELA 3.3. Continuação.

1	0,1	0,01	NMP	Prob. (%)	IC (mín.)	IC (máx.)
3	1	0	4,272	37,433	1,664	21,327
0	2	0	0,620	0,156	0,192	2,239
1	2	0	1,138	0,627	0,414	3,468
2	2	0	2,106	2,318	0,847	6,261
3	2	0	9,324	32,817	3,331	38,555
0	3	0	0,944	0,004	0,343	2,762
1	3	0	1,568	0,030	0,635	4,194
2	3	0	2,855	0,216	1,229	7,726
3	3	0	23,970	36,594	9,128	139,550
0	0	1	0,300	0,332	0,073	1,675
1	0	1	0,723	0,624	0,225	2,711
2	0	1	1,432	1,120	0,522	4,791
3	0	1	3,850	3,099	1,511	17,662
0	1	1	0,611	0,045	0,189	2,208
1	1	1	1,118	0,179	0,407	3,401
2	1	1	2,046	0,632	0,823	6,037
3	1	1	7,488	6,579	2,777	28,088
0	2	1	0,930	0,004	0,338	2,722
1	2	1	1,538	0,025	0,623	4,108
2	2	1	2,763	0,170	1,191	7,420
3	2	1	14,938	12,507	5,569	50,581
0	3	1	1,261	0,000	0,512	3,233
1	3	1	1,988	0,002	0,871	4,842
2	3	1	3,602	0,021	1,632	8,966
3	3	1	46,208	42,767	17,836	240,763
0	0	2	0,601	0,001	0,186	2,176
1	0	2	1,098	0,006	0,399	3,336
2	0	2	1,990	0,019	0,802	5,832
3	0	2	6,348	0,158	2,434	22,749
0	1	2	0,917	0,000	0,334	2,684
1	1	2	1,510	0,002	0,612	4,026

(continua...)

TABELA 3.3. Continuação.

1	0,1	0,01	NMP	Prob. (%)	IC (mín.)	IC (máx.)
2	1	2	2,680	0,015	1,156	7,143
3	1	2	11,520	0,649	4,380	35,159
0	2	2	1,242	0,000	0,505	3,185
1	2	2	1,950	0,000	0,854	4,740
2	2	2	3,478	0,005	1,579	8,598
3	2	2	21,470	2,470	8,652	64,067
0	3	2	1,579	0,000	0,695	3,693
1	3	2	2,418	0,000	1,126	5,486
2	3	2	4,408	0,001	2,082	10,217
3	3	2	109,849	44,442	38,227	478,767
0	0	3	0,904	0,000	0,329	2,645
1	0	3	1,482	0,000	0,601	3,948
2	0	3	2,600	0,000	1,123	6,887
3	0	3	9,538	0,004	3,706	27,927
0	1	3	1,224	0,000	0,498	3,140
1	1	3	1,911	0,000	0,838	4,644
2	1	3	3,359	0,000	1,529	8,261
3	1	3	15,878	0,032	6,485	42,502
0	2	3	1,555	0,000	0,686	3,636
1	2	3	2,370	0,000	1,104	5,356
2	2	3	4,240	0,000	2,009	9,782
3	2	3	29,170	0,235	12,543	79,220
0	3	3	1,898	0,000	0,890	4,141
1	3	3	2,860	0,000	1,397	6,126
2	3	3	5,254	0,000	2,574	11,478

¹ Esta tabela indica o número de células viáveis por unidade de volume, baseado no número de tubos que foram inoculados demonstrando crescimento, conforme metodologia descrita anteriormente: três plantas-teste inoculadas com uma unidade de volume (exemplo, 1 mL), três plantas-teste inoculadas com 0,1 unidades de volume (exemplo, 0,1 mL) e três com 0,01 unidades de volume (exemplo, 0,01 mL). A combinação é estabelecida com o número de plantas-teste que nodularam em cada caso, na sequência decrescente de volumes utilizados para inoculação. A coluna designada como NMP refere-se ao número de células viáveis de rizóbio proveniente da solução matriz. A coluna designada como Prob(%) representa a chance de ocorrer a combinação obtida se o experimento fosse repetido um número infinito de vezes, com a mesma solução matriz.

TABELA 3.4. Números Mais Prováveis para uso com diluições decimais e quatro tubos, probabilidades de ocorrência e limites mínimo e máximo do intervalo de confiança a 95%.

1	0,1	0,01	NMP	Prob. (%)	IC (mín.)	IC (máx.)
1	0	0	0,255	37,449	0,062	1,445
2	0	0	0,598	28,252	0,186	2,283
3	0	0	1,126	24,382	0,410	3,802
4	0	0	2,311	23,822	0,941	10,213
0	1	0	0,227	3,352	0,055	1,268
1	1	0	0,519	5,788	0,161	1,916
2	1	0	0,926	8,865	0,337	2,877
3	1	0	1,597	14,093	0,644	4,796
4	1	0	3,614	31,830	1,526	15,319
0	2	0	0,460	0,172	0,142	1,665
1	2	0	0,794	0,584	0,288	2,375
2	2	0	1,278	1,540	0,517	3,490
3	2	0	2,137	4,307	0,926	5,913
4	2	0	6,215	28,693	2,505	23,367
0	3	0	0,700	0,006	0,254	2,045
1	3	0	1,081	0,038	0,438	2,834
2	3	0	1,655	0,161	0,723	4,133
3	3	0	2,770	0,793	1,261	7,172
4	3	0	11,450	25,514	4,428	38,923
0	4	0	0,943	0,000	0,383	2,419
1	4	0	1,380	0,001	0,606	3,299
2	4	0	2,059	0,008	0,955	4,810
3	4	0	3,517	0,072	1,661	8,588
4	4	0	23,978	26,174	9,816	110,708
0	0	1	0,226	0,331	0,054	1,255
1	0	1	0,513	0,565	0,159	1,892
2	0	1	0,912	0,850	0,332	2,829
3	0	1	1,562	1,311	0,630	4,663
4	0	1	3,387	2,705	1,435	13,518
0	1	1	0,455	0,045	0,141	1,648

(continua...)

TABELA 3.4. Continuação.

1	0,1	0,01	NMP	Prob. (%)	IC (mín.)	IC (máx.)
1	1	1	0,784	0,150	0,285	2,344
2	1	1	1,258	0,387	0,509	3,428
3	1	1	2,085	1,042	0,904	5,726
4	1	1	5,498	5,802	2,271	19,610
0	2	1	0,691	0,003	0,251	2,024
1	2	1	1,068	0,021	0,432	2,796
2	2	1	1,627	0,089	0,711	4,055
3	2	1	2,693	0,419	1,229	6,921
4	2	1	9,398	9,199	3,731	29,251
0	3	1	0,933	0,000	0,379	2,393
1	3	1	1,362	0,001	0,598	3,254
2	3	1	2,024	0,011	0,938	4,715
3	3	1	3,406	0,099	1,613	8,255
4	3	1	16,268	15,031	6,640	49,168
0	4	1	1,181	0,000	0,520	2,760
1	4	1	1,668	0,000	0,779	3,721
2	4	1	2,450	0,000	1,192	5,408
3	4	1	4,245	0,011	2,068	9,754
4	4	1	38,499	36,950	16,169	170,485
0	0	2	0,450	0,001	0,139	1,630
1	0	2	0,774	0,005	0,281	2,314
2	0	2	1,238	0,013	0,501	3,370
3	0	2	2,037	0,035	0,884	5,555
4	0	2	4,980	0,170	2,095	17,075
0	1	2	0,683	0,000	0,248	2,002
1	1	2	1,054	0,002	0,427	2,758
2	1	2	1,601	0,008	0,700	3,981
3	1	2	2,620	0,037	1,198	6,688
4	1	2	8,068	0,603	3,285	24,094
0	2	2	0,924	0,000	0,375	2,367
1	2	2	1,343	0,000	0,590	3,210

(continua...)

TABELA 3.4. Continuação.

1	0,1	0,01	NMP	Prob. (%)	IC (mín.)	IC (máx.)
2	2	2	1,990	0,002	0,923	4,623
3	2	2	3,302	0,019	1,568	7,954
4	2	2	12,958	1,621	5,364	35,463
0	3	2	1,168	0,000	0,515	2,730
1	3	2	1,646	0,000	0,769	3,670
2	3	2	2,408	0,000	1,171	5,297
3	3	2	4,100	0,005	2,003	9,362
4	3	2	21,838	4,696	9,469	60,745
0	4	2	1,419	0,000	0,666	3,095
1	4	2	1,960	0,000	0,962	4,140
2	4	2	2,857	0,000	1,443	6,012
3	4	2	5,024	0,000	2,516	10,939
4	4	2	70,197	37,360	37,360	271,301
0	0	3	0,677	0,000	0,246	1,981
1	0	3	1,041	0,000	0,422	2,724
2	0	3	1,575	0,000	0,689	3,910
3	0	3	2,557	0,000	1,169	6,478
4	0	3	7,118	0,006	2,966	20,743
0	1	3	0,912	0,000	0,371	2,342
1	1	3	1,326	0,000	0,583	3,167
2	1	3	1,954	0,000	0,908	4,535
3	1	3	3,207	0,000	1,526	7,676
4	1	3	10,938	0,039	4,598	28,697
0	2	3	1,157	0,000	0,509	2,701
1	2	3	1,625	0,000	0,758	3,620
2	2	3	2,368	0,000	1,149	5,197
3	2	3	3,963	0,000	1,954	8,972
4	2	3	16,780	0,172	7,379	42,000
0	3	3	1,403	0,000	0,659	3,061
1	3	3	1,932	0,000	0,950	4,078
2	3	3	2,803	0,000	1,415	5,892

(continua...)

TABELA 3.4. Continuação.

1	0,1	0,01	NMP	Prob. (%)	IC (mín.)	IC (máx.)
3	3	3	4,838	0,000	2,432	10,482
4	3	3	28,400	0,887	12,910	73,902
0	4	3	1,657	0,000	0,818	3,422
1	4	3	2,258	0,000	1,153	4,556
2	4	3	3,279	0,000	1,709	6,617
3	4	3	5,848	0,000	3,000	12,145
4	4	3	138,569	42,187	52,601	507,080
0	0	4	0,903	0,000	0,367	2,317
1	0	4	1,308	0,000	0,576	3,125
2	0	4	1,921	0,000	0,894	4,452
3	0	4	3,119	0,000	1,488	7,416
4	0	4	9,538	0,000	4,072	24,461
0	1	4	1,143	0,000	0,504	2,672
1	1	4	1,603	0,000	0,749	3,570
2	1	4	2,321	0,000	1,131	5,093
3	1	4	3,839	0,000	1,888	8,678
4	1	4	13,951	0,001	6,194	33,395
0	2	4	1,388	0,000	0,652	3,027
1	2	4	1,908	0,000	0,937	4,023
2	2	4	2,752	0,000	1,391	5,766
3	2	4	4,672	0,000	2,354	10,070
4	2	4	20,920	0,008	9,706	48,923
0	3	4	1,641	0,000	0,809	3,387
1	3	4	2,226	0,000	1,138	4,490
2	3	4	3,208	0,000	1,678	6,472
3	3	4	5,618	0,000	2,896	11,613
4	3	4	36,181	0,084	17,084	88,599
0	4	4	1,898	0,000	0,975	3,748
1	4	4	2,557	0,000	1,351	4,974
2	4	4	3,708	0,000	1,989	7,224
3	4	4	6,698	0,000	3,528	13,339

TABELA 3.5. Números Mais Prováveis para uso com diluições decimais e cinco tubos, probabilidades de ocorrência e limites mínimo e máximo do intervalo de confiança a 95%.

1	0,1	0,01	NMP	Prob. (%)	IC (mín.)	IC (máx.)
1	0	0	0,199	36,483	0,048	1,118
2	0	0	0,447	26,579	0,139	1,664
3	0	0	0,777	21,738	0,283	2,431
4	0	0	1,276	18,681	0,516	3,799
5	0	0	2,312	16,643	1,003	8,676
0	1	0	0,182	3,344	0,044	1,012
1	1	0	0,403	5,450	0,125	1,473
2	1	0	0,684	7,662	0,249	2,067
3	1	0	1,071	10,459	0,433	2,951
4	1	0	1,689	14,827	0,735	4,659
5	1	0	3,289	26,380	1,473	12,173
0	2	0	0,367	0,182	0,114	1,326
1	2	0	0,612	0,563	0,223	1,814
2	2	0	0,931	1,282	0,377	2,472
3	2	0	1,384	2,720	0,605	3,497
4	2	0	2,161	6,259	0,991	5,626
5	2	0	4,932	26,016	2,169	17,179
0	3	0	0,556	0,009	0,202	1,624
1	3	0	0,828	0,042	0,336	2,151
2	3	0	1,190	0,143	0,522	2,885
3	3	0	1,721	0,455	0,798	4,074
4	3	0	2,708	1,716	1,293	6,713
5	3	0	7,923	22,564	3,309	24,796
0	4	0	0,748	0,000	0,304	1,917
1	4	0	1,050	0,002	0,462	2,489
2	4	0	1,460	0,010	0,681	3,308
3	4	0	2,086	0,048	1,013	4,686
4	4	0	3,350	0,302	1,644	7,952
5	4	0	12,988	19,923	5,406	38,961
0	5	0	0,944	0,000	0,416	2,205

(continua...)

TABELA 3.5. Continuação.

1	0,1	0,01	NMP	Prob. (%)	IC (mín.)	IC (máx.)
1	5	0	1,279	0,000	0,599	2,829
2	5	0	1,743	0,000	0,853	3,744
3	5	0	2,480	0,002	1,249	5,337
4	5	0	4,111	0,027	2,059	9,338
5	5	0	23,978	18,721	10,430	93,682
0	0	1	0,180	0,332	0,044	1,004
1	0	1	0,399	0,535	0,124	1,459
2	0	1	0,677	0,743	0,246	2,043
3	0	1	1,055	0,997	0,428	2,906
4	0	1	1,658	1,374	0,721	4,543
5	0	1	3,139	2,273	1,408	11,112
0	1	1	0,364	0,045	0,113	1,315
1	1	1	0,607	0,137	0,221	1,795
2	1	1	0,921	0,307	0,373	2,443
3	1	1	1,364	0,639	0,601	3,427
4	1	1	2,116	1,418	0,971	5,469
5	1	1	4,562	5,206	2,035	15,241
0	2	1	0,551	0,004	0,200	1,611
1	2	1	0,820	0,020	0,333	2,130
2	2	1	1,176	0,068	0,516	2,850
3	2	1	1,696	0,211	0,787	4,003
4	2	1	2,643	0,758	1,263	6,508
5	2	1	6,993	7,892	2,999	21,049
0	3	1	0,741	0,000	0,301	1,900
1	3	1	1,040	0,002	0,458	2,464
2	3	1	1,442	0,009	0,673	3,266
3	3	1	2,054	0,043	0,997	4,600
4	3	1	3,260	0,259	1,603	7,679
5	3	1	10,858	11,038	4,602	30,036
0	4	1	0,936	0,000	0,412	2,186
1	4	1	1,267	0,000	0,592	2,801

(continua...)

TABELA 3.5. Continuação.

1	0,1	0,01	NMP	Prob. (%)	IC (mín.)	IC (máx.)
2	4	1	1,722	0,001	0,843	3,694
3	4	1	2,437	0,005	1,229	5,233
4	4	1	3,982	0,056	2,001	8,983
5	4	1	17,238	16,148	7,540	47,884
0	5	1	1,134	0,000	0,532	2,472
1	5	1	1,499	0,000	0,738	3,140
2	5	1	2,015	0,000	1,027	4,136
3	5	1	2,857	0,000	1,484	5,906
4	5	1	4,829	0,006	2,469	10,452
5	5	1	34,760	31,238	15,496	134,382
0	0	2	0,362	0,002	0,112	1,304
1	0	2	0,601	0,005	0,219	1,779
2	0	2	0,910	0,012	0,369	2,414
3	0	2	1,345	0,024	0,589	3,385
4	0	2	2,072	0,052	0,953	5,322
5	0	2	4,268	0,169	1,923	13,773
0	1	2	0,547	0,000	0,199	1,598
1	1	2	0,813	0,002	0,330	2,109
2	1	2	1,163	0,006	0,511	2,814
3	1	2	1,670	0,019	0,776	3,936
4	1	2	2,582	0,067	1,235	6,315
5	1	2	6,308	0,575	2,763	18,473
0	2	2	0,734	0,000	0,299	1,884
1	2	2	1,030	0,000	0,453	2,439
2	2	2	1,425	0,002	0,665	3,224
3	2	2	2,020	0,008	0,983	4,519
4	2	2	3,171	0,045	1,564	7,427
5	2	2	9,438	1,343	4,070	25,088
0	3	2	0,929	0,000	0,409	2,167
1	3	2	1,255	0,000	0,587	2,771
2	3	2	1,700	0,000	0,833	3,645

(continua...)

TABELA 3.5. Continuação.

1	0,1	0,01	NMP	Prob. (%)	IC (mín.)	IC (máx.)
3	3	2	2,399	0,002	1,210	5,134
4	3	2	3,861	0,019	1,946	8,662
5	3	2	14,058	2,916	6,222	35,595
0	4	2	1,124	0,000	0,528	2,450
1	4	2	1,484	0,000	0,730	3,107
2	4	2	1,990	0,000	1,014	4,080
3	4	2	2,806	0,000	1,460	5,789
4	4	2	4,663	0,005	2,392	10,044
5	4	2	22,118	6,982	10,143	58,002
0	5	2	1,323	0,000	0,654	2,733
1	5	2	1,722	0,000	0,883	3,449
2	5	2	2,290	0,000	1,207	4,530
3	5	2	3,247	0,000	1,733	6,482
4	5	2	5,589	0,001	2,917	11,580
5	5	2	54,210	33,684	23,386	194,950
0	0	3	0,541	0,000	0,197	1,584
1	0	3	0,804	0,000	0,327	2,089
2	0	3	1,150	0,000	0,505	2,781
3	0	3	1,648	0,000	0,765	3,871
4	0	3	2,523	0,001	1,210	6,136
5	0	3	5,770	0,009	2,577	16,561
0	1	3	0,730	0,000	0,296	1,868
1	1	3	1,020	0,000	0,449	2,415
2	1	3	1,409	0,000	0,658	3,184
3	1	3	1,990	0,000	0,968	4,439
4	1	3	3,090	0,002	1,526	7,199
5	1	3	8,388	0,044	3,691	21,787
0	2	3	0,920	0,000	0,405	2,149
1	2	3	1,242	0,000	0,582	2,743
2	2	3	1,680	0,000	0,823	3,599
3	2	3	2,360	0,000	1,191	5,040

(continua...)

TABELA 3.5. Continuação.

1	0,1	0,01	NMP	Prob. (%)	IC (mín.)	IC (máx.)
4	2	3	3,750	0,002	1,897	8,365
5	2	3	12,049	0,152	5,395	29,244
0	3	3	1,115	0,000	0,523	2,428
1	3	3	1,468	0,000	0,724	3,073
2	3	3	1,963	0,000	1,001	4,028
3	3	3	2,758	0,000	1,436	5,675
4	3	3	4,510	0,001	2,326	9,659
5	3	3	17,498	0,497	8,140	41,492
0	4	3	1,312	0,000	0,648	2,708
1	4	3	1,703	0,000	0,874	3,412
2	4	3	2,260	0,000	1,192	4,468
3	4	3	3,188	0,000	1,703	6,349
4	4	3	5,390	0,000	2,820	11,116
5	4	3	27,804	1,968	13,240	69,472
0	5	3	1,516	0,000	0,780	2,990
1	5	3	1,946	0,000	1,033	3,756
2	5	3	2,570	0,000	1,396	4,923
3	5	3	3,651	0,000	1,996	7,062
4	5	3	6,390	0,000	3,401	12,730
5	5	3	91,759	34,542	37,218	295,079
0	0	4	0,721	0,000	0,294	1,852
1	0	4	1,010	0,000	0,445	2,391
2	0	4	1,391	0,000	0,650	3,146
3	0	4	1,960	0,000	0,954	4,364
4	0	4	3,018	0,000	1,493	6,978
5	0	4	7,588	0,000	3,390	19,410
0	1	4	0,912	0,000	0,402	2,130
1	1	4	1,228	0,000	0,576	2,716
2	1	4	1,660	0,000	0,815	3,551
3	1	4	2,322	0,000	1,173	4,950
4	1	4	3,648	0,000	1,849	8,093

(continua...)

TABELA 3.5. Continuação.

1	0,1	0,01	NMP	Prob. (%)	IC (mín.)	IC (máx.)
5	1	4	10,610	0,002	4,808	25,190
0	2	4	1,104	0,000	0,519	2,408
1	2	4	1,453	0,000	0,716	3,043
2	2	4	1,939	0,000	0,990	3,973
3	2	4	2,710	0,000	1,414	5,566
4	2	4	4,370	0,000	2,259	9,323
5	2	4	14,788	0,011	6,936	33,554
0	3	4	1,300	0,000	0,642	2,685
1	3	4	1,687	0,000	0,865	3,377
2	3	4	2,233	0,000	1,178	4,406
3	3	4	3,130	0,000	1,675	6,222
4	3	4	5,210	0,000	2,734	10,684
5	3	4	21,212	0,053	10,305	47,799
0	4	4	1,501	0,000	0,773	2,964
1	4	4	1,923	0,000	1,022	3,715
2	4	4	2,538	0,000	1,378	4,855
3	4	4	3,582	0,000	1,959	6,915
4	4	4	6,148	0,000	3,284	12,192
5	4	4	34,531	0,358	16,900	82,467
0	5	4	1,707	0,000	0,909	3,245
1	5	4	2,172	0,000	1,190	4,056
2	5	4	2,860	0,000	1,590	5,319
3	5	4	4,070	0,000	2,271	7,647
4	5	4	7,214	0,000	3,922	13,880
5	5	4	160,883	40,960	66,026	528,982
0	0	5	0,904	0,000	0,399	2,113
1	0	5	1,218	0,000	0,570	2,689
2	0	5	1,642	0,000	0,805	3,509
3	0	5	2,288	0,000	1,155	4,864
4	0	5	3,548	0,000	1,805	7,840
5	0	5	9,538	0,000	4,370	22,290

(continua...)

TABELA 3.5. Continuação.

1	0,1	0,01	NMP	Prob. (%)	IC (mín.)	IC (máx.)
0	1	5	1,094	0,000	0,514	2,387
1	1	5	1,440	0,000	0,709	3,013
2	1	5	1,918	0,000	0,978	3,923
3	1	5	2,668	0,000	1,391	5,448
4	1	5	4,250	0,000	2,214	8,963
5	1	5	12,928	0,000	6,112	28,621
0	2	5	1,289	0,000	0,637	2,662
1	2	5	1,670	0,000	0,857	3,342
2	2	5	2,205	0,000	1,163	4,348
3	2	5	3,078	0,000	1,647	6,102
4	2	5	5,030	0,000	2,654	10,293
5	2	5	17,668	0,000	8,661	37,976
0	3	5	1,488	0,000	0,767	2,942
1	3	5	1,908	0,000	1,012	3,676
2	3	5	2,503	0,000	1,360	4,790
3	3	5	3,518	0,000	1,925	6,774
4	3	5	5,926	0,000	3,178	11,711
5	3	5	25,260	0,003	12,716	54,486
0	4	5	1,692	0,000	0,901	3,216
1	4	5	2,149	0,000	1,176	4,016
2	4	5	2,821	0,000	1,570	5,243
3	4	5	3,990	0,000	2,230	7,481
4	4	5	6,930	0,000	3,780	13,281
5	4	5	42,560	0,034	21,237	97,173
0	5	5	1,898	0,000	1,042	3,495
1	5	5	2,400	0,000	1,346	4,366
2	5	5	3,150	0,000	1,791	5,716
3	5	5	4,498	0,000	2,557	8,237
4	5	5	8,060	0,000	4,475	15,040

3.6.3. Exemplo

Supondo-se que o ensaio seja conduzido segundo a metodologia descrita anteriormente, com quatro repetições e que, como resultado, seja obtido: “quatro” plantas-teste com nódulos na inoculação com 1 mL (da solução matriz), “uma” planta-teste com nódulos na inoculação com 0,1 mL e “zero” nódulos nas plantas-teste inoculadas com 0,01 mL. A combinação “4-1-0” seria a combinação a ser verificada na Tabela 3.4. O valor do NMP correspondente é 3,6164. Supondo-se, também, que a solução matriz, neste ensaio, fosse diluída até que nela estivesse contido 0,001 g de solo (diluição 10^{-4}). O número de células viáveis na suspensão original será, então, $3,6164 \cdot 10^4$ células/g solo úmido, que deve ser corrigido para base de solo seco em estufa. Isto porque, nessa solução matriz, 0,001 g da amostra de solo estão diluídas em 10 mL de solução. Conseqüentemente, na alíquota de 1 mL (que é inoculada como diluição mais concentrada, ou transferida para compor a próxima diluição) está contida uma massa, ao menos teoricamente, de 0,0001 g da amostra de solo úmido.

Deve ser observada, ainda, a probabilidade de 31,83% de chance de ocorrência dessa combinação, caso o ensaio pudesse ser repetido um número infinito de vezes. Avaliando a combinação isoladamente, então com 95% de certeza, o valor real da densidade de células viáveis de rizóbio estaria compreendido entre $1,5263 \cdot 10^4$ e $15,3196 \cdot 10^4$ células/g de solo úmido.

3.6.4. Comentários

Algumas questões devem ser discutidas quanto ao método das diluições sucessivas e à obtenção da densidade mais provável da população de rizóbio em uma amostra:

- a) o princípio básico do método admite que, se existir uma única célula na alíquota inoculante capaz de induzir a nodulação, esta ocorrerá. Ocorrendo a nodulação, significa que existe ao menos uma célula viável. Ao contrário, se não ocorrer nodulação, não se pode afirmar a inexistência das células, o que desloca a maneira de analisar os eventos nodulação/não-nodulação, para probabilidades de ocorrência de infecção radicular. Do ponto de vista matemático, o princípio básico do método é determinista, sendo expresso pela equação (3), enquanto a perspectiva probabilística é visualizada pela equação (4);
- b) pela abordagem determinista, para um determinado resultado experimental válido, chega-se a um valor único de densidade de células viáveis de rizóbio. Basta olhar as tabelas, para concluir que a densidade é uma variável discreta, ou seja, apenas alguns valores são possíveis. Deve também ser lembrado que a densidade é definida como número de células viáveis por unidade de massa ou volume, podendo assumir qualquer valor positivo, do conjunto de números reais. Assim, as densidades e as tabelas tornam-se aparentemente incompatíveis;
- c) essa incompatibilidade é explicada pela abordagem probabilística, onde o valor da densidade de células viáveis é obtido pela sua probabilidade de ocorrência. Dessa forma, um resultado experimental pode ser conseqüência de um conjunto de valores possíveis de densidade. E cada valor possível está associado a uma probabilidade, às vezes próxima à do valor mais provável.

Conseqüentemente, percebe-se que o experimentador não deve ter em mente apenas o número mais provável, mas também, seu intervalo de confiança com algum nível de certeza. Discussões sobre o intervalo de confiança são encontradas em Loyer & Hamilton (1987) e no trabalho de Ridout (1994); d) a abordagem probabilística também permite descartar valores de densidade associados à probabilidades muito pequenas (exemplo, não nodulação nas plantas-teste inoculadas com as suspensões de diluições mais concentradas e nodulação abundante nas inoculadas com suspensões de diluições mais diluídas). Do ponto de vista matemático, isso deve-se ao fato de que as premissas 1 e 2 da seção 3.6.1 não foram satisfeitas. Por outro lado, do ponto de vista experimental, isso pode ocorrer devido às condições desfavoráveis para a nodulação, como falha na sobrevivência ou multiplicação do rizóbio, baixo vigor das plantas-teste ou interferência de algas ou fungos saprofíticos (Brockwell, 1982). Conclui-se, portanto, que o experimentador não é neutro no experimento. A resposta obtida depende do arranjo experimental proposto (número de repetições, diluições), o que torna o intervalo de confiança de extrema importância na comparação dos resultados.

3.7. Considerações Finais

Em todos os estudos de levantamento e monitoramento da população de rizóbio no solo a etapa de coleta de amostras e determinação do número de células viáveis é fundamental. Apesar de ser, aparentemente, uma etapa de fácil execução, procedimentos adequados na amostragem e diluições refletirão na obtenção de resultados adequados.

3.8. Referências Bibliográficas

- ALEXANDER, M. Most Probable Number Method for Microbial Populations. In: PAGE, A. L. ed. **Methods of soil analysis**; part 2, chemical and microbiological properties. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p.815-820. (Agronomy Monograph, 9).
- ARAUJO, R. S.; MAYA-FLORES, J.; BARNES-McCONNELL, D.; YOKOYAMA, C.; DAZZO, F. B.; BLISS, F.A. Semienclosed tube cultures of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) for enumeration of *Rhizobium phaseoli* by the most-probable-number-technique. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.52, p.954-956, 1986.
- BARBER, L. E. Use of selective agents for recovery of *Rhizobium meliloti* from soil. **Soil Sci. Soc. Amer. J.**, v.43, p.1145-1148, 1979.
- BROCKWELL, J. Plant-Infection Counts of Rhizobia in Soils. In: VINCENT, J. M. ed. **Nitrogen fixation in legumes**. New York: Academic Press, 1982. p.41-58.

- BUSHBY, H. V. A. Quantitative estimation of rhizobia in non-sterile using antibiotics and fungicides. **Soil Biol. Biochem.**, v.13, p.237-239, 1981.
- COCHRAN, W. C. Estimation of bacterial densities by means of the "most probable number." **Biometrics**, v.6, p.105-116, 1950.
- DATE, R. A.; VINCENT, J. M. Determination of the number of root-nodule bacteria in the presence of other organisms. **Aust. J. Exper. Agric. Anim. Husb.**, v.2, p.5-7, 1962.
- DYE, M. The enrichment of *Rhizobium* from a model system using immunomagnetic separation. **J. Microbiol. Meth.**, v.19, p.235-245, 1994.
- GRAHAM, P. H. Seletive medium for growth of *Rhizobium*. **Appl. Microbiol.**, v.17, p.769-70, 1969.
- GUERRA, P. A. G. **Geostatística operacional**. Brasília: MME/Departamento Nacional de Produção Mineral, 1988. 145p.
- KOCH, A. L. Growth Measurement. In: GERBARDT, P. ed. **Manual of methods for General Bacteriology**: Washington DC: American Society for Microbiology, 1981, p.179-207.
- LOYER, M. W.; HAMILTON, M. A. Interval estimation of the density of organisms using a serie-experiment. **Biometrics**, v.40, p.907-916, 1984.
- MONTANGE, D.; MACARY, H. S. Semiasseptic method of culturing legumes in buckets. In: FAO-Food and Agriculture organization of the United Nations. **Technical handbook on of soil micro-organisms**. Rome: FAO, 1983. 116p. (IBP Handbook, 19).
- NORRIS, D. O. & DATE, R. A. Legume bacteriology. In: SHAW, N. H. & BRYAN, W. W. ed. **Tropical pastures research; principles and methods**. Hurley: Comonwealth Bureau of Pastures and Field Crops, 1976. p.134-174. (Bulletin, 51).
- PARKINSON, D. T.; GRAY, R. G.; WILLIAMS, S. T. **Methods for studying the ecology of soil micro-organisms**. Edinburgh: Blackwell Scientific Publications, 1971. 164p. (IBP Handbook, 19).
- PATTISON, A. C.; SKINNER, F. A. The effect of antimicrobial substances on *Rhizobium* sp. and their use in seletive media. **J. Appl. Bacteriol.**, v.37, p.239-250, 1974.
- PIMENTEL GOMES, F.P. **A Estatística moderna na pesquisa agropecuária**. Piracicaba: Potafos, 1987. 160p.
- RIDOUT, M. S. A comparison of confidence interval methods for dilution series experiments. **Biometrics**, v.50, p.289-296, 1994.
- SOMASEGARAN, P. & HOBEN, H. J. **Methods in legume-Rhizobium technology**. Hawaii: Niftal, 1985. p.54-63.

- SPEIDEL, K. L. & WOLLUM, II, A. G. **Evaluation of leguminous inoculant quality**: a manual. North Carolina: North Carolina Agricultural Research Service, 1980. 51p. (Technical. Bulletin, 266).
- TOOMSAN, B.; RUPELA, P.; MITTAL, S.; DART, P. J.; CLARK, K. W. Counting *Cicer- Rhizobium* using a plant infection technique. **Soil Biol. Biochem.**, v.16, p.503-507, 1984.
- VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 119 p.(IBP Handbook, 15)
- WILSON, J. K. Legume bacteria population of the soil. **J. Amer. Soc. Agron.**, v.18, p.911-919, 1926.
- WOLLUM II, A. G. Cultural methods for soil microorganisms. In: PAGE, A.L. ed. **Methods of soil analysis**; part 2, chemical and microbiological properties. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p.781-802. (Agronomy Monograph, 9).
- WEAVER, R.W. & FREDERICK, L.R. *Rhizobium*. In: PAGE, A. L. ed. **Methods of soil analysis**; part 2, chemical and microbiological properties. 1982. p.1043-1070. (Agronomy Monograph, 9).
- WEAVER, R. W. & FREDERICK, L.R. A new technique for most probable number count of rhizobia. **Pl. Soil**, v.36, p.219-222, 1972.

CAPÍTULO 4

PRODUÇÃO DE BIOMASSA CELULAR DE RIZÓBIO

Luiz C. Urenha¹
José G. C. Pradella¹
Margaretti S. Oliveira¹
Antônio Bonomi¹

4.1. Exigências Nutricionais

4.1.1. Características Gerais dos Gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*

As bactérias dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* são bastonetes com 0,5 µm a 0,9 µm por 1,2 µm a 3,0 µm. São Gram negativas, movem-se através de flagelos e utilizam oxigênio como receptor final de elétrons na cadeia respiratória. A temperatura adequada para seu crescimento oscila entre 25° a 30° C e o pH entre 6 e 7. Para maiores detalhes sobre as espécies de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, ver capítulo 2.

O gênero *Rhizobium* (p. ex., *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*) tem crescimento rápido. A literatura relata a presença de reação ácida durante o cultivo, promovendo queda do pH do meio de cultura (Jordan, 1984). No entanto, dados experimentais de cultivo desta bactéria em fermentador, na presença de sacarose, glutamato monossódico e extrato de levedura mostram comportamento oposto. A Figura 4.1 apresenta o comportamento típico do *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* SEMIA 4064 num cultivo em fermentador. As velocidades específicas máximas de crescimento desta bactéria oscilam em torno de 0,20/h, o que resulta num tempo de geração de aproximadamente 3,5 horas (IPT, 1993a).

O gênero *Bradyrhizobium* (p. ex., *Bradyrhizobium japonicum*) tem crescimento lento e produz reação básica no meio de cultura, provocando aumento do pH. As velocidades específicas máximas de crescimento desta bactéria oscilam em torno de 0,07/h, com tempo de geração de aproximadamente 10,0 horas. A Figura 4.2 apresenta o comportamento típico do *B. japonicum* SEMIA 587 num cultivo em fermentador (IPT, 1987).

4.1.2. Formulação de Meios de Cultura

Os meios de cultura podem ser divididos em dois grupos: os meios sintéticos (também chamados de meios definidos) e os meios complexos (também chamados de meios naturais). Meios sintéticos são aqueles preparados usando-se compostos puros e em proporções definidas. Meios complexos são aqueles preparados usando-se produtos de origem animal, vegetal ou microbiana, de composições

¹ Pesquisadores, Ph.D., Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), Divisão de Química, Agrupamento de Biotecnologia, Cidade Universitária, CEP 05508-901, São Paulo, SP.

químicas não definidas completamente como, por exemplo: extrato de levedura, extrato de carne, melaço, água de maceração de milho, etc. Os meios sintéticos são muito utilizados em estudos de laboratório, uma vez que sua composição, bem definida, permite a reprodutibilidade, simplifica os balanços materiais e possibilita inferir a influência de cada componente do meio no resultado do cultivo microbiano. Os meios complexos são utilizados em processos comerciais, pois são mais baratos (Zabriskie, sem data).

A análise química elementar de células de bactérias resulta em composições do tipo $CH_aN_bO_c$. Alguns exemplos de composição elementar de bactérias são (Atkinson, 1991):

<i>Enterobacter aerogenes</i>	CH1,78N0,24O0,33
<i>Klebsiella aerogenes</i>	CH174N0,22O0,43
- bactéria genérica -	CH1,666N0,20O0,27
- outra bactéria genérica -	CH2N0,25O0,5

A composição de meios de cultura deve levar em consideração a composição elementar do microrganismo a ser cultivado e a sua capacidade de converter as substâncias químicas do meio de cultura em massa celular ou outros produtos desejados. O uso de um determinado nutriente em quantidade menor que a desejada vai provocar limitação da ação microbiana. Por outro lado, o uso deste nutriente, em quantidade maior que um determinado valor, vai provocar inibição desta ação.

Os valores de composição elementar apresentados na literatura privilegiam os macronutrientes (elementos que se apresentam em maior quantidade na composição celular) que são C, H, N e O, já que a composição química completa da célula é de difícil avaliação. No entanto, ao se formular um meio de cultura, outros macronutrientes (P e S), além dos micronutrientes, também devem ser adicionados. Os micronutrientes são: K, Na, Cl, Mg, Mo, Mn, Fe, Ca, Cu, Zn, Co, I, V, Ni, Cr, F, Se, Si, Sn, B e As (Lehninger, 1988).

Para o cultivo dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, os macronutrientes e principais micronutrientes são fornecidos como açúcares, polialcoois e por alguns dos seguintes sais: K_3HPO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $MgSO_4$, NaCl, $(NH_4)_2HPO_4$, $CaSO_4$, $Ca(NO_3)_2$, $CaCO_3$, $FeCl_3$, $MnSO_4$ e KNO_3 (Peppler, 1979; IPT, 1989; Balatti, 1992).

Quanto aos demais micronutrientes assume-se, em geral, que são necessários em quantidades tão ínfimas que sua presença na água de preparação dos meios de cultura, ou ainda como impurezas nos demais produtos químicos ou biológicos utilizados, é suficiente para suprir todas as necessidades da cultura. Esta hipótese é verdadeira para cultivos onde não se busca uma elevada concentração celular. No entanto, para cultivos onde se pretende atingir concentrações celulares elevadas (acima de 10^9 células por mililitro de meio de cultura), esta hipótese não é verdadeira. O meio de cultura, neste caso, deverá ser suplementado com uma solução de micronutrientes. Composições destas soluções serão apresentadas mais adiante.

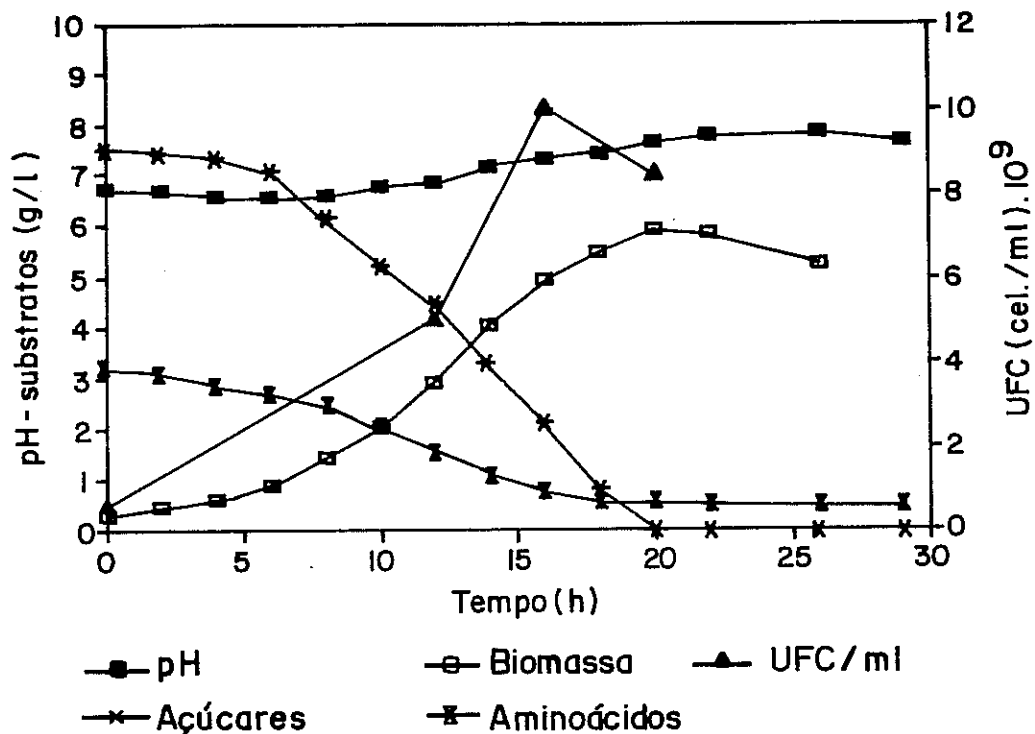


FIGURA 4.1. Comportamento típico do *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* SEMIA 4064 num cultivo em fermentador.

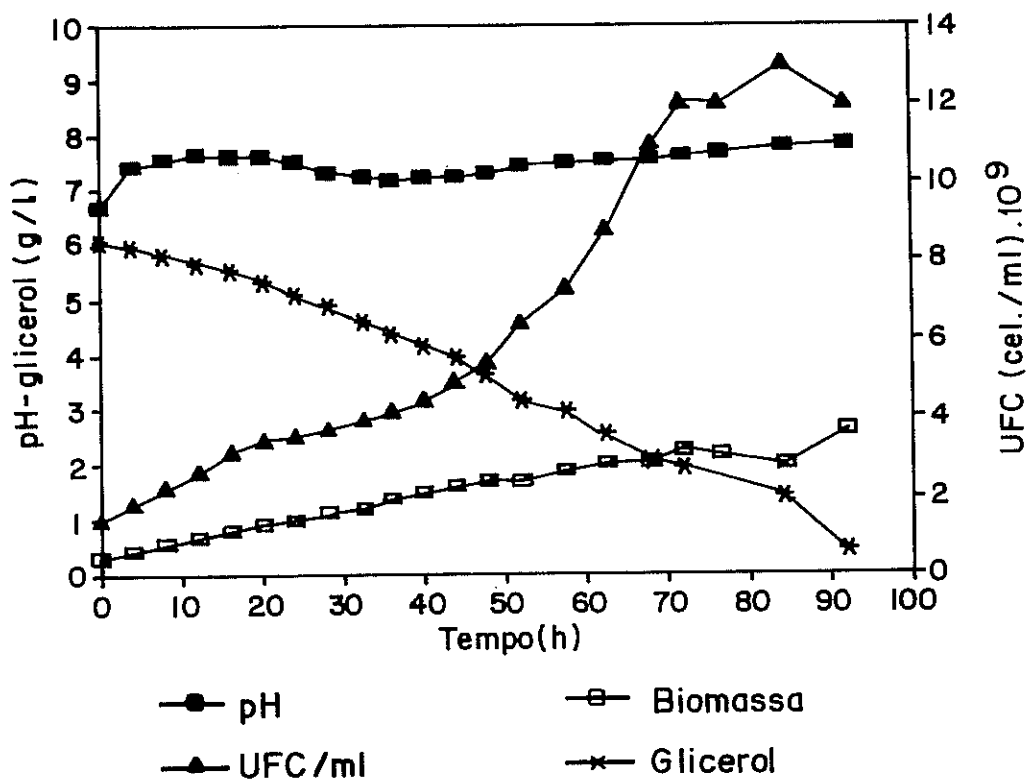


FIGURA 4.2. Comportamento típico do *B. japonicum* SEMIA 587 num cultivo em fermentador.

A formulação do meio de cultura deve prever, também, a adição de fatores de crescimento. Estes fatores são produtos como aminoácidos, vitaminas, ácidos orgânicos e outros, que a célula não consegue sintetizar devendo, portanto, ser suplementados ao meio de cultura. Podem ser adicionados ao meio como produtos puros (p. ex., ácido glutâmico, glutamato monossódico, biotina, vitamina B12, ácido fólico). Uma forma mais prática e mais barata de acrescentá-los é usar produtos extraídos de material biológico, como extrato de levedura, água de levedura, peptona, extrato de carne, água de maceração de milho, etc. A água de levedura é uma excelente fonte de fatores de crescimento, sendo relativamente barata (dependendo de um fornecedor de leveduras na região, como usinas de álcool, cervejarias, etc) e é de fácil preparação (apresentada mais adiante). Em alguns casos, o extrato ou a água de levedura podem não fornecer todos os fatores de crescimento necessários, exigindo o uso conjunto de outras fontes.

Os microrganismos têm diferentes capacidades de converter as substâncias químicas dos meios de cultura em biomassa ou outros produtos de interesse. Esta capacidade pode ser expressa numericamente como um rendimento de conversão. Por exemplo, *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* SEMIA 4064 apresenta um rendimento de conversão de sacarose em biomassa de 40% a 50% (Boiardi, 1983; Balatti, 1992; IPT, 1993a). *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 587 apresenta conversão de glicerol em biomassa de 40% a 60% (IPT, 1985; Balatti, 1992). Estes valores mostram que o aproveitamento dos nutrientes não é integral, ou seja, apenas uma parcela dos nutrientes é efetivamente transformada em biomassa ou produtos de interesse. Isso deve ser levado em conta no projeto do meio de cultura, a fim de se evitar limitações da ação microbiana por falta de nutrientes.

O último aspecto a ser considerado na formulação dos meios de cultura é a inibição que os nutrientes presentes em quantidade excessiva podem provocar na ação microbiana. A Figura 4.3 apresenta o comportamento do *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* SEMIA 4064 em um meio de cultura com concentração inicial da fonte de carbono (sacarose) de 18 g/L. O crescimento foi completamente inibido pela concentração elevada da sacarose (compare-se com o comportamento apresentado na Figura 4.1. onde não há inibição do crescimento).

4.1.3. Fontes de Carbono

As bactérias do gênero *Rhizobium* são capazes de utilizar uma ampla gama de produtos como fonte de carbono. A literatura cita cultivos com glicose, galactose, frutose, arabinose, xilose, ramnose, maltose, sacarose, lactose, trealose, rafinose, manitol, fumarato, malato, succinato, citrato e piruvato (Jordan, 1984).

De todos estes produtos, a sacarose é o de mais fácil obtenção e mais vantajoso economicamente. O rendimento da conversão de sacarose em células pelo *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* oscila entre 0,4 g e 0,5 g de células por grama de sacarose (Boiardi, 1983; Balatti, 1992; IPT, 1993a). Deve-se observar que, desta forma, 10 g/L de sacarose vão render, no máximo, 4 g a 5 g de células por litro de meio de cultura. Concentrações de sacarose maiores do que 12 g/L começam a provocar inibição do crescimento. Assim, se o objetivo é alcançar concentrações celulares superiores a 6 g/L, deve-se utilizar, na fermentação, o processo descontínuo-alimentado, com adição parcelada da sacarose.

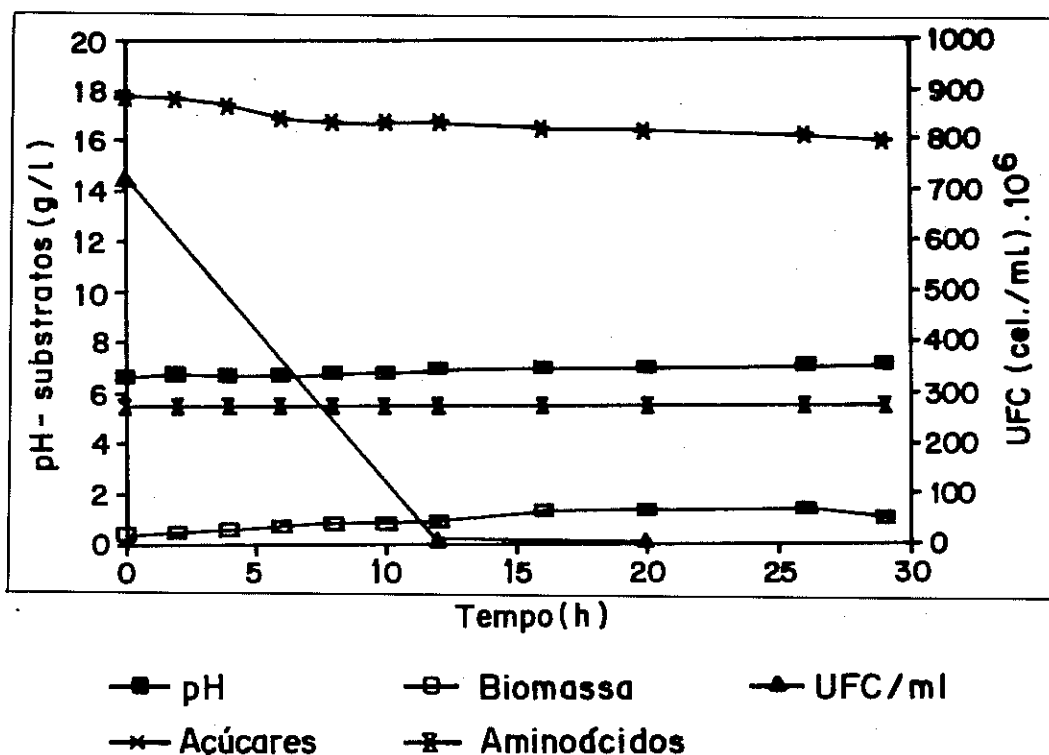


FIGURA 4.3. Comportamento do *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* SEMIA 4064 em um meio de cultura com concentração inicial da fonte de carbono (sacarose) de 18 g/L.

As bactérias do gênero *Bradyrhizobium* são capazes de metabolizar uma gama menor de fontes de carbono. A literatura cita a glicose, galactose, gluconato, glicerol, frutose, arabinose e manitol (Jordan, 1984). A fonte mais comumente utilizada é o glicerol.

A conversão deste substrato em biomassa está em torno de 0,4 g a 0,6 g de células por grama de glicerol (IPT, 1985; Balatti, 1992). Vale, aqui, a mesma observação feita para a conversão de sacarose em biomassa pelo *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*.

4.1.4. Fontes de Nitrogênio

As bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* são capazes de metabolizar fontes de nitrogênio inorgânicas e orgânicas. Assim, o nitrogênio pode ser fornecido na forma de sais de amônio, nitratos e aminoácidos. O gênero *Rhizobium* metaboliza, também, os nitritos (Jordan, 1984).

O nitrogênio é o segundo macronutriente em importância. O primeiro é o carbono e, em geral, a fonte de carbono fornece também oxigênio e hidrogênio. Na ausência de nitrogênio e presença de carbono, o metabolismo destas bactérias é alterado. As células cessam sua reprodução, mas seguem metabolizando o carbono e formando produtos de reserva interna em grande quantidade (por exemplo, os poli- β -hidroxibutiratos). Os polissacarídeos extracelulares também podem ter parte de sua produção vinculada a este mecanismo². O correto balanceamento do nitrogênio disponível é fundamental para o alcance de altas concentrações celulares no meio.

² Dados obtidos no IPT, ainda não completamente correlacionados.

As fontes inorgânicas de nitrogênio devem ser bem projetadas para evitar grandes alterações de pH, quando de seu consumo. Em geral, uma mescla de sais nitrogenados é empregada. As fontes orgânicas têm a vantagem de não provocarem grandes alterações no pH quando são consumidas. Estas fontes aportam, simultaneamente, carbono, hidrogênio e oxigênio ao meio de cultura. As principais fontes orgânicas de nitrogênio são: aminoácidos, uréia, extrato ou água de levedura, água de maceração de milho e outros subprodutos ou resíduos industriais orgânicos (Balatti, 1992).

4.1.5. Fatores de Crescimento

Por fatores de crescimento entendem-se produtos orgânicos como vitaminas, aminoácidos e outros, essenciais à nutrição celular e que a célula não sintetiza devendo, portanto, ser suplementados ao meio de cultura. A necessidade de suplementação destes produtos depende da célula que se está cultivando.

Os gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* necessitam, intensamente, desta suplementação, que pode ser obtida por intermédio da adição, ao meio de cultura, de quantidade adequada de extrato ou água de levedura.

A água de levedura pode ser preparada segundo Jordan (1984): 1) pesar 50 g de levedura seca (ou 150 g de levedura de panificação prensada, que tem teor de umidade de aproximadamente 70 %) para cada litro de meio de cultura a ser preparado; 2) misturar a levedura com um volume adequado de água. O volume de água não deve ser menor que 3,5 vezes a massa de levedura. Assim, para cada 50 g de levedura seca usar, no mínimo, 150 mL de água; 3) autoclavar a mistura por 1 hora a 121° C ou 17 horas a 60° C e deixar esfriar; 4) centrifugar a mistura a 9000 rpm por 30 min.; alternativamente, pode-se filtrar a mistura; e 5) tomar todo o sobrenadante da centrifugação (ou o filtrado) e utilizar na preparação do meio de cultura, adicionando a água restante, a fonte de carbono e os sais. A água de levedura preparada desta forma substitui cerca de 4 g/L de extrato de levedura seco ou cerca de 5 g/L de extrato de levedura em pasta.

Na Tabela 4.1 é apresentada uma composição da parte solúvel em água de um autolisado de leveduras (extrato de levedura).

4.1.6. Soluções de Micronutrientes

As soluções de micronutrientes visam suplementar os meios de cultura com metais que as células utilizam, principalmente, em seus sistemas enzimáticos. Os cultivos que não buscam concentrações celulares maiores que 10^9 células/mL de meio podem negligenciar este aspecto. No entanto, para concentrações celulares maiores do que 10^9 , recomenda-se a adição de alguma solução destes elementos.

TABELA 4.1. Composição de um autolisado de leveduras (Zabriskie, sem data).

ANÁLISE TÍPICA	(% em peso)	ANÁLISE TÍPICA	(% em peso)
Nitrogênio total	8,0	Cinzas	9,7
Proteína (N x 6,25)	50,0	Cl como NaCl	2,5
Umidade	3,0	pH em solução 5 %	5,8
VITAMINA	(µg/g)	VITAMINA	(µg/g)
Tiamina	50	Pantotenato	100
Riboflavina	35	Colina	2000
Niacina	550	Biotina	2
Piridoxina	25	Inositol	3000
AMINOÁCIDO	(% em peso)	AMINOÁCIDO	(% em peso)
Arginina	3,9	Fenilalanina	4,2
Lisina	6,3	Treonina	3,4
Triptofano	1,0	Leucina	6,3
Metionina	2,1	Isoleucina	4,4
Cistina	0,8	Valina	4,2
Histidina	2,4	ácido glutâmico	8,8
Tirosina	4,0	Glicina	5,3

A composição da solução de micronutrientes é função da composição elementar do microrganismo que se está cultivando. Como nem sempre se dispõe desta informação, utiliza-se uma solução que seja composta dos micronutrientes mais conhecidos. A seguir, são dadas quatro composições de soluções de micronutrientes formuladas para microrganismos diferentes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*. No entanto, estas soluções podem ser utilizadas para estas bactérias, por serem comuns a muitas espécies microbianas.

Solução de micronutrientes 1 (Zabriskie, sem data)

ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22 g
CaCl ₂	0,55 g
MnCl ₂	0,5 g
FeSO ₄	0,5 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,1 g
CuSO ₄	0,16 g
CoCl ₂	0,16 g

Modo de preparar - dissolver os sais em 1 litro de água destilada.

Modo de utilizar - acrescentar de 1 a 10 mL por litro de meio de cultura.

Solução de micronutrientes 2

H_3BO_3	0,3 g
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,2 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,03 g
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0,03 g
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	0,02 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,01 g

Modo de preparar - dissolver os sais em 1 litro de água destilada.

Modo de utilizar - acrescentar 1 mL por litro de meio de cultura.

Solução de micronutrientes 3 (Suzuki, 1985).

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,04 g/L
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,04 g/L
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,01 g/L
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,008 g/L
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01 g/L
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,005 g/L

Modo de utilizar - acrescentar os sais diretamente no meio de cultura.

Solução de micronutrientes 4 - para *R. leguminosarum* by. *phaseoli* (IPT, 1993b)

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,5 g/L
$ZnSO_4 \cdot H_2O$	0,025 g/L
$CoSO_4$	0,025 g/L
$Cu_2SO_4 \cdot 5H_2O$	0,025 g/L
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0,02 g/L

Modo de utilizar - acrescentar os sais diretamente no meio de cultura.

4.1.7. Meios de Cultura para *Bradyrhizobium japonicum*

4.1.7.1. Recuperação do liofilizado

Verificar meio de cultura e metodologia no capítulo 5.

4.1.7.2. Manutenção em meio líquido ou sólido (meio YM)

Verificar capítulo 2.

4.1.7.3. Meio para cultivo em fermentador

Meio para cultivo em fermentador de Lopreto (1972)

Glicerol	10,0 g/L
Extrato de levedura	4,0 g/L
K_2HPO_4	0,5 g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g/L
NaCl	0,1 g/L
KNO_3	0,8 g/L
$(NH_4)_2HPO_4$	0,3 g/L
$MnSO_4$ - solução a 10 %	2 gotas/L
$FeCl_3$ - solução a 10 %	2 gotas/L

Ajustar o pH para 6,8.

Recomenda-se acrescentar uma solução de micronutrientes.

4.1.8. Meios de Cultura para *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*

4.1.8.1. Recuperação do liofilizado e manutenção

Recomenda-se utilizar os mesmos meios já descritos para *B. japonicum*.

4.1.8.2. Meio para cultivo em fermentador

Meio para cultivo em fermentador (Boiardi, 1983; IPT, 1992)

Sacarose	10,0 g/L
Extrato de levedura	2,0 g/L
Glutamato monossódico	2,0 g/L
KH_2PO_4	0,6 g/L
K_2HPO_4	0,75 g/L
NaCl	0,1 g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g/L
$FeCl_2 \cdot 6H_2O$ - solução a 10 %	0,1 mL/L
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$ - solução a 10 %	0,1 mL /L

Ajustar o pH em 6,8.

Recomenda-se utilizar a solução de micronutrientes da seção 4.1.6.

4.1.9. Meios de Cultura Para Outros Rizóbios

A seguir, meios de cultura recomendados para outras espécies de rizóbios.

Meios de cultura para diversas espécies de rizóbios (Balatti, 1992)

	<i>Rhizobium meliloti</i>	<i>Rhizobium loti</i>	<i>Rhizobium trifolii</i>
K ₂ HPO ₄	0,50 g/L	0,50 g/L	0,50 g/L
KH ₂ PO ₄	0,50 g/L	0,50 g/L	0,50 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20 g/L	0,20 g/L	0,20 g/L
NaCl	0,10 g/L	0,10 g/L	0,10 g/L
KNO ₃	0,80 g/L	1,00 g/L	0,80 g/L
MnSO ₄ .4H ₂ O sol.10%	0,06 g/L	0,06 g/L	0,06 g/L
FeCl ₃ .6H ₂ O sol.10%	0,06 g/L	0,06 g/L	0,06 g/L
Extrato de levedura	4,00 g/L	4,00 g/L	4,00 g/L
Sacarose	10,0 g/L	10,00 g/L	10,00 g/L
pH	6,8	6,8	6,8

4.2. Medidas de Crescimento**4.2.1. Em Meio Líquido**

Algumas maneiras de se avaliar o crescimento em meio líquido são detalhadas a seguir. As primeiras metodologias descritas medem células totais e a última mede as células viáveis. No caso de crescimento de rizóbios é muito importante a utilização de medida de células viáveis, já que o produto são as próprias células.

4.2.1.1. Contagem em câmara de Petroff-Hausser

Diversos são os cuidados para a utilização desta lâmina calibrada. Tal metodologia é bem descrita em vários manuais (Gerhardt, 1981; Somasegaran & Hoben, 1985). Seguem, aqui, alguns aspectos fundamentais para o sucesso deste método:- A câmara e a lamínula devem ser bem lavadas em detergente neutro, enxaguadas diversas vezes em água destilada e secas em local livre de pó, ou numa estufa. Este procedimento assegurará que o líquido se espalhe uniformemente e impedirá a formação de bolhas de ar no momento da contagem.

- a cultura deverá ser diluída várias vezes, até se determinar qual será a diluição a ser empregada durante os ensaios, em cada fase de crescimento. Após cada diluição, deve-se novamente lavar a câmara para o uso posterior;
- a diluição da cultura é adicionada com auxílio de uma pipeta Pasteur ou micropipeta, de modo que a pipeta somente encoste na câmara e o líquido desça por capilaridade e não ocorra extravasamento. Caso aconteça da câmara ficar com excesso de cultura não enxugar com papel de filtro. A lamínula deve ser retirada e, junto com a câmara, novamente lavada, seca e inicia-se novamente o preenchimento de forma adequada;

- esta câmara deve ser observada no aumento de 40X, num microscópio de contraste de fase e o número de células contado. A importância do uso do contraste de fase, para tal observação, está no fato que as células muito pequenas, não coradas, sofrem um efeito de iluminação, aumentando visualmente seu tamanho.

Neste método, são contadas bactérias vivas e mortas e, ao contrário das leveduras e células animais, não se conhece nenhum corante capaz de penetrar somente em células mortas de modo a diferenciá-las das vivas. O método apresenta bons resultados nas medidas da fase logarítmica de crescimento, onde poucas são as células mortas. A vantagem deste método é a rapidez com que se obtêm os resultados. É adequado somente a meios líquidos, sem partículas. Necessita de que as pessoas sejam meticolosas e treinadas para que se obtenham resultados reproduzíveis e de forma rápida.

4.2.1.2. Estimativa da concentração celular por transmitância

A densidade óptica de uma suspensão bacteriana é, geralmente, correlacionada com o número de células presentes. Assim, medidas de transmitância desta suspensão, ou de suas diluições, podem ser um modo conveniente de estimar o número de células, ao longo de cultivos, uma vez que o método é simples, rápido e não requer condições de assepsia. As amostras, retiradas ao longo de um cultivo, são previamente centrifugadas, diluídas em água e as transmitâncias lidas em comprimento de onda de 540 nm. Este método também tem limitações, sendo adequado para meios de cultura sem partículas, culturas em fase logarítmica de crescimento e para linhagens que não apresentem grande formação de exopolissacarídeos.

4.2.1.3. Determinação de células viáveis - unidades formadoras de colônias (UFC)

Este método consiste em semear diferentes diluições da cultura na superfície do meio de cultivo sólido, até que se obtenha uma contagem de colônias dispersas, isoladas. Embora rotineiramente empregado em microbiologia, é um método que pode apresentar resultados variáveis. Alguns problemas são intrínsecos ao método e de difícil solução, enquanto outros podem ser contornados através da melhora na técnica de execução. Os principais problemas e as possíveis soluções são comentados a seguir.

Formação de grumos

Devido à existência de polissacarídeos externos nas células de rizóbios, estas tendem a se agrupar. Para algumas espécies, isto pode ser contornado utilizando-se, como diluente, solução salina a 0,85% com adição de 0,5% de Tween 80, além de uma agitação vigorosa. Testes preliminares para verificar morte celular causada por este procedimento devem ser realizados. A formação de grumos é ao acaso e, quanto mais a espécie bacteriana produzir exopolissacarídeos, maior será a dificuldade da dissolução destes agrupamentos de células.

Tempo de aparecimento das colônias

Este é um aspecto crítico, pois exige detecção precoce das colônias, evitando que as mesmas se unam, e que o número de colônias contadas reflita os valores corretos. Isto pode ser contornado com o auxílio de um microscópio estereoscópico, que permite uma ampliação do material a ser enumerado.

Forma de plaqueamento

As principais formas de plaqueamento estão descritas no capítulo 1. Há equipamentos, no mercado, automatizados ou semi-automatizados, que reduzem muito os erros decorrentes da manipulação e contagem manuais como, por exemplo, o plaqueador espiral.

4.2.1.4. Determinação da massa celular

Esta é uma determinação gravimétrica do peso (massa) seco (a) de células contidas em um volume de cultura conhecido, expressando-se os resultados em gramas de células secas por litro de meio de cultivo. Para isso o volume de cultura deve ser filtrado através de membrana tipo Millipore, de peso conhecido, capaz de reter as células. As células, em conjunto com a membrana, devem ser secas, a 100° C até peso constante.

Uma das principais restrições a este método é o custo, bem como a impossibilidade de diferenciar a presença de contaminantes. Deve, portanto, ser empregado sempre associado a algum outro método que faça esta detecção, como a determinação de UFC/mL.

Em diversos laboratórios, porém, tem-se determinado a massa celular pela pré-pesagem de um recipiente (balança com 0,0001 g de precisão) colocando-se, então, de 1 mL a 10 mL da cultura. Após a secagem por 72 h a 60° C, pesar e calcular a massa de células pela diferença entre o peso final e o peso inicial.

4.2.2. Em Meio Sólido

Avaliação de células de rizóbios em veículos sólidos, como a turfa, é feita através da determinação do número de UFC por grama de produto. Deve-se, de acordo com as condições de cada laboratório, estabelecer a quantidade de turfa que, inicialmente será amostrada de cada pacote de inoculante, sendo que a amostragem mínima é de cinco gramas (Somasegaran & Hoben, 1985). Em nossos laboratórios, em escala experimental, em ensaios de viabilidade em turfas, o conteúdo total de cada embalagem de inoculante (estabelecido ser de 50 g) foi vertido, com o auxílio de um funil de papel de alumínio esterilizado, em um erlenmeyer contendo 250 mL de meio YMB ou solução salina com Tween. Os erlenmeyers são, então, agitados a 150 rpm, a 30° C, por uma hora, em agitador. Após este período, espera-se que a turfa sedimente e é tomado um volume do sobrenadante, que será diluído e o número de UFC determinado.

4.3. Cinética de Crescimento

4.3.1. Fases de Crescimento

Quando se transfere uma população bacteriana (inóculo) para um meio de cultura provido de fontes de carbono, nitrogênio, fósforo e fatores de crescimento, à temperatura, nível de O_2 dissolvido e pH adequados, essa população microbiana passa a consumir aqueles substratos e a se reproduzir aumentando, com o tempo, a sua concentração, isto é, o número de células por unidade de volume do meio de cultura.

A evolução dessa população microbiana é tipicamente representada pela Figura 4.4.

Durante a vigência da fase *lag*, a velocidade de reprodução celular é praticamente nula e nenhum aumento no número de células é evidente. De uma maneira geral, a duração dessa fase depende da mudança da composição do meio de cultura quando se faz a transferência da população microbiana, do tamanho e da idade do inóculo.

Quando da transferência do inóculo, mudanças significativas de meio de cultura forem impostas, por exemplo, cultura primária possuía glicose como fonte de carbono e é inoculada em um meio de cultura que utiliza sacarose, pode ocorrer um intervalo de tempo onde a velocidade de divisão celular é nula. Durante esse período, as células estarão se adaptando ao seu novo ambiente e sintetizando as novas enzimas necessárias para o consumo desse novo nutriente. Somente após esse período é que as células estarão aptas a se desenvolver plenamente no novo meio de cultura. Para a minimização desse problema é prática usual utilizar-se de meios de cultura de produção e do inóculo os mais semelhantes possíveis.

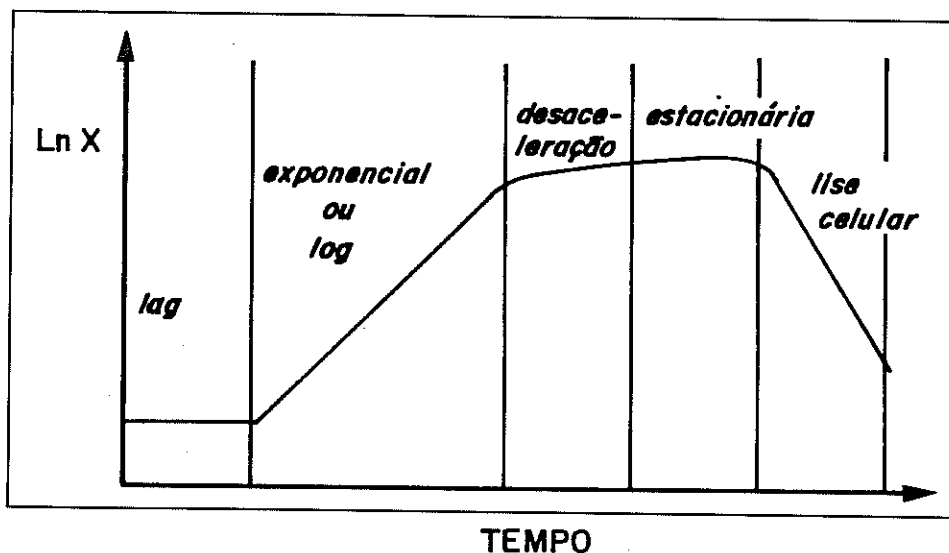


FIGURA 4.4. Curva de crescimento típica de um cultivo de microrganismo.

Muitas enzimas intracelulares necessitam, para sua ativação, de moléculas (vitaminas, cofatores e ions) que possuem uma apreciável permeabilidade através da membrana celular. Dessa maneira, a transferência de um pequeno volume de inóculo para um grande volume de meio de cultura pode ocasionar uma perda dessas espécies através de difusão, causando uma fase *lag*, até que as células microbianas consigam regenerar essas substâncias. Deve-se salientar que, se essas substâncias perdidas forem essenciais e não houver sua suplementação através do meio de cultura, a atividade celular pode ficar irreversivelmente comprometida. A Figura 4.5 é ilustrativa da influência desse fator na evolução do crescimento de uma população de *Rhizobium phaseoli* (Boiardi, 1983).

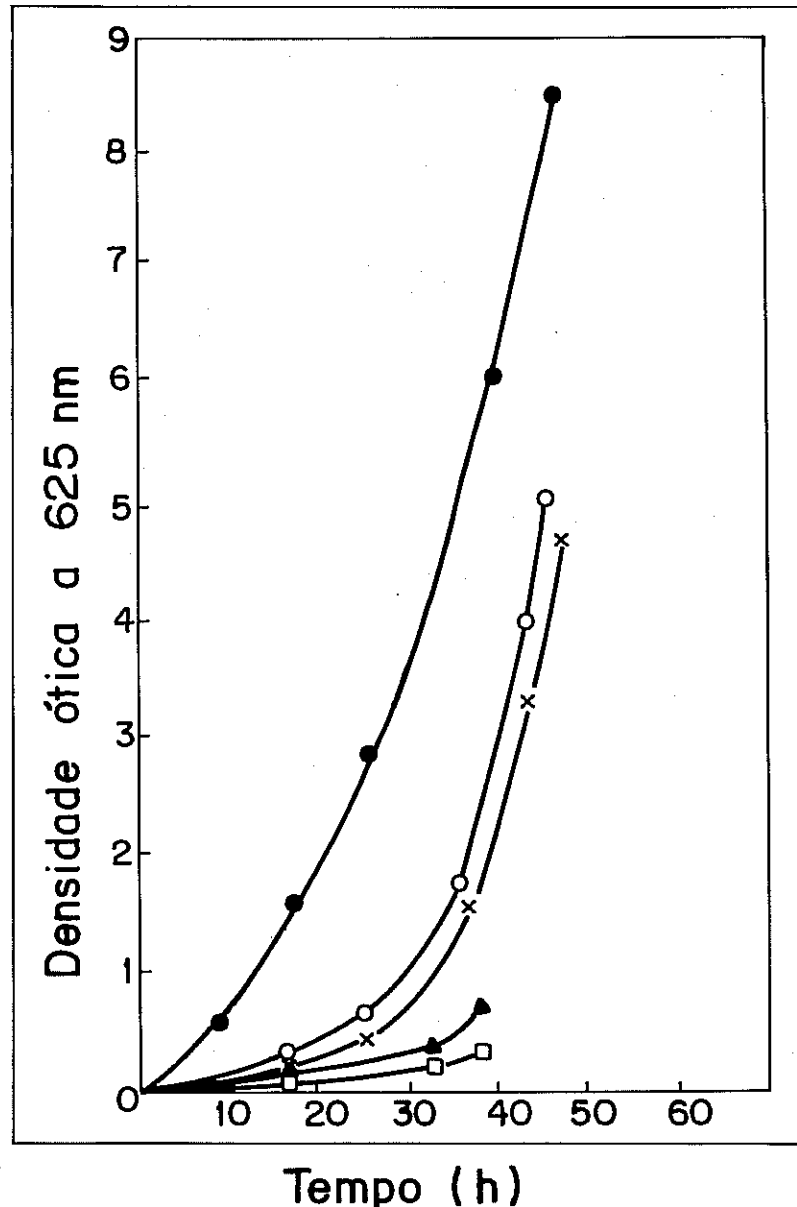


FIGURA 4.5. Influência de X_0 sobre crescimento de *Rhizobium phaseoli*: \square 10^4 cel./mL; Δ 10^5 cel./mL; \times 10^6 cel./mL; \circ 10^7 cel./mL; \bullet 10^8 cel./mL (Boiardi, 1983).

É evidente que concentração celular inicial (X_0) menor que 1.10^8 células/mL implica no surgimento de uma prolongada e indesejável fase lag. Para cultivos de *Bradyrhizobium japonicum* foi observado, em nosso laboratório, que uma fração de inóculo de até 5,0 % (volume inóculo/volume total), X_0 de cerca de 5.10^8 células/mL, não provocou um aparecimento sensível de fase lag, embora tenha sido nossa prática a utilização de fração de inóculo igual a 10 %, isto é, X_0 igual a 1.10^9 céls./mL.

Com relação à idade da população que é transferida para o meio de cultura, embora a literatura registre importante influência no crescimento microbiano que irá se processar (Bailey, 1977), a prática de se utilizar inóculo que provém de um crescimento celular que se encontra da metade para o final de sua fase exponencial (ou fase *log*) de crescimento, tem-se mostrado correta em nosso laboratório, uma vez que não temos tido registro de ocorrência de expressivas fases *lag* decorrente desse protocolo.

A fase exponencial ou fase *log* de crescimento celular se dá quando a população microbiana está bem adaptada às suas condições ambientais, não existindo limitação de qualquer nutriente no meio de cultura. Nessas circunstâncias, a população celular dobra regularmente a um determinado intervalo de tempo constante, denominado tempo de geração, t_g .

Durante essa fase a concentração da população microbiana (X) varia com o tempo segundo a equação:

$$X = X_0 \exp(\mu t) \quad (4.1)$$

A derivada dessa equação, em relação ao tempo, produz a equação:

$$dX / dt = \mu X \quad (4.2)$$

A constante é a velocidade específica de crescimento celular e está relacionada com t_g segundo a equação:

$$t_g = \ln 2 / \mu \quad (4.3)$$

A velocidade específica de crescimento celular é uma característica da população microbiana e seu valor, constante durante a fase exponencial de crescimento, varia segundo o microrganismo que está sendo cultivado e as condições ambientais do cultivo : temperatura, pH e concentração de nutrientes presentes no meio de cultura (inclusive concentração de O_2 dissolvido). Nas seções 4.3.2 e 4.3.3 trataremos, com mais detalhes, da influência desses fatores.

A Tabela 4.2 apresenta alguns valores típicos de μ e t_g para fase exponencial de crescimento de rizóbio. Como pode se verificar há uma grande diferença de valores de t_g para cada microrganismo, encontrando-se variações entre gêneros e mesmo para um a mesma espécie de microrganismo.

À medida que o crescimento evolui, os substratos são consumidos e os metabólitos se acumulam no meio de cultura. Há um determinado instante do processo em que se verifica a limitação de algum nutriente do meio de cultura ou o acúmulo de algum metabólito inibidor, a uma concentração deletéria para o crescimento celular (ou ambos os eventos). Nesse instante, a população microbiana cessa de crescer a uma razão exponencial e os microrganismos apresentam velocidade específica de crescimento decrescente com o tempo, na fase de *desaceleração*, e igual a zero, na fase *estacionária*. Nessa última, a população atinge a sua máxima concentração, X_p , naquelas determinadas condições ambientais de cultivo.

TABELA 4.2. Valores típicos de μ e t_p para cultivo de rizóbio.

Microrganismo	Meio de Cultura (g/L)	t_p (h)/ μ .(h)	Referência
<i>B. japonicum</i> SEMIA 587	glicerol, 10; água de levedura, 50; SM1	11,2/0,062	Pradella(1994)
<i>B. japonicum</i> SEMIA 5019	glicerol, 10; água de levedura, 50; SM1	14,4/0,048	IPT (dados não publicado)
<i>B. japonicum</i> E - 45	glicerol, 10; extrato de levedura, 4; SM1	8,6/0,08	Balatti (1978)
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> SEMIA 4064	sacarose, 10; extrato de levedura, 2; glutamato de sódio, 2; SM2	3,0/0,23	IPT (1993a)
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> F - 45	sacarose, 10; extrato de levedura, 2; peptona, 2; SM2	6,4/0,108	Boiardi (1983)

SM1 e SM2 são os componentes minerais dos meios de cultura descritos, respectivamente, nas seções 4.1.7.3 e 4.1.8.2.

Do ponto de vista de produção de biomassa microbiana, como é o caso do cultivo de rizóbio, convém definir, adicionalmente, alguns parâmetros do processo.

A produtividade, em biomassa, de um sistema P_x , é dada pela equação:

$$P_x = (X_f - X_0) / t_f \quad (4.4)$$

onde t_f é o tempo de processo para a população aumentar sua concentração de X_0 até sua concentração máxima, X_f . A produtividade em biomassa é expressa, mais comumente, em número de células /mL de meio de cultura x hora ou como g de biomassa seca /L de meio de cultura x hora, unidades essas que são abreviadas, respectivamente, por nº céls. /mL.h e g/L.h.

O fator de conversão de substrato a biomassa, $Y_{x/s}$, é dado, genericamente, pela equação:

$$Y_{x/s} = X / S \quad (4.5)$$

Esse fator é a relação da quantidade de biomassa formada com a quantidade de um substrato genérico S do meio de cultura consumido para produzir aquela biomassa. O fator $Y_{x/s}$ é expresso normalmente em g de biomassa formada/g de substrato consumido ou por número de células formadas/g de substrato consumido.

4.3.2. Influência da Agitação e da Aeração

As bactérias do gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* são microrganismos aeróbios estritos necessitando, portanto, de oxigênio dissolvido no meio de cultura para sua multiplicação celular. Na produção massal de rizóbio esse fator é decisivo e uma transferência adequada de O_2 para o meio de cultura deve ser, criteriosamente, projetada, uma vez que, em escala industrial, normalmente se opera com volumes de fermentação da ordem de 100 L a 2.000 litros.

A literatura apresenta uma razoável quantidade de informações referentes à influência das condições de aeração e agitação em cultivos de microrganismos desses gêneros.

A Tabela 4.3 apresenta alguns exemplos de condições de velocidade de transferência de O_2 dissolvido para o meio de fermentação ($V.T.O_2$) e do coeficiente volumétrico de transferência de O_2 (kla) e respectivos resultados obtidos em termos de concentração máxima celular (X_r) e produtividade em células (P_x).

Os valores de $V.T.O_2$ e de kla, aqui relacionados, podem ser utilizados como uma primeira aproximação para o projeto de fermentadores no sentido de se determinar os níveis de agitação e aeração dos equipamentos. Literatura especializada deve ser consultada para realização do projeto de fermentadores (Bailey, 1977; Kossen, 1985).

TABELA 4.3. Valores de velocidade de transferência de O_2 dissolvido e resultados obtidos para cultivo de rizóbio.

Microrganismo	$V.T.O_2$ (mL O_2 /L.h)	kla ¹ (/h)	X_r (céls./mL)	X_r (g/L)	P_x (g/L.h)	Referência
<i>B. japonicum</i> E-45	94,7	18,9	$3,0 \cdot 10^{10}$	4,0	0,04 ²	Lopreto (1973)
<i>B. japonicum</i> SEMIA 5019	233	46,6	$2,3 \cdot 10^{10}$	4,7	0,07	Balatti (1987)
<i>B. japonicum</i> SEMIA 587	n.d.	35 ³	$1,5 \cdot 10^{10}$	3,2	0,03	Bonomi (1987)
<i>R. phaseoli</i> F-10	402	80,4	$1,5 \cdot 10^{10}$	4,4	n.d.	Balatti (1987)
<i>R. phaseoli</i> F-45	410	82,0	$1,2 \cdot 10^{10}$	4,0 ¹	0,13 ²	Boiardi (1983)

¹Valores calculados segundo a expressão $kla = VTO_2 / C^*$, onde $C^* = 5$ mL O_2 /L. de meio.

²Valores estimados utilizando-se os dados dos autores.

³Valor medido segundo o método dinâmico (Ruchti, 1981).

No projeto de fermentadores para cultivo de rizóbio, precauções adicionais devem ser tomadas, principalmente no que tange à elevação de pH do meio de fermentação por conta dos níveis excessivamente elevados de aeração, os quais contribuem para a diminuição da velocidade específica de crescimento celular, como o verificado por Lopreto (1973) e Bonomi (1987).

4.3.3. Influência do pH e da Temperatura

A influência do pH no cultivo de rizóbio ainda não está totalmente estabelecida. Balatti (1992) aponta que, dependendo das linhagens pertencentes aos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, o intervalo de desenvolvimento das culturas pode se dar entre pH 5,5 a 7,5. Segundo Vincent (1975), citado em Balatti (1992), a tolerância à acidez decresce na ordem: *R. lupini*, *B. japonicum*, *R. leguminosarum*, *R. phaseoli* e *R. meliloti*, enquanto que se verifica comportamento inverso com relação aos meios alcalinos. Embora não muito estudada, a influência desse parâmetro de cultivo pode ser sensível para o crescimento celular. Alguns exemplos da literatura ilustram bem essa situação.

Boiardi (1983) encontrou forte influência do pH inicial do meio de cultura no cultivo de *R. phaseoli*. A um pH inicial de 7,0 observou-se uma fase *lag* de nove horas de duração, ao passo que em pH inicial de 6,5, essa fase foi reduzida a um tempo mínimo de duas horas. Abaixo de 6,5, o crescimento também exibiu longas fases *lag*.

Mazza (1985), citado por Balatti (1992), descreveu a influência do pH inicial do meio de cultura no crescimento para duas linhagens de *R. meliloti*. Ambas as linhagens tiveram crescimento ótimo a pH inicial de 6,5, com tendência a alcalinizar o meio até pH em torno de 7,0. Em pH inicial de 7,5, o crescimento era, sensivelmente, inferior. Em pH inicial de 6,0, o crescimento era cerca de 1/4 do valor ótimo e, em 5,75, praticamente nulo.

De maneira geral, o que se faz é dimensionar meios de cultura com componentes que não afetem, demasiadamente, a evolução do pH ao longo do cultivo, procurando-se manter esse valor próximo da neutralidade. É comum, por exemplo, a utilização do tamponamento do meio de cultura com o par fosfato monoácido e diácido de potássio. Alternativa a esse procedimento é a utilização de fermentadores munidos de controle automático de pH, prática largamente empregada na indústria de fermentação (Bailey, 1977).

A influência da temperatura no crescimento de rizóbio tem sido largamente estudada. A temperatura ótima para o crescimento celular de rizóbio se situa no intervalo de 28° a 30° C (Balatti, 1992).

Na Tabela 4.4 (Frankenberg, 1990) é ilustrada, com muita propriedade, a influência da temperatura no desenvolvimento de *B. japonicum* SEMIA 587. É muito claro, então, que os principais parâmetros de cultivo desse microrganismo possuem o valor ótimo no intervalo compreendido entre 28° e 30° C. Fora deste intervalo, μ , X_f e P_x decrescem significativamente.

TABELA 4.4. Influência da temperatura no crescimento de *B. japonicum* SEMIA 587.

Temperatura (° C)	μ , fase exponencial (/h)	X_r (log nº céls./mL)	P_x (nº céls./mL.h)
26	0,0528	10,08	1,33.10 ⁸
28	0,0903	10,61	4,75.10 ⁸
30	0,0858	10,60	4,64.10 ⁸
34	0,0629	10,41	2,41.10 ⁸

Do ponto de vista industrial, equipamentos (estufas, agitadores rotativos e fermentadores) devem ser dotados de controle automático de temperatura para possibilitar a manutenção da temperatura do cultivo em seu valor ótimo.

4.3.4. Influência de Componentes do Meio de Cultura

Como já exposto anteriormente, a composição do meio de cultura é fundamental no crescimento dos microrganismos. Seu correto balanceamento, em termos de fontes de carbono, nitrogênio, fósforo e componentes menores como vitaminas e cofatores, é um dos fatores decisivos no projeto de uma planta de produção de biomassa de rizóbio em larga escala.

Fatores importantes que devem ser levados em consideração na determinação do meio de cultura são o custo e a disponibilidade das matérias primas, a facilidade de manuseio, transporte e esterilização e o nível de sua padronização.

Dentre os componentes do meio de cultura, os que provavelmente exercem maior nível de influência na produtividade e na população máxima do processo são o tipo e a concentração das fontes de carbono e nitrogênio orgânico. Não é nossa intenção fazer, aqui, uma revisão sobre esse tema e, a título de ilustração, faremos algumas considerações que julgamos ser adequadas.

Ertola (1969), Balatti (1978) e Boiardi (1983) estudaram a influência do tipo de fontes de carbono no crescimento de vários rizóbios; a Tabela 4.5 resume as observações desses autores.

TABELA 4.5. Fontes de C para cultivo de rizóbio.

Microrganismo	Fontes de C estudadas	Fontes de C de escolha
<i>R. meliloti</i>	sacarose, glicose, glicerol, manitol	sacarose, 10 g/L
<i>B. japonicum</i>	sacarose, galactose, glicose, manitol, glicerol	glicerol, 10 g/L
<i>R. l. bv. phaseoli</i>	sacarose, galactose, lactose, glicose, manitol, glicerol	sacarose, 10g/L

Embora os rizóbios possam utilizar-se de uma gama relativamente extensa de fontes de carbono para seu crescimento, é fundamental, na sua produção massal, o emprego das fontes de C que conduzam aos maiores valores de P_x e X_r .

Com relação à fonte de nitrogênio orgânico, várias observações têm sido feitas que dão conta da importância desse componente do meio de cultura no crescimento de rizóbio. Como já apontado anteriormente, o N orgânico é fornecido ao meio de cultura através dos diversos tipos comerciais de hidrolisados de proteínas (peptonas), extratos de levedura ou mesmo como aminoácidos livres. Algumas dessas fontes comerciais são carreadoras não somente de nitrogênio, mas também de vitaminas e cofatores, como é o caso dos extratos de levedura (Zabriskie, sem data). Além disso, aparentemente, o esqueleto carbônico dessas fontes de N orgânico pode também ser consumido para a síntese de material celular (Pradella, 1994).

As Figuras 4.6 e 4.7 são exemplos típicos da influência da concentração de N orgânico no cultivo em fermentador de *B. japonicum* SEMIA 587 e *B. japonicum* SEMIA 5019 (IPT, dados não publicados). É evidente o efeito da concentração da água de levedura, presente no meio de cultura, no crescimento de ambas as linhagens.

Concentrações celulares acima de $2,0 \cdot 10^{10}$ células/mL são obtidas em cerca de 70 h de fermentação quando a concentração de água de levedura é de 50 g/L de meio de cultura, praticamente o mesmo valor quando se emprega no meio de cultura extrato de levedura Difco a 4 g/L.

É importante afirmar que não existe um meio de cultura único que maximize a formação de biomassa de todas as linhagens de rizóbio. No desenvolvimento de um processo que objetiva a produção massal desse microrganismo, deve-se sempre ter em mente a necessidade de haver um extenso trabalho experimental a nível de laboratório, para definição do meio de cultura mais adequado àquela determinada linhagem de rizóbio que se quer utilizar na fabricação de um inoculante.

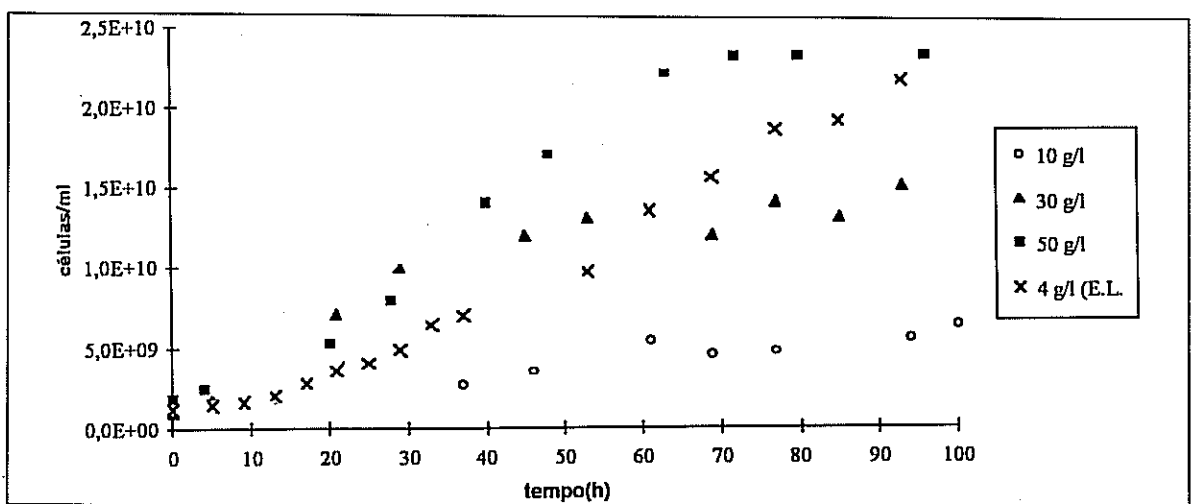


FIGURA 4.6. Influência da concentração de água de levedura no cultivo de *B. japonicum* SEMIA 587.

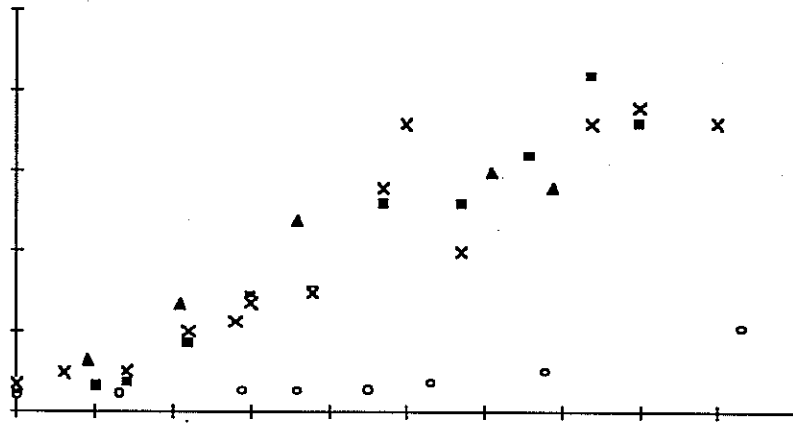


FIGURA 4.7. Influência da concentração de água de levedura no cultivo de *B. japonicum* SEMIA 5019.

4.4. Produção de Biomassa

De acordo com a forma de condução do processo de produção de biomassa microbiana ela pode ser classificada da seguinte maneira:

- cultivo descontínuo;
- cultivo descontínuo alimentado;
- cultivo contínuo.

A seguir, são destacadas as principais características de cada um desses processos, principalmente no que se refere à produção de biomassa de rizóbio.

4.4.1. Cultivo Descontínuo

As indústrias de inoculantes comumente utilizam o cultivo descontínuo (também denominado de "batch") para obtenção da suspensão celular de rizóbio que, posteriormente, será veiculada.

O cultivo descontínuo é realizado em garrações com volume de 10 L a 20 litros, munidos de aeradores em profundidade e colocados dentro de estufas especiais para manutenção da temperatura, ou é processado em fermentadores, agitados e aerados, com volume útil que pode variar de 100 L a 2000 litros.

O primeiro tipo de equipamento pode ser utilizado quando se necessita de produção de pequenas quantidades de inoculantes para finalidade de testes em campo ou para culturas que ocupem pequenas áreas de plantio.

Nesse tipo de frasco, é notória a deficiência de transferência de oxigênio para o meio de cultura, devido à má aeração e/ou agitação. Além disso, as células dos rizóbios decantam, formando uma camada no fundo do garrafão, tendo dificultado seu acesso a todos os nutrientes dissolvidos no meio de cultura. Estes são os principais motivos que levam às baixas produtividades obtidas, que oscilam entre 10^8 e 10^9 células por mL de meio. Uma maneira de melhorar a produtividade é fazer uma maior e melhor distribuição do ar injetado no garrafão e agitar o conteúdo do mesmo através de agitadores magnéticos.

A Figura 4.8 apresenta os resultados de um cultivo em garrafão de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*.

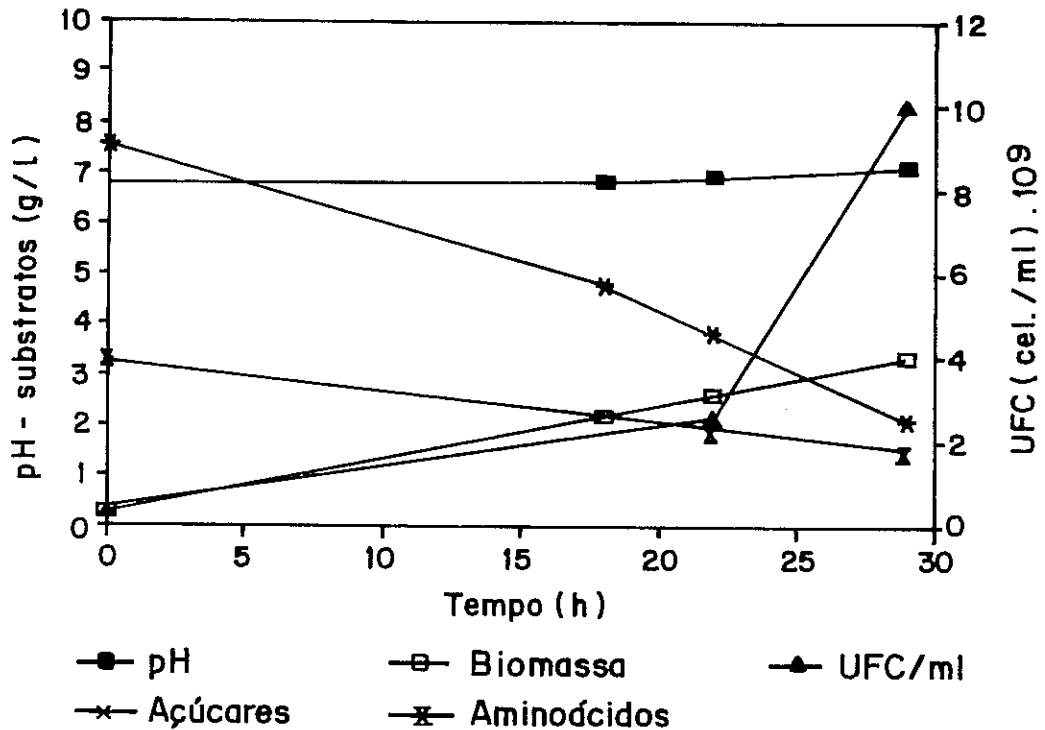


FIGURA 4.8. Resultados de um cultivo em garrafão de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* SEMIA 4064.

O meio de cultura empregado foi o citado na seção 4.1.8.2, diminuindo-se a concentração de sacarose para 7,5 g/L. Não se acrescentou a solução de micronutrientes. O ar foi injetado através de um pequeno cilindro de aço sinterizado, que promovia a formação de um grande número de pequenas bolhas, semelhante ao que ocorre com os conhecidos aeradores de aquário. O garrafão foi colocado sobre um agitador magnético e agitado na maior velocidade possível, a qual não foi mensurada. O experimento foi realizado no verão, em temperatura ambiente (aproximadamente 28° C). Pode-se notar que atingiu-se 10¹⁰ células por mL de meio em 29 horas de experimento.

A Figura 4.9 apresenta os resultados de um cultivo em garrafão de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 587. O balão continha 10 litros do meio recomendado na seção 4.1.7.3. A aeração foi de 1 vvm (1 litro de ar por litro de meio por minuto, ou seja, 10 litros de ar por minuto). Atinge-se uma biomassa de 2,7 g/L e cerca de 9.10⁹ células por mL de meio.

Grandes extensões agrícolas, como a cultura de soja, demandam, entretanto, volumes de produção consideráveis de inoculantes. Nesse caso, a opção mais conveniente é o uso de fermentadores de 100 L a 2.000 litros de volume útil. Mesmo assim, os balões aerados são muito úteis para confecção de inóculos para fermentadores de 100 L a 200 litros de volume útil.

A Figura 4.10 é um exemplo típico de fluxograma de uma planta industrial para produção descontínua de biomassa de *B. japonicum*, a ser utilizada em inoculante para soja.

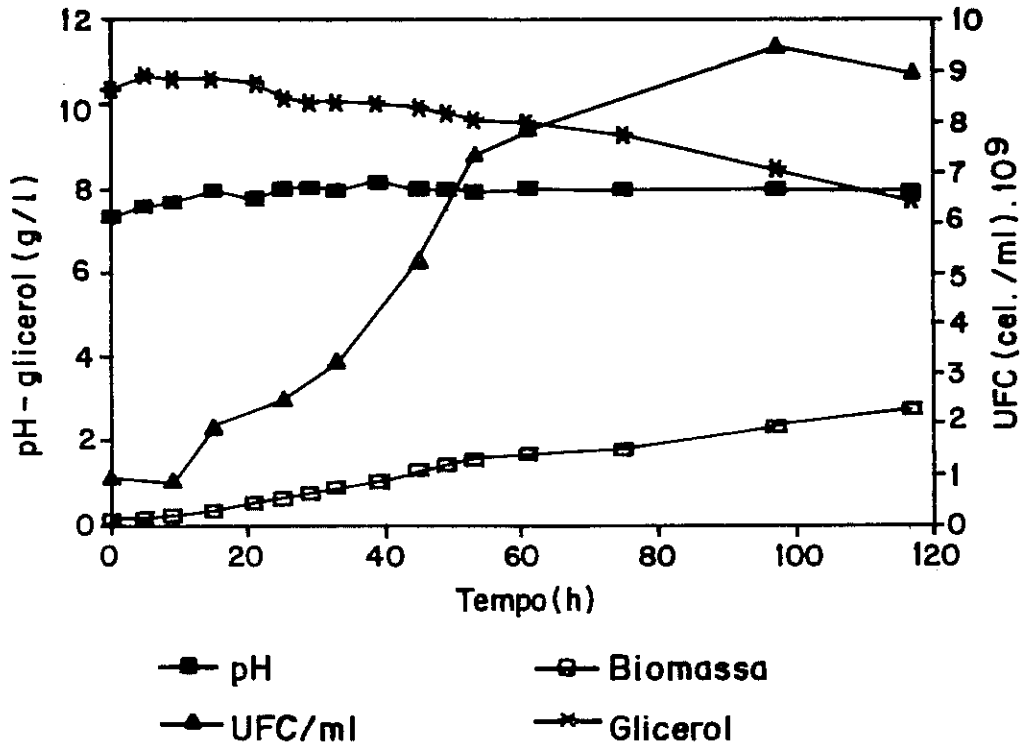


FIGURA 4.9. Resultados de um cultivo em garrafão de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 587.

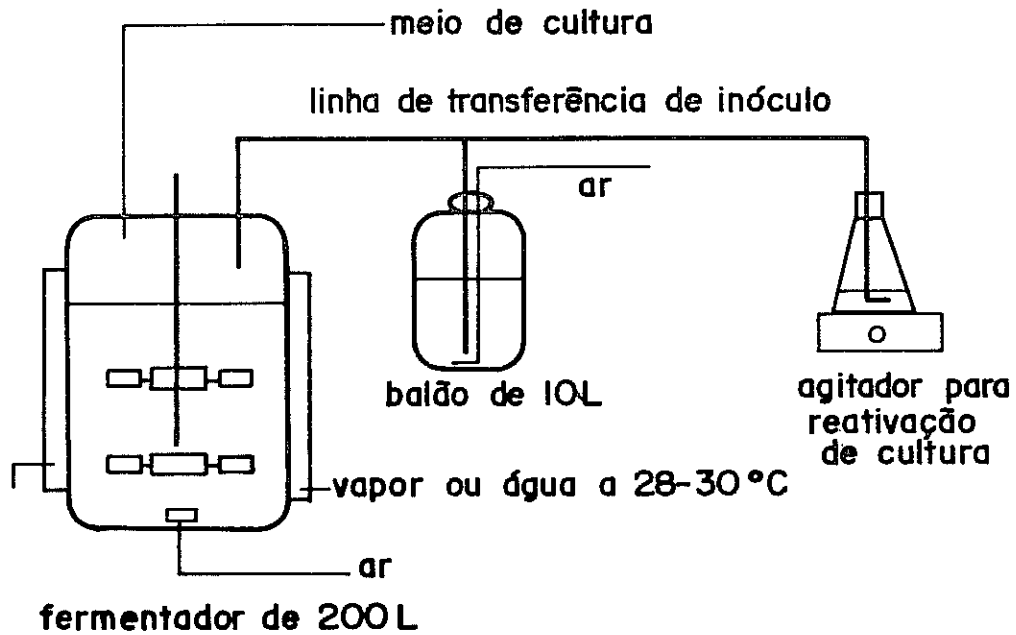


FIGURA 4.10. Exemplo típico de fluxograma de uma planta industrial para produção descontínua de biomassa de *B. japonicum*.

O fermentador principal, de 200 litros de volume útil, é carregado com meio de cultura, convenientemente balanceado e esterilizado, através da injeção de vapor na camisa e no interior do tanque, até a temperatura de 121° C, sob agitação, por cerca de 15 a 30 minutos. A temperatura é, então, diminuída para cerca de 28° a 30° C pela circulação de água de resfriamento na camisa do fermentador, aerado e agitado para fornecer a quantidade adequada de O₂ para o desenvolvimento microbiano e inoculado pela transferência da população de rizóbio previamente crescida no balão de 10 litros de volume útil. O controle da temperatura do processamento é realizado, por exemplo, pela passagem contínua de água termostaticada pela camisa do tanque.

O consumo dos substratos do meio de cultura dará ensejo ao crescimento celular como descrito na seção 4.3.1 e, após atingido o início da fase estacionária, o fermentador é descarregado e limpo, dando-se início então a um novo ciclo.

As Figuras 4.1, 4.2, 4.6 e 4.7 são exemplos típicos de curvas de crescimento de *B. japonicum* e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* obtidas em fermentadores agitados e aerados.

4.4.2. Cultivo Descontínuo-Alimentado

Os cultivos descontínuo-alimentados são empregados quando se pretende obter determinadas concentrações celulares (ou de algum metabólito) que demandam quantidades de substratos que provocariam inibição do crescimento num cultivo descontínuo comum (“batch”).

O processo consiste em começar o cultivo no fermentador como se fosse um processo descontínuo comum. A partir do momento em que um ou mais substratos atinjam concentrações que limitem o crescimento celular (ou a produção de um metabólito), inicia-se a suplementação destes substratos (previamente preparados e esterilizados) ao meio. A alimentação é feita através de uma ou mais bombas, que podem ter vazão constante ou, preferencialmente, vazão variável que acompanhe a velocidade de demanda dos substratos pelo microrganismo. O processo é interrompido quando se atinge a capacidade volumétrica máxima do fermentador, ou antes, se o resultado esperado foi alcançado.

Neste processo, a concentração dos substratos limitantes no fermentador deve ser mantida sempre num valor baixo, que não provoque limitação. É a adição contínua que vai garantir o suprimento constante de substrato, necessário ao bom desempenho microbiano.

Através deste processo, podem-se atingir concentrações celulares elevadíssimas, impossíveis de ser obtidas nos cultivos descontínuos comuns.

A Figura 4.11 apresenta os resultados obtidos num cultivo descontínuo-alimentado de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* em fermentador. O cultivo começou como um descontínuo e, a partir de 17 horas de ensaio, iniciou-se a alimentação da solução de substratos limitantes, composta de sacarose, extrato de levedura, glutamato monossódico e sais em quantidades balanceadas. Pode-se notar que, entre 20 e 50 horas, a concentração de açúcares é sempre menor que 1,5 g/L. No entanto, a adição contínua dos substratos em velocidade que aumentou logaritmicamente para acompanhar a demanda crescente, permitiu a obtenção de $6 \cdot 10^{10}$ células por mL de meio. A biomassa atingida, de cerca de 12 g/L, demandou cerca de 26 g/L de sacarose. Se esta quantidade de sacarose tivesse sido acrescentada de uma só vez ao meio de cultura, teria provocado a completa inibição do crescimento celular (veja inibição por sacarose na Figura 4.3).

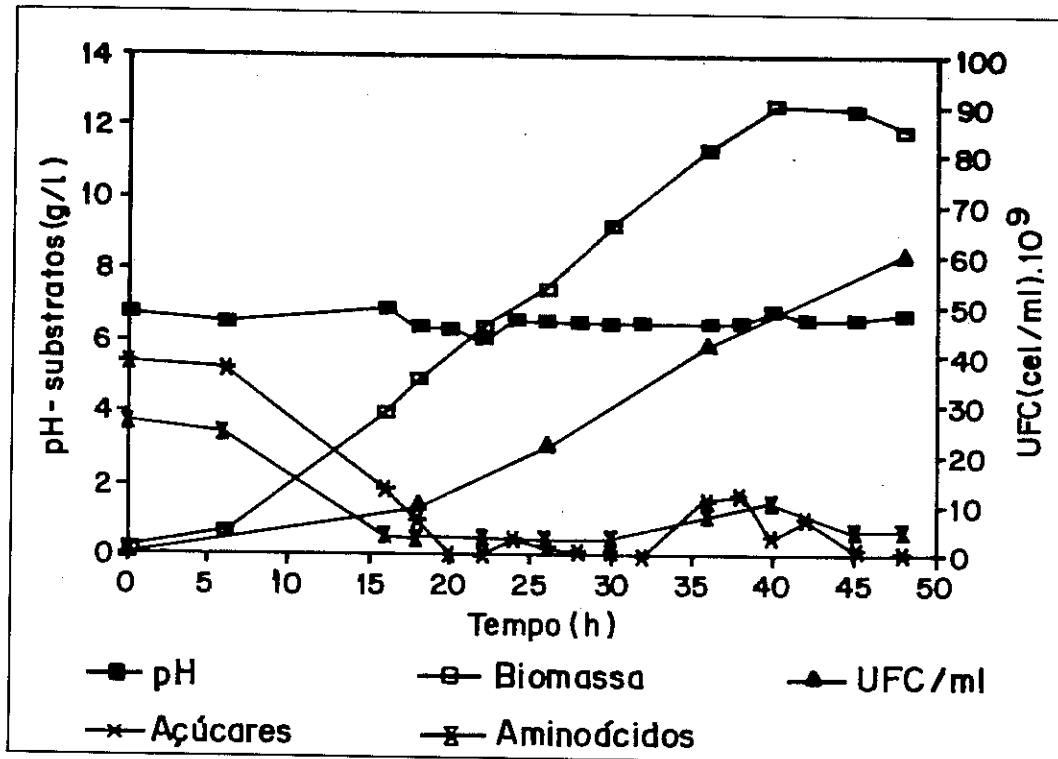


FIGURA 4.11. Resultados de um cultivo descontínuo-alimentado de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* em fermentador.

4.4.3. Cultivo Contínuo

Apesar de nos processos industriais de produção de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* serem hoje largamente empregados sistemas de cultivo em batelada ou descontínuos, vislumbra-se a possibilidade de, no futuro, serem introduzidos processos contínuos de produção, em função de suas inúmeras vantagens.

O processo de cultivo contínuo difere basicamente do descontínuo por não sofrer interrupções. O tanque de fermentação é continuamente alimentado com meio de cultura esterilizado, sofrendo também de, forma contínua, uma retirada de caldo rico em bactérias, com uma vazão igual à de alimentação. O sistema contínuo de cultivo, empregado pela primeira vez no início dos anos 20 para a produção de levedura de panificação, é largamente estudado nos livros texto de Engenharia Bioquímica (Aiba, 1973; Bailey, 1986; Dunn, 1992 entre outros). Na literatura, é conhecido como a técnica CSTR ("continuous stirred tank reactor") e tem, como principal característica, a possibilidade de fornecer um fluxo contínuo de produto.

A tendência natural dos processos fermentativos, tanto para crescimento microbiano como para produção de produtos metabólicos, é o seu desenvolvimento na forma de um processo descontínuo e, à medida que aumenta o nível de conhecimento acumulado, e sempre que as características específicas do processo o permitem, este passa a ser operado de forma contínua. Esta tendência observada é explicada pelas inúmeras vantagens que o cultivo contínuo apresenta, via de regra, quando comparado com a operação em batelada:

- uniformidade do produto obtido ao longo do tempo, tornando mais eficiente e econômico o acoplamento da etapa de cultivo, às operações a montante e a jusante do processo de produção do inoculante;
- redução significativa dos tempos não produtivos da planta industrial, aumentando a produtividade e, por conseqüência, a capacidade instalada da unidade (se a decisão de utilizar cultivo contínuo ocorrer quando do projeto da planta industrial, é possível que ocorra uma redução significativa do investimento requerido);
- permite reduzir a concentração de nutrientes adicionados no preparo do meio de cultura, uma vez que, a operação contínua de toda a planta, permite esgotar o meio de cultura no tanque, sem necessidade de existir um excesso de nutrientes, para manter as células viáveis durante os tempos de descarga e veiculação do produto, como ocorre nos processos em batelada;
- viabiliza e torna eficiente a instalação de unidades contínuas de esterilização do meio de cultura e de veiculação do inoculante produzido;
- permite a introdução de controles automáticos do processo de produção visando, principalmente, garantir a qualidade do produto e reduzir os custos operacionais, evitando desperdícios e antecipando falhas.

Apesar das inúmeras vantagens apontadas, existem algumas dificuldades na utilização do cultivo contínuo, que ajudam a explicar os problemas enfrentados na sua aplicação industrial (Aiba, 1973):

- possibilidade de que as espécies microbianas empregadas sofram mutações deletérias durante a operação do sistema;
- dificuldades técnicas de operar asépticamente a fermentação, durante um longo período de tempo;
- falta de conhecimento dos aspectos dinâmicos relacionados ao crescimento microbiano;
- a operação com meio de cultura com elevada viscosidade ou com sólidos em suspensão presentes, prejudica a manutenção da homogeneidade nas linhas de alimentação e retirada do produto e no próprio tanque de fermentação.

Teoria do Cultivo Contínuo

Dois diagramas deste processo são representados na Figura 4.12, que ilustra um sistema contínuo montado em laboratório (que pode servir de base para o projeto de uma unidade industrial) e, na Figura 4.13, que apresenta um diagrama esquemático de um CSTR, a ser empregado no desenvolvimento teórico a seguir.

Suponhamos um CSTR contendo um volume de meio em fermentação, sendo alimentado continuamente com meio de cultura esterilizado ($X_0 = 0$) a uma vazão F_0 , sendo S_0 a concentração da fonte de carbono (normalmente limitante num crescimento microbiano) no meio de cultura. Dentro do tanque o meio, com uma concentração da fonte de carbono S , é consumido pelo microrganismo presente na concentração X , e retirado a uma vazão F , idêntica à de alimentação.

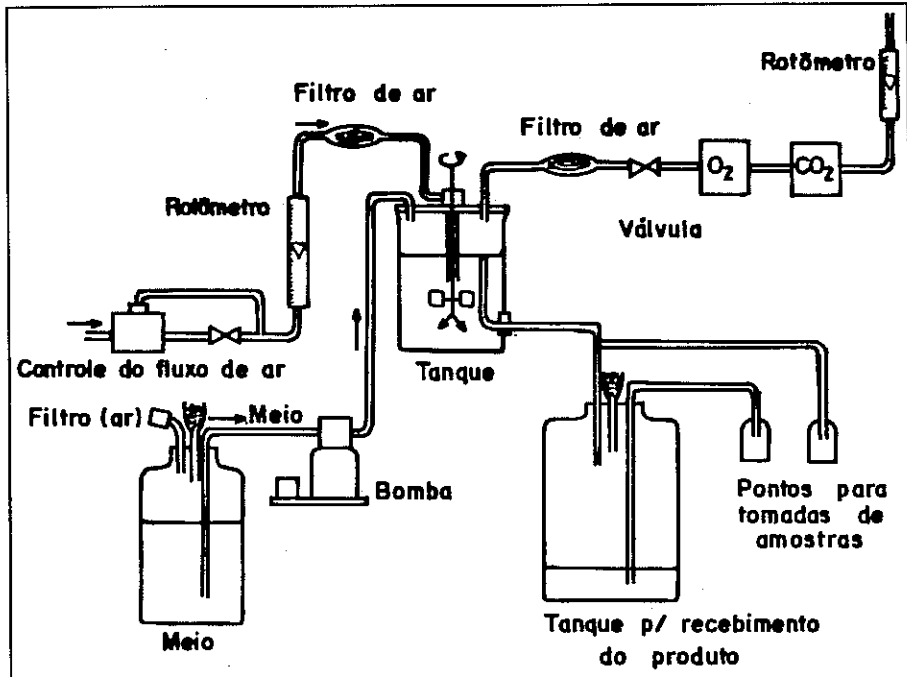


FIGURA 4.12. Esquema de um sistema de cultivo de células por fermentação contínua (Bailey, 1986).

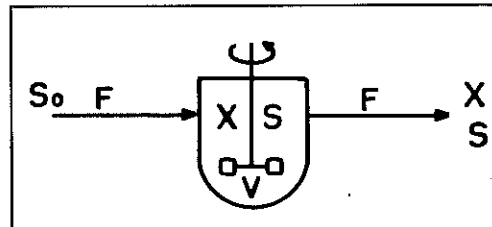


FIGURA 4.13. Diagrama do sistema contínuo utilizado para análise neste texto.

Balço material para o microrganismo:

$$\left(\begin{array}{c} \text{Variação da massa} \\ \text{de microrganismos} \\ \text{no tanque} \end{array} \right) = \left(\begin{array}{c} \text{Variação da massa} \\ \text{de microrganismos} \\ \text{por reprodução celular} \end{array} \right) - \left(\begin{array}{c} \text{Massa de microrganismos} \\ \text{retirada no meio} \\ \text{efluente} \end{array} \right)$$

$$V \frac{dX}{dt} = V \left(\frac{dX}{dt} \right)_{\text{cresc}} - FX$$

$$\frac{dX}{dt} = \left(\frac{dX}{dt} \right)_{\text{cresc}} - DX \quad \text{onde } D = F/V \dots \text{ vazão específica}$$

Definindo: μ ... velocidade específica de crescimento

$$= \frac{1}{X} \left(\frac{dX}{dt} \right)_{\text{cresc.}}$$

a equação do balanço material pode ser escrita como:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - DX$$

Balanço material do substrato:

$$\left(\begin{array}{c} \text{Variação da} \\ \text{massa do substrato} \\ \text{no tanque} \end{array} \right) = \left(\begin{array}{c} \text{Massa de substrato} \\ \text{alimentada no meio} \\ \text{afluente} \end{array} \right) - \left(\begin{array}{c} \text{Massa de substrato} \\ \text{retirada no meio} \\ \text{efluente} \end{array} \right) - \left(\begin{array}{c} \text{Variação da massa de} \\ \text{substrato devido ao consumo} \\ \text{pelo microrganismo} \end{array} \right)$$

$$V \frac{dS}{dt} = F S_0 - F S - V \left(\frac{dS}{dt} \right)_{\text{cons}}$$

$$\frac{dS}{dt} = D (S_0 - S) + \left(\frac{dS}{dt} \right)_{\text{cons}}$$

Definindo: $Y_{x/s}$...fator de conversão do substrato em células

$$= \frac{(dX)_{\text{cresc}}}{(dS)_{\text{cons}}}$$

$$\frac{dS}{dt} = D (S_0 - S) - \frac{1}{Y_{x/s}} \mu X$$

No estado estacionário, situação na qual as concentrações no interior do reator não variam com o tempo, isto é:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{dS}{dt} = 0$$

as equações do balanço de massa para o CSTR se tornam:

$$D X = \mu X$$

$$D (S_0 - S) = - \frac{1}{Y_{x/s}} \mu X$$

Critérios de Projeto

Se o cultivo microbiano obedecer o modelo de Monod (Monod, 1949):

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S}$$

É possível calcular as concentrações de S e X, que serão obtidas no estado estacionário, para um dado valor de D utilizado:

$$S = \frac{D K_s}{\mu_{\max} - D} \quad \text{e} \quad X = Y_{x/s} (S_0 - S)$$

Destas equações, é possível verificar que o valor da concentração do substrato limitante no meio de cultura (S) é igual a zero para $D = 0$, e aumenta proporcionalmente ao aumento de D, enquanto $D < \mu_{\max}$. À medida que o valor de D se aproxima de μ_{\max} , o valor de S cresce rapidamente, atingindo o valor S_0 , para $D \geq \mu_{\max}$.

A concentração celular (X) no tanque é, aproximadamente, $Y_{x/s} S_0$ para valores de D baixos. À medida que D se aproxima de μ_{\max} , quando $S > S_0$, o valor de X se aproxima rapidamente de zero. Esta situação é chamada de "lavagem" e ocorre porque a velocidade de crescimento não consegue mais acompanhar a vazão específica de alimentação do tanque. Estas condições estão ilustradas na Figura 4.14. Deve-se ressaltar que é muito difícil manter um cultivo contínuo em estado estacionário próximo à lavagem, uma vez que uma pequena mudança D, resultará numa grande variação de S e X.

É possível, através do chamado "Método Dinâmico" (Dias, 1982), determinar a velocidade específica máxima de crescimento num cultivo contínuo. Este método consiste em se romper o regime estacionário pela adoção de uma vazão específica maior que a velocidade específica máxima de crescimento do microrganismo cultivado, ou seja, aumentando o valor de D de modo a obter $D > \mu_{\max}$. A hipótese fundamental do método dinâmico de medida de μ_{\max} é a de que o microrganismo, estimulado pela alta vazão específica imposta ao sistema, vai se reproduzir com a máxima velocidade específica de crescimento, que será constante ao longo do tempo. Desta forma, na equação de balanço do sistema contínuo, derivada anteriormente, obtém-se:

$$\frac{dX}{dt} = (\mu_{\max} - D) X$$

admitindo-se μ_{\max} e D constantes e independentes do tempo, a integração da equação leva a:

$$\ln (X/X_0) = (\mu_{\max} - D) (t - t_0)$$

ou

$$\ln X = \ln X_0 + (\mu_{\max} - D) (t - t_0)$$

onde t_0 é o instante em que D é aumentado. Em geral são obtidos vários valores de X para diferentes $t > t_0$, e o valor de máx. é obtido por regressão linear.

No projeto de uma unidade industrial de cultivo contínuo busca-se, geralmente, maximizar a produtividade do processo (XD), cujo comportamento pode ser visto na Figura 4.14. Das equações derivadas para o estado estacionário do sistema contínuo é possível obter:

$$XD = D Y_{x/s} \left(S_0 - \frac{D K_s}{\mu_{\max} - D} \right)$$

Para obter o valor de D no qual o valor de XD é máximo:

$$\frac{d(XD)}{dD} = 0$$

obtém-se:

$$D = D_m = \mu_{\max} [1 - (K_s / (K_s + S_0))^{1/2}]$$

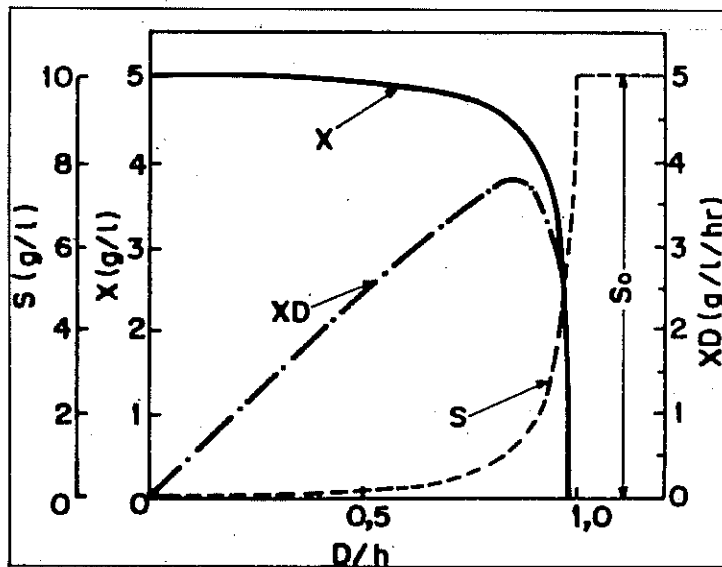


FIGURA 4.14. Comportamento da concentração celular (X), da concentração de substrato (S) e da produtividade (XD) em função da vazão específica de alimentação D para um cultivo contínuo que obedece ao modelo de Monod ($\mu_{\max} = 1,0$ /h; $K_s = 0,2$ g/L; $Y_{x/s} = 0,5$ g/g) (Aiba, 1973).

Como na maioria dos cultivos contínuos $K_s < S_0$, verifica-se que a condição de produtividade máxima é próxima da de lavagem, requerendo, desta forma, o estabelecimento de um compromisso entre uma operação com produtividade máxima e uma operação segura, sem risco de lavagem do sistema.

Aplicação do cultivo contínuo à produção de *Rhizobium*

Poucos trabalhos foram desenvolvidos visando estudar o comportamento de diferentes espécies de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* em sistemas de cultivo contínuo. Boiardi (1985), estudou o comportamento de *R. phaseoli* e *R. meliloti* em cultivo contínuo. Relatou que cultivos contínuos de *R. phaseoli* realizados em laboratório, com mais de um mês de duração, não apresentaram qualquer anormalidade, como, por exemplo, perda da capacidade de fixar nitrogênio em associação simbiótica, fato que poderia ocorrer se um mutante que houvesse perdido essa característica se estabelecesse no tanque.

A Tabela 4.6, extraída desse trabalho, indica, claramente, as vantagens em produtividade do processo contínuo, em relação aos cultivos em batelada e batelada alimentada.

TABELA 4.6. Resultados do crescimento de *R. phaseoli* (Boiardi, 1985).

Parâmetros	Cultivo	Cultivo	Cultivo
	Descontínuo	Descontínuo-Alimentado	Contínuo
Conc. cel. máx.(cel/mL)	12.10 ⁹	49.10 ⁹	9.10 ⁹
Rend. cel./substr (cel/g)	1,1.10 ¹²	1,3.10 ¹²	1,3.10 ¹²
Produtividade (cel./mL.h)	3,75.10 ⁸	7,42.10 ⁸	12,8.10 ⁸
Rel. entre produtividades	1	1,98	3,43

Visando a avaliar o comportamento de *B. japonicum* em cultivo contínuo foi realizado um ensaio preliminar nos laboratórios do IPT (IPT, 1985; Bonomi, 1986). A Figura 4.15 apresenta os resultados obtidos neste teste exploratório. Apesar dos resultados obtidos estarem muito longe de indicar um processo otimizado de produção, o ensaio realizado mostrou ser possível produzir *Bradyrhizobium japonicum* em processo contínuo, com os mesmos cuidados normalmente tomados para a condução do processo em batelada, principalmente no que se refere a evitar a contaminação do sistema. A Tabela 4.7 apresenta os estados estacionários identificados na análise da Figura 4.15. Os resultados obtidos neste ensaio indicaram que:

- mesmo trabalhando com vazões específicas baixas não foi possível obter estados estacionários com elevada concentração celular; a alteração no "set-point" do controlador de pH do sistema (indicada na Figura 4.15) não trouxe qualquer benefício;

- valores elevados da concentração residual de glicerol nos estados estacionários, também não representam uma condição ideal de operação;
- valores elevados de $Y_{x/s}$ obtidos são justificados pelo baixo crescimento ocorrido, consumindo preferencialmente outra fonte de carbono (extrato de levedura que não o glicerol) (Pradella, 1994);
- em função da complexidade do processo, principalmente pela provável presença de substâncias inibidoras, é possível a existência de mais de um estado estacionário para cada valor da vazão específica de alimentação; caso este fato seja comprovado, é possível atingir um outro estado estacionário, operacionalmente mais interessante, pela simples mudança do início da fase contínua do processo.

A aplicação do método dinâmico permitiu calcular a velocidade específica máxima de crescimento para o processo contínuo, obtendo-se o valor $\mu_{\max} = 0,0620/h$, muito próximo dos valores obtidos para o processo operado em batelada.

Apesar de no ensaio contínuo realizado, não terem sido atingidos valores elevados da concentração celular, quanto aqueles obtidos com o crescimento em batelada, pode-se concluir pela viabilidade da produção de *B. japonicum* por processo contínuo, prevendo-se que, após a sua otimização, será possível reduzir de duas a três vezes as dimensões dos fermentadores requeridos, bem como reduzir a concentração de glicerol do meio de cultura.

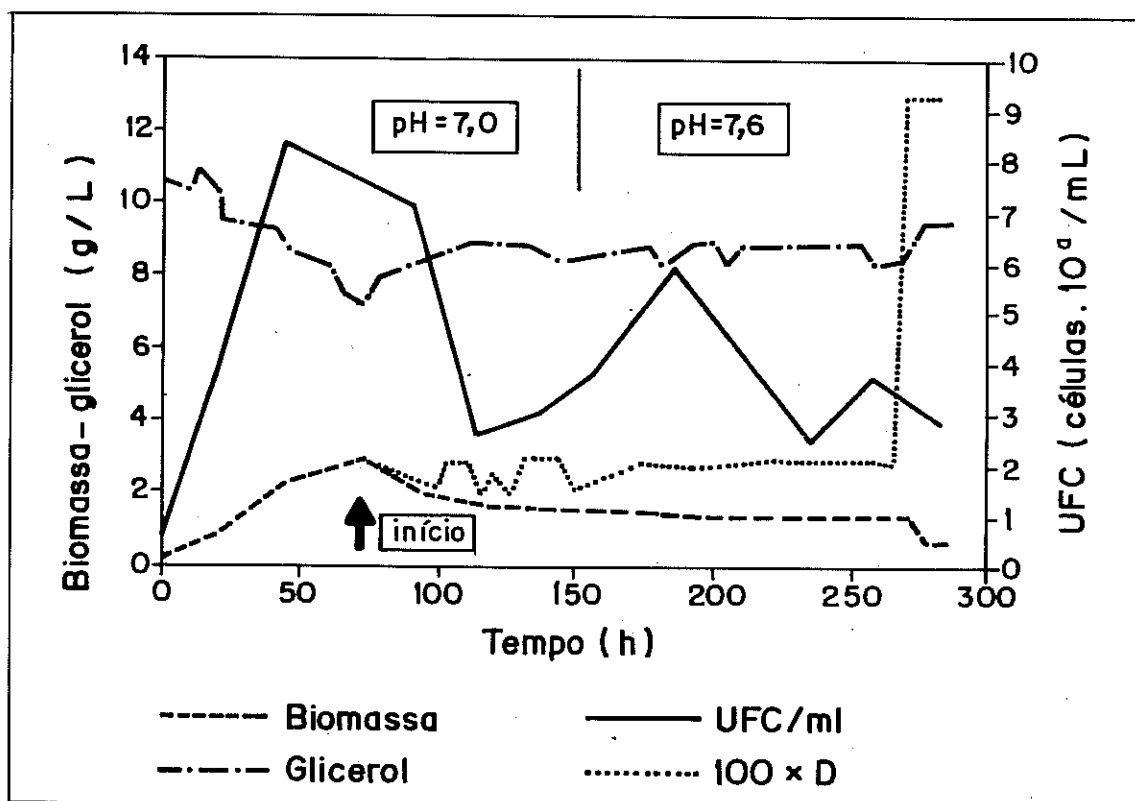


FIGURA 4.15. Cultivo contínuo de *B. japonicum* SEMIA 587.

TABELA 4.7. Estados estacionários obtidos no experimento da Figura 4.14.

D (/h)	Células (g/L)	Glicerol (g/L)	YX/S (g/g)
0,026	1,525	8,80	1,07
0,030	1,450	8,90	1,10

4.5. Veiculação

4.5.1. Inoculantes Agrícolas

A prática de colocar bactérias nas sementes ou no solo de leguminosas, pela aplicação do próprio solo contendo bactérias foi iniciada após Hellriegel e Wilfarth (1886-1888) comprovarem a origem do fenômeno de nodulação e Beijerinck ter conseguido isolar as bactérias capazes de provocar a nodulação. A inoculação com culturas artificiais de bactérias noduladoras data de 1869 (Roughley, 1970).

A primeira fábrica de culturas puras de rizóbio foi estabelecida na Alemanha no início do século e, logo a seguir, nos Estados Unidos. Segundo E. S. Lopes (Instituto Agrônomo de Campinas, SP), o pioneirismo em pesquisas com rizóbio/leguminosas no Brasil cabe ao Instituto Agrônomo de Campinas, São Paulo. Em 1930 já havia uma distribuição de culturas puras de *Rhizobium* para inoculação de sementes. A primeira fábrica particular no país foi estabelecida em 1956 na cidade de Pelotas, com assistência técnica do grupo da Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul.

Atualmente, inoculantes agrícolas contendo rizóbios são amplamente empregados na inoculação de sementes de leguminosas durante o plantio. Tal inoculação favorece o fenômeno da simbiose entre bactérias e plantas, resultando na fixação biológica de nitrogênio.

A manutenção do número elevado de rizóbios viáveis é importante no sucesso de tal inoculante, especialmente nos solos onde estão presentes linhagens nativas competitivas e de baixa eficiência.

Atualmente, existem pelo menos nove fábricas de inoculantes no Brasil, nas quais o produto inoculante biológico para soja é preparado com turfa estéril ou sem esterilizar.

4.5.2. Seleção de Linhagens

A seleção de linhagens é realizada para assegurar que um inoculante contenha células de *Rhizobium* efetivas na formação de nódulos fixadores de nitrogênio em espécies de leguminosas para as quais são recomendadas e nas condições de solo e clima nos quais estas irão se desenvolver.

Algumas características consideradas "essenciais" e outras "desejáveis" devem estar presentes na linhagem selecionada. Uma característica essencial é a habilidade de nodular a planta de interesse, sob as condições em que esta é cultivada, ou seja, ser uma linhagem infectiva. Linhagens que são infectivas no campo são linhagens que, usualmente, são competitivas com as linhagens nativas

presentes no solo. A tolerância às condições de estresse por agentes físicos ou químicos, aos quais determinado solo pode estar sujeito, é também uma característica indispensável.

A segunda característica essencial é que a linhagem deve ser capaz de fixar N_2 o suficiente para manter ou aumentar a produção de grãos tanto com o uso de fertilizantes nitrogenados.

Uma terceira característica de uma linhagem a ser empregada no inoculante é que ela deve ter um comportamento estável quando sujeita às condições do sistema de produção industrial. As linhagens de inoculantes devem se multiplicar bem nos tanques de cultivos e serem capazes de manter em alto número nos veículos que são normalmente empregados.

Uma quarta característica é sobreviver bem durante a distribuição e uso pelos agricultores. As linhagens deverão ser tolerantes à temperatura máxima que irão encontrar e devem sobreviver na semente e no solo até que a radícula susceptível à infecção apareça ou o sistema radicular comece seu aparecimento (usualmente, sete dias). Dentre as características desejáveis está a tolerância a inseticidas e fungicidas normalmente empregados no plantio de leguminosas.

Linhagens de rizóbios estão presentes naturalmente nos solos e, através de isolamento em meios de cultura e ensaios em plantas, podem ser selecionadas em casa de vegetação e, posteriormente, em condições de campo. Assim, linhagens efetivas nestes ensaios podem ser consideradas como boas linhagens a serem empregadas como inoculantes para uma determinada espécie vegetal. Outro aspecto também importante é a capacidade que a linhagem tem de sobrevivência e mesmo de multiplicação num solo perpetuando, assim, a sua presença de forma a garantir a nodulação. Este aspecto é positivo quando nos baseamos na premissa de que linhagens não sofrem modificações fisiológicas ou genéticas. Como na prática, ao longo dos anos, estas modificações ocorrem e novas cultivares de plantas são desenvolvidas. Este par - linhagem de rizóbio/cultivar da planta - deve ser constantemente estudado e analisado quanto aos benefícios da simbiose.

Entre os dados de literatura foi possível verificar dois procedimentos a serem empregados na produção industrial de inoculantes. O uso de linhagens padrões referendadas ou linhagens isoladas do solo que será plantado. No Brasil, linhagens-padrão referendadas têm sido empregadas em diversos tipos de plantações.

Outro procedimento utilizado para soja e, principalmente, para diversas outras leguminosas, é a obtenção de linhagens nativas que são isoladas e novamente inoculadas aumentando, assim, a possibilidade do sucesso do fenômeno da fixação biológica de nitrogênio. Os defensores deste tipo de inoculante argumentam que linhagens, assim obtidas, têm melhor sobrevivência devido à adaptação aquele solo e manutenção da flora endógena. Deste modo, são produzidos inoculantes somente em pequena escala, já que é necessária uma infra-estrutura e recursos humanos especializados, o que economicamente é incompatível, principalmente devido ao baixo preço do inoculante no mercado.

No Brasil, o mercado de inoculantes concentra-se basicamente no plantio da soja e do feijão e as estirpes recomendadas podem ser obtidas das coleções de culturas mantidas no MIRCEN do Rio Grande do Sul. Estirpes para outras leguminosas também são obtidas na mesma coleção.

4.5.3. Veiculação

No início da história do uso de inoculantes estes eram feitos através de transferência de solos provenientes de grandes áreas em volta das raízes de plantas que apresentavam bom rendimento de grãos aos solos a serem plantados. Pequenas quantidades deste solo podiam ser aplicadas às sementes sob a forma de pó ou pasta (Williams, 1984).

A prática de inocular sementes com culturas puras foi iniciada em 1896 após a descoberta da fixação de N_2 pela planta e o isolamento do rizóbio de nódulos de raiz. A cultura pura era, inicialmente, suspensa em água e usada para impregnar o solo ou a semente.

Estes primeiros inoculantes foram rapidamente substituídos pelo uso de solos esterilizados impregnados com rizóbio, subsequentemente com turfa "coated" com ágar e, finalmente, em 1920 pela turfa sozinha impregnada com rizóbios (Williams, 1984).

4.5.4. Veiculação em Suportes Sólidos

Para que um suporte sólido seja adequado à veiculação de rizóbios, deve possuir as seguintes características : alta capacidade de absorção, não apresentar reações exotérmicas com o caldo, ser física e quimicamente uniforme, possuir pH próximo à neutralidade, ou ser facilmente ajustável, não ser tóxico, possuir baixa carga microbiana, manter a viabilidade do rizóbio, permitir uma rápida liberação no solo, manuseável durante a mistura e acondicionamento, boa aderência, estar disponível localmente e ter um baixo custo.

Devido à proteção contra altas temperaturas e baixa umidade alcançadas durante a estocagem do produto e durante a aplicação, a turfa e solos contendo alto teor de matéria orgânica são os suportes mais comumente usados na produção de inoculantes. Esforços para obter um inoculante de melhor qualidade têm sido realizados pelo enriquecimento da turfa pela adição de nutrientes (Williams, 1984).

No Brasil, o suporte mais frequentemente usado é o solo turfoso que apresenta uma intensa atividade microbiana e onde o rizóbio, ao ser introduzido, vai sofrer uma série de interações com a microflora e a microfauna presentes. Tais interações podem afetar a sobrevivência e o número de células do rizóbio afetando, conseqüentemente, a qualidade do inoculante. O tipo de turfa pode afetar a população da bactéria, seu desenvolvimento e sobrevivência durante o armazenamento e um fator importante a ser considerado na seleção de uma turfa são suas características físico-químicas. Roughley (1967) relatou que uma turfa variava segundo o local do depósito de onde provinha. A variação pode ainda ocorrer em um mesmo depósito segundo a profundidade (Van Schevren, 1970). Uma alta porcentagem de matéria orgânica (> 60%) é desejável, mas não essencial. Também devem ter um baixo conteúdo de sais (< 1%) e uma alta capacidade de absorção de umidade usualmente entre 150 e 200 % do peso. Na prática, no entanto, têm sido usadas turfás ou solos com apenas 50% de capacidade de absorção.

Onde a turfa não é adequada ou disponível, outros veículos têm sido empregados com sucesso variado. Dentre os suportes alternativos estão a vermiculita, serragem decomposta, perlita e palha de

arroz decomposta, resíduos de cultura de milho suplementados com nutrientes, e uma mescla com carvão, bentonita e alfafa. Bagaço de cana finamente moído tem se mostrado adequado para rizóbios para soja, especialmente após a retirada do açúcar (Williams, 1984).

O tipo de turfa pode afetar a população de rizóbios durante o armazenamento. O fator mais importante a ser considerado na seleção de uma turfa é a fonte e as características físico químicas. Roughley (1967) avaliou os principais parâmetros para o crescimento e sobrevivência de rizóbios veiculados em turfa. Foram considerados a origem, o pH e o método de ajuste, método de esterilização, temperatura de secagem e conteúdo de umidade. Em relação ao tipo de turfa a viabilidade variou e algumas linhagens foram sensíveis a esta variação, enquanto outras não. Esta sensibilidade variou, ainda, com a temperatura de armazenamento e a 26° C, mesmo a melhor turfa apresentou um declínio de 10 vezes após 15 a 16 semanas. A profundidade (0-18 polegadas) da turfa empregada não afetou os rizóbios, embora pareça que as camadas mais profundas apresente resultados mais satisfatórios. A variação pode ocorrer, ainda, em um mesmo depósito, segundo a profundidade (Van Schreven, 1970).

A seleção da turfa pode ser apoiada pela análise química embora turfas com composição similar tenham mostrado grande variação no crescimento e sobrevivência das células bacterianas. O teste determinante para a seleção é a habilidade de proporcionar altas populações do rizóbio.

Para o preparo da turfa o primeiro passo é a secagem. A turfa é colhida úmida no campo e é drenada. Os restos de vegetais são removidos e os pedaços maiores fragmentados. Tal secagem pode ser feita ao ar ou no forno, onde a temperatura não deve exceder 100° C pois altas temperaturas podem causar degradação e produção de substâncias tóxicas (Date, 1977).

Além disso, aumento excessivo de temperatura ocorre quando a turfa é seca a altas temperaturas e, subseqüentemente, umedecida pela adição da cultura (Roughley, 1970). Burton (1967) relatou a produção de inoculantes de alta qualidade pelo aquecimento rápido a 650° C, onde a turfa é seca e resfriada tão rapidamente que a degradação não ocorre.

A turfa seca é, usualmente, moída em moinho, e o tamanho de partícula vai depender da forma como o inoculante vai ser aplicado. Se na forma de pó, a partícula deve passar pelo menos através de peneira de 0,25 mm. Alguns autores recomendam que 50% a 60% passem através de peneira de 0,075 mm (200 mesh) (Strijdom, 1976). Na forma granular o tamanho das partículas entre 1,18 e 0,35 mm é considerado adequado.

Dado que a maioria das turfeiras são ácidas para serem usadas como suportes necessitam ser neutralizadas a pH entre 6,5 e 7,0. O carbonato de cálcio (CaCO₃), na forma de calcário, é o agente neutralizante mais comumente usado. O carbonato de magnésio pode ser usado com algumas turfas, em vez do carbonato de sódio e potássio. O hidróxido de amônio tem mostrado efeitos negativos tanto ao crescimento inicial, como para a sobrevivência do rizóbio (Roughley, 1967; Van Schreven, 1970).

4.5.5. Outros Tipos de Veiculação

Culturas em ágar

O primeiro inoculante comercialmente produzido, Nitragin, foi produzido em gelatina e, posteriormente, em meio ágar nutriente. Tais inoculantes foram usados ou pela aplicação direta nas sementes, usando suspensão em leite desnatado, ou pela mistura da bactéria com solo contendo restos de leguminosas, cortados, que eram espalhados sobre o campo. Culturas em ágar foram mudadas para inoculantes em sólido em 1920, nos EUA, e em 1952 na Austrália, principalmente devido à mortalidade logo após a aplicação. A mortalidade, durante a fase de secagem, pode ser significativamente reduzida pela adição de 9% de maltose (Williams, 1984).

Culturas líquidas

Culturas líquidas de *Rhizobium* são, normalmente, utilizadas em ensaios de casa de vegetação e para inocular inoculantes sólidos. Não são disponíveis comercialmente como inoculantes, exceto para fins específicos quando solicitadas por algum agricultor. No Brasil existe, atualmente, um produto veiculado em líquido, fornecido por uma das empresas produtoras de inoculantes.

Células liofilizadas

O objetivo da liofilização é remover a água intracelular das células de rizóbio. Isto reduz, ao mínimo, a atividade metabólica aumentando, assim, a longevidade. É conseguido pelo congelamento das soluções intracelulares e remoção da umidade pelas membranas celulares, sob vácuo, sem permitir que o conteúdo celular extravase. Liofilização de caldos requerem equipamentos sofisticados, especialista técnico, e o uso de tampões ou protetores para aumentar a viabilidade durante a secagem e reconstituição das células. É, portanto, um processo caro.

Veiculação em talco

Talco foi usado como veículo para ajudar a inoculação em larga escala. Tal inoculante não é disponível, comercialmente, por causa do alto custo de produção e a baixa sobrevivência na semente (Vincent, 1965).

Culturas secas em óleos

Culturas contendo alto número de células são suspensas em óleo líquido mineral ou vegetal e, por borbulhamento de ar através da suspensão, o conteúdo de água da célula pode ser reduzido, sem afetar a sua viabilidade. Umidades de 1% a 10% são possíveis de conseguir e estas preparações são estáveis até 73° C. Após o processo de secagem as células são coletadas, por filtração ou centrifugação, e misturadas com um suporte como óleo ou vermiculita fina. O uso deste óleo é indicado para a aplicação direta na semente. O uso da vermiculita resulta num pó com textura oleosa que facilita a aplicação deste na semente sem necessidade de um aderente. Resultados obtidos com este tipo de inoculante têm sido inconsistentes (Williams, 1984).

Cultura líquida concentrada congelada

Culturas líquidas são concentradas na forma de pasta (aproximadamente 10^{12} céls./mL), distribuídas em tubos plásticos ou canisteres, congeladas e mantidas em gelo seco, podendo manter a viabilidade por até nove meses. Uma vez descongeladas, devem ser usadas em 24 horas. Tem ocorrido um rápido aumento no uso comercial desta forma de inoculante para soja e amendoim nos EUA, principalmente nos estados onde os problemas ambientais, de solo e doenças têm afetado o uso de inoculantes convencionais.

Esta formulação é aplicada diluída em água e por aspersão ao solo. Resultados publicados sugerem que, a depender das condições, bons resultados podem ser obtidos (Scudder, 1974).

4.6. Controle da Contaminação no Produto

Devido ao crescimento lento, ao emprego de meio de cultura não seletivo e à temperatura e pH comuns a diversos microrganismos, o cultivo de rizóbios, principalmente do gênero *Bradyrhizobium*, apresenta sério problemas de contaminação durante a obtenção do produto a nível industrial. Cada etapa, desde a preservação até o cultivo de veiculação, devem ser amostradas e analisadas.

Dentre as técnicas mais comumente empregadas está a observação microscópica de um esfregaço da cultura em lâminas coradas pelo método de Gram. Este acompanhamento é importante, mas é necessário que se tenha conhecimento exato dos dados que esta observação fornece. Assim, a observação de lâminas de rizóbios coradas pelo Gram nos mostra a forma de resposta. Diversos microrganismos, porém, são semelhantes ou idênticos aos rizóbios quanto a estes dois aspectos.

A presença de microrganismos contaminantes só será observada caso estes sejam morfológicamente distintos ou possuam características tintoriais distintas. A presença de contaminantes só será observada em lâmina quando estes estiverem presentes, no mínimo, em 10^2 células/mL da cultura de rizóbios.

Outro aspecto que também influi nesta observação é o fato de que rizóbios em cultura líquida, a depender da fase de crescimento, apresentam-se pleomórficos o suficiente para sugerir a existência de, pelo menos, dois microrganismos Gram-negativos.

As considerações acima não invalidam a utilização de lâminas como método de acompanhamento para a produção de inoculantes, mas sugerem que a observação microscópica da lâminas nem sempre é decisiva ou conclusiva.

Uma outra forma de se verificar a pureza de uma cultura é a semeadura na superfície de meios sólidos, de modo que se obtenham colônias isoladas. Os dois meios sólidos mais empregados para rizóbios são YMA contendo vermelho-congo ou azul de bromotimol como indicador (capítulo 2).

Até o momento, os meios empregados em cultivo de rizóbios não são seletivos, pois os meios mencionados acima são apenas meios indicadores (ver capítulo 2). No meio contendo azul de bromotimol (BB), os microrganismos cujo metabolismo leva à acidificação do meio tornarão este

meio amarelo, enquanto os microrganismos cujo metabolismo leva à alcalinização tornarão o meio azul; os de metabolismo neutro não modificarão o meio. As colônias de rizóbio, em qualquer situação, são sempre brancas, mucóides e brilhantes, podendo absorver o corante com a idade.

No meio contendo vermelho-congo, as colônias podem apresentar tonalidade branca, rosa e fortemente rosa. Algumas linhagens de rizóbio, quando crescidas nestes meios, não tomam o corante e são brancas, enquanto que outras podem tomar o corante em diferentes graus. É conhecido, também, que muitos contaminantes tomam o vermelho-congo e apresentam-se fortemente corados. O que muitas vezes é desconhecido, é que este meio funciona bem, deste que não exposto à luz. Esta exposição faz com que, após 2 horas, todas as colônias tomem o vermelho-congo. Deste modo, mais uma vez, salienta-se a necessidade destes conhecimentos básicos sobre o uso destes meios, para que não sejam cometidos erros grosseiros.

Um outro parâmetro importante para identificarmos um contaminante é que estes costumam ter crescimento mais rápido do que os rizóbios. Isso, inclusive, explica sua predominância no final do cultivo. O crescimento em meio sólido deve ser observado todos os dias, tentando verificar qual é o tempo em que surgem as primeiras colônias do rizóbios ou do contaminante. O emprego de um microscópio estereoscópico (lupa), para estas observações, auxiliará na detecção precoce do aparecimento de colônias e na descrição da morfologia das colônias, que eventualmente são distintas das de rizóbios. Estes dois métodos da observação, em lâmina e cultivo de meio sólido, devem ser analisados em conjunto, para que se possa chegar a um diagnóstico e, portanto, deverão acompanhar todas etapas de produção de inoculante até a veiculação. Em nossa experiência, as contaminações na produção de inoculantes são, em geral, devido a falhas nos procedimentos de assepsia, lavagem e esterilização dos equipamentos utilizados (capítulo 1).

O esquema dos pontos importantes a serem amostrados é apresentado a seguir (Figura 4.16).

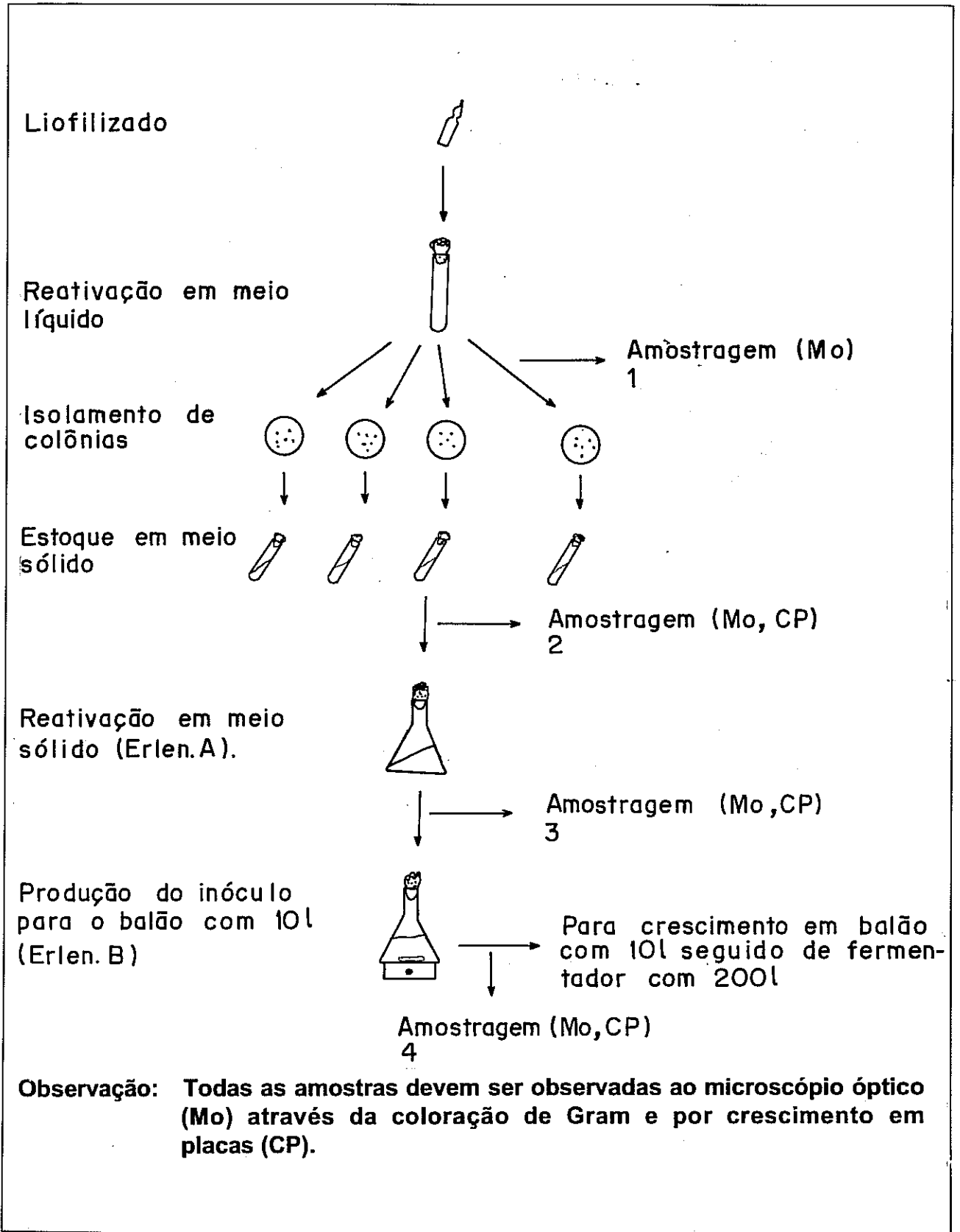


FIGURA 4.16. Produção de inóculo e controle de contaminações.

4.7. Referências Bibliográficas

- AIBA, S.; HUMPHREY, A. E.; MILLIS, N. F. **Biochemical Engineering**. New York: Academic Press, 1973. 434p.
- ATKINSON, B. et al. **Biochemical Engineering and Biotechnology. Handbook**. New York: Stockton Press, 1991. 1271p.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. New York: Mc-Graw Hill Book Co., 1977. 753p.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. New York: McGraw-Hill Book Company, 1986. 998p.
- BALATTI, A. P.; MAZZA, L. A. Producción de inoculantes para leguminosas. **Rev. Lat-amer. Microbiol.**, v.20, p.87-93, 1978.
- BALATTI, A. P.; MAZZA, L. A.; MORETTI, E. Aeration requirements of *Rhizobium* cultures. **MIRCEN J**, v.3, p.227-234, 1987.
- BALATTI, A. P. **Producción de Inoculantes para Leguminosas**. La Pampa: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de La Pampa, 1992. 152p.
- BOIARDI, J. L.. Alternative culture systems for *Rhizobium* biomass production. In: WORKSHOP ON RHIZOBIUM/LEGUME INOCULANTS, 1, 1985, Porto Alegre. Porto Alegre: MIRCEN, 1985. (Apresentação oral).
- BOIARDI, J. L.; BALATTI, A. P.; MAZZA, L. A. Cultivos de *Rhizobium phaseoli* en sistema sumergido. **Rev. Fac. Agron.**, v.4, p.19-27, 1983.
- BONOMI, A.; BARRAL, M. F.; KOSHIMIZU, L. H.; MANTELLATO, P. E.; OHBA, M. S. Desenvolvimento tecnológico para a produção industrial de *Bradyrhizobium japonicum*. **Bol. Fert.**, v.8, p.3-7, 1986.
- BONOMI, A.; CARVALHO, R. N.; OLIVEIRA, M. S.; PRADELLA, J. G. C.; SEVERO, A. C. R.; URENHA, L. C. Influência da aeração no crescimento de *Rhizobium japonicum* estripe 587 em fermentador. In: SEMINÁRIO SOBRE INOCULANTES DE LEGUMINOSAS, 1, 1987, Porto Alegre. Porto Alegre: IPAGRO, 1987. (Apresentação oral).
- BURTON, J. C. *Rhizobium* culture and use. In: PEPPLER, A.J. ed. **Microbial Technology**. New Jersey: Van Nostrand-Reinhold, 1967. p.1-33.
- DATE, R. A.; ROUGHLEY, R. J. Preparation of legume seed inoculants. In: HARDY, R. W. F.; GIBSON, A. H. ed. **A Treatise on Dinitrogen Fixation, Section IV, Agronomy and Ecology**. New York: John Wiley and Sons Inc, 1977. p.243-276.

- DIAS, J. M. C. S. **Aplicação do método dinâmico de medida da velocidade específica máxima de crescimento celular à fermentação alcoólica contínua de mosto de melaço.** São Paulo: Politécnica/USP, 1982. 225p. (Tese de mestrado).
- DUNN, I. J.; HEINZLE, E.; INGHAM, J.; PRENOSIL, J. E. **Biological Reaction Engineering.** Weinheim: VCH, 1992. 438p.
- ERTOLA, R. J.; MAZZA, L. A.; BALATTI, A. P.; CUEVAS, C. M.; DAGUERRE, R. Effect of composition of medium and oxygen supply rates on growth of *Rhizobium meliloti*. **Soil Sci.**, v.108, n.5, p.373-380, 1969.
- FRANKENBERG, C. L. C. **Tecnologia da produção de inoculante de *Bradyrhizobium japonicum* em fermentador e em turfa.** Porto Alegre: UFRGS, 1990. (Tese de mestrado).
- GERHARDT, P. **Manual of methods for general bacteriology.** Washington DC: American Society for Microbiology, 1981. 521p.
- IPT. **Desenvolvimento de tecnologia para a produção industrial de inoculantes; *Rhizobium* spp.** São Paulo: IPT, 1985. 102 p. (Relatório Técnico Parcial, 23.210)
- IPT. **Desenvolvimento de tecnologia para a produção industrial de inoculantes *Rhizobium* spp.** São Paulo: IPT, 1987. 149 p. (Relatório Técnico, 25.675/87)
- IPT. **Produção experimental de inoculantes à base de *Rhizobium japonicum*.** São Paulo: IPT, 1989. 44 p. (Relatório Técnico, 27.709/89)
- IPT. **Estudo da produção e utilização de inoculante para fixação biológica de nitrogênio em feijão.** São Paulo: IPT, 1992. 22 p. (Relatório Técnico Parcial, 30.705/92).
- IPT. **Estudo da produção e utilização de inoculante para fixação biológica de nitrogênio em feijão.** São Paulo: IPT, 1993a. 60 p. (Relatório Técnico Parcial, 30.989/93)
- IPT. **Estudo da produção e utilização de inoculante para fixação de nitrogênio em feijão.** São Paulo: IPT, 1993b. 29p. (Relatório Técnico Final, 31.978/93)
- JORDAN, D. C. Generos *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. In: KRIEG, N. R. ; HOLT, J. G. ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 1. Baltimore: Williams & Wilkins, p.235-244, 1984.
- KOSSEN, N. W. F.; OOSTERHUIS, N. M. G. Modelling and scaling-up of bioreactors, In: REHM, H. J.; REED, G. ed. **Biotechnology**, v. 2. Germany: VHC, 1985. p.571-605.
- LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica.** São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda., 1988. 725p.

- LOPRETO, C. R.; MAZZA, L. A.; BALATTI, A. P. Influencia del subministro de oxigeno sobre la velocidad de crecimiento de una cepa de *Rhizobium japonicum*. **Rev. Asoc. Arg. Microbiol.**, v.5, n.3, 1973. p.128-131.
- LOPRETO, C. R.; MAZZA, L. A.; BALATTI, A. P. Influencia de los componentes del medio de cultivo sobre el tiempo de generación de una cepa de *Rhizobium japonicum*. **An. Soc. Cient. Argentina**, v.193, n.1-2, p.35-47, 1972.
- MONOD, J. The growth of bacterial cultures. **Ann. Review of Microbiol.**, v.3, p. 371, 1949.
- PEPPLER, H. J.; PERLMAN, D. **Microbial technology**. v.1. New York: Academic Press, 1979. 552p.
- PRADELLA, J. G. C.; OLIVEIRA, M. S.; ZUCCOLO, M.; SEVERO, A. C. R.; BONOMI, A. Improved culture media for growth of *Bradyrhizobium japonicum*. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 10, p.112-113, 1994.
- ROUGHLEY, R. J.; VINCENT, J. M. Growth and survival of *Rhizobium* spp in peat culture. **J. Appl. Bact.**, v.30, n.2, p.362-376, 1967.
- ROUGHLEY, R. J. The preparation and use of legume seed inoculants. **Pl. Soil**, v.32, p.675-701, 1970.
- RUCHTI, G.; DUNN, I. J.; BOURNE, J. R. Comparison of dynamic oxygen electrode methods for the measurement of k_{la}. **Biotechnol. Bioeng.**, v. XXIII, p 277-290, 1981.
- SCUDDER, W. T. *Rhizobium* inoculation of soybeans for subtropical and tropical soils. 1. Intial. field trials. **Proc. Soil Crop Sci. Soc. Fla.** 34:79-82, 1975.
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Methods in legume-Rhizobium technology**. Hawaii: Niftal, 1985.
- STRIJDOM, B.W.; DESCHODT, C.C. Carriers of rhizobia and the effects of prior treatment on survival of rhizobia. -. In:NUTMAN, P. S. ed. **Symbiotic nitrogen fixation in plants**. Cambridge: Cambridge University Press, 1976, p.151-168.
- SUZUKI, T.; MORI, H.; YAMANÉ, T.; SHIMIZU, S. Automatic supplementation of minerals in fed-batch culture to high cell mass concentration. **Biotechnol Bioeng**, v.XXVII, p.192-201, 1985.
- VAN SCHREVEN, D. A. Some factors affecting growth and survival of *Rhizobium* spp in soil-peat cultures. **Pl. Soil**, v.32, p.113-130, 1970
- VINCENT, J. M. Environmental factors in the fixation on nitrogen by legumes. In: BARTHOLOMEW, W. V.; CLARR, F. G. ed. **Soil nitrogen**. Madison: American Soc. Agron. Inc., 1965, p. 384-435.
- WILLIAMS, P. M. **Current use of legume inoculant technology**. New York: M. Alexander Plenum Press, 1984, p.173-199.
- ZABRISKIE, D. W.; ARMIGER, W. B.; PHILLIPS, D. H.; ALBANO, P. A. **Traders' guide to fermentation media formulation**. Traders Protein, 41p, s. d.

CAPÍTULO 5

PRESERVAÇÃO DE CULTURAS DE RIZÓBIOS

Luiziana F. da Silva¹
Margaretti S. Oliveira¹

5.1. Introdução

Várias são as razões para que os microbiologistas preservem linhagens bacterianas: taxonomia, ensino, pesquisa em diferentes áreas e aplicações em processos industriais, entre outras. A manutenção, no entanto, nem sempre teve sua importância reconhecida, sendo realizada de modo inadequado e resultando, muitas vezes, em perda de culturas de interesse, além da perda concomitante de tempo, dinheiro, informações valiosas e reprodutibilidade de testes. Um efetivo sistema de manutenção de culturas pode significar a solução para boa parte destas perdas. Este papel é, em grande parte, desempenhado por coleções de culturas. Entretanto, isto não elimina necessidades rotineiras que exigem culturas viáveis e estáveis para as aplicações já mencionadas, o que leva cada microbiologista a estar alerta para a preservação adequada das linhagens de interesse.

A emergência da nova biotecnologia despertou a consciência dos cientistas e pesquisadores da necessidade, há muito reconhecida por alguns, do uso de culturas adequadamente preservadas, livres de contaminações e com características originais mantidas, já que muitos projetos de pesquisa e produções industriais dependem da ação direta de microrganismos.

Entre as coleções de culturas espalhadas pelo mundo, cuja função primordial é resguardar o “pool” genético conhecido pelo homem, muitas se especializaram, e em bacteriologia, esta especialização é direcionada por áreas de aplicação, como bacteriologia médica, de alimentos, de patógenos de plantas, biometalurgia e outros interesses industriais. É interessante notar que existe um número expressivo de centros direcionados à manutenção de rizóbios, entre as maiores coleções de culturas de bactérias, podendo-se mencionar *Rhizobium* Microbiological Resource Centers (MIRCEN) e coleções de culturas estabelecidos no Quênia, Senegal, Brasil, Colômbia, Havaí, Estados Unidos e Reino Unido (Hill et al., 1991). Algumas dessas coleções surgiram a partir de projetos de pesquisa ou iniciativas governamentais, passando a integrar a World Federation for Culture Collections e a prestar serviços à comunidade. Abrigam boa parte das linhagens de rizóbios estudadas, mantidas por especialistas.

¹ Pesquisadoras, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), Divisão de Química, Agrupamento de Biotecnologia, Cidade Universitária, CEP 05508-901. São Paulo, SP.

Novamente, deve ser lembrado que tal grau de organização e especialização, embora de importância fundamental, não supre completamente as necessidades diárias de todos os que trabalham com rizóbios, pois culturas recém isoladas de ambientes e regiões particulares, ou aquelas constantemente subcultivadas, bem como culturas geneticamente manipuladas, podem ser perdidas ainda no laboratório de origem devido a uma preservação em condições inapropriadas.

A perda de uma linhagem não significa, aqui, simples morte celular ou impossibilidade de recuperação de células viáveis. Inclui, também, a contaminação por microrganismos indesejáveis, que podem ser detectados prontamente ou somente após perdas maiores. A possibilidade de contaminação cruzada, que nem sempre é rapidamente observável, de uma espécie de rizóbio por outra, é um outro risco existente. Adicionalmente, mesmo culturas viáveis podem perder ou sofrer modificações em características de interesse pela perda de plasmídeos ou mesmo pela seleção de células de uma cultura em resultado da técnica de preservação empregada (Williams & Calcott, 1982). Pode-se, ainda, incluir aqui a manutenção da viabilidade e efetividade de rizóbios em produtos comercializados à base destas células, como é o caso dos inoculantes, que é dependente de fatores diversos (Kremer & Peterson, 1983).

Em todos os casos mencionados, vários são os fatores que contribuem para a perda de uma cultura. Destacam-se, aqui, desde a simples troca de rótulos no momento de renovação de subcultivos, a temperatura de armazenamento, a velocidade de congelamento empregada na liofilização ou criopreservação, até a natureza dos protetores empregados. Inúmeros fatores têm sido levantados, pela literatura, como capazes de influenciar a confiabilidade dos vários métodos empregados na preservação (Silva, 1990). A sensibilidade particular da linhagem merece destaque e cada microbiologista tem a responsabilidade de conhecer a cultura ou o grupo que constituem sua ferramenta de trabalho. Obviamente o conhecimento e o acompanhamento de linhagens de interesse específico aqui a cargo do grupo que depende, diretamente, do desempenho das mesmas para o desenvolvimento dos seus trabalhos.

Pelo exposto, tenta-se alertar que um dos objetivos maiores, senão o primeiro, é a preservação apropriada desta ferramenta de trabalho. Dentro das condições materiais de cada laboratório, ou mesmo com a orientação e cooperação de outros laboratórios mais experientes, cada profissional deve selecionar e adaptar, em muitos casos, métodos para manter suas culturas e ninguém mais indicado do que ele próprio, para avaliar, periodicamente estes diferentes estoques e definir aqueles mais indicados para garantir a manutenção das características que são importantes para o seu trabalho.

A seguir serão apresentados alguns dos principais métodos empregados para a manutenção de culturas de rizóbios e outras bactérias, com base em dados de literatura, bem como nas técnicas utilizadas no Laboratório de Microbiologia Industrial do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, seguidos de alguns comentários sobre os mesmos.

5.2. Subcultivo

A transferência periódica de culturas para meio sólido inclinado ou caldo (meio líquido), é um dos métodos mais amplamente empregados para a manutenção de linhagens, consistindo de um método geral indicado para a preservação por curto espaço de tempo .

O método consiste na inoculação da cultura em meio apropriado, recém preparado, seguida de incubação à temperatura (28° - 30° C) e tempo exigidos pela cultura de rizóbio e armazenamento sob condições não deletérias às células.

Os meios de cultivo que podem ser empregados para rizóbios são o EM ou YM, (extrato de levedura-manitol), com ou sem ágar (capítulo 2), ou o meio indicado por Lopreto et. al. (1972) e colaboradores, cujas formulações está descrita no capítulo 4. A fonte de carbono pode ser trocada, de glicerol para manitol.

O meio de Lopreto et al. (1972) é, também, empregado para cultivo e contagem de rizóbios, adicionado de 5 mL de azul de bromotimol (solução alcoólica a 0,5%) ou vermelho-congo (solução aquosa a 25%).

A partir de uma cultura pura retirar, com uma alça, colônias de rizóbios, estriando em tubos contendo meio sólido inclinado. Rotular com cuidado, para não haver troca na denominação da cultura, incubando entre 28° e 30° C até obter bom crescimento. Observar, cuidadosamente para detecção visual de contaminantes. Armazenamento em temperatura de refrigerador doméstico (4° a 8° C) prolonga os períodos necessários à renovação do subcultivo, que pode ser de um até oito meses, dependendo da susceptibilidade da linhagem. O emprego de tubos com tampa rosqueável também pode prolongar o período entre as renovações de repiques. É aconselhável, para redução das possibilidades de contaminação, armazenar pelo menos dois tubos de cultura intactos, reservados para o momento da renovação do repique, utilizando-se de outros para retirada rotineira de cópias da cultura.

O subcultivo é uma técnica familiar a todos microbiologistas e, talvez, a primeira a se tentar em uma dada cultura. Não requer equipamentos ou técnicas muito sofisticadas, exigindo apenas o correto emprego de técnicas de assepsia e organização, especialmente para número elevado e grande variedade de culturas a serem mantidas. Apresenta a vantagem adicional de facilitar a visualização de contaminantes, principalmente quanto se armazena sobre meio sólido (Hill,1981). Entretanto, para longos períodos, o emprego deste método é desaconselhado, já que repetidas transferências aumentam as possibilidades de perdas por contaminação, mutação e seleção, que podem ocorrer em diferentes graus de intensidade, dependendo da linhagem (Snell,1984).

5.3. Suspensão em Água

A preservação em água destilada foi, inicialmente, empregada com sucesso para esporos de fungos, estendendo-se para culturas de fitopatógenos, rizóbios e outros fixadores de nitrogênio (Pereira et al., 1970; Crist et al., 1984; Iacobellis & Devay, 1986; De León et al., 1988, Silva et al., 1988), sem perda de suas características.

Um dos procedimentos empregados para esta forma de armazenamento é descrito a seguir:

- cultivar células em meio indicado por Lopreto et al. (1972) ou YM líquido, em agitador rotativo (250 rpm) entre 28° e 30° C, até se obter culturas ao final da fase logarítmica de crescimento. Observar as células em microscópio óptico, coradas pelo método de Gram (capítulo 2), para detecção de possíveis contaminantes;
- separar as células por centrifugação sob refrigeração, desprezando-se o sobrenadante;
- ressuspender as células em água destilada esterilizada, empregando-se o mesmo volume da cultura centrifugada ou menor, caso seja necessário concentrar a suspensão;
- distribuir, assepticamente, alíquotas de 5 mL em frascos âmbar (capacidade de 10 mL). Estes frascos podem ser do tipo normalmente empregado para conter antibióticos, devendo ser vedados com tampa ou rolha de borracha e selados para evitar a evaporação;
- retirar amostras para se fazer contagem de células viáveis e estrias em placas com meio sólido, para a detecção de contaminantes resultantes da manipulação. Essas alíquotas podem ser retiradas com seringas e agulhas, perfurando-se a tampa de borracha, após assepsia superficial. Deste modo, pequenos volumes podem ser periodicamente retirados, quando houver necessidade da cultura, inoculando-se em meio apropriado.

Culturas de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 587 foram assim mantidas com sucesso, à temperatura ambiente. A viabilidade celular caiu de 10^{11} UFC para 10^9 UFC/mL nos dois primeiros meses, para 10^8 UFC/mL nos quatro meses subsequentes, chegando a 10^7 UFC/mL após 20 meses (Silva et al., 1988).

As explicações para o sucesso deste método não convergem para um ponto comum, especialmente em se tratando de células na forma vegetativa, embora estudos mostrem que a susceptibilidade de bactérias fixadoras de nitrogênio, quando assim preservadas, está relacionada com o nível de diluição do inóculo preservado. Apresenta as vantagens de manuseio menos freqüente, menores gastos com meio de cultivo, não necessitando ambiente refrigerado ou equipamentos específicos, sendo recomendado para laboratórios menos equipados.

5.4. Liofilização

Um dos mais significativos avanços na tecnologia das coleções de culturas foi o desenvolvimento do processo de liofilização para a preservação de grande número de culturas de microrganismos por longos períodos. O método consiste na remoção de água, por sublimação, a partir de uma suspensão celular previamente congelada (Prista, 1981; Pitombo, 1989).

Técnica de liofilização:

- obter uma cultura bacteriana em meio sólido ou líquido, separando as células por centrifugação, ou remover da superfície do meio sem carregar resíduos do mesmo;

- ressuspender as células em uma solução de glutamato de sódio a 5% contendo leite desnatado a 10%. As duas soluções devem ser preparadas separadamente, em concentrações apropriadas para atingir a concentração mencionada quando misturadas, esterilizando-se em autoclave a 121° C, 1 atm por 15 min;
- distribuir alíquotas de 0,05 mL a 0,1 mL em ampolas de vidro previamente esterilizadas. Vários tipos de ampolas estão disponíveis no mercado, podendo ser selecionadas de acordo com o sistema de liofilização. Devem ser previamente vedadas com rolhas de algodão hidrófobo e esterilizadas por calor seco;
- congelar à razão de 1,0 °C/min até -30 °C. Este congelamento pode ser feito em aparelhos apropriados ou, de modo alternativo, pode se empregar um banho de gelo seco e acetona, com resultados razoáveis;
- submeter as ampolas à secagem à vácuo em liofilizador (10 µm Hg) por 12 h a 18 h. Após este período, a suspensão apresenta um aspecto seco, podendo mesmo descolar-se das paredes da ampola.

Liofilizadores variados encontram-se disponíveis no mercado, mas sistemas bastante satisfatórios podem ser montados manualmente, levando a bons resultados (Simione, 1988). Há liofilizadores do tipo centrífuga onde as ampolas acondicionadas no rotor, são congeladas seguindo-se a secagem à vácuo no mesmo local. Em seguida as ampolas são retiradas, submetidas a uma secagem secundária, à temperatura ambiente e à vácuo, mas agora acopladas em saídas individualizadas da árvore ou “manifold” do aparelho, sendo então seladas depois de secas, utilizando-se chama de maçarico e mantendo-se o vácuo interno das ampolas. Outra alternativa, é a colocação das ampolas em prateleiras do liofilizador, ao invés de rotor, procedendo-se do mesmo modo, exceto da centrifugação.

Como a secagem ocorre primeiro nas camadas superiores da suspensão contida na ampola, é conveniente evitar volumes que gerem uma relação grande entre a altura do líquido e o diâmetro da ampola, o que retardaria a secagem, já que a camada superior já seca retarda a saída da água das camadas inferiores.

É importante que as ampolas sejam seladas à vácuo pois tanto o oxigênio, como a umidade residual podem contribuir para a perda da viabilidade (Silva, 1990).

Recuperação das culturas:

- marcar a ampola com um cortador de vidro, fazendo-se um risco na região acima do liofilizado;
- fazer assepsia local com álcool e quebrar a ampola em condições de assepsia;
- ressuspender o seu conteúdo em meio de cultura líquido (5 mL), permitindo a reidratação por cinco a 10 minutos e incubando-se em condições apropriadas.

Um período maior de cultivo pode ser necessário para a recuperação da cultura.

É recomendado que se façam controles do número de células viáveis e da presença de contaminação na cultura antes e depois da liofilização. Isto é feito pela observação de esfregaços corados pelo método de Gram (capítulo 2) e pela determinação de UFC/mL.

As células a serem liofilizadas devem ser suspensas em meios apropriados, que diminuam os danos causados pelo processo, já que o congelamento e a secagem são deletérios. As substâncias empregadas como protetores pertencem a classes diferentes e o seu mecanismo de atuação não se encontra completamente esclarecido. Entre as mais citadas na literatura, encontram-se os próprios meios de cultivo, glutamato de sódio, leite desnatado, dextrana, sacarose, soros equino e bovino (Lapage, 1970). Trabalhos têm demonstrado que a natureza deste meio protetor, associada à condição de cultivo e velocidade de congelamento, desempenham papel decisivo na obtenção de elevados níveis de viabilidade de muitas espécies bacterianas liofilizadas. (Silva, 1990). Não obstante, especialistas em rizóbios demonstraram que nem a idade da cultura, nem a concentração celular influem na sobrevivência destas células quando liofilizadas (Dye, 1982), ao contrário de outras espécies que devem, preferencialmente, ser mantidas quando em final de fase logarítmica de crescimento. Tais resultados evidenciam, novamente, a variabilidade com a espécie de bactéria. A natureza do protetor empregado por estes autores na fase de congelamento, influenciou nos resultados e a extensão do armazenamento a 4°C mostrou-se dependente, também, da estirpe estudada.

O emprego da liofilização tem sido recomendado para rizóbios, mantendo-os por longos períodos (11 a 30 anos) sem perda de sua infectividade e efetividade. (Dye, 1982; Atthasampuna et al., 1988). Assume-se que a atividade metabólica é reduzida, nesta forma de preservação, pela redução da temperatura e remoção de água. O armazenamento das ampolas em refrigerador (4° a 8°C) é mais recomendado, pois a mortalidade aumenta com a temperatura.

5.5. Criopreservação

O emprego de temperaturas baixas para manter células é conhecido de longa data, justificando-se pela inibição da atividade metabólica celular (Mugleton, 1963). O quanto células, bacterianas ou não, podem sobreviver nestas condições, depende da temperatura empregada, protetores, métodos de resfriamento e descongelamento posterior, cujos mecanismos ainda não se encontram completamente esclarecidos. Este método passou a ser utilizado, com maior frequência, a partir do aperfeiçoamento dos sistemas de refrigeração e da maior disponibilidade de nitrogênio líquido. Temperaturas de -20° C, -30° C, -40° C, -70° C, -140° C e -196° C têm sido empregadas, acima de -30° C, em geral, os resultados são insatisfatórios.

Procedimento para criopreservação:

- partir de uma cultura bacteriana em meio líquido YM ou o meio de Lopreto et al. (1972), em agitador rotativo a 250 rpm, 28° - 30° C;
- misturar volumes iguais da cultura e de uma solução protetora, que pode ser uma solução de glicerol a 20%, esterilizada em autoclave;
- distribuir alíquotas em ampolas, de plástico resistente ou polipropileno, esterilizadas;

- congelar, reduzindo-se a temperatura na taxa de $1,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até -50°C , mantendo-se assim por duas horas;
- imergir as ampolas, dispostas em suportes apropriados, em recipientes para nitrogênio líquido. Variações do método incluem o uso de outros protetores, manutenção de células apenas em vapores do nitrogênio (-140°C) e métodos miniaturizados para melhor aproveitamento de espaço (Kirsop & Henry, 1984).

Controles, para verificar a presença de contaminantes e o número inicial de células viáveis, devem ser feitos antes e depois da preservação, através de observação, em microscópio óptico, de esfregaços corados pelo método de Gram e contagem de UFC/ml.

Para a recuperação, deve-se descongelar, rapidamente, a mistura em banho de água a 37°C , inocular e incubar em meio e condições apropriadas. O descongelamento lento pode ser deletério às células.

A suspensão de bactérias em protetor pode também ser distribuída em pérolas de vidro que são armazenadas, de modo alternativo, a -70°C , retirando-se uma bolinha e inoculando-se em meio de cultura para a recuperação.

A necessidade de se otimizarem as condições de congelamento é evidente, face ao número de fatores e teorias sobre os danos resultantes do congelamento. Na prática, tem-se verificado que alta porcentagem de células sobrevive ao congelamento lento ($1^{\circ}\text{C}/\text{min}$), em contraposição ao congelamento rápido. A 0°C , tem início a formação de gelo, cujos cristais aumentam à medida que a temperatura diminui e, sendo formados de água pura, retiram água livre do meio, aumentando a concentração de sais e eletrólitos na água ainda não congelada. Propriedades da fase não congelada são, então, alteradas (pH, força iônica, propriedades coligativas, tensão superficial e interfacial, além de potencial de óxido-redução). Além disso, macromoléculas podem aproximar-se, favorecendo a sua interação. Danos mecânicos oriundos de cristais de gelo são também mencionados por alguns autores (Fujikawa & Miura, 1986; Pitombo, 1989).

A extensão dos danos causados pelo congelamento e descongelamento em bactérias é classificada, por alguns autores, no mesmo nível daqueles produzidos por raios X a nível de DNA (Williams & Calcott, 1982) sendo, porém, mais críticos em células eucarióticas.

A despeito de todos estes riscos de danos, a superioridade deste método tem sido ressaltada por vários autores, tendo sido empregado para células animais e outras linhagens com sucesso (Kirsop, 1984). É indicado para a manutenção por longos períodos, já que os níveis iniciais de viabilidade são mantidos, ao contrário da liofilização, cuja perda inicial induzida pode ser da ordem de 90%, mas sem perdas adicionais ao longo do tempo de estoque. Como desvantagens, há o custo elevado, grande demanda de nitrogênio líquido, bem como vigilância constante para a manutenção das culturas imersas no nitrogênio.

5.6. Considerações Finais

Pelo exposto na descrição e comentários, fica evidente que linhagens de interesse específico merecem atenção especial e estudo individualizado no que se refere à escolha do método de manutenção. O emprego de mais de um método, simultaneamente, é recomendado até que se tenha conhecimento daquele mais apropriado a cada cultura. A literatura traz importantes subsídios, servindo como orientação, mas muitos resultados não podem ser amplamente extrapolados para todas as espécies, dependendo da experiência prática.

5.7. Referências Bibliográficas

- ATTHASAMPUNA, P.; DAENGSUBHA, W.; BUDHAKA, P. ; BOONKERD, N. Viability of the freeze-dried *Rhizobium* cultures and their nitrogen-fixing abilities. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF CULTURE COLLECTIONS, 6, 1988, Maryland. **Abstracts**. Maryland: WFCC/ University, 1988. p.76.
- CRIST, D. K.; WYZA, R. E.; MILLS, K. K.; BAUER, W. D.; EVANS, W. R. Preservation of *Rhizobium* viability and symbiotic infectivity by suspension in suspension in water. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.47, p.595-600, 1984.
- DE LEÓN, R.; CASTELLANOS, M.; ROLZ, C. Storage in water of *Rhizobium phaseoli* cells harvested from continuous cultures and its effect on biological nitrogen fixation. **Biotechnol. Lett.**, v.10, p.509-512, 1988.
- DYE, M. A note on some factors affecting the survival of *Rhizobium* cultures during freeze-drying and subsequent storage. **J. Appl. Bacteriol.**, v.52,p.461-4, 1982.
- FUJIKAWA, S.; MIURA, K. Plasma membrane ultrastructural changes caused by mechanical stress in the formation of extracellular ice as a primary cause of slow freezing injury in fruit bodies of *Basidiomycetes*. **Cryobiology**, v.23, p.371-82, 1983.
- HILL, L. R. Preservation of microorganisms. In: NORRIS, J. D.; RICHMOND, M. H., eds. **Essays in Applied Microbiology**. Chichester: John Wiley, 1981. p.1-30.
- HILL, L. R., KOMAGATA, K.; GERNA. Resource centres. In: HILL L.R.; KIRSOP, B.E: **Living resources for biotechnology**; bacteria. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p. 1-21.
- IACOBELLIS, N. S.; De VAY, J. E. Long-term storage of plant-pathogenic bacteria in sterile distilled water. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.52, p.388-389, 1986.
- KIRSOP, B. E.; HENRY, J. E. Development of a miniaturised cryopreservation method for a wide range of yeasts. **Cryoletters**, v.5, p.191-200, 1984.

- KREMER, R. J.; PETERSON, H. L. Effects of carrier and temperature on survival of *Rhizobium spp.* in legume inocula: development of an improved type of inoculant. **App. Environ. Microbiol.**, v.45, p.1790-1794, 1983.
- LAPAGE, S. P.; SHELTON, J. E.; MITCHELL, T.C.; MACKENZIE, A. R. Culture collection and preservation of bacteria. **Methods Microbiol.**, v.3A, p.135-228, 1970.
- LOPRETO, C. R.; MAZZA, L. A.; BALATTI, A. P. Influencia de los componentes del medio de cultivo sobre el tiempo de generacion de una cepa de *Rhizobium japonicum* . **An. Soc. Cient. Argentina**, v.193, p.35-47, 1972.
- MUGGLETON, P.W. The preservation of cultures. **Progr. Ind. Microbiol**, v.4, p.191-214, 1963.
- PEREIRA, A. L.; ZAGATTO, A. G.; FIGUEIREDO, M. B. Preservação e virulência de bactérias mantidas em água destilada. **Biológico**, v.11, p.311-14, 1970.
- PITOMBO, R. N. M. A liofilização como técnica de conservação de material de pesquisa. **Cienc. Cult.**, v.41, p.427-431, 1989.
- PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. Liofilização. In: **TÉCNICA Farmacêutica e Farmácia Galênica**, v.1. 3a. ed. Lisboa: Fund. Calouste Gulbenkian, 1981. p.251-299.
- SILVA, L. F. **Comparação de métodos de preservação de leveduras de interesse industrial**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1990. 151 p. (Tese de Mestrado).
- SILVA, L. F.; CRUZ, M. R. M.; OLIVEIRA, M. S. Different methods for the preservation of *Bradyrhizobium japonicum* used as legume inoculant in Brazil. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF CULTURE COLLECTIONS, 6, 1988, Maryland. **Abstracts**. Maryland: WFCC/ Univ.of Maryland, 1988. p.73.
- SIMIONE Jr., F.P. Freezing and freeze-drying as a means of preservation of microorganisms. In: WORKSHOP ON PRESERVATION OF MICROORGANISMS, 1, 1988, Maryland. **Proceedings**. Maryland: UNESCO/WFCC, 1988. p.13-80.
- SNELL, J. J. General introduction to maintenance methods In: KIRSOP, B. E.; SNELL, J. J. ed. **Maintenance of microorganisms: a manual of laboratory methods**. London: Academic Press, 1984. p.11-21.
- WILLIAMS, D. L.; CALCOTT, P.H. Role of DNA repair genes and R plasmids conferring cryoresistance on *Pseudomonas aeruginosa*. **J.Gen. Microbiol.**, v.128, p.215-218, 1982.

CULTIVO EM ESCALA COMERCIAL

Fábio F. de Araújo¹

6.1. Introdução

A produção de inoculantes a nível industrial, no Brasil, teve início na década de 50 no Rio Grande do Sul, mas somente na década de 70, com a expansão da cultura da soja, que novas indústrias foram criadas no país. A tecnologia para o cultivo em escala comercial não acompanhou o avanço das pesquisas nos últimos anos devido a vários fatores. Pode-se citar, entre estes, o custo final do insumo e a pouca exigência, por qualidade, feita pelos agricultores. Atualmente, as indústrias estão envolvidas na modernização, com a implantação de novas tecnologias de produção em grande escala, o que garantirá uma melhoria na qualidade do inoculante.

No cultivo em escala comercial busca-se, principalmente, a otimização de todas as etapas do processo. Desta forma, a relação custo-benefício é explorada em todas as etapas industriais, desde a preparação da turfa até a embalagem do inoculante. Para obter maior eficiência do processo, as indústrias sempre estão à procura de tecnologia de baixo custo, que envolvam desenvolvimento de novos meios de cultivo, processos fermentativos, novos veículos para o rizóbio, métodos de esterilização dos produtos, entre outros.

6.2. Componentes Essenciais para Produção de Inoculantes

6.2.1. O Veículo ou Substrato

O inoculante à base de turfa é o principal veículo utilizado pelas indústrias, mas algumas delas desenvolveram veículos alternativos. A turfa, para a produção de inoculante, deve possuir elevado teor de matéria orgânica (acima de 50%) e baixos teores de cloretos e areia (Araújo, 1982). Após a secagem e moagem, o pH da turfa é corrigido com calcário dolomítico (pH final: 6,5 a 7,0), propiciando um ambiente adequado para o rizóbio. A turfa é, então, acondicionada nos pacotes para esterilização. Quase todas as indústrias utilizam a autoclavagem (calor úmido) como processo de esterilização, mas alguns autores condenam este método, devido a perdas na qualidade da turfa, que ocorrem após o aquecimento a temperaturas superiores a 100°C (Thompson, 1991).

¹ Engenheiro-agrônomo, curso de pós-graduação na Universidade Estadual de Londrina e EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), Cx. Postal 1061, CEP 86001-970, Londrina, PR.

A esterilização, através de radiação gama, é a mais indicada para turfa. Esta técnica é amplamente utilizada em outros países e a dosagem mais eficiente é a de 5 Mrad (Somassegaran & Hoben, 1985). No Brasil, o tratamento da turfa, com radiação, aumenta o custo de produção do inoculante, o que desestimula algumas indústrias a investirem no processo. Entretanto, com as mudanças a serem implementadas na legislação brasileira sobre inoculantes, exigindo um inoculante mais concentrado e com baixo índice de contaminantes, certamente as indústrias investirão neste tratamento.

6.2.2. Meios de Cultura

Atualmente, o meio de cultura mais utilizado nas indústrias de inoculante é uma modificação do meio de cultura EM (extrato de levedura-manitol, ver capítulo 2) descrito por Vincent (1970), contendo glicerol como fonte de carbono, solução de levedura como fonte de aminoácidos e vitaminas e os seguintes sais minerais: fosfato dibásico de potássio, sulfato de magnésio e cloreto de sódio. Para o cultivo aerado e com agitação, utiliza-se um anti-espumante à base de silicone. Estes componentes do meio de cultura são facilmente encontrados no mercado.

6.2.3. Estirpes de *Rhizobium e Bradyrhizobium*

As indústrias utilizam as estirpes recomendadas oficialmente pela RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação de Estirpes) as quais são referendadas durante reuniões de pesquisa bianuais. Todas as estirpes recomendadas são mantidas no Instituto de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (IPAGRO-RS), que é responsável pela distribuição às indústrias de inoculantes.

6.3. Fermentação em Escala Comercial

Existem diversos métodos para multiplicar o *Rhizobium* a nível industrial, através de cultivo por fermentação contínua ou descontínua (alimentada) (capítulo 4). Algumas indústrias de inoculantes desenvolveram métodos próprios, com modificações nos equipamentos, mas com o mesmo princípio. Alguns deste métodos são simplificados e econômicos, mas com baixa eficiência e com grandes riscos de contaminação. Na Figura 6.1 é apresentado um processo simples de fermentação do rizóbio desenvolvido pela firma Turfal Ltda. (Curitiba, PR), o qual tem como ponto de partida um tubo com a bactéria em meio sólido funcionando como inóculo inicial ("starter"). Deste tubo é preparado uma calda concentrada, obtida através da adição de meio líquido e raspagem das colônias bacterianas previamente multiplicadas no meio sólido. Esta calda é injetada em um recipiente de maior volume contendo meio líquido iniciando-se, então, o processo de fermentação descontínuo. Atualmente, a maioria das indústrias utiliza, para produção de inoculantes, fermentadores de grande capacidade (500 até 2.000 litros), construídos de aço inoxidável e que trabalham em conjunto com pré-fermentadores, tornando a fermentação mais eficiente, e permitindo a obtenção de caldas com concentração superior de 1.10^{10} céls./mL.

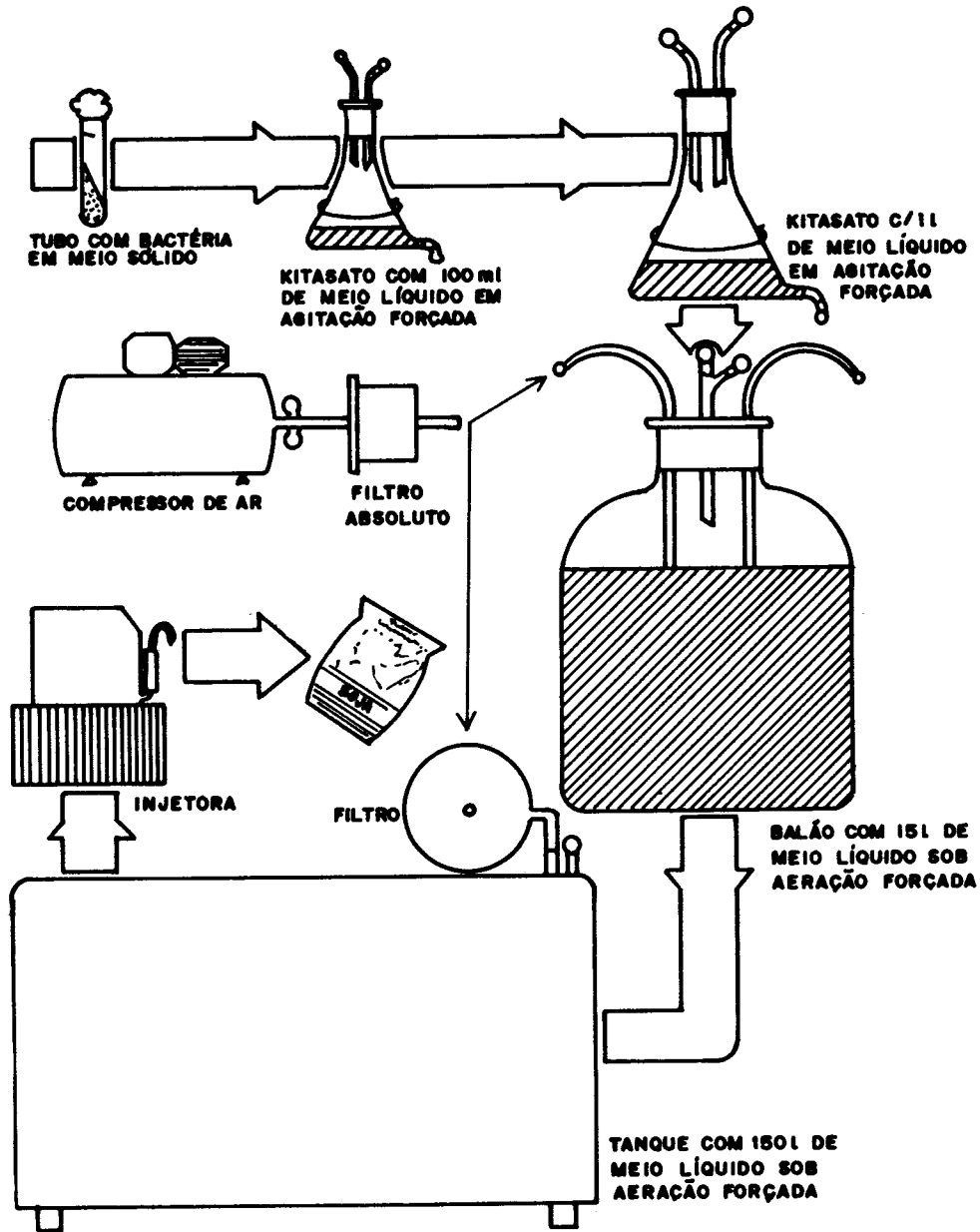


FIGURA 6.1. Processo de fermentação utilizado para a produção de inoculantes pela TURFAL.

6.3.1. Cultivo

As condições de cultivo do rizóbio são um ponto chave para a eficiência na produção de inoculantes. O cultivo é processado a temperatura de 28° a 30° C, com aeração constante. Este fornecimento de ar, muitas vezes, não é controlado durante a fermentação, resultando em perdas no rendimento. A dosagem ideal de oxigênio para a multiplicação da bactéria varia com a espécie de *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium*. Por isso, cada indústria deve otimizar esta dosagem dentro de suas

condições. Roughley (1970) cita que a dosagem de 51 L/h tem sido a mais satisfatória para produção em pequena escala. Deve-se salientar, porém, que o ar a ser injetado deve ser previamente seco e esterilizado por filtração. O tempo de cultivo da bactéria também varia com o tipo de fermentação e a estirpe de rizóbio. No caso da fermentação descontínua, o ideal é trabalhar com a bactéria na fase exponencial de crescimento, evitando perdas no metabolismo do microrganismo. Deste modo, o tempo médio de cultivo é de três dias em cada etapa da fermentação.

6.3.2. Controle de Qualidade do Caldo

Durante a fermentação, faz-se necessário um acompanhamento diário da pureza e concentração do caldo de cultivo e, para isso, são retiradas várias amostras dos fermentadores. A pureza da cultura é verificada através de um microscópio, em lâmina, com colocação de Gram ou, simplesmente, com fucsina. Em caso de dúvida, são realizados outros métodos para identificação do rizóbio (capítulos 2, 4, 7, 8 e 9). A concentração de células no caldo, geralmente, é avaliada por contagem em câmara de Petroff-Hauser. Esta técnica fornece valores aproximados da concentração real, mas o erro de contagem pode ser maior ou menor, dependendo da perícia do observador. Para ser incorporado ao veículo o caldo de cultivo necessita ter uma concentração final superior a 1.10^9 células/mL com pureza determinada (Somassegaran & Hoben, 1985). Atualmente, com novas técnicas de fermentação algumas indústrias chegam a produzir caldo com concentração final acima de 1.10^{10} células/mL.

6.4. Mistura do Caldo ao Veículo (turfa)

Quando se trabalha com veículos esteréis, esta etapa necessita alguns cuidados, pois a injeção do caldo rizobial ao veículo pode facilitar a contaminação do mesmo. Faz-se necessário trabalhar em ambientes desinfestados ou, se possível, dentro de câmaras assépticas. A proporção de inóculo para a quantidade de turfa é variável. A maioria das indústrias trabalha com uma proporção média de 20% de calda concentrada para o volume de turfa. Neste processo, a concentração inicial de células por grama de turfa já está em um patamar ótimo, desprezando-se a multiplicação da bactéria que poderá ocorrer na turfa. Day (1991), em trabalho realizado com a estirpe de *B. japonicum* SEMIA 586 (CB 1809), observou que a utilização de caldo concentrado ou até 1.000 vezes diluído, para injeção na turfa de boa qualidade e esterilizada, proporcionava a mesma concentração final após dez dias de inoculação (Tabela 6.1).

Resultado semelhante foi encontrado por Araújo (1992), trabalhando com *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (SEMIA 4064) em turfa estéril enriquecida com meio de cultivo utilizado na produção industrial.

TABELA 6.1. Número de células de *B. japonicum* SEMIA 586 (CB 1809) em inoculante turfoso produzido pela utilização de caldo concentrado e diluído.

Inoculante	Nº aproximado de céls./mL de caldo injetado	Nº de céls./g de turfa após 10 dias
Caldo concentrado	$1,2 \cdot 10^{10}$	$3,6 \cdot 10^9$
Caldo normal	$1,4 \cdot 10^9$	$3,4 \cdot 10^9$
10X diluído	$1,6 \cdot 10^8$	$3,37 \cdot 10^9$
100X diluído	$1,1 \cdot 10^7$	$3,12 \cdot 10^9$
1.000X diluído	$1,7 \cdot 10^6$	$3,06 \cdot 10^9$

6.5. Armazenamento e Prazo de Validade

O inoculante é, geralmente, armazenado à temperatura ambiente, o que favorece a multiplicação da bactéria. Em caso de outros veículos ou turfa não esterilizada, o ideal é o armazenamento em câmaras frias a 5° C. Hoje, como a produção de inoculantes no Brasil é processada à base de turfa desinfestada sem alta concentração de rizóbio, o prazo de validade é de seis meses após a fabricação. Em caso de inoculantes produzidos com veículos estéreis, a qualidade do produto prolonga-se por mais tempo.

6.6. Controle de Qualidade do Inoculante

A qualidade de qualquer produto é de responsabilidade do fabricante, mas o produto pode estar sujeito à regulamentação oficial. As indústrias de inoculantes possuem estruturas equipadas para a realização do controle de qualidade em cada lote de inoculante produzido controlando, desta forma, a qualidade do produto. O controle, quase sempre, é realizado pelo método de infecção em planta (Vincent, 1990) (capítulo 3). A desvantagem deste método é o tempo mínimo para a obtenção dos resultados, de cerca de 30 dias. Nas indústrias que trabalham com veículos estéreis, é possível proceder uma avaliação da qualidade através da contagem de bactérias em meio de cultura, mas somente para controle interno. Atualmente, a legislação brasileira exige uma concentração mínima de 10^7 células/g de inoculante na hora de utilização pelo produtor, contagem esta utilizada através do número mais provável em plantas (NMP; ver capítulo 3). O Ministério da Agricultura exerce fiscalização periódica em inoculantes através de análises em laboratórios credenciados, que utilizam a mesma metodologia empregada nas indústrias.

É importante salientar que o controle de qualidade de inoculante não se restringe apenas ao produto final. Na Austrália, o programa de controle de qualidade exercido pelo Australian Inoculant Research and Control Service (AIRCS) é fundamentado em todas as etapas da produção industrial, buscando a eficiência total (Thompson, 1980). É imprescindível que as indústrias brasileiras comecem a trabalhar dentro de um programa semelhante visando sintonizar as suas estruturas de produção com as necessidades do mercado. A qualidade final do produto é conseguida a partir do aperfeiçoamento de todas as etapas de produção.

6.7. Comercialização

Atualmente, existem sete indústrias de inoculantes no País, que são responsáveis pelo atendimento à demanda de inoculantes para cerca de 15 milhões de hectares cultivados apenas com soja. O principal mercado consumidor está situado nos Cerrados brasileiros, devido à abertura constante de novas áreas agrícolas para a cultura da soja. Na Região Sul do País, que já vem utilizando a inoculação há mais de 30 anos, somente 10% dos agricultores utilizam a inoculação, o que ocorre pela falta de resposta à inoculação em algumas áreas com alta população de rizóbio naturalizada e, também, pelo descrédito dos agricultores quanto à qualidade dos inoculantes. Outro fator que contribuiu para este quadro atual foi o uso maciço deste produto, na década de 70, agregado ao financiamento agrícola da soja o que forçou o uso do produto com preços reduzidos. Isto reflete no mercado atual, onde se observa que o preço é mais importante, para o agricultor, do que a qualidade. Atualmente, o valor da dose de inoculante (200 g) não ultrapassa os US\$ 0,40, enquanto no mercado internacional este valor fica em torno de US\$ 1,00. Em sua conclusão sobre qualidade de inoculante, Catroux (1991) relatou que os padrões de qualidade propostos, estirpes recomendadas, alta concentração do rizóbio e ausência de contaminantes podem determinar um excessivo custo ao inoculante.

6.8. Considerações Finais

Na safra 1993/1994 foram comercializadas cerca de 10 milhões de doses de inoculantes para a soja, alcançando um bom índice de uso, principalmente pela maior difusão da tecnologia. Contudo, ainda existe um grande potencial de uso deste insumo para a soja e, particularmente, para outras leguminosas, como feijão, ervilha e forrageiras. É importante salientar que os agricultores estão começando a exigir mais informações e resultados sobre o uso do inoculante, o que tem levado as indústrias a procurarem melhorar a qualidade dos produtos. Maiores esforços estão sendo feitos, por parte da indústria, para garantir maior número de células viáveis no inoculante.

6.9. Referências Bibliográficas

ARAÚJO, F. F. **Relatório técnico de pesquisa da TURFAL**. Curitiba: Turfal, 1992. 15 p.

ARAÚJO, S. C. Produção e uso de inoculantes no Brasil. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. ed. **A Soja no Brasil**. São Paulo: ITAL, 1981. p.447-452.

DAY, J. M. Inoculant production in the UK. In: FAO. ed. **Report on the expert consultation on legume inoculation production and quality control**. Rome: FAO, 1991. p.75-86.

SOMASSEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Methods in Legume-Rhizobium Technology**. Hawaii: NIFTAL, 1985. 367p.

THOMPSON, J. A. Production and quality control of legume inoculants. In: BERGERSEN, F.J. ed. **Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation**. John Wiley & Sons, 1980. p.489-533.

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DO RIZÓBIO

Ricardo S. Araujo¹

7.1. Introdução

Na rotina de trabalho de um laboratório onde se realizam pesquisas em microbiologia do solo, são freqüentes as vezes em que se necessita de uma forma para a identificação rápida de um determinado organismo, sobretudo das estirpes de bactérias mais comumente estudadas.

Uma das formas mais rápidas de se identificarem bactérias é através de características morfológicas, como forma e tamanho das células ou colônias e número de flagelos, através de propriedades fisiológicas, como a habilidade de utilizar certos substratos ou de alterar o pH do meio, e através de características bioquímicas como a reação à coloração de Gram. Há inúmeras outras formas pelas quais o microbiologista treinado e perceptivo pode identificar “seus” organismos. Há, por exemplo, aqueles que conhecem, pelo cheiro, se uma placa de cultura de *Rhizobium* está contaminada ou não, ou se as *Escherichia coli* estão crescendo satisfeitas em suas mornas incubadoras.

Neste capítulo serão apresentadas algumas técnicas simples que facilitam a caracterização dos rizóbios. O equipamento mais complexo necessário é um microscópio com uma objetiva de óleo de imersão (100X; ver capítulo 1) e um dispositivo (opcional) para contraste de fase. Cabe ao microbiologista adequar os procedimentos às condições de seu laboratório, combinando-os com sua experiência para melhor identificação dos organismos de trabalho.

7.2. Características Morfológicas

7.2.1. Tamanho das Células

Apesar de não ser possível determinar, com facilidade, as dimensões exatas das células bacterianas, pode-se obter uma noção relativa de seu tamanho pela simples observação de uma cultura ao microscópio. O procedimento é bem simples:

- 1) fazer uma montagem em uma lâmina de microscópio limpa, aplicando cerca de 1/2 alça de cultura líquida ou de células suspensas de placas e cobrindo com uma lamínula;
- 2) levar ao microscópio para observar. Com a objetiva de 40X, observar bem o tamanho, a forma, e o movimento das bactérias na lâmina. Se houver uma corrente muito forte, repetir a montagem, aplicando menos líquido;

¹ Pesquisador, Ph.D., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP), Cx. Postal 179, CEP 74001-970, Goiânia, GO.

- 3) mudar para a objetiva de 100X (óleo de imersão) e repetir as observações. Neste ponto, o microbiologista deve decidir qual das duas ampliações é mais confortável a seus olhos, permitindo-lhe maior tempo de observação de espécies e agilidade em sua identificação.

7.2.2. Forma da Célula

As células bacterianas apresentam as mais variadas formas, indo desde bastonetes retos a espirais, cocos (esferas), ramificadas e outras formas bizarras. Os rizóbios são relativamente desinteressantes no que se refere à forma das células que, em cultura, são bastonetes. Sua forma pode ser facilmente observada na montagem da seção anterior.

Uma maneira um pouco menos tediosa de se observar a forma das células bacterianas é através de uma simples coloração. Os rizóbios são facilmente coloridos pelo procedimento abaixo:

- 1) transferir uma alça de água destilada esterilizada para uma lâmina de microscópio limpa. Com a alça esterilizada na chama de um bico de Bunsen, transferir um pouco de material de uma colônia, tirada de uma placa, para a água na lâmina e misturar bem. Espalhar para cobrir uma área de 1 cm²;
- 2) para culturas líquidas, transferir uma alça de cultura diretamente para a lâmina e espalhar por uma área de cerca de 1 cm²;
- 3) deixar os esfregaços secarem ao ar, fixá-los ao calor da chama de bico de Bunsen e deixar esfriar;
- 4) cobrir a lâmina com solução de fucsina carbólica diluída por 60 segundos. Enxaguar cuidadosamente em água corrente e secar em papel absorvente.

Solução de fucsina carbólica:

Fucsina básica	1g
Etanol	10mL
Solução de fenol a 5%	100mL

- 5) observar ao microscópio com objetivas de 40X e 100X.

Quando isolados diretamente dos nódulos, os rizóbios, na forma de bacteróides, podem apresentar alguma variação morfológica. Os bacteróides de nódulos de trevo (Figura 7.1), por exemplo, podem ter as formas de tacapes, tês (T), agás (H), ípsilons (Y) e cruzes (X).



FIGURA 7.1.
Microfotografia eletrônica de bacteróides isolados dos nódulos de trevo.

Alguns outros, como os dos nódulos do feijoeiro, não apresentam formas bizarras, apenas são maiores que as células em cultura. A preparação de lâminas para a observação de bacteróides é simples:

- 1) retirar um ou mais nódulos das raízes lavadas de uma leguminosa;
- 2) desinfestar a superfície do nódulo por imersão, com agitação, em solução de água sanitária comercial a 40% (v/v), por 1 min, seguida de três lavagens, sucessivas, de 1 min cada, com água destilada esterilizada;
- 3) transferir o nódulo para um tubo de ensaio, adicionar cerca de 0,5 mL de água destilada esterilizada, e macerá-lo com um bastão de vidro até obter uma suspensão leitosa; acrescentar mais nódulos ou água se for necessário;
- 4) fazer um esfregaço, com uma pipeta Pasteur, do macerado de nódulos sobre uma lâmina de microscópio limpa e secar o esfregaço passando a lâmina, rapidamente, algumas vezes, sobre a chama de um bico de Bunsen. Deixar esfriar;
- 5) cobrir o esfregaço com a solução de violeta cristal para o teste de coloração de Gram (ver capítulo 2), e deixar repousar por 5 min à temperatura ambiente;
- 6) lavar a lâmina sob água corrente para remover o excesso de corante, e deixar secar ao ar.

Observar ao microscópio sem lamínula, aplicando o óleo de imersão diretamente sobre o esfregaço. Os bacteróides estarão coloridos de violeta.

7.2.3. Motilidade

Os rizóbios são bactérias que exibem movimento característico, relativamente lento. O movimento das células pode ser observado ao microscópio nas mesmas montagens empregadas para a observação de seu tamanho. Se as bactérias não estiverem sendo arrastadas pela corrente sob a lamínula, pode-se observar seu movimento ativo. é também comum observarem-se células cujos flagelos estão presos à lamínula e que, por isso, não conseguem se deslocar, mas se movem em torno do mesmo eixo, continuamente.

Uma forma indireta de se observar o movimento dos rizóbios é através de placas de motilidade. Nestes testes, empregam-se placas com meio de cultura “mole”, em que as células migram, e o movimento é medido em termos do diâmetro da zona de migração.

Procedimento:

- 1) preparar placas com meio de cultura YM (capítulo 2) ou TY (capítulo 10) com 0,5% de ágar. Observar, ao verter o meio, que as placas sejam e estejam completamente planas. Guardar as placas em geladeira por dois a três dias, antes do uso. Retirá-las da geladeira cerca de duas horas antes de inoculá-las, para secar a condensação;
- 2) preparar culturas matrizes das estirpes em teste, repicando-as para placas com meio sólido (utilizar o meio das placas de motilidade). Incubar a 28° C, até o pleno desenvolvimento das colônias;

- 3) utilizando palitos de madeira esterilizados, transferir o inóculo das placas matrizes para as placas de motilidade, apenas espetando o meio mole com os palitos contendo inóculo. Várias repetições da mesma estirpe podem ser inoculadas na mesma placa e em placas separadas;
- 4) incubar as placas a 28° C por dois a 10 dias, dependendo da velocidade de crescimento, medindo o diâmetro das zonas de migração, com régua, diariamente. Com este procedimento pode-se, inclusive, comparar as taxas de migração de diferentes estirpes em meio de cultura. É, ainda, um excelente procedimento para a identificação de mutantes com motilidade alterada (maior, menor, nula), após inserção de transpósons (ver capítulo 11).

7.2.4. Flagelos

Os flagelos são interessantes estruturas bacterianas que participam da locomoção celular. Em alguns casos pode ser interessante determinar, por exemplo, se mutantes não-motivos perderam seus flagelos. O procedimento a seguir pode ser empregado para a coloração de flagelos para a observação microscópica:

- 1) crescer as culturas em tubos com meio de cultura apropriado, solidificado com ágar a 1,5%, e inclinado. Cerca de meia hora antes de fazer a amostragem, adicionar um volume de solução de peptona (5 g/L), para onde as bactérias nadarão;
- 2) centrifugar esse líquido e lavar o pellet mais uma vez com solução de peptona (5 g/L). Centrifugar novamente. Ressuspender cuidadosamente (para evitar perda dos flagelos) em solução aquosa de formalina a 10% (v/v), até ficar ligeiramente turvo;
- 3) deixar o conteúdo de uma alça dessa suspensão correr por uma lâmina de microscópio limpa, inclinada a 45° e secar ao ar;
- 4) com um lápis próprio para marcar vidros, desenhar um retângulo ao redor do esfregaço.
- 5) transferir 1 mL da solução de corante para a lâmina, sem deixar vazar sobre as bordas do retângulo. Deixar colorir por sete a 15 min. O tempo ideal de coloração deve ser determinado experimentalmente para cada caso.

Assim que começar a se formar uma película dourada sobre a superfície do corante e aparecer um precipitado quando a lâmina for iluminada por baixo, dispensar a película de corante fazendo-a flutuar, em água corrente, sobre a lâmina. Deixar secar ao ar e examinar ao microscópio. As bactérias e os flagelos adquirem coloração vermelha.

7.2.5. Forma das Colônias

As bactérias podem organizar-se em colônias com características distintas, tanto na natureza, como em meio de cultura líquido ou sólido. Por exemplo, as células podem estar arrançadas individualmente, em pares, em cadeias, tétrades e filamentos. Os rizóbios aparecem, em meio líquido, como células individuais e, às vezes, em aglomerados sem forma distinta.

Em meio sólido, as colônias de rizóbios são, geralmente, discretas, redondas, variando de achatadas a cônicas, ou até em forma de cúpula (Figura 7.2). As margens das colônias são normalmente lisas. Quando as colônias crescem sob a superfície do meio elas adquirem a forma característica de lentes biconvexas.

As colônias dos rizóbios podem ser branco opaco, ou leitosas, e até translúcidas. Elas podem ser brilhosas ou foscas, podendo escurecer no centro quando a cultura fica mais velha. Alguns rizóbios podem produzir colônias rosadas ou amareladas, mas são incomuns.

O tempo necessário para as colônias atingirem seu máximo desenvolvimento, em placas, varia de 3 a 5 dias para estirpes de crescimento rápido (4 mm-5 mm) até 7 a 12 dias no caso das estirpes de crescimento mais lento (1 mm-4 mm). A velocidade de crescimento varia com a temperatura de incubação, a origem do inóculo (cultura ou nódulo) e a composição do meio. O tamanho das colônias também pode diminuir em placas superpovoadas.

Algumas estirpes de rizóbios, sobretudo as de crescimento rápido, apresentam colônias com aspecto bastante gomoso (Figura 7.3), principalmente em placas com meio de cultura rico em carbono (ex.: YM). Em alguns casos, as colônias chegam a pingar nas tampas das placas que são incubadas invertidas. Esse aspecto gomoso se deve à produção de exopolissacarídeos (EPS), polímeros de glicose e outras hexoses que compõem as cápsulas das bactérias (Figura 7.4). Em meios de cultura com baixo teor de carbono (ex.: TY, LB), as bactérias tendem a produzir colônias “secas”. As cápsulas bacterianas podem ser observadas por coloração e microscopia. Os dois métodos descritos a seguir são excelentes para essa finalidade.

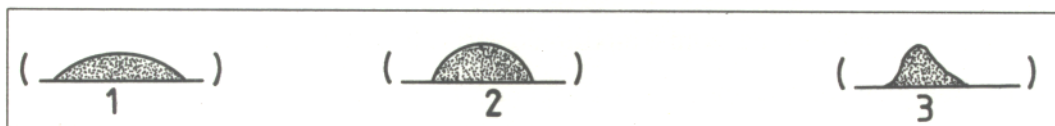


FIGURA 7.2. Tipos de colônias de rizóbios em placas com meio sólido: 1- colônia achatada; 2- colônia em forma de cúpula; e 3- colônia cônica.

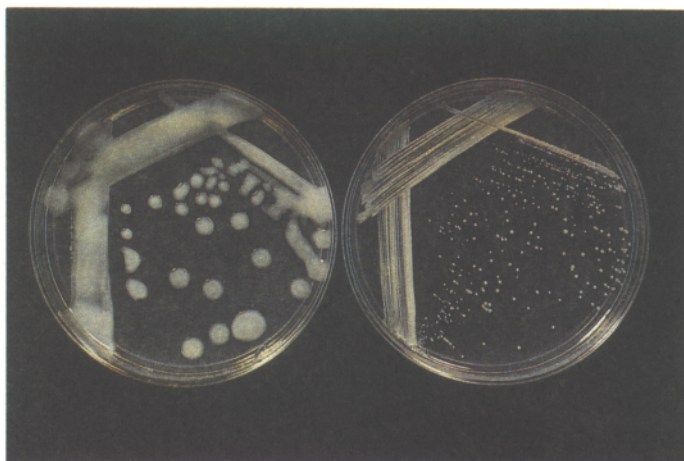


FIGURA 7.3. Aspecto de colônias de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* em placas com meio YM. À esquerda, colônias gomosas (KIM5s) e à direita, colônias secas (KM5021).

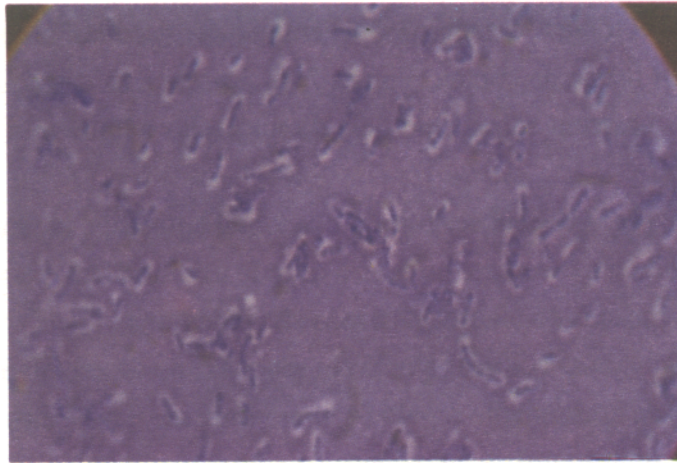


FIGURA 7.4. Cápsulas de *Rhizobium etli* coloridas com violeta cristal.

Procedimento N° 1 (Duguid, 1953)

- 1) transferir uma alça cheia de tinta preta, tipo nanquim, para uma lâmina de microscópio limpa e misturar à tinta uma alça cheia da cultura de bactérias (as bactérias crescidas em placas produzem cápsulas maiores). Cobrir apenas uma parte da mistura com uma lamínula;
- 2) exercer pressão sobre a lamínula, com o auxílio de várias folhas de papel absorvente, até o aparecimento de um fluido de cor marrom;
- 3) examinar ao microscópio com objetivas de 40X e 100X (imersão). As cápsulas aparecem como zonas claras ao redor do organismo, contra o fundo escuro.

Procedimento N° 2 (Araujo, 1993)

- 1) partindo de culturas novas, em placas, fazer suspensões celulares em água, de forma a gerar uma suspensão turva;
- 2) preparar esfregaços dessas suspensões em lâminas de microscópio limpas e fixá-los levemente ao calor;
- 3) colorir os esfregaços por 5 min, submergindo as lâminas em solução de violeta cristal da coloração de Gram (ver capítulo 2). Lavar, gentilmente, com água corrente e deixar secar ao ar;
- 4) examinar em óleo de imersão ao microscópio.

As células bacterianas adquirem a cor violeta, enquanto as cápsulas, ao seu redor, permanecem descoloridas (Figura 7.4).

7.2.6. Inclusões Celulares

Os rizóbios apresentam, em suas células, grandes inclusões de poli- β -hidroxibutirato. O método a seguir é eficiente para colorir essas inclusões, facilitando sua observação e demonstração.

Procedimento:

- 1) preparar um esfregaço da mistura, conforme descrito na seção 7.2.2, e imergir numa solução de negro-sudão a 0,3% (p/v) em etilenoglicol, filtrada. Deixar colorir por 15 min, determinando o tempo ideal experimentalmente;
- 2) drenar e deixar secar ao ar, sobre papel absorvente;
- 3) imergir e retirar a lâmina, várias vezes, em xileno, e secar sobre papel absorvente;
- 4) tratar a lâmina em água corrente, secar sobre papel absorvente, e examinar.

As inclusões de poli- β -hidroxibutirato aparecem como gotas azul-escuras, enquanto as partes citoplasmáticas do organismo adquirem uma coloração rosada.

7.2.7. Microscopia de Contraste de Fase

Quando se dispõe de um microscópio com dispositivo para contraste de fase (ver capítulo 1), pode-se empregar esse recurso para observar a morfologia celular dos rizóbios, para contagens microscópicas, etc.

Podem-se utilizar montagens a úmido, conforme descrito na seção 7.2.1. Deve-se verificar que o microscópio esteja devidamente ajustado para o contraste de fase, de acordo com as instruções do fabricante. Podem-se observar as lâminas com as objetivas de 40X a 100X (imersão). Os rizóbios aparecem como células escuras, variando de cinza a violeta, dependendo do microscópio, contra um fundo claro.

7.3. Características Fisiológicas

7.3.1. Taxa de crescimento

Uma das características mais importantes nos estudos de bactérias, sobretudo os de fisiologia e genética, é a taxa de crescimento das estirpes, ou seja, o tempo de geração nos diferentes meios de cultura empregados nas atividades de pesquisa. Essas informações servem, por exemplo, para se verificar a pureza e a estabilidade cultural das estirpes. A elaboração de curvas de crescimento e determinação dos tempos de geração foram detalhadas no capítulo 4.

7.3.2. Absorção de Corantes

As células dos rizóbios geralmente não absorvem o corante vermelho-congo quando as placas são incubadas no escuro. Essa propriedade permite que se empregue este corante em estudos que envolvam o plaqueamento de misturas de outras bactérias com os rizóbios (capítulo 2).

Após o crescimento, as colônias dos contaminantes adquirem cor vermelha forte, enquanto as dos rizóbios permanecem brancas ou levemente rosadas (ver capítulos 2 e 4). A reação depende da concentração de vermelho congo e da idade da cultura. As colônias dos rizóbios absorvem o corante se as placas forem incubadas à luz, ou se forem expostas à luz durante uma hora ou mais após ter ocorrido o crescimento. No caso de culturas muito velhas de rizóbios que acidificam o meio (ver 7.3.3), pode haver uma mudança na coloração do meio, que passa a violeta devido à acidez. Para maiores detalhes ver os capítulos 2 e 4.

7.3.3. Modificação do pH do Meio de Cultura

De uma forma bem grosseira, os rizóbios podem ser divididos em três classes quanto à reação de indicadores de pH adicionados ao meio de cultura: estirpes que acidificam o meio, estirpes que alcalinizam o meio, e estirpes que não alteram o pH do meio de cultura. As placas do meio YM adicionadas de azul de bromotimol (capítulo 2), recém-preparadas, têm um pH em torno de 6,8 e a cor verde. Os rizóbios de crescimento lento tendem a alcalinizar o meio de cultura, causando uma mudança na cor do indicador, nas placas, para azul. Os rizóbios de crescimento rápido costumam apresentar reação ácida, tornando o meio de cultura amarelo (Figura 7.5). A observação da cor do meio de cultura, nessas placas, permite a detecção rápida de contaminantes nas culturas de trabalho.

7.3.4. Crescimento em Meios Modificados

Quando não se dispõe de manitol e extrato de levedura pode-se modificar o meio de cultura básico, pois os rizóbios são capazes de utilizar carbono e nitrogênio de outras fontes. O procedimento abaixo ajuda a determinar as condições mais adequadas para o crescimento das estirpes de interesse.

- 1) preparar 1500 mL de uma solução contendo apenas os sais do meio YM (capítulo 2). Adicionar 28 g de ágar e derreter na autoclave ou em banho-maria. Dispensar o meio de cultura em volumes de 12 mL para tubos de ensaio. Esterilizar esses tubos com meio na autoclave e mantê-los derretidos em um banho-maria a 48° C;
- 2) preparar solução estoque, a 10 g/100 mL, de manitol, sacarose, arabinose e glicerol. Esterilizar a solução de arabinose por filtração e as demais na autoclave;
- 3) preparar água de levedura (capítulo 4) e solução de extrato de levedura a 0,5 g/100 mL, extrato de soja a 0,4 g/100 mL e NH₄Cl a 0,4 g/100 mL. Esterilizar na autoclave;
- 4) pipetar para dentro de placas de Petri esterilizadas, separadamente, 1,5 mL de cada uma das soluções do item 2 acima e 1,5 mL de cada uma das soluções do item 3 acima e adicionar, em cada placa, o conteúdo de um tubo com meio com ágar e sais, de forma a obter todas as 16 combinações possíveis entre fontes de carbono e de nitrogênio;
- 5) misturar imediatamente após a adição do ágar, girando as placas para incorporar as soluções ao meio. Deixar as placas assentarem durante uma noite;
- 6) inocular as placas com as culturas em teste e comparar o crescimento nos diferentes meios após três a 10 dias de incubação à temperatura apropriada.

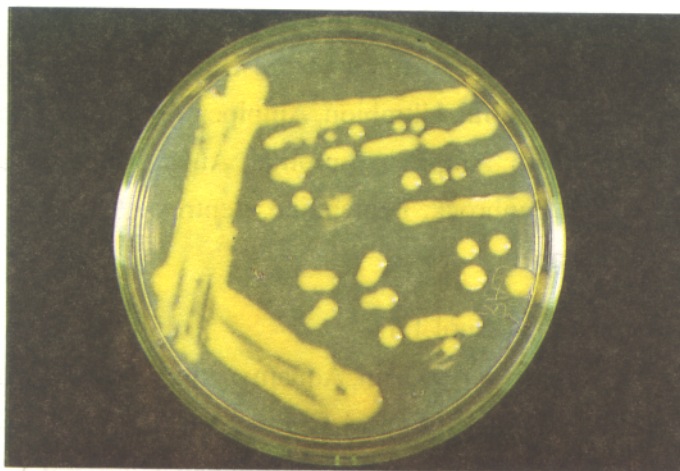


FIGURA 7.5. Colônias de *Rhizobium tropici* CIAT899 em placas com meio YM contendo azul de bromotimol. Colônias amareladas porque absorvem o corante acidificado.

7.3.5. Resistência Intrínseca a Antibióticos

A habilidade dos rizóbios de resistir, naturalmente, a concentrações baixas de diferentes antibióticos permite a elaboração de antibiogramas para as estirpes de interesse. A resistência intrínseca aos antibióticos (RIA) pode ser empregada, em rizobiologia, para comparar e/ou caracterizar diferentes estirpes, para auxiliar a escolha de estirpes para estudos de sorologia e como marcador de estirpes empregadas em estudos ecológicos. Os resultados obtidos em diferentes laboratórios demonstram que é possível, em muitos casos, distinguir estirpes, crescendo em meio YM contendo antibióticos, por intermédio de seu crescimento diferencial. Não se deve assumir, porém, que é sempre possível distinguir entre estirpes por meio da RIA, entendendo-se que quanto maior for o número de antibióticos empregados na comparação das estirpes, maiores são as chances de observar diferenças. É importante que se padronizem as condições de ensaio, em cada laboratório, com a finalidade de se obter reprodutividade. A composição e pH do meio de cultura, as técnicas de esterilização, a temperatura do meio de cultura no momento da adição dos antibióticos, o volume de meio de cultura em cada placa, o estágio de crescimento da cultura em teste e a quantidade de inóculo são alguns dos aspectos que podem e devem ser padronizados. Um outro fator crítico é a preparação das soluções estoque de antibióticos. A seguir, são apresentadas instruções sobre como preparar soluções estoque dos antibióticos mais comumente empregados nesses estudos.

Relação de antibióticos, veículos para solução e nomes comerciais de produtos contendo o princípio ativo (produtos que podem ser encontrados em farmácias)

1) ácido nalidíxico - dissolver em água-metanol 1:1

Nomes comerciais: Betaxina, Cybis, Dixiben, Eucisten, Innoxalon, Kusnarin, Nalidicon, Nalitucsan, Narigix, NegGram, Nevigramon, Nicelate, Nogram, Poleon, Specifin, Uriben, Uriclar, Uralgin, Urodixin, Uroman, Uroneg, Uropan, Wintomylon.

2) Ampicilina - dissolver em água-etanol 1:1

Nomes comerciais: Adobacillin, Alpen, Anfipen, Ampí-Bol, Bonapicilin, Grampenil, Guicitrina, Copharcilin, Nuvapen, Synpenin, Viccillin, Ultrabion, Ampipenin, Amplisom, Ampimed, Ampí-Penyl, Totalciclina, Ampipenix s, Amblosin, Ampicin, Amplital, Austrapen, Binotal, Britacil, Doktacillin, Marisilan, Pen-Bristol, Penbritin, Penbrock, Peniciclina, Pentrex, Pentrexyl, Ponecil, Polycillin, QI Damp, Tokiocillin, Totacillin, Totapen.

3) Cloranfenicol - dissolver em água-etanol 1:1

Nomes comerciais: Aflicetyn, Amphicol, Anacetin, Aquamycetin, Austracol, Chemicetina, Chlomycol, Chloramex, Chloramphilin, Chloramsaar, Chlorasol, Chloricol, Chlorocaps, Chlorocid, Chloromycetin, Chloronitrin, Cidocetine, Ciplamycetin, Cloramficin, Cloramicol, Clorócyn, Cloromisan, Cylphenicol, Duphenicol, Embacitin, Enicol, Enteromycetin, Farmicetina, Fenicol, globenicol, Interomycetine, Intramycetin, Juvamycetin, Kamaver, Kemicetyne, Klorita, Leukomycin, Levomicetine, Levomycetin, Loromisin, Mastiphen, Medichol, Mieloretin, Micoclorina, Microcetina, Mychel, Mycinol, Novomycetin, Opclor, Pantovermil, Paraxin, Quemiketina, Ronfenil, Septicol, Sintomicetina, Sno Phenicol, Stanomycetin, Synthomycetine, Tega-Cetin, Teococin, Tifomycine, Treomicetina, Unimycetin, Veticol, Viceton.

4) Eritromicina - dissolver em água-etanol 1:1

Nomes comerciais: Erythromicin A, Abomacetin, EMU, Ery Derm, Ery-Tab, Erythrocin, Erythromast 36, Erythromid, ERYC, Erycin, Erycinum, Ilotycin, Rectin, Staticin, Torlamicina.

5) Espectinomicina - dissolver em água

Nomes comerciais: Spectan, Spectogard, Stanilo, Togamycin, Trobicin.

6) Estreptomicina (sulfato) - dissolver em água

Nomes comerciais: Agristep, Streptobrettin, Streptorex, Vetstrep.

7) Kanamicina (Sulfato) - dissolver em água

Nomes comerciais: Cantrex, Cristalomicina, Kamycin, Kamynex, Kanabristol, Kanacedin, Kanamytrex, Kanasig, Kanatrol, Kanicin, Kannasyn, Kantrex, Kantrox, Klebcil, Otokalixin, Resistomycin (Bayer), Ophthalmokalixan, Kantrexil, Kano, Kanescin, Kanaqua.

8) Neomicina (B sulfato) - dissolver em água-etanol 1:1

Nomes comerciais: Bykomycin, Fraquinol, Myacine, Neosulf, Neomix, Neobrettin, Tuttomycin.

9) Rifampicina - dissolver em água:metanol 1:1

Nomes comerciais: Rifa, Rifadin, Rifadine, Rifaldin, Rifaprodin, Rifobac, Riforal, Rifoldine, Rimactan.

10) Tetraciclina (HCl) - dissolver em água-etanol 1:1

Nomes comerciais: Achro, Achromycin V, AlaTet, Ambracyn, Artomycin, Cefracycline, Cyclopar,

Diacycline, Dumocyclin, Mephacyclin, Partrex, Quadracycline, Quatrex, Remicyclin, Ricycline, Rocyline, Stilciclina, Subamycin, Supramycin, Sustamycin, Tefilin, Teline, Telotrex, Tetrabakat, Tetrabid, Tetrablet, Tetrachel, Tetracomprex, Tetra-D, Tetrakap, Tetralution, Tetramavan, Tetramycin, Tetrosol, Tetra-Wedel, Topicycline, Totomycin, Triphacyclin, Unicin, Unimycin, Vetquamycin-324.

11) Trimethoprim - dissolver em água-metanol 1:1

Nomes comerciais: Monotrim, Proloprim, Syraprim, Tiempo, Trimanyl, Trimopan, Trimpex, Wellcoprim.

Preparo e utilização de soluções de antibióticos

Os antibióticos não podem ser autoclavados, pois eles perdem sua ação. As soluções de antibióticos devem ser preparadas da seguinte forma:

- Pesar o antibiótico - na maioria das vezes são preparadas soluções estoque com a concentração de 100 mg/mL. Pesar 500 mg de antibiótico e transferir para um tubo de ensaio limpo. Adicionar 5 mL de água destilada esterilizada, ou 2,5 mL de etanol ou metanol, conforme o antibiótico, e 2,5 mL de água destilada esterilizada. Dissolver completamente.

- Filtrar a solução em filtro miliporo de 0,2 μm a 0,4 μm , dispensando o filtrado para um tubo de ensaio com tampa rosqueada previamente esterilizado. Não esquecer de anotar no tubo o nome do antibiótico, a data de preparo e a concentração.

- Armazenar as soluções de antibióticos filtradas no congelador ou freezer. Descongelar a solução antes de misturar a quantidade necessária ao meio de cultura. Todo o manuseio das soluções filtradas deve ser feito assepticamente e usando-se pipetas ou ponteiras para pipetadores previamente esterilizadas.

Procedimento:

- 1) preparar as soluções estoque de antibióticos conforme descrito;
- 2) preparar meio de cultura YM com 1,5% de ágar, esterilizar e resfriar em banho-maria para a temperatura de 45° a 55° C;
- 3) incorporar ao meio de cultura resfriado a quantidade de solução estoque de antibiótico necessária para obter as concentrações finais adequadas, que variam de acordo com o organismo em estudo; preparar, também, placas sem antibióticos para servirem de controle do crescimento;
- 4) verter exatamente 25 mL de meio de cultura para cada placa, e identificar os antibióticos e as concentrações; as placas com antibióticos devem ser preparadas 24 h a 72 h antes do uso, e não devem ter água condensada sobre a superfície do meio;
- 5) crescer as culturas das estirpes em teste em tubos de ensaio ou frascos contendo meio de cultura YM líquido, sem antibióticos, pelo tempo necessário, até atingirem o final da fase logarítmica de crescimento;

- 6) preparar mapas que indiquem a posição de cada uma das estirpes em teste nas placas com antibióticos, de forma a ser possível identificar cada estirpe nos meios com diferentes antibióticos;
- 7) transferir, com palitos de madeira ou cotonetes, esterilizados, o inóculo de cada uma das estirpes dos tubos ou frascos com meio líquido para as placas contendo os antibióticos e para as placas controle (estas devem ser as últimas da série de placas para garantir que o palito ou cotonete contenha inóculo viável até a última placa). Alternativamente, pode-se transferir um volume de inóculo conhecido (50 μ L a 100 μ L) dos frascos ou tubos de cultura para as placas, com o auxílio de uma micropipeta; em ambos os casos, pelo menos três repetições devem ser feitas;
- 8) incubar as placas inoculadas a 28° C e observar o crescimento após o tempo de incubação necessário para cada organismo.

Uma forma alternativa e menos subjetiva de se determinar a RIA dos rizóbios é através do crescimento em meio líquido contendo os antibióticos. Nesse caso, ao invés de se prepararem placas com os antibióticos, estes são incorporados ao meio líquido que é, então, dispensado em volumes de 5 mL em tubos ou frascos que são, posteriormente, inoculados com as estirpes em teste e incubados pelo tempo necessário. Devem-se incluir tubos com meio de cultura sem antibióticos como controle. O crescimento é avaliado pela medição da absorbância (densidade ótica) das culturas a 600 nm, considerando-se como resistentes aquelas culturas cuja densidade ótica for pelo menos 50% daquela observada nos tubos sem antibiótico.

7.4. Características Bioquímicas

7.4.1. Coloração de Gram

A coloração de Gram é a técnica diferencial mais importante aplicada às bactérias. Teoricamente, elas poderiam ser divididas em dois grupos: Gram-positivas e Gram-negativas; na prática, porém, há situações em que um organismo é Gram-variável. Essa técnica foi desenvolvida pelo físico dinamarquês Christian Gram em 1884. As diferenças na coloração das células se devem às diferenças nas estruturas dos envelopes celulares bacterianos.

As células das bactérias Gram-negativas são envoltas por duas membranas, a membrana citoplasmática (interna) e a membrana celular (externa). Ambas as membranas apresentam estruturas típicas de camadas duplas de lipídios e são separadas por um espaço periplásmico e por uma camada de peptidoglican, constituída de polissacarídeos e proteínas interligadas. A membrana celular é rica em lipídios e proteínas e é recoberta por uma espessa camada de lipopolissacarídeos responsáveis pelas características antigênicas desses organismos. As bactérias Gram-positivas não apresentam a membrana celular encontrada nas Gram-negativas e, em seu lugar, elas apresentam uma camada externa rígida de peptidoglican ou mureína, com uma estrutura mais complexa. As diferenças na composição da parede celular acarretam diferenças na permeabilidade das células a certas substâncias. O teste de coloração de Gram baseia-se nessas diferenças. O procedimento para a coloração de Gram está descrito no capítulo 2.

7.4.2. Outras Características Bioquímicas

Existe uma série de outras características bioquímicas que servem para a caracterização dos rizóbios, sobretudo se as estirpes de trabalho têm marcas como a produção de determinados metabólitos que podem ser identificados em meio de cultura, ou perfis característicos de proteínas celulares ou lipopolissacarídeos da parede celular. Apesar de não serem detalhadas aqui, duas técnicas são particularmente importantes: eletroforese de proteínas celulares (totais ou de frações) e eletroforese de lipopolissacarídeos em géis de poli(acrilamida). O procedimento para a corrida de géis de proteínas está detalhado no capítulo 11. Para a corrida de géis para a separação dos lipopolissacarídeos da membrana celular o seguinte procedimento pode ser utilizado:

- 1) crescer as bactérias até a fase estacionária em tubos ou frascos com meio de cultura TY líquido;
- 2) centrifugar alíquotas de 1 mL a 14.000 rpm durante 1 min;
- 3) lavar as células uma vez com 1 mL de Tris a 10 mM, pH 7,6;
- 4) ressuspender as células em 100 µL de tampão TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8,0) e ferver por 10 min;
- 5) resfriar as suspensões obtidas para 60° C e adicionar proteinase-K dissolvida em tampão TE para obter uma concentração final de 0,2 mg/mL;
- 6) incubar a mistura a 60° C por 1 hora e centrifugar a 14.000 rpm por 1 min para precipitar o lixo celular;
- 7) determinar a concentração de KDO [ácido 2-ceto-3-deoxioctanóico (2-keto-3-deoxyoctanoic acid) nos sobrenadantes para equalizar as quantidades de KDO (e, conseqüentemente, de LPS) aplicadas a cada uma das canaletas do gel. Esta etapa tem como objetivo a obtenção de coloração mais uniforme no gel para permitir a comparação entre as espécies e quantidades de lipopolissacarídeos;
- 8) para a separação dos lipopolissacarídeos, submeter as amostras à eletroforese em géis com 12% de acrilamida, a uma intensidade de 10 mA;
- 9) após a corrida, colorir os géis com nitrato de prata para revelar os lipopolissacarídeos.

Método para quantificar KDO

O ácido 2-ceto-3-deoxioctanóico (KDO) é um importante indicador da presença de lipopolissacarídeos, pois é um açúcar característico daquelas moléculas. A quantificação dos lipopolissacarídeos de uma amostra pode ser realizada, indiretamente, medindo-se a quantidade de KDO.

Procedimento (cuidado, usar luvas e avental protetor):

- 1) preparar os reagentes;
periodato - dissolver ácido periódico (HIO_4) em solução de H_2SO_4 , a 0,125 N, de modo a obter uma concentração final de 0,025 N;

ácido sulfúrico diluído - diluir H_2SO_4 em água destilada para uma concentração final de 0,02N;
arsenito de sódio - 0,2 N de arsenito de sódio dissolvido em 0,5 N HCl (CUIDADO: o arsenito de sódio é venenoso; não inalar a poeira, lavar bem as mãos após o uso e não pipetar o reagente com a boca);

ácido tiobarbitúrico - dissolver 0,3% de ácido tiobarbitúrico em água e ajustar o pH para 2,0;

- 2) misturar cerca de 100 μ L de material contendo LPS (fazer diluições dos extratos) com 100 μ L de H_2SO_4 a 0,02 N e aquecer a 100° C para liberar o KDO do LPS;
- 3) ajustar o volume para 200 μ L com H_2SO_4 a 0,02 N. Adicionar 250 μ L de periodato, misturar e deixar repousar à temperatura ambiente por 20 min;
- 4) adicionar 500 μ L da solução de arsenito de sódio e incubar, à temperatura ambiente, por 2 min;
- 5) adicionar 2mL da solução de ácido tiobarbitúrico, misturar e aquecer a 100°C por 20 min. Após esse tratamento, deverá aparecer uma coloração rosada nos tubos;
- 6) deixar esfriar e ler a absorbância a 548 nm;
- 7) determinar a concentração de KDO por interpolação dos resultados das amostras em uma curva padrão elaborada pelo mesmo procedimento, a partir de soluções puras de KDO contendo de 0 mg a 100 mg/mL. Caso as leituras das amostras caiam fora da curva padrão, fazer novas diluições dos extratos até obter leitura dentro da curva.

7.5. Considerações Finais

O trabalho diário com os rizóbios exige que os laboratoristas e pesquisadores sejam capazes de reconhecer e identificar determinadas estirpes com freqüência. A existência de métodos que permitam essa identificação de forma rápida é um grande auxílio no sentido de se economizar o tempo que seria consumido na identificação mais criteriosa dos organismos. A maior parte das técnicas descritas neste capítulo é empregada todos os dias nos laboratórios de rizobiologia, agilizando muito os trabalhos. Não existe uma receita de bolo sobre quais os procedimentos mais adequados para cada situação, ou sobre as combinações de procedimentos que facilitem a identificação dos organismos. Cabe ao microbiologista avaliar e escolher quais procedimentos se adaptam mais às suas condições de trabalho.

7.6. Referências Bibliográficas

- ARAUJO, R.S. **Mutational analysis of the cell surface and nodulation competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli***. Madison: University of Wisconsin, 1993. 118p. (Tese de Doutorado).
- DUGUID, J.P. The demonstration of bacterial capsules and slime. **J. Pathol. Bacteriol.**, v.63, p.673-685, 1953.

IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA DE *BRADYRHIZOBIUM/RHIZOBIUM*Catalina Y. M. Nishi¹**8.1. Introdução**

As estirpes de *Bradyrhizobium/Rhizobium* apresentam grande variabilidade quanto à infectividade e efetividade. Devido a essa variabilidade, vem-se selecionando estirpes mais eficientes quanto à fixação do nitrogênio (Döbereiner et al., 1970; Maier & Graham, 1990; Peres et al., 1984; Oliveira & Vidor, 1984; Sá et al., 1993; Salamanca et al., 1989). Um dos métodos utilizados para a identificação e o monitoramento das bactérias inoculadas no solo, via inoculação, é baseado nas características antigênicas das bactérias, a sorologia (Vincent, 1975; Somasegaran & Hoben, 1985).

A sorologia é o estudo das reações entre os antígenos (Ag) e os anticorpos (Ac). Estas reações Ag-Ac são específicas, o que significa que um antígeno reagirá com anticorpos desencadeados por sua própria classe ou classe antigênica similar. Devido a esta especificidade, as técnicas sorológicas são utilizadas para identificar antígenos ou anticorpos quando algum destes é conhecido.

Como em outras bactérias Gram-negativas, os antígenos de superfície dos rizóbios podem ser: 1) flagelares ou antígeno H; 2) capsulares, ou antígeno K, sendo ambos termolábeis e somáticos; e 3) ou antígeno O, que é termoestável, dependendo de sua origem. Os tipos mais comuns de reação Ag-Ac são as reações de aglutinação e precipitação, as quais dependem do estado físico do antígeno, seja este células em suspensão, para as reações de aglutinação, ou moléculas em solução, para as reações de precipitação. Estas reações resultam na formação de "lattices" (Figura 8.1), que consistem em complexos de antígenos polivalentes e anticorpos bivalentes ligados alternadamente (Somasegaran & Hoben, 1985).

8.2. Conceitos Básicos de Algumas Reações Sorológicas**8.2.1. Aglutinação Direta**

Na aglutinação direta, o antígeno consiste da suspensão de microrganismos, ou células, ou antígenos adsorvidos em partículas uniformes inertes, como o látex ou a bentonita. Quando estes antígenos e os anticorpos específicos são misturados, as células aglutinam-se, formando grumos, que finalmente decantam, deixando um sobrenadante claro. A reação pode ser acelerada mediante a elevação da temperatura (37° para 56° C) e pelo movimento (por agitação ou centrifugação), que aumentam o contato entre o antígeno e o anticorpo (Jawetz et al., 1981).

¹ Biomédica, M.Sc., curso de pós-graduação na Universidade Estadual de Londrina e EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), Cx. Postal 1061, CEP 86001-970, Londrina, PR.

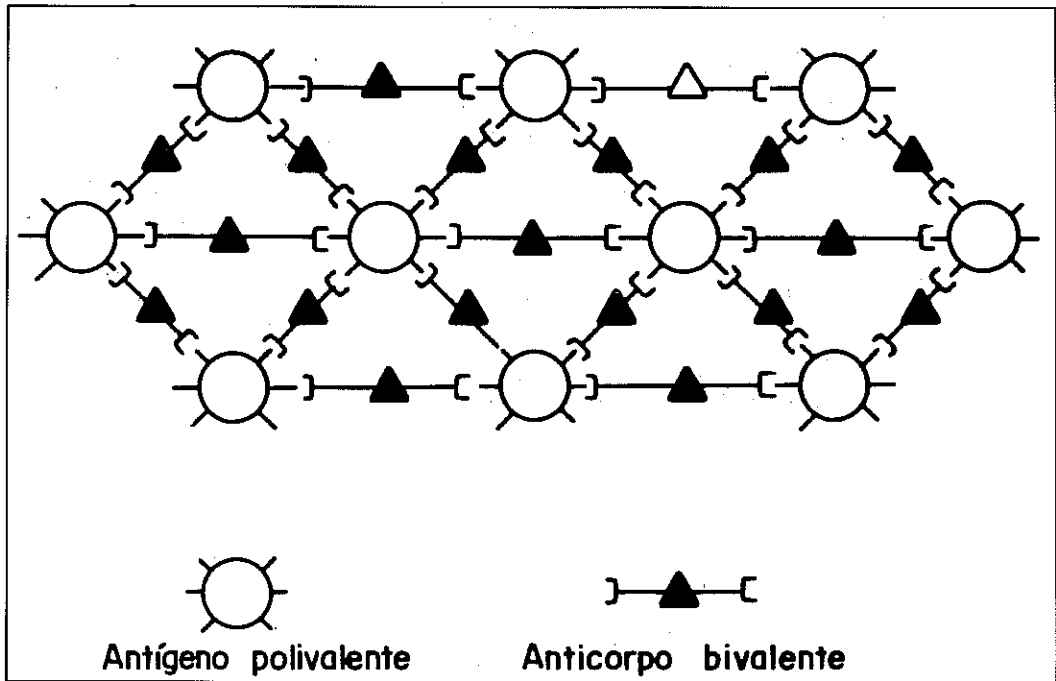


FIGURA 8.1. Formação de "lattices" na reação antígeno-anticorpo.

Esta técnica é uma das mais utilizadas e descritas, até o momento, para a identificação e o monitoramento das estirpes no solo, devido à sua simplicidade, baixo custo e capacidade de processar grande número de amostras. A técnica utiliza, como antígenos, tanto as células em cultura quanto os nódulos (Means et al., 1964; Damirgi et al., 1967; Vincent, 1975; Somasegaran & Hoben, 1985; Lovato et al., 1991).

8.2.2. Imunodifusão

A imunodifusão é uma reação de precipitação que ocorre em um meio semi-sólido como o ágar-gel. Nesta reação, um dos determinantes mais importantes é a concentração dos componentes, onde o excesso de antígeno, ou de anticorpo, dificulta a reação. Em 1948, Ouchterlony e Elek descreveram a técnica da imunodifusão dupla em ágar-gel, ou análise de Ouchterlony, na qual o antígeno e o anticorpo se difundem através do ágar-gel e, ao se encontrarem, formam complexos estáveis, que podem ser analisados visualmente. Esta técnica é utilizada para fins comparativos, para os quais existem três padrões básicos característicos: 1) de identidade; 2) de não identidade; e 3) de identidade parcial (Fudenberg et al., 1980; Roitt et al., 1986) (Figura 8.2).

Nos rizóbios, a imunodifusão tem sido utilizada para a identificação e reconhecimento de sorogrupos (Dudman, 1964; Somasegaran & Hoben, 1985). Esta é uma técnica simples e de baixo custo.

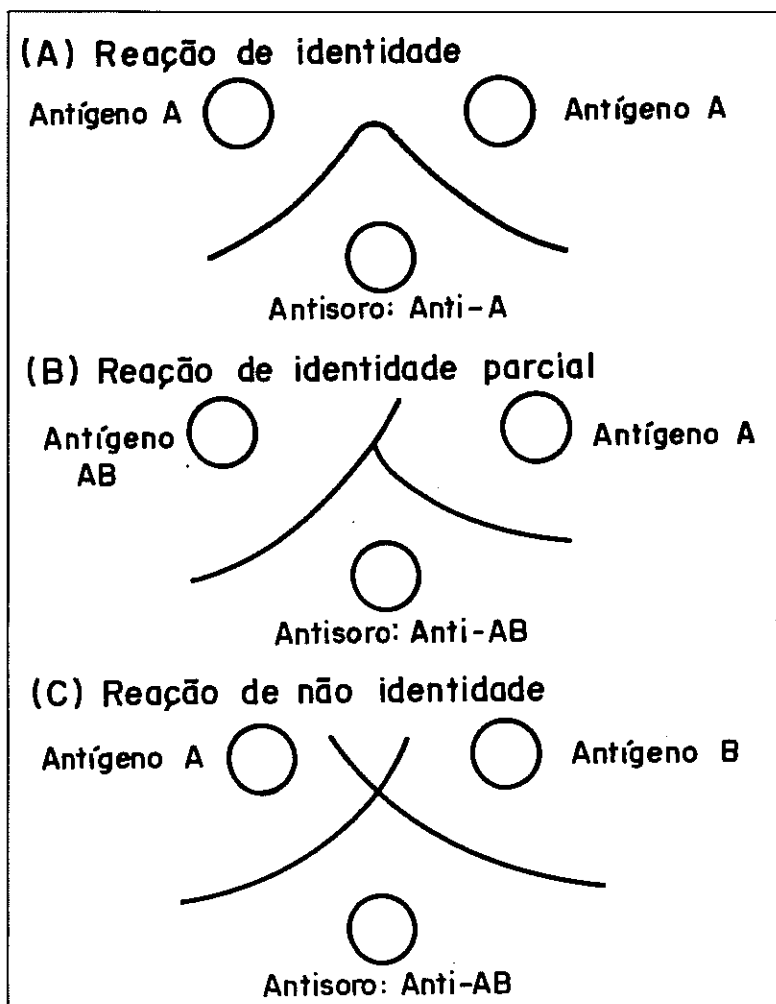


FIGURA 8.2. Padrões básicos da reação de precipitação de imunodifusão dupla em ágar-gel.

8.2.3. Imunofluorescência

A imunofluorescência é uma técnica histoquímica, na qual o anticorpo específico é conjugado com compostos fluorescentes e, quando adicionado às células ou tecidos, forma complexos imunitários estáveis com os antígenos, que são observados num microscópio de fluorescência. Esta técnica foi introduzida em 1941 por Coons, utilizando a substância β -antraceno, de cor azul, conjugada com anti-soro antipneumocócico, para descrever os antígenos bacterianos em cortes de tecido. Depois, utilizaram-se anti-soros conjugados com a fluoresceína, que emite uma luz de cor verde.

A fluorescência é a emissão de luz de uma cor, ou seja, um comprimento de onda, enquanto uma substância é irradiada com luz de uma cor diferente. Os fluorocromos mais utilizados são o isotiocianato de fluoresceína (FITC) e a rodamina.

A reação de imunofluorescência é: 1) direta (Figura 8.3), quando um anticorpo conhecido é marcado e reage diretamente com o antígeno desconhecido; 2) indireta (Figura 8.4), quando o antígeno é fixado a uma lâmina, e o anticorpo específico é adicionado. A lâmina é, então, lavada para eliminar o anticorpo não fixado e um segundo anticorpo, que é uma anti-imunoglobulina marcada, é adicionado (Fudenberg et al., 1980; Roitt et al., 1986).

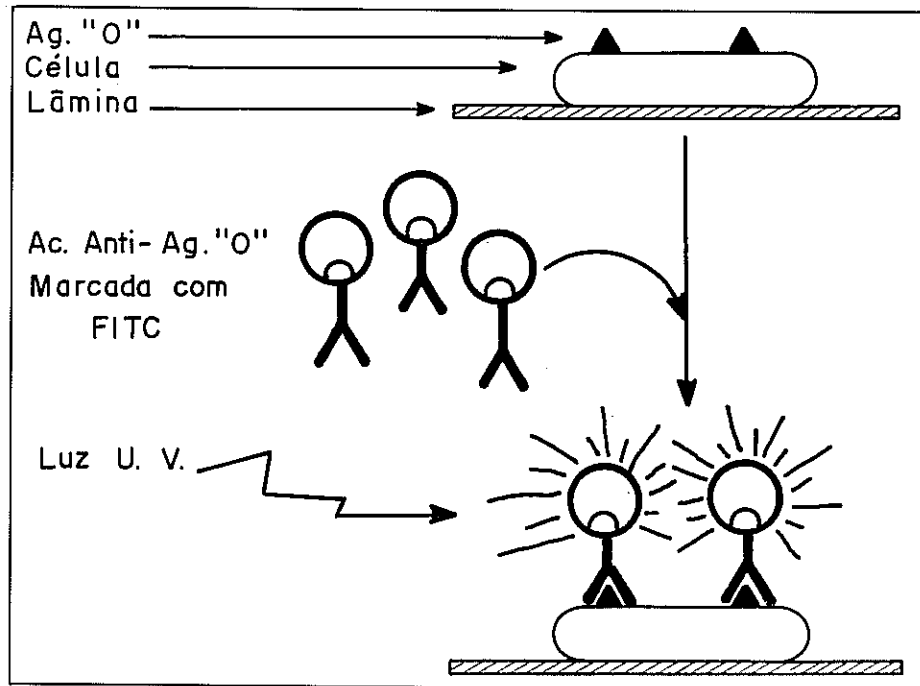


FIGURA 8.3. Reação de imunofluorescência direta.

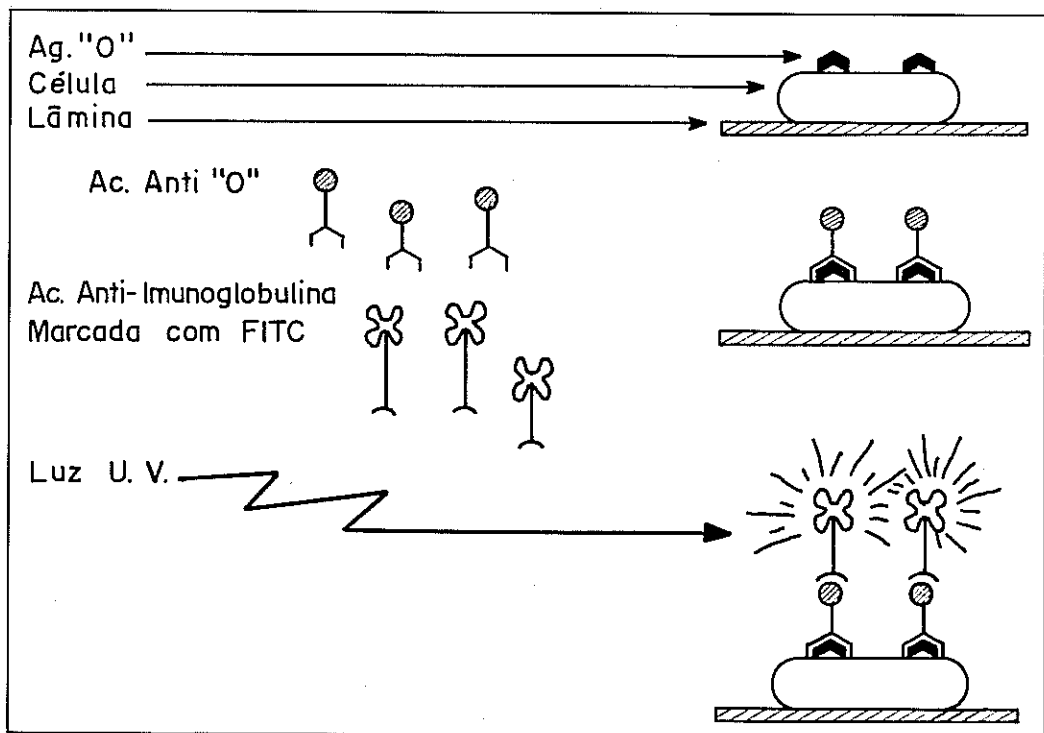


FIGURA 8.4. Reação de imunofluorescência indireta.

A técnica de imunofluorescência tem sido aplicada, com êxito, para a identificação de rizóbios e para o reconhecimento de estirpes dentro do nódulo (Schmidt et al., 1968; Trinick, 1969; Sato et al., 1988; Zdor et al., 1990).

8.2.4. Ensaio de Imunoadsorção Ligado à Enzima (ELISA, Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay)

A técnica de ELISA é baseada na utilização de antígenos ou anticorpos marcados com uma enzima, de forma que os conjugados resultantes apresentem tanto atividades imunológicas, quanto enzimáticas. Estando um dos componentes (antígeno ou anticorpo) marcado com uma enzima e fixado sobre um suporte (imunoabsorvente), a reação antígeno-anticorpo ficará imobilizada e, portanto, poderá ser facilmente revelada mediante a adição de um substrato específico. Quando a enzima atuar sobre o substrato, produzir-se-á uma cor visível a olho nu, ou quantificável mediante a utilização de espectrofotômetro ou colorímetro. As enzimas mais utilizadas são a peroxidase e a fosfatase alcalina.

Este método têm muitas variações, como: 1) a ELISA direta, quando o anticorpo específico é marcado e reage diretamente com o antígeno; 2) a ELISA indireta (Figura 8.5), quando um segundo anticorpo, uma anti-imunoglobulina marcada, é utilizada (Jawetz et al., 1991; Roitt et al., 1986).

A ELISA vem substituindo a técnica de aglutinação e imunodifusão, tanto para a identificação, quanto para o monitoramento de estirpes de rizóbios, por sua alta sensibilidade, fácil reprodução, possível automatização, baixo custo, fácil execução e capacidade de processar grande número de amostras (Kinhinevsky & Gurfel, 1990; Wolff et al., 1991).

As técnicas imunoenzimáticas são utilizadas, também, na detecção de antígenos, que têm sido transferidos para uma membrana de nitrocelulose ou de náilon, como nas técnicas de “colony immunoblot” (Olsen & Rice, 1989).

8.3. Produção de Anti-soro para *B. japonicum*

8.3.1. Preparo de Antígenos Somáticos para a Técnica de Aglutinação

Este processo segue a seguinte metodologia:

- a) repicar cada estirpe de rizóbio em meio líquido de extrato de levedura-manitol (capítulo 2), sem corante, e incubar a 28° C até obter crescimento abundante (5 a 7 dias);
- b) testar a pureza da cultura com a coloração de Gram (capítulo 2);
- c) centrifugar as culturas a 4.500 rpm por 30 min, descartar o sobrenadante e ressuspender as células em solução salina fisiológica (NaCl, 0,85%). Centrifugar novamente, repetindo esta ação por três vezes para lavar as células, retirando a camada de exopolissacarídeos formada por algumas estirpes, eliminando alguns antígenos solúveis;
- d) padronizar a concentração para 1.10^9 céls./mL, através da comparação com os padrões de sulfato de bário (BaSO₄) ou nefelômetro de McFarland. A turbidez deve ser intermediária entre os tubos 3 e 4 desses padrões (Tabela 8.1);

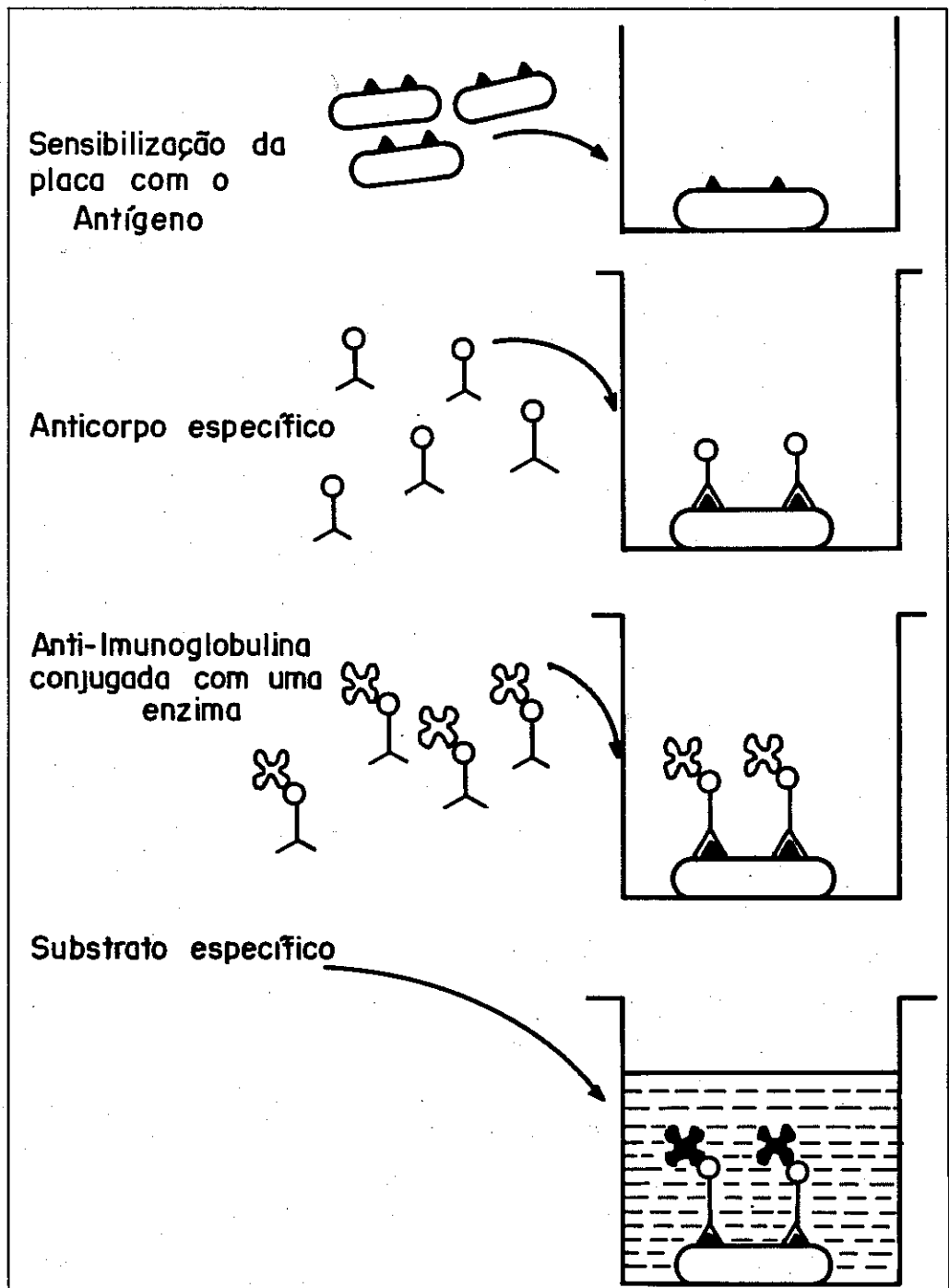


FIGURA 8.5. Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA, Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay), reação indireta.

TABELA 8.1. Preparo dos padrões de sulfato de bário (BaSO_4) ou nefelômetro de McFarland.

Tubo	Cloreto de bário 1% ¹ (mL)	Ác. sulfúrico 1% ² (mL)	Concentração aproximada de células (10 ⁶ /mL)
1	0,1	9,9	300
2	0,2	9,8	600
3	0,3	9,7	900
4	0,4	9,6	1200
5	0,5	9,5	1500
6	0,6	9,4	1800
7	0,7	9,3	2100
8	0,8	9,2	2400
9	0,9	9,1	2700
10	1,0	9,0	3000

¹ Cloreto de bário (BaCl_2) a 1%: prepara-se dissolvendo 1 g de cloreto de bário em 100 mL de água destilada.

² Ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 1%: prepara-se diluindo 1,04 mL de ácido concentrado (96%) em 100 mL de água destilada.

- e) aquecer os tubos a 100° C em banho-maria por uma hora, para eliminar os antígenos termolábeis, como os antígenos flagelares e os capsulares;
- f) adicionar 1 mL de mertiolate a 1% para cada 100 mL de suspensão. Conservar os antígenos em quantidades pequenas no congelador (temperatura < 0° C).

8.3.2. Imunização do Coelho

- a) utilizar coelhos com 2,5 kg a 3,0 kg de peso e de três a cinco meses de idade;
- b) identificar os coelhos;
- c) retirar uma amostra de sangue da veia marginal da orelha (5 mL-10mL) antes da inoculação, para o teste em branco, e confirmar que esteja livre de anticorpos;
- d) retirar os antígenos do congelador e, depois que atingirem a temperatura ambiente, inocular no coelho via intramuscular. No primeiro dia, inocular 0,5 mL da suspensão bacteriana mais 0,5 mL de adjuvante de Freund completo (mistura previamente homogeneizada). No quarto e oitavo dias, inocular 1 mL da suspensão bacteriana.

8.3.3. Sangria para Determinação do Título dos Anticorpos

- a) no décimo dia após começada a inoculação, retirar da veia marginal da orelha uma amostra de sangue (10 mL);

- b) deixar a amostra de sangue na estufa a 37° C por uma hora, para facilitar a coagulação e, depois, deixá-la por uma noite na geladeira (4° C) para a retração do coágulo;
- c) coletar o soro, com ajuda de uma pipeta Pasteur ou similar e centrifugá-lo para retirar as células residuais;
- d) preparar as diluições do soro em oito tubos de ensaio. O primeiro tubo deve conter 4,6 mL de solução salina fisiológica (NaCl a 0,85%) e os demais tubos, 2,5 mL dessa mesma solução. Adicionam-se, ao primeiro tubo, 0,4 mL do soro coletado, homogeneizam-se e transferem-se 2,5 mL para o segundo tubo. Transferem-se 2,5 mL do segundo tubo, previamente homogeneizado, para o terceiro tubo e assim, sucessivamente, até o oitavo tubo. Dessa maneira, obtêm-se diluições seriadas, começando por 1:25 até 1:3.200;
- e) para a reação de titulação, transferem-se, de cada diluição, 0,2 mL para outros tubos devidamente marcados de 1 a 8 e adicionam-se 0,2 mL da suspensão bacteriana preparada conforme seção 8.3.1;
- f) levar as reações ao banho-maria a 50° C por duas a seis horas, colocando, como controle, um tubo contendo 0,2 mL de solução salina fisiológica e 0,2 mL da suspensão bacteriana. O título do soro é dado pela última diluição que apresente reação de aglutinação. O título deve ser maior do que 1:800.

8.3.4. Sangria

- a) se o título estiver adequado, coletar 30 mL de sangue, da veia marginal da orelha;
- b) extrair o soro conforme descrito para a determinação do título;
- c) adicionar 1 mL de mertiolate a 1% para cada 100 mL de soro coletado. Adicionar, também, glicerina em partes iguais e conservar, em pequenas quantidades no congelador.

8.3.5. Doses de Reforço e Sangrias

Semanalmente, inocula-se uma dose de reforço de 1 mL de suspensão bacteriana e coletam-se 30 mL de sangue, verificando-se o título do soro.

8.4. Ensaio de Aglutinação em Placa Rígida de Poliestireno em “U”

8.4.1. Utilizando os Nódulos como Antígenos

- a) lavar os nódulos em hipoclorito a 50%;
- b) lavar, abundantemente com água destilada;
- c) no caso de nódulos secos, deixá-los, individualmente, em tubos contendo de 2 mL a 4 mL de solução salina fisiológica (NaCl a 0,85%) por uma noite, para reidratação;
- d) macerar os nódulos;
- e) levar a 100° C, em banho-maria, por 30 min;
- f) colocar 100 µL desta suspensão em cada orifício da placa;

- g) adicionar 50 µL do anti-soro diluído, de acordo com o título do mesmo;
- h) tampar as placas, para evitar a evaporação, e incubá-las em banho-maria a 50° C por 2 a 3 horas.
- i) retirar as placas do banho-maria e deixá-las na geladeira por duas horas ou mais;
- j) ler as reações, comparando com um controle negativo do antígeno (nódulos macerados) e solução salina fisiológica.

8.4.2. Utilizando Cultura de Células como Antígeno

- a) crescer as bactérias em meio sólido de extrato de levedura-manitol inclinado (capítulo 2);
- b) adicionar solução salina fisiológica e raspar a cultura, com ajuda da alça de platina;
- c) ressuspender até a concentração de 1.10^9 céls./mL, da mesma maneira que na seção 8.3.1.(d); Levá-las a 100° C por 30 min em banho-maria;
- d) colocar 100 µL desta suspensão bacteriana na placa;
- e) adicionar 50 µL de anti-soro diluído, de acordo com o título do mesmo;
- f) levar as placas a 50° C, em banho-maria, por 2 a 3 horas;
- g) retirar as placas do banho e deixá-las no refrigerador por 2 horas ou mais;
- h) ler as reações comparando com um controle negativo do antígeno (suspensão de bactérias) e solução salina fisiológica.

8.5. Considerações Finais

As técnicas imunológicas vêm sendo, tradicionalmente, utilizadas nos estudos de ecologia rizobiana e monitoramento de estirpes no solo. Hoje, com a utilização de variações dessas técnicas, como a ELISA, ficou ainda mais fácil realizar diversas análises em um período curto de tempo. As técnicas imunológicas também vêm sendo, cada vez mais, empregadas em estudos específicos, como a determinação de componentes celulares e proteínas.

8.6. Referências Bibliográficas

- BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; ORNSTON, L. N.; JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Jawets, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology**. Connecticut: Appleton & Lange, 1991. 632p.
- DAMIRGI, S. M.; FREDERICK, L. R.; ANDERSON, I. C. Serogroups of *Rhizobium japonicum* in soybean nodules as affected by soil types. **Agron. J.**, v.59, p.10-12, 1967.
- DÖBEREINER, J.; FRANCO, A. A.; GUZMAN, I. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. **Pesq. agrop. bras.**, v. 5, p. 155-161, 1970.
- DUDMAN, W. F. Immune diffusion of the extracellular soluble Antigens of two strains of *Rhizobium meliloti*. **J. Bacteriol.**, v.88, p.782-794, 1964.

- FUDENBERG, H. H.; STITES, D. P.; CALDWELL, J. L.; WELLS, J. V. **Immunologia Clínica**. México: El Manual Moderno, 1980. 877p.
- JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Manual de Microbiologia Médica**. México: El Manual Moderno, 1981. 595p.
- KISHINEVSKY, B.; GURFEL, D. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for serological identification of different *Rhizobium* strains. **J. Appl. Bacteriol.**, v.49, p.517-526, 1980.
- LOVATO, P. E.; PEREIRA, J. C.; VIDOR, C. Sobrevivência de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* em solo e sua relação com a ocorrência em nódulos e fixação de nitrogênio em feijoeiro. **Rev. bras. Ci. Solo**, v.15, p.277-282, 1991.
- MAIER, R. J.; GRAHAM, L. Mutant strains of *Bradyrhizobium japonicum* with increased symbiotic N₂ fixation rates and altered Mo metabolism properties. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.56, p. 2341-2346, 1990.
- MEANS, U. M.; JOHNSON, H. W.; DATE, R. A. Quick serological method of classifying strains of *Rhizobium japonicum* in nodules. **J. Bacteriol.**, v.87, p.547-553, 1964.
- OLIVEIRA, L. A. D.; VIDOR, C. Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* em soja. I. Eficiência e especificidade hospedeira. **Rev. bras. Ci. Solo**, v.8, p.37-42, 1984.
- OLSEN, P. E.; RICE, W. A. Use of monoclonal antibodies in a colony immunoblot analysis of viable *Rhizobium* cell numbers in legume inoculants and on preinoculated seed. **Can. J. Microbiol.**, v.37, p.430-432, 1991.
- PERES, J. R. R.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R. Variabilidade na eficiência em fixar nitrogênio entre isolados de uma mesma estirpe de *Rhizobium japonicum*. **Rev. bras. Ci. Solo**, v.8, p.193-196, 1984.
- ROITT, I. M.; BROSTOFF, J.; MALE, D. K. **Immunology**. Tokyo: Nankodo, 1986. 316p.
- SÁ, N. M. H. de; SCOTTI, M. R. M. M. L.; PAIVA, E.; FRANCO, A. A.; DÖBEREINER, J. Selection and characterization of *Rhizobium* spp. strains stable and capable in fixing nitrogen in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Rev. Microbiol.**, v. 24, p.38-48, 1993.
- SALAMANCA, C. R. S.; VARELA, R. G.; SILVESTER-BRADLEY, R. Selección de Cepas de Rizobios en Selos Promisorios para el Cultivo de la Soja (*Glycine max* (L) Merrill) en Colombia. **Acta Agron.**, v.39, p.59-71, 1989.

- SATO, T.; KATO, T.; SUGAWARA, S. Difference of infectivity between two similar soybean rhizobial strains and immunohistochemical evidence of double infection. **Soil Sci. Plant Nutr.**, v.34, p.247-254, 1988.
- SCHMIDT, E. L.; BANKOLE, R. O.; BOHLOOL, B. B. Fluorescent antibody approach to Study of Rhizobia in soil. **J. Bacteriol.**, v.95, p.1987-1992, 1968.
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Methods in legume-Rhizobium technology**. Hawai: Niftal, 1985. 367p.
- TRINICK, M.J. Identification of legume nodule bacteria by the fluorescent antibody reaction. **J. Appl. Bacteriol.**, v.32, p.181-186, 1969.
- VINCENT, J. M. **Manual Prático de Rizobiologia**. Argentina: Hemisferio Sur, 1975. 200p.
- WOLFF, A. B.; STREIT, W.; KIPE-NOLT, J. A.; VARGAS, H.; WERNER, D. Competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains in relation to enviromental stress and plant defense mechanisms. **Biol. Fertil. Soils**, v.12, p.170-176, 1991.
- ZDOR, R. E.; PUEPPKE, S. G. Nodulation competitiveness of Tn5-induced mutants of *Rhizobium fredii* USDA 208 that are ltered in motility and extracellular polysaccharide production. **Can. J. Microbiol.**, v.37, p.52-58, 1991.

CAPÍTULO 9

CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES POR TÉCNICAS MOLECULARES: O USO DOS MÉTODOS DE PCR E RAPD

Maria de Fátima Loureiro¹

9.1. Introdução

Na ausência de métodos que determinem, facilmente, a relação genética entre diversas espécies da família Rhizobiaceae e de outras bactérias do solo associadas às plantas, essas bactérias têm sido tradicionalmente caracterizadas e classificadas com base em características fenotípicas, como grupo de plantas hospedeiras, morfologia das colônias, crescimento em meios seletivos e várias características metabólicas (Jordan, 1984), como resistência a antibióticos (Beynon & Josey, 1980), sorologia (Robert & Schmidt, 1985) e estrutura de polissacarídeos extracelulares (Zevenhuizen & Bertocchi, 1989). Embora tenha sido observado que as características fenotípicas, particularmente o grupo de hospedeiros, não fornecem uma base segura para a determinação das relações filogenéticas entre as bactérias, o seu uso em sistemática é sempre justificado em termos de facilidade das observações e significado agrônômico (Eardly et al., 1990).

Um fato comum no estudo das simbioses rizóbio-leguminosas é a importância de se dispor de um método eficiente, mas acessível a diversos laboratórios, para a caracterização de estirpes. Um modo eficiente de caracterizar individualmente os isolados é através de informações sobre a estrutura genética das populações de rizóbio. Neste contexto, são particularmente úteis os métodos que mostram especificidade para as estirpes e, ao mesmo tempo, produzem informações sobre a diversidade genética e o grau de relação genética a nível molecular (Harrison et al., 1992). Deste modo, o desenvolvimento de técnicas moleculares tornou possível a avaliação das relações filogenéticas entre estirpes.

Neste capítulo, serão apresentados os métodos mais utilizados, atualmente, em estudos filogenéticos e de identificação de microrganismos, dando-se ênfase para a técnica de PCR ("polymerase chain reaction"), especialmente PCR-RAPD ("random amplified polymorphic DNA").

¹ Professora, Ph.D., Universidade Federal do Mato Grosso, Av. Fernando Correa da Costa, s/n., Cidade Universitária, CEP 86060-900, Cuiabá, MT.

9.2. Métodos Moleculares

9.2.1. RFLP e Isoenzimas

Marcadores moleculares, tais como polimorfismos de tamanho de fragmento de restrição ou “restriction fragment length polymorphisms” (RFLPs) e isoenzimas, têm sido extensivamente utilizados em estudos genéticos de plantas e microrganismos. O problema com RFLPs, porém, é que o procedimento consome muito tempo, requer uma grande quantidade de DNA (2,0 µg a 10,0 µg) e sondas específicas. Além disso, geralmente envolve o uso de radioisótopos (Demerke & Adams, 1994).

O método do RFLP utiliza enzimas de restrição que clivam o DNA, em determinados locais, produzindo os denominados “fragmentos de restrição”. Desse modo, conseguem-se inúmeros fragmentos de DNA, que podem ser separados por tamanho, após eletroforese em gel de agarose. Posteriormente, os fragmentos podem ser transferidos para uma membrana de náilon pela técnica de “Southern”, e um ou mais fragmentos podem ser detectados por hibridização com uma sonda específica. Este fragmento pode ser de tamanho diferente nos indivíduos de uma população, caracterizando um polimorfismo. As sondas são desenhadas para detectar determinados fragmentos polimórficos, que ficam associados a determinados genes. Algumas seqüências polimórficas se repetem, inúmeras vezes, uma após a outra, ao longo do DNA, e o número de repetições varia de cromossomo para cromossomo. Existem sondas específicas para estes *loci* hipervariáveis que, em uma análise por RFLP, proporcionam o “DNA fingerprints”, ou seja, bandas de DNA em forma de um código de barras (a tradução do inglês seria impressões digitais) (Bidwell, 1988).

Uma outra técnica, a análise de isoenzimas, é limitada pelo pequeno número de *loci* amostrados pela técnica (Demeke & Adams, 1994).

9.2.2. PCR (Polymerase Chain Reaction)²

A reação em cadeia da polimerase ou “polymerase chain reaction”(PCR) é uma recente e poderosa tecnologia, que foi desenvolvida nos últimos anos e tem revolucionado muitas áreas da ciência. Aplicações valiosas desta nova tecnologia são encontradas em diversas áreas, como: diagnose clínica, imunologia, controle de alimentos, microbiologia ambiental, ciência forense e evolução molecular. A rapidez, simplicidade e facilidade da técnica possibilitam que novas adaptações e aplicações sejam constantemente desenvolvidas e que o PCR (é comum, entre os pesquisadores brasileiros, se referirem a esse processo como masculino) seja, atualmente, uma das tecnologias mais amplamente usadas na ciência biológica moderna (Erich, 1989; Innis et al., 1990; Steffan & Atlas, 1991; Griffin, 1994).

² O processo da “polymerase chain reaction”, PCR, é patenteado pela Hoffmann-La Roche, Inc. (U.S.Pat. Nº 4,683,195 e 4,683,202).

9.2.2.1. A amplificação do DNA através de PCR

A DNA polimerase, enzima responsável pela amplificação do DNA, é capaz de fazer reparos no DNA e também capaz de replicá-lo. Esta enzima pode alongar, *in vitro*, um pequeno oligonucleotídeo (“primer”), adicionando nucleotídeos em sua seqüência, desde que este esteja hibridizado a uma fita de DNA complementar, denominada “template” ou molde (Figura 9.1). Para isto, é necessário um excesso de nucleotídeos na solução, que servem como unidades na montagem da fita complementar à do molde. Desse modo, caso a última base seja T, a enzima coloca um A, se for um C, ela adiciona um G, e assim em diante. Assim, se existirem dois oligonucleotídeos (será dada preferência ao termo oligonucleotídeo ao invés de “primer”), delimitando uma região do DNA, e se as fitas forem separadas pelo calor (95° C), a polimerase fará cópias complementares às duas fitas, em temperatura inferior, iniciando sempre pela região dos oligonucleotídeos. Estas novas fitas hibridizam-se, formando uma molécula idêntica à anterior (Saiki et al, 1988).

O processo de amplificação envolve, portanto, três passos (Figura 9.2):

- 1- o DNA contendo a seqüência a ser amplificada é desnaturado pelo calor;
- 2- o DNA desnaturado é anelado pelo excesso de oligonucleotídeos;
- 3- a DNA-polimerase é usada para replicar o segmento de DNA a partir das terminações livres 3'OH dos oligonucleotídeos.

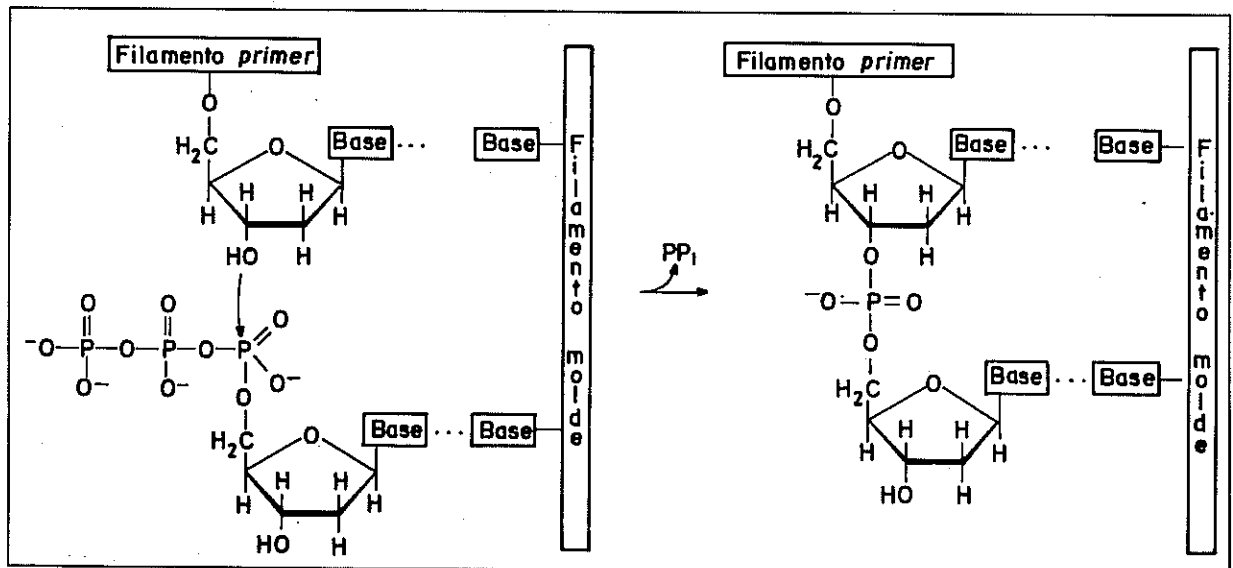


FIGURA 9.1. Reação de alongamento da cadeia analisada pela DNA polimerase (Segundo Styrrer, 1992).

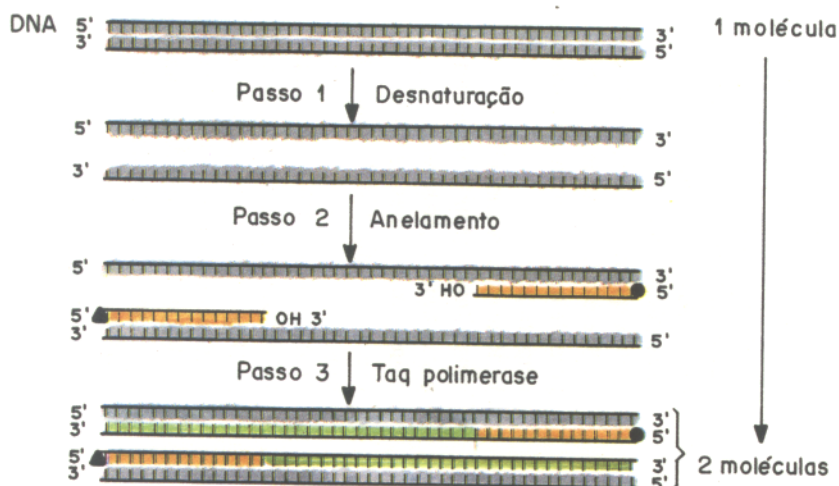
Os produtos do primeiro ciclo de replicação são, então, desnaturados, anelados pelos oligonucleotídeos, e replicados novamente com DNA polimerase. O ciclo é repetido muitas vezes, até que o nível desejado de amplificação, que ocorre exponencialmente, seja alcançado. Um DNA de hélice dupla produzirá duas hélices duplas após um ciclo de replicação, quatro após dois ciclos, oito após três ciclos, 16 após quatro ciclos, 1024 após 10 ciclos e, assim, sucessivamente (Gardner et al., 1991). Essa amplificação exponencial ocorre porque, sob condições apropriadas, os produtos da extensão dos oligonucleotídeos sintetizados no ciclo “n” funcionam como moldes para o outro oligonucleotídeo no ciclo “n+1”. O comprimento dos produtos gerados durante o processo de PCR é igual à soma dos comprimentos dos dois oligonucleotídeos, mais a distância entre os oligonucleotídeos no DNA molde. O PCR permite a amplificação do DNA em forma de fita dupla (ds, double strain) ou simples (ss, single strain) e, com a transcrição reversa do RNA em cDNA, o RNA pode também ser utilizado (Erlich et al., 1991).

9.2.2.2. Aperfeiçoamento do processo de PCR

Nos primeiros estudos, foi utilizado, como replicase, o fragmento Klenow da DNA polimerase I de *E. coli*. Como essa enzima era inativada pelo calor durante o passo da desnaturação, nova enzima precisava ser adicionada no passo 3 de cada ciclo tornando, com isso, o método muito demorado. A técnica melhorou substancialmente com a descoberta da enzima Taq DNA polimerase, que foi obtida da bactéria *Thermus aquaticus*. Como essa bactéria foi isolada de águas termais, sua enzima é termo-resistente e permanece ativa durante a fase de desnaturação pelo calor em cada ciclo de amplificação (Saiki et al., 1988; Gardner et al., 1991). Deste modo, DNA, 2 oligonucleotídeos, Taq polymerase, desoxirribonucleotídeos, trifosfato e magnésio podem ser adicionados no início do processo de PCR, e os ciclos de amplificação podem ocorrer com as alterações de temperatura, de forma automatizada, no aparelho denominado termociclador (Saiki et al., 1988; Gardner et al., 1991).

A disponibilidade de uma enzima termo-resistente não somente simplificou o procedimento de PCR, mas aumentou a especificidade e a produção da reação de amplificação, pois permitiu que o anelamento e a extensão dos oligonucleotídeos ocorressem em uma temperatura mais elevada eliminando, consideravelmente, a amplificação não específica (Saiki et al., 1988). Além disso, a temperatura elevada usada na extensão do oligonucleotídeo possibilita que longos produtos de PCR possam ser amplificados, provavelmente devido à redução na estrutura secundária das fitas moldes. O limite superior de tamanho para a amplificação com o fragmento Klenow era somente de cerca 400 pb (pares de bases). Fragmentos com mais de 10 kb têm sido sintetizados com a Taq DNA polimerase e outras enzimas termo-resistentes (Erlich et al., 1991) (Tabela 9.1).

CICLO 1



CICLO 2

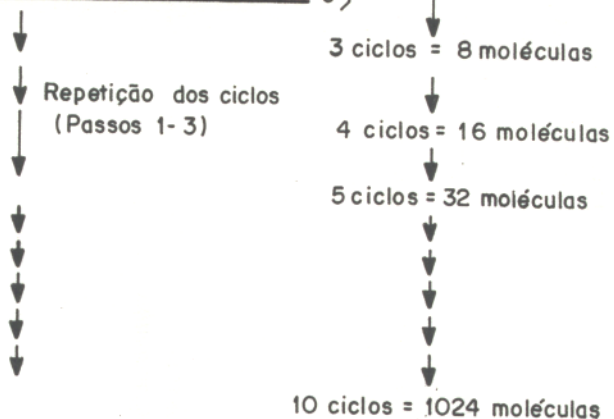
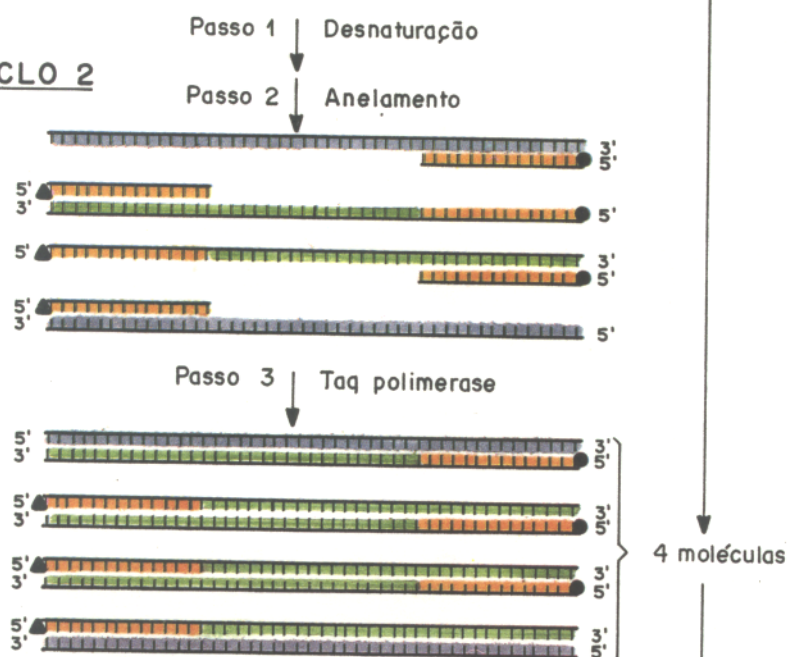


FIGURA 9.2. Diagrama ilustrando o uso de PCR para amplificar moléculas de DNA *in vitro*. Cada ciclo de amplificação envolve três passos: (1) desnaturação do DNA; (2) anelamento do DNA desnaturado pelos oligonucleotídeos; e (3) replicação enzimática da região de interesse pela Taq polimerase (segundo Gardner et al., 1991).

TABELA 9.1. Comparações entre as propriedades e aplicações de várias DNA polimerases termo-resistentes

Enzima (DNA pol)	Fonte	Peso Molecular (kDa)	Condições ideais de reação			Atividade		Aplicações Gerais	
			MgCl ₂ (mM)	KCl (mM)	pH	Temperatura (C)	5' → 3'		Exonuclease 3' → 5'
Taq™	<i>Thermus aquaticus</i>	94	2-4	50-55	7.8-9.4	70-80	Sim	Não	PCR, clonagem, sequenciamento direto, mutagênese.
Stoffel Fragment™	<i>Thermus aquaticus</i>	61.3	2-10	10	8.3	70-80	Não	Não	Sequenciamento de DNA, PCR de molde com estruturas secundárias, amplificação de grande quantidade de produto de PCR, elevada termo estabilidade permite maior número de ciclos de amplificação.
Tth™	<i>Thermus thermophilus</i>	110-120	1.5-2.5	100	8-9.3	50-60	Sim	Não	PCR de mRNA com alta sensibilidade (Mn ²⁺ é necessário para a transcrição reversa), clonagem de genes de RNA celular e viral, PCR de amostras de sangue.
Tli/Vent™	<i>Thermococcus litoralis</i>	92-97	2-8	0-50	8-9	72-80	Não	Sim	PCR síntese de DNA com alta fidelidade, ligação de fragmentos de DNA com terminação abrupta, sequenciamento de DNA, clonagem gênica, e mutagênese direcionada.
Pfu™	<i>Pyrococcus furiosus</i>	92	1.5-8	10	8-9	70-80	Sim	Sim	PCR síntese de DNA com alta fidelidade, clonagem, sequenciamento, e mutagênese direcionada.

(continua...)

Tabela 9.1 Continuação.

Enzima (DNA pol)	Fonte	Peso Molecular (kDa)	Condições ideais de reação			Atividade Exonuclease		Aplicações Gerais	
			MgCl ₂ (mM)	KCl (mM)	pH	Temperatura (C)	5' → 3'		3' → 5'
Bst TM	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	95	10-30	100-200	8-9	60-65	Não	Não	PCR e sequenciamento geral com alta sensibilidade.
Sac	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	100	2-8	ND	7-8	70-80	Não	Sim	Sequenciamento de DNA, mutagenese direcionada, fusão de genes por PCR.
Tac	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	88	2-4	ND	8-9	65	Não	Sim	PCR de moldes ricos em A-T em ciclos curtos.
Tfi/Tuf TM	<i>Thermus flavus</i>	66	10-15	5-10	7-8	70	Não	Não	PCR de grande DNA (10 kb)
Ttu	<i>Thermus ruber</i>	70	2-3	15	7-12	50	Não	Não	Potencial para PCR de amostras contínuas, sequenciamento de DNA
Tsp	<i>Thermotoga</i> sp.	85	10	10	7,5-8	80	Não	Não	Potencial para PCR.
Mth	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	72	10-20	10-20	7-9	65	Sim	Sim	Potencial para sequenciamento de DNA, clonagem gênica, mutagenese direcionada, PCR de DNA rico em A-T.

ND = não determinado.

Fonte: Bej & Mahubani (1994).

Aperfeiçoamentos recentes no protocolo de PCR têm afetado parâmetros críticos, como a taxa de erros na incorporação, especificidade (amplificação alvo *versus* não alvo) e o comprimento máximo dos produtos de PCR. A estimativa inicial da taxa de erros na incorporação pela Taq DNA polimerase durante o processo de PCR, de cerca de 10⁻⁸ nucleotídeos por ciclo, foi baseada na medida da frequência de nucleotídeos substituídos, em uma série de análises de produtos de PCR clonados. Deste modo, mudanças nas condições de PCR, tais como concentrações inferiores de dNTP's e MgCl₂, temperaturas superiores de anelamento e menores períodos de extensão, têm reduzido a taxa de erros na incorporação para menos que 10⁻⁸ nucleotídeos por ciclo (Erlich et al., 1991).

9.2.3 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Recentemente, Williams et al. (1990) descreveram um processo simples, também baseado na amplificação do DNA, mas utilizando um único oligonucleotídeo com seqüência nucleotídica arbitrária. Nesse estudo, foi demonstrado que pequenos oligonucleotídeos com seqüência nucleotídica arbitrária podiam ser usados para amplificar segmentos de DNA de uma grande variedade de espécies, gerando polimorfismos entre os produtos de amplificação que, por sua vez, poderiam ser utilizados como marcadores genéticos. Neste caso, o polimorfismo era revelado através do acesso, ao acaso, dos oligonucleotídeos ao DNA genômico. Esta técnica foi então denominada RAPD.

O RAPD, portanto, é uma variação do PCR, que gera DNA "fingerprints" com um único oligonucleotídeo sintético ("primer") (Demeke e Adams, 1994). Como o oligonucleotídeo apresenta seqüência nucleotídica arbitrária, o RAPD não requer, para o desenho dos oligonucleotídeos, nenhuma informação sobre a seqüência do DNA a ser amplificada. Sendo uma variação do PCR, o RAPD apresenta as mesmas vantagens em relação ao RFLP, ou seja, é menos dispendioso, mais rápido, requer uma menor quantidade de DNA (0,5 ng a 50,0 ng), não envolve o uso de radioisótopos, e requer menos experiência na execução (Demeke & Adams, 1994).

Inúmeros trabalhos têm sido realizados utilizando-se as informações obtidas através de RAPD com diferentes objetivos: construção de mapas genéticos (Williams et al., 1990); taxonomia e estudo de evolução vegetal (Demeke & Adams, 1994); análise de população de plantas (Yu & Pauls, 1994), e caracterização de estirpes de bactérias (Mazurier & Wernars, 1992; Harrison et al., 1992; Loureiro & Carvalho, 1993).

9.3. Uso da Técnica RAPD em Estirpes de Rizóbio

9.3.1. Protocolo

A seguir, será apresentado o protocolo de RAPD utilizado em um estudo filogenético, realizado por Loureiro & Carvalho (1993), com 41 estirpes de rizóbio, sendo 36 estirpes isoladas de nódulos de raiz e caule de leguminosas nativas do Pantanal Mato-grossense e cinco estirpes-controle do gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* (obtidas na coleção de cultura da EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia, CNPAB, Itaguaí, RJ).

- 1 - Cultivar as estirpes, durante 48 horas, em meio PY (Noel et al., 1984) a 28° C, sob agitação.
- 2 - Transferir a cultura para tubos de centrifuga, sob condições assépticas.
- 3 - Centrifugar, a 8000 g, por 10 min.
- 4 - Descartar o sobrenadante.
- 5 - Lavar, com solução salina de NaCl a 0,9% (peso/volume). Repetir a operação três vezes.
- 6 - Centrifugar, a 8000 g, por 5 min.
- 7 - Descartar o sobrenadante.
- 8 - Ressuspender o pélete ("pellet") em NaCl.
- 9 - Efetuar as diluições, para obter um solução contendo 10^4 a 10^5 céls./reação de amplificação.
- 10 - Romper as células, em água fervente, durante cinco minutos. Resfriar à temperatura ambiente. Repetir a operação três vezes.
- 11 - Verificar, em gel de agarose a 1%, o material (DNA) a ser amplificado.
- 12 - Transferir 10,0 μ L da solução de células rompidas para tubo de microcentrifuga de 500 μ L.
- 13 - Adicionar 20,0 μ L da solução de reação contendo: mqH_2O (água ultrapura); tampão enzima (1X); dNTPs (0,1 mM); oligonucleotídeo (0,4 μ M); enzima Amplitaq DNA polimerase - Stoffel fragment (2,4 unids./tubo); $MgCl_2$ (4,0 mM). Um exemplo da concentrações utilizadas em um ensaio consta na Tabela 9.2.

TABELA 9.2. Exemplo da composição e das concentrações de reagentes utilizados nas 53 reações de RAPD.

Reagente	[Estoque]	Solução (μ L)	[Final]	Ordem de adição
mqH_2O	-	411,28	-	1
Tampão E	10X	159,00	1X	2
dATP	10 mM	15,9	0,1 mM	3
dCTP	10 mM	15,9	0,1 mM	4
dGTP	10 mM	15,9	0,1 mM	5
dTTP	10 mM	15,9	0,1 mM	6
Oligonucleotídeo	4 μ M	159,00	0,4 μ M	7
Enzima	10 unids./ μ L	12,72	2,4 unid	8
$MgCl_2$	25 mM	254,40	4 mM	9
Volume sol.		1060		
TOTAL*		1590		

*Total = volume da solução de reação + volume da solução de células.

- 14 - Adicionar duas gotas de óleo mineral (o Light White Oil, da Sigma, proporcionou bons resultados).
- 15 - Colocar os tubos no termociclador, submetendo-os a 42 ciclos, sendo:
 - um ciclo de 94° C por 3 min e 36°C por 1 min;
 - 40 ciclos de 90° C por 1 min, 36°C por 1 min e 72°C por 2 min;
 - e um ciclo final de 72° C por 7 min.
- 16 - Aplicar o produto de amplificação em gel de agarose a 2,0%.
- 17 - Efetuar a coloração do gel com brometo de etídio, sob agitação, durante 30 min.
- 18 - Lavar o gel com dH₂O e descolorir durante 15 min, sob agitação.
- 19 - Visualizar em transiluminador (UV).
- 20 - Fotografar.
- 21 - Efetuar a análise dos dados.

Obs.: No caso de utilização de células intactas ou nódulos macerados, em vez de células que sofreram lise, substituir os passos 1 a 10 pelas recomendações da seção 9.3.2.2.

9.3.2. Comentários

9.3.2.1. Eficiência da amplificação de DNA a partir de células rompidas

Para determinar a eficiência da amplificação de DNA, com oligonucleotídeos arbitrários a partir de células rompidas, foram efetuados testes, e suspensões bacterianas com diferentes concentrações de células (10^4 a 10^7 céls./reação) foram comparadas com suspensões de DNA purificado. Foi observado que as concentrações de 10^4 a 10^5 células/reação produziram padrões de bandas similares àqueles obtidos a partir de DNA bacteriano purificado (Figura 9.3). Resultados semelhantes foram obtidos por Harrison et al. (1992), utilizando DNA purificado, células intactas de *Rhizobium* e nódulos macerados. Esses autores também observaram que os padrões gerados a partir das diferentes formas de amplificação foram semelhantes.

Em relação ao uso de células rompidas ou intactas, foi observado um rendimento significativamente superior nos produtos de amplificação pelo uso das células rompidas. Essa diferença foi atribuída à qualidade da enzima utilizada na amplificação (Loureiro & Carvalho, dados não publicados). A possibilidade de se obter produtos de amplificação, sem a necessidade de efetuar a extração de DNA, representa uma grande vantagem para os estudos com RAPD, pois os métodos normalmente empregados na extração de DNA consomem tempo e requerem cuidados, devido à toxicidade dos reagentes utilizados (por exemplo, com fenol e clorofórmio).

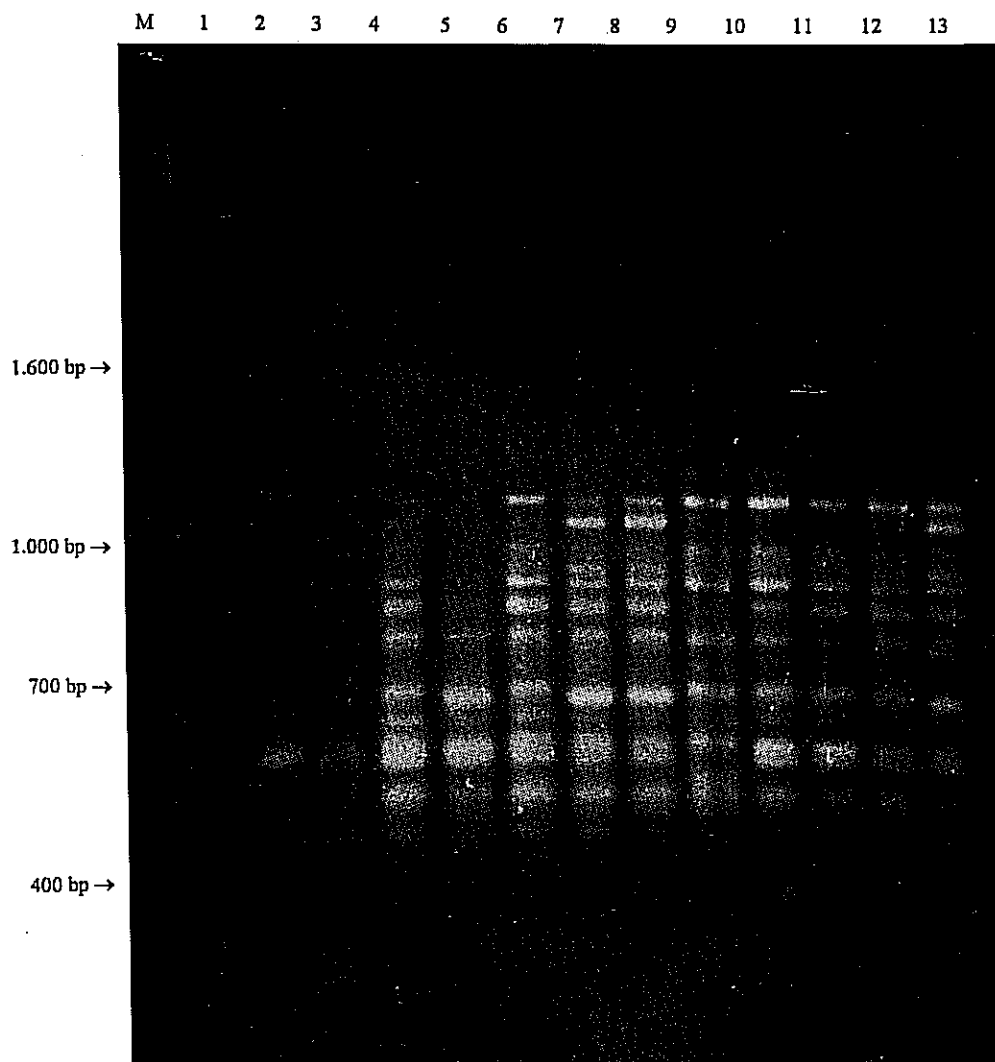


FIGURA 9.3. Padrão de bandas obtido com a estirpe BTAi 1, comparando ampliações a partir de diferentes concentrações de células rompidas e DNA purificado, utilizando o oligonucleotídeo OPP-20 (5'GACCCTAGTC3'). (M) marcador; 1) $2,1 \times 10^7$ cel; 2) $3,3 \times 10^6$ cel; 3) $6,6 \times 10^6$ cel; 4) $3,8 \times 10^5$ cel; 5) $7,7 \times 10^5$ cel; 6) $4,0 \times 10^4$ cel; 7) $8,1 \times 10^4$ cel; 8) $2,3 \times 10^4$ cel; 9) $4,6 \times 10^4$ cel.; 10) 15 ngDNA; 11) 30 ng DNA; 12) 50 ng DNA; 13) 100 ng DNA.

9.3.2.2. Preparo de *Rhizobium* e extrato de nódulo para a amplificação direta do DNA (método de Harrison et al., 1992)

As células foram cultivadas em meio PA (Hirsch et al., 1980), durante uma noite, até atingirem uma concentração aproximada de 10^8 células/mL. Um mililitro da cultura foi centrifugado a 11.600 g e o pélete foi suspenso em 1 mL de água destilada e esterilizada. A suspensão de células foi, então, diluída com água destilada e esterilizada até atingir 10^4 a 10^5 células por reação de amplificação.

Os nódulos foram removidos de plantas de trevo branco (cv. Menna) com seis semanas. As plantas foram cultivadas, assepticamente, e inoculadas aos dois dias após a germinação. Os nódulos foram macerados em 50 μ L de água destilada e esterilizada, e a suspensão foi centrifugada a 5250 g durante 30 s, para remover fragmentos. Dez microlitros do sobrenadante foram removidos e diluídos em água destilada e esterilizada, para obter a concentração de células correta para a amplificação.

9.3.2.3. Oligonucleotídeos

Como acontece com a maioria dos marcadores moleculares, a informação obtida a partir de um marcador individual de RAPD é muito baixa. Somente quando muitos desses marcadores anônimos (oligonucleotídeos arbitrários) são usados para definir um genoma é que as informações obtidas terão utilidade (Tanksley et al., 1989). Conseqüentemente, em experimentos com RAPD, é recomendado utilizar um número elevado de oligonucleotídeos, objetivando obter maiores informações sobre o genoma do organismo estudado.

Outros aspectos importantes, relacionados aos oligonucleotídeos utilizados em estudos com RAPD, são o seu tamanho e a sua composição: Williams et al. (1990), utilizando oligonucleotídeos arbitrários para amplificar o DNA genômico de soja, indicaram que oligonucleotídeos com menos que 9 pb foram ineficientes na amplificação. Harrison et al. (1992) destacaram que o tamanho do genoma de *Rhizobium* é muito menor do que o de soja; conseqüentemente, o uso de oligonucleotídeos muito longos poderá gerar menos informações quando usado com DNA de procariotos de tamanho limitado, devido ao número menor de sítios de ligação. Isso levou esses autores a testarem, para amplificar o DNA de *Rhizobium*, oligonucleotídeos de 7 a 10 mers. Em relação à composição dos oligonucleotídeos, Caetano-Anollés et al. (1991) indicaram que oligonucleotídeos com alto percentual de GC resultaram em mais produtos de amplificação. O uso de oligonucleotídeos com porcentagem de GC elevada, para a amplificação de DNA de *Rhizobium*, é necessário, devido ao teor geralmente elevado de GC no genoma desses organismos (Gibbins & Gregory, 1972).

No estudo efetuado por Loureiro & Carvalho (1993), foram utilizados 27 oligonucleotídeos de 10 mers, com quantidade de GC de 60 a 70% (sintetizados pela Operon Technologies). Os oligonucleotídeos que possibilitaram maior número de informações (quantidade e intensidade de bandas) possuíam as características relacionadas na Tabela 9.3.

9.3.2.4. Análise dos dados

Vários métodos numéricos têm sido utilizados para analisar os dados de RAPD (Demeke & Adams, 1994). Em relação ao estudo filogenético efetuado por Loureiro & Carvalho (1993), os dados foram codificados em relação à presença ou ausência de bandas de tamanho específicos. Após a codificação, foram usados em uma análise de similaridade genética no programa NTSYS para o PC. Através do dendrograma obtido, foi possível estabelecer diferentes grupos de similaridade entre as estirpes (Figura 9.4)

TABELA 9.3. Oligonucleotídeos que apresentaram boas ampliações com *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*.

Identificação do oligonucleotídeo	5' → 3'	Peso Molecular
OPN-01	GGTACTCCCC	2955
OPN-04	GACCGACCCA	2973
OPN-05	ACTGAACGCC	2988
OPN-06	GAGACGCACA	3037
OPN-08	ACCTCAGCTC	2939
OPN-13	AGCGTCACTC	2979
OPP-17	TGACCCGCCT	2955
OPP-18	GGCTTGGCCT	3026

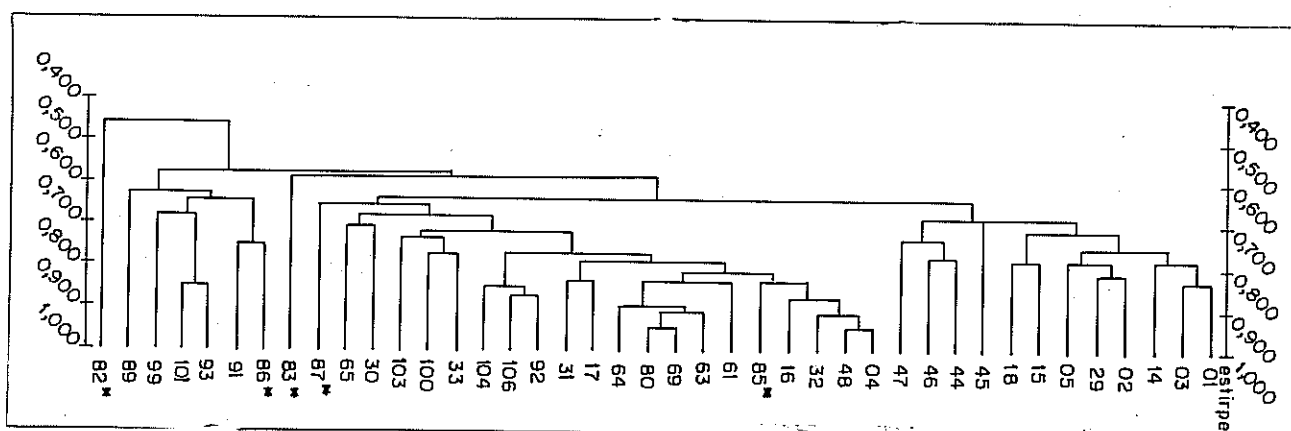


FIGURA 9.4. Dendrograma mostrando o nível de relação genética entre as estirpes de rizóbio, baseado em informações de RAPDs. Os agrupamentos foram consistentes com as demais informações sobre rizóbio (* Estirpes-controle).

Outros programas, além do NTSYS, têm sido utilizados, como PAUP, PHYLIP, CLINCH e MaClade (Demeke & Adams, 1994)

O grau de similaridade pode ser quantificado pela determinação da fração de marcadores em comum, em relação ao total de marcadores que foram comparados. A comparação entre dois indivíduos, em relação à presença ou ausência de um marcador de RAPD, induz a quatro resultados possíveis:

- presença no genótipo A e presença no genótipo B (1,1);
- presença no genótipo A e ausência no genótipo B (1,0);
- ausência no genótipo A e presença no genótipo B (0,1);
- ou ausência no genótipo A e ausência no genótipo B (0,0).

Através da comparação desses valores, é possível determinar a distância genética (d_g) entre os organismos (Figura 9.5) (Yu & Pauls, 1994). Essa distância é calculada por:

$$d_g = \frac{\sum_{i=1}^n |A_i - B_i|}{n}$$

$$= 4/6, = 0,67$$

(a)

Número de marcadores		
RAPD	Genótipo A	Genótipo B
1	—	—
2	—	
3		—
4	—	
5		—
6	—	—

(b)

	Condição de Contingência do Genótipo A	Condição de Contingência do Genótipo B	A - B
1	1	1	0
2	1	0	1
3	0	1	1
4	1	0	1
5	0	1	1
6	1	1	0
$\Sigma A - B $			4

FIGURA 9.5. Método de determinação da distância genética pela comparação de marcadores RAPD: (a) padrão hipotético de RAPD obtido com dois genótipos; (b) condições de contingência para os genótipos A e B com base nos padrões mostrados em (a).

9.4. Considerações Finais

Devido à eficiência, à facilidade técnica e ao baixo custo, o uso de PCR-RAPDs deverá ser muito comum (talvez fundamental) nos estudos de taxonomia e evolução de microrganismos do solo. Os dados obtidos nas análises com RAPD têm apresentado boa concordância com os dados de morfologia, análise química, e molecular (isoenzima, RFLP) (Demeke & Adams, 1994).

De modo similar ao que ocorre em estudos com outros organismos, o uso de oligonucleotídeos arbitrários para amplificar segmentos de DNA do *Rhizobium* é uma ferramenta útil no estudo de populações nativas ou introduzidas, e em análise de relações genéticas entre estirpes, especialmente se forem utilizados oligonucleotídeos diferentes. A possibilidade de amplificar DNA diretamente de células e, especialmente, de nódulos, torna a técnica viável (aplicável) para os estudos que necessitam selecionar grande número de estirpes nativas. Esta técnica também é útil em estudos de competição, inoculação e, preferencialmente, naqueles que envolvem estirpes específicas. Com o uso de isolados marcados, por exemplo, pela resistência a antibióticos, pode-se trabalhar com estirpes que não representam exatamente o comportamento dos tipos selvagens originais. A técnica de RAPD evita esse problema. Além disso, considerando o grande interesse na introdução de organismos modificados geneticamente, muitos estudos futuros envolvendo populações artificiais de rizóbio necessitarão de métodos que possibilitem o monitoramento de organismos e do DNA recombinante transportado por eles. O uso de oligonucleotídeos arbitrários para a amplificação do DNA (RAPD) pode permitir, ainda, o estudo de microrganismos geneticamente engenheirados (modificados) em populações (Harrison et al., 1992).

Deve-se lembrar, entretanto, que tanto o RAPD como o PCR (Charlieu, 1994) não poderão substituir todas as outras metodologias empregadas, atualmente, em biologia molecular, mas essas análises representam, em muitos casos, uma boa alternativa para vários estudos na área da microbiologia do solo.

9.5. Referências Bibliográficas

- BEJ, A. K.; MAHBUDANI, M. Thermostable DNA polymerases for *in vitro* DNA amplifications. In: GRIFFIN, H.G.; GRIFFIN, A.M. eds. **PCR - Technology Current Inovations**. Florida: CRC Press, Inc., 1994. p 219-237.
- BEYNON, J. L; JOSEY, D. P. Demonstration of heterogeneity in a natural population of *Rhizobium phaseoli* using variation in I intrinsic resistance. **J. Gen. Microbiol.**, v.118, p.437-442, 1980.
- BIDWELL, J. DNA-RFLP analysis and genotyping of HLA-DR and HLA-DQ antigens. **Immun.Today**, 9:18-23, 1988
- CAETANO-ANOLLÉS, G., BASSAM, B. J.; GRESSHOFF, P. M. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Biotechnology**, v.9, p.553-557, 1991.

- CHARLIEU, J. P. PCR as a technique used daily in molecular biology. In: GRIFFIN, H.G; GRIFFIN, A.M. eds. **PCR Technology Current Inovations**. Florida: CRC Press, Inc., 1994. p.1-4.
- DEMEKE, T.; ADAMS, R. P. The use of PCR-RAPD analysis in plant taxonomy and evolution. In: GRIFFIN, H.G; GRIFFIN, A.M. eds. **PCR Technology -Current Innovations**. Florida: CRC Press, Inc., 1994. p. 179-191.
- EARDLY, B. D., MATERON, L. A., SMITH, N. H., JOHNSON, D. A.; RUMBAUGH, M.D.; SELANDER, R.K. Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.56 p.187-194, 1990.
- ELRICH, H.A.,ed. **PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification**. New York: Stockton. 1989. 246p.
- ERLICH, H. A., GELFAND, D.; SNINSKY, J. J. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**, v.252, p.1643-1651, 1991.
- GARDNER, E. J., SIMMONS, M. J; SNUSTAD, D. P., eds. Genetic fine structure: gene cloning and sequencing. In: **Principles of Genetics**. 8th. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1991.p.348-389.
- GIBBINS, A. M; GREGORY, K. F. Relatedness among *Rhizobium* and *Agrobacterium* species determined by three methods of nucleic acid hybridisation. **J. Bacteriol.**, v.111, p.129-141, 1972.
- GRIFFIN, H. G. Direct PCR screening of lambda and cosmid libraries. In: GRIFFIN, H.G.; GRIFFIN, A.M. eds. **PCR Technology - Current Innovations**. Florida: CRC Press, Inc., 1994. p.53-57.
- HARRISON, S. P., MYTTON, L. R., SKØT, L., DYE, M.; CRESSWELL, A. Characterisation of *Rhizobium* isolates by amplification of DNA polymorphisms using random oligonucleotides. **Can. J. Microbiol.**, v.38, p.1009-1015, 1992.
- HIRSCH, P. R., van MONTAGU, M., JOHNSTON, M., BREWIN, N. J.; SCHELL, J. Physical identification of bacteriocinogenic nodulation and other plasmids in strains of *Rhizobium leguminosarum*. **J. Gen. Microbiol.**, v.120, p.403-412, 1980.
- INNIS, M., GELFAND, D., SNINSKY, D.; WHITE, T. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. New York: Academic Press, 1990. 482 p.
- JORDAN, D.C. In: N.R. KRIEG; J.G. HOLT ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 1. Baltimore: The William & Wilkins Co., 1984. p.234-244.

- LOUREIRO, M.de F.; CARVALHO, L. J. C. B. Genomic fingerprinting of rhizobia by using polymerase chain reaction (PCR) with arbitrary oligonucleotídeos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 22, 1993, Caxambú. **Resumos**. Caxambu: SBBq, 1993. p.66.
- MAZURIER, S. I.; WERNARS, K. Typing of *Listeria* strains by random amplification of polymorphic DNA. **Res. Microbiol.** 143:499-505. 1992.
- NOEL, K.D., SÁNCHEZ, F., FERNÁNDEZ, L., LEEMANS, J.; CEVALLOS, M.A *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. **J. Bacteriol.**, v.158, p.148-155, 1984.
- ROBERT, F. M.; SCHMIDT, E. L. Somatic serogroups among 55 strains of *Rhizobium phaseoli*. **Can. J. Microbiol.**, v.31, p.519-523, 1985.
- SAIKI, R. K., GEFAND, H.; STOFELL, S. Oligonucleotide: direct enzymatic amplification of DNA polymerase. **Science**, v.239 p.487-491, 1988.
- STEFFAN, R. J; ATLAS, R. M. Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology. **Annu. Rev. Microbiol.**, 45:137-161. 1991
- STRYER, L. ed. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A., 1992. 881p.
- TANKSLEY, S. D., YOUNG, N. D., PATERSON, A. H.; BONIERBALE, M. W. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **Biotechnology**, v. 7 p.257-264, 1989.
- WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. DNA polymorphisms amplified by arbitrary oligonucleotídeos are useful as genetic markers. **Nucl. Acids Res.**, v.18, p.6531-6555, 1990.
- YU, K.; PAULS, K. P. The use of RAPD analysis to tag genes and determine relatedness in heterogeneous plant populations using tetraploid alfafa as an example. In: GRIFFIN, H.G.; GRIFFIN, A.M. ed.. **PCR Technology - Current Innovations**. Florida: CRC Press, Inc., 1994. p.201-214.
- ZEVENHUIZEN, L. P T. M; BERTOCCHI, C. Polysaccharide production by *Rhizobium phaseoli* and the typing of their excreted anionic polysaccharides. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.65, p.211-218, 1989.

INTRODUÇÃO DE GENES EM *RHIZOBIUM*Leif Skøt¹Ricardo S. Araujo²**10.1. Introdução**

Em termos agrícolas, a simbiose de rizóbio com culturas de leguminosas implica em uma menor necessidade de aplicação de fertilizantes nitrogenados, mas a simbiose é também interessante em termos de interações entre plantas e microrganismos. A análise dos genes de nodulação dos rizóbios, ao longo dos últimos 10 anos, conduziu à descoberta de diversos sinais moleculares produzidos por ambos os parceiros da simbiose. Flavonóides liberados pelas raízes da planta atuam como sinais na indução dos genes nos rizóbios; esses genes, por sua vez, são responsáveis pela síntese de moléculas de lipo-oligossacarídeos sinalizadores que induzem o encurvamento dos pelos radiculares e a divisão das células do córtex da raiz, dando origem a um meristema nodular (Lerouge et al., 1990). Os lipo-oligossacarídeos também apresentam, em sua composição, decorações químicas que atuam como determinantes de especificidade hospedeira (Fisher & Long, 1992; Spaink, 1992). A regulação dos genes envolvidos com a fixação de nitrogênio também foi investigada (Hennecke, 1990).

Apesar desse sucesso, ainda há muito o que se aprender antes que os conhecimentos resultem em uma performance mais adequada das leguminosas na agricultura. Uma das maiores barreiras para isso é o problema da competição por sítios de nodulação. Em muitas áreas do mundo é difícil se obter uma resposta à inoculação com estirpes melhoradas de *Rhizobium*, porque o solo contém uma grande população naturalizada de rizóbios competitivos (Triplett, 1990), o que faz da genética da competitividade uma área de estudos de grande importância. Uma outra área interessante é a da possibilidade de se utilizarem os rizóbios como fabricantes e excretadores de determinados produtos gênicos na rizosfera ou nos nódulos das leguminosas (Mytton & Skøt, 1993). Alguns dos métodos descritos neste capítulo foram empregados em um projeto cujo objetivo era a introdução de genes envolvidos na síntese de toxinas inseticidas, clonados de *Bacillus thuringiensis*, no *Rhizobium* e nos nódulos, para o controle biológico de larvas de determinados insetos que se alimentam de nódulos (Skøt et al., 1990, 1994). Esses métodos, no entanto, prestam-se à manipulação genética dos rizóbios em geral, tendo sido selecionados devido a sua utilidade específica no caso desses organismos. Métodos generalizados de manipulação genética não serão incluídos, por haverem sido descritos em diversos manuais de metodologia.

¹Pesquisador, Ph.D., Institute of Grassland and Environment Research, Plas Gogerddan, Aberystwyth, Dyfed, SY23 3EB, Wales, UK.

²Pesquisador, Ph.D., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP), Cx. Postal 179, CEP 74001-970, Goiânia, GO.

10.2. Meios de Cultura

Existe um grande número de meios de cultura complexos ou definidos (mínimos) desenvolvidos e empregados ao longo dos anos. O meio de cultura mais utilizado universalmente é, provavelmente, o Extrato de Levedura (“Yeast Extract”)-manitol (YM), um meio de simples preparo que promove crescimento rápido. Além disso, a viabilidade dos rizóbios no meio YM, após armazenamento a 4° C, é melhor que nos outros meios. A maior desvantagem desse meio é que as bactérias produzem quantidades copiosas de polissacarídeos de alta viscosidade, dificultando a obtenção de “pellets” firmes após centrifugação. O meio Triptona-Extrato de Levedura (TY) ou o Peptona (PA) são meios alternativos nos quais os rizóbios produzem menos polissacarídeos. Os rizóbios podem, ainda, apresentar taxas de crescimento mais lentas em meio PA, o que às vezes é vantajoso.

Meios complexos (quantidades para 1 litro de meio de cultura)

a) Extrato de levedura-manitol: EM ou YM (Vincent, 1970) (ver capítulo 2)

b) Triptona-extrato de levedura: TY (Beringer, 1974)

Triptona	5,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
CaCl ₂ · 6 H ₂ O ou (2 H ₂ O)	1,3 g (0,87 g)
Ajustar o pH para 6,8-7,0.	

c) Meio de peptona: PA (Hirsch et al., 1980)

Peptona	4,0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g
Ajustar o pH para 6,8-7,0.	

d) Meio Luria-Bertani: LB (Maniatis et al., 1989) - para *Escherichia coli*

Tryptona	10,0 g
Extrato de Levedura	5,0 g
NaCl	3,0 g
Ajustar o pH para 7,5.	

Meios de cultura definidos (quantidades para 1 litro)a) Meio de sais com MOPS: MS (Jordan, 1984)

Macronutriente	Quantidade (g)	Conc. Estoque
MOPS	8,37	10X
KOH	1,12	
NH ₄ Cl	1,07	100
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,98	100X
K ₂ HPO ₄	0,21	100X
KH ₂ PO ₄	0,05	100X

Preparar uma solução estoque com MOPS e KOH juntos, e esterilizá-la por filtração; preparar, em separado, soluções estoque dos outros sais. Para o preparo do meio, observar a diluição necessária das soluções estoque. Por exemplo: se o estoque for 10X, empregar 100 mL por litro de meio de cultura.

Fonte de carbono: succinato de sódio, 2,43 g.

Micronutriente (estoque 100X)	Quantidade (mg)
NaCl	5,0
H ₃ BO ₃	1,0
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1,0
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,5
MnSO ₄ · H ₂ O	0,5
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	1,0

Preparar a solução estoque conforme composição acima. Esta solução estoque é concentrada 100X; utilizar 10 mL por litro de meio de cultura.

Outros ingredientes:

CaCO ₃	20,0 g	
EDTA	10,0 g	1000X
Fe NaEDTA	2,0 g	

CaCO₃ e NaFeEDTA devem ser adicionados diretamente ao meio de cultura; preparar solução estoque (1000X) de EDTA (observar condições de pH para dissolver) e empregar 1 mL por litro de meio de cultura.

Vitaminas	µg/L	1000X
Biotina	75	
Ácido pantotênico	75	
Tiamina	75	

Preparar a solução de vitaminas e esterilizar, por filtração, em membrana de 0,22 µm; empregar 1 mL por litro de meio de cultura esterilizado.

Preparar o meio sem adicionar o MOPS e o KOH e autoclavar. Adicionar a quantidade apropriada da solução de MOPS-KOH filtrada ao meio após autoclavagem. Adicionar as vitaminas ao meio somente após autoclavagem. NÃO AUTOCLAVAR AS SOLUÇÕES ESTOQUE, E ARMAZENÁ-LAS A 4° C. Após a adição da solução de MOPS-KOH o pH do meio deverá estar em torno de 7,2.

b) Meio BSM (Bergersen, 1961) - quantidades para 1 litro

Manitol	10 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	0,45 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
Solução de ferro do meio YM	1 mL
Ácido glutâmico	1,1 g
Solução de tiamina	1 mL
Solução de biotina	1 mL

As soluções de vitaminas (tiamina e biotina) são feitas, separadamente, à concentração de 1 mg/mL, dissolvidas em água, e filtradas em filtro miliporo; só devem ser misturadas ao meio de cultura quando este estiver frio o suficiente para receber antibióticos (45° C a 55° C). É EXTREMAMENTE IMPORTANTE AJUSTAR O pH DESTE MEIO PARA 7,0, OU NÃO HAVERÁ SOLIDIFICAÇÃO PORQUE O ÁGAR É HIDROLISADO PELA ACIDEZ.

c) Meio Y (Diebold & Noel, 1989) - quantidades para 1 litro

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,10 g
K ₂ HPO ₄	0,22 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,15 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,04 g
Glutamato de sódio	1,00 g
Succinato de sódio	1,00 g
Solução de vitaminas	10 mL
Ajustar o pH para 7,0	

A solução de vitaminas é preparada com 100 mg/L de cada uma das vitaminas (biotina, tiamina e pantotenato de cálcio) e filtrada em filtro miliporo antes de incorporá-la ao meio de cultura.

10.3. Plasmídeos

Os rizóbios normalmente contêm alguns plasmídeos cujos tamanhos variam entre 100 e 500 kilobases (kb). A maior quantidade de plasmídeos é encontrada em *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *trifolii* e *phaseoli*. No *R. meliloti* normalmente se encontram dois plasmídeos muito grandes, o maior deles contendo cerca de 1.500 kb. Os genes envolvidos na nodulação (*nod*) e fixação de nitrogênio (*nif* e *fix*) estão localizados em um desses plasmídeos (denominado plasmídeo simbiótico - pSym). O *R. loti* contém um plasmídeo grande mas, ao contrário das espécies mencionadas acima, esse plasmídeo não carrega os genes *nod*, *nif* e *fix*. O *Bradyrhizobium*, de crescimento lento, não parece conter nenhum grande plasmídeo. A presença, em plasmídeos, de genes relevantes para a simbiose, em diversas espécies de *Rhizobium*, em sua forma natural, provocou um grande interesse pela identificação e análise desse material genético. A seguir, serão descritos alguns métodos para a visualização e análise de DNA de plasmídeos dos rizóbios. O primeiro é bastante rápido, mas gentil o suficiente para permitir, inclusive a visualização dos maiores plasmídeos encontrados em *Rhizobium*. O método é baseado no procedimento originalmente descrito por Eckhardt (1978), com modificações introduzidas por P. Hirsch (comunicação pessoal) para adequá-lo à eletroforese em géis horizontais de agarose.

10.3.1. Géis “Rápidos” para Visualização de Plasmídeos em *Rhizobium*

10.3.1.1. Meios, tampões e soluções

1. Meio PA (ver composição seção 10.2, item c).

2. 10X TBE - Tampão para eletroforese:

108 g Tris-base;

55 g ácido bórico;

9,3 g EDTA (sal dissódico);

água destilada suficiente para 1 L;

pH 8,3 é automático.

3. Tampão Tris-sacarose para ressuspender células.

Dissolver 25% (p/v) de sacarose em uma solução 25 mM de TrisCl, pH 8,0. O estoque de Tris deve ser preparado com a concentração de 1 M e o pH ajustado para 8,0 com HCl. Os tampões contendo Tris devem ser autoclavados. Dividir a solução de Tris-sacarose em pequenas alíquotas para armazenagem.

4. Solução estoque de lisozima.

Utilizar lisozima do tipo SIGMA (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), referência L-6876 cristalizada.

Preparar uma solução estoque na concentração de 20 mg/mL em água destilada esterilizada e dividir em alíquotas de 50 μ L para armazenagem a -20° C. Cada alíquota só deve ser descongelada uma ÚNICA vez para utilização.

5. Solução estoque de ribonuclease (RNase).

Utilizar ribonuclease A do tipo SIGMA, referência R-5503, com 50 a 75 U/mg de proteína. Preparar a solução na concentração de 400 µg/mL em tampão de RNase (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 15 mM NaCl). Ferver por 15 min e deixar esfriar à temperatura ambiente; este tratamento inativa as DNases. Dividir em alíquotas de 50 µL e armazenar a -20° C.

6. Tampão de ressuspensão (preparar imediatamente antes do uso):

1 mL de estoque Tris-sacarose

50 µL de estoque de lisozima

50 µL de estoque de RNase.

7. Brometo de etídio

Preparar uma solução estoque na concentração de 10 mg/mL em água destilada, e armazenar no escuro. CUIDADO, este reagente é cancerígeno e mutagênico.

8. Corante

30% de glicerol

50 mM Na₂EDTA pH 8,0

0,25% (p/v) azul de bromofenol

0,25% (p/v) cianol de xileno

Armazenar a 4° C.

9. Agarose

Preparar a agarose dissolvendo-a na concentração de 0,7% em TBE 1X (partindo do estoque 10X, fazer uma diluição em água destilada). A quantidade de agarose a ser preparada vai depender do tamanho da caixa de gel. Por exemplo, uma caixa de 15 cm x 15 cm consome cerca de 150 mL de agarose. Dissolva a agarose através de fervura ao fogo ou no forno de microondas.

10. SDS (Sodium Dodecyl Sulphate)-agarose

Preparar uma solução de agarose a 0,4% com SDS em TBE 1X. A forma mais fácil de preparar esta solução é tomando-se 2 mL da solução de agarose a 0,7% (depois de derretida) e adicionando-se 1,15 mL de TBE 1X, 0,35 mL de uma solução de SDS a 10% (p/v) e 100 µL de corante. Manter a solução derretida a 65° C até o momento de empregar.

10.3.1.2. Preparação do *Rhizobium*

1. Multiplicar as culturas de *Rhizobium* em 5 mL de meio PA, com aeração, a 28° C, até a metade da fase logarítmica de crescimento (a concentração desejada é cerca de 10⁷ céls./mL); normalmente são necessárias 14 a 16 horas de crescimento.

2. Transferir 0,5 mL a 1,0 mL (dependendo da densidade óptica da cultura) para um tubo de microcentrífuga e centrifugue à velocidade máxima por 30 segundos. Descartar o sobrenadante.

3. Ressuspender as células em 30 µL de tampão de ressuspensão e transferir para o gel.

10.3.1.3. Preparação do Gel

1. Limpar a bandeja com etanol e selar as extremidades com fita adesiva (tipo fita-crepe).
2. Limpar o pente e o formador de sulcos com etanol, e monte o conjunto. Transfira o conjunto para a bandeja, certificando-se que há um espaço de 0,5 a 1,0 mm entre o pente e a bandeja.
3. Despejar a solução de agarose a 0,7% e deixar solidificar. Remover o formador de sulcos e preencher o sulco resultante, atrás das cavidades, com a solução de agarose a 0,4% + 1% SDS, deixando solidificar. Remover o pente formador das cavidades e a fita de vedação.
4. Transferir o gel para a caixa de eletroforese. Encher a caixa com tampão para eletroforese (TBE 1X) até que o gel esteja coberto por cerca de 1 mm de tampão. Aplicar as bactérias ressuspensas às cavidades do gel e deixá-lo correr sob 75 a 100 V (75 a 100 mA) até que a linha do indicador azul de bromofenol tenha saído do gel, cerca de quatro a cinco horas. O indicador cianol de xileno indica a posição aproximada de fragmentos lineares de DNA cromossômico. Levar o gel para colorir com solução contendo 0,5 µg/mL de brometo de erídio durante 20 a 40 min. Deixar descolorir em água destilada por 20 min. Examinar o gel sob luz ultravioleta para visualização das bandas correspondentes aos plasmídeos.

DICAS: 1) Quando estiver ressuspensando culturas de bactérias através de pipetagens, ser gentil para evitar a quebra de plasmídeos grandes e frágeis. 2) Certificar-se de usar tampão TBE a 1X; Maniatis et al. (1989) defendem o uso de TBE a 0,5X para eletroforese em géis de agarose, o que é bom para a maioria dos casos, mas não serve para os géis de plasmídeos.

10.3.1.4. Isolamento de Plasmídeos de *Rhizobium*

O método descrito acima só é útil para a visualização dos plasmídeos nos rizóbios. Já os seguintes permitem o isolamento de DNA plasmidial em quantidade suficiente para manipulações futuras (ex.: clonagem de fragmentos). Todavia, o manuseio e as etapas envolvidas normalmente permitem que sejam isolados intactos apenas os menores plasmídeos e alguns cosmídeos.

Método Nº 1

1. Crescer as culturas em 200 mL de meio PA por 2 a 3 dias a 28° C, com aeração, até a metade da fase logarítmica de crescimento.
2. Colher as células por centrifugação a 8000 rpm durante 15 min. Lavar o pélete com T₅₀E₂₀ (50 mM Tris-Cl, pH 8,0, 20 mM Na₂EDTA). Ressuspender o pélete em 16 mL de T₅₀E₂₀ em um béquer pequeno.
3. Adicionar 2 mL de pronase B (5 mg/mL em T₅₀E₂₀, pré-digerida por 1 hora a 37° C) e 2 mL de SDS (10% p/v em T₅₀E₂₀). Tampar.

4. Incubar, a 37° C, durante 1 hora, ou até que haja clarificação da suspensão (indica que houve quebra das células), agitando, gentilmente de vez em quando. A solução se tornará muito viscosa.

5. Elevar o pH para 12,4 com solução 3 M de NaOH (são necessários cerca de 0,5 mL), agitando de um modo gentil, mas completamente, com um bastão de plástico ou pipeta, até que a leitura no potenciômetro se estabilize. Deixar descansar por 20 minutos à temperatura ambiente.

6. Ajustar o pH para 8,5 utilizando solução 2 M de Tris-HCl, com pH 7,0 (são necessários cerca de 2 mL).

7. Decantar para um tubo de centrifuga com capacidade para 50 mL. Adicionar solução gelada de NaCl a 5 M de forma a obter concentração final de 1 M (ou seja, são necessários cerca de 5,5 mL para 20 mL de mistura de células rompidas). Misturar, por meio de inversões dos tubos e deixar repousar, em gelo, por quatro horas.

8. Centrifugar o preparado de células lisadas (os sedimentos de NaCl/SDS), centrifugando a 15000 rpm por 20 minutos, com a centrífuga a 4° C. Decantar o sobrenadante para um tubo limpo (repita a operação se ainda houver resíduos de SDS/NaCl).

9. Adicionar 50% p/v de PEG (polietileno glicol, peso molecular 8000) para uma concentração final de 10%. Misture invertendo os tubos e guardar no gelo até o dia seguinte.

10. Sedimentar a mistura de PEG e DNA por centrifugação a 7000 rpm, por cerca de 15 min a 4° C. Descartar o sobrenadante e secar os tubos completamente. Adicionar cerca de 0,5 mL de T₅₀E₂₀ ao pélete e deixe no gelo para redissolver. A dissolução pode ser acelerada girando-se os tubos gentilmente.

11. Transferir a solução de DNA para um tubo de microcentrifuga por meio de uma pipeta de 5 mL invertida ou através da ponta cortada de um bico plástico para pipetador automático de 1 mL.

12. Transferir uma amostra (30 µL de DNA + 6 µL de solução de azul bromofenol 6x: 0,25% azul de bromofenol em 40% p/v sacarose em água destilada esterilizada) para um gel com 0,7% de agarose para correr. Este procedimento visa confirmar a presença de DNA plasmidial na preparação.

Método N° 2 (Holmes & Quigley, 1981)

1. Partindo de culturas frescas, inocular meio de cultura TY líquido (3 mL a 5 mL) adicionado de antibióticos (5 µg/mL), quando possível e/ou necessário para manter a pressão seletiva para os plasmídeos em estudo, e multiplicar as bactérias por 6 a 8 horas (*E. coli*), ou durante a noite (*Rhizobium*).

2. Transferir 1,5 mL da cultura para um tubo de microcentrifuga esterilizado e centrifugar na velocidade máxima por 5-10 segundos se for *E. coli*, ou 2 min se for *Rhizobium*.

3. Se estiver trabalhando com *Rhizobium*, lavar as células uma vez com uma solução de SARKOSYL a 0,1%.

4. Ressuspender o pellet em 350 µL de solução STET (ver a seguir).

5. Adicionar 5 µL de uma solução de lisozima a 50 mg/mL, preparada em tampão TE (10 mM TrisCl e 1 mM EDTA) com pH 8,0 no caso *E. coli*, e 10 µL, para *Rhizobium*.
6. Misturar invertendo o tubo, NÃO USAR O VÓRTEX.
7. Incubar à temperatura ambiente por 2-5 min no caso de *E. coli*, e 15 min para *Rhizobium*.
8. Transferir os tubos para banho-maria a 90°-99°C (assim que parar de ferver) e deixá-los ali por 45 segundos se estiver extraindo cosmídeos, ou 90 segundos no caso de estar extraindo plasmídeos menores.
9. Centrifugar na velocidade máxima por 10-15 min à temperatura ambiente.
10. Retirar, com um palito esterilizado, e jogar fora o pélete branco e viscoso que se formará no fundo do tubo.
11. Adicionar 40 µL de uma solução 3 M de acetato de sódio, e 400 µL de isopropanol à temperatura ambiente.
12. Misturar por inversão do tubo e incubar em gelo por cerca de 3 min.
13. Centrifugar na velocidade máxima por 5 min e descartar o sobrenadante.
14. Lavar o pélete duas vezes com etanol a 70%. Se for usar os plasmídeos para transformação, é recomendável fazer mais uma lavagem com etanol a 70% para remover o excesso de detergente (Triton X-100).
15. Secar o pélete e ressuspender o DNA em 20 µL de tampão TE a pH 8,0, e usar 10 µL numa digestão, ou ressuspender em 100 µl e usar tudo para a transformação.
16. Para ter certeza da completa ressuspensão do DNA, incubar os tubos em um banho-maria a 65° C por 10 min, antes de usar em digestões ou transformações.

Solução STET

- 8% Sacarose
- 5% Triton X-100
- 50 mM EDTA
- 50 mM Tris-HCl, pH 8,0

10.3.2. Plasmídeos de Amplo Espectro para Estudos Genéticos de *Rhizobium*

Desde que Beringer (1974) relatou a transferência do plasmídeo RP4, do grupo de incompatibilidade P, entre duas estirpes de *R. leguminosarum*, houve o desenvolvimento de muitos plasmídeos para a manipulação dos rizóbios. Os plasmídeos mais utilizados para a transferência de DNA nos rizóbios pertencem aos grupos de incompatibilidade P e Q. Seria necessário um texto muito longo para a elaboração de uma lista completa dos plasmídeos empregados em genética molecular dos rizóbios, razão pela qual só serão mencionados, nesta parte, alguns dos mais utilizados. Para maiores detalhes sobre plasmídeos promíscuos em bactérias Gram-negativas, o leitor deve procurar o artigo de Thomas (1989) e, para aqueles específicos para a análise dos rizóbios, o artigo de Martinez et al. (1990).

Um dos vetores de clonagem mais populares na preparação de bibliotecas genômicas em *Rhizobium* é o cosmídeo pLAFR1 (Friedman et al., 1982). Este vetor permite a clonagem de fragmentos de 15 kb a 30 kb, e seu empacotamento em cabeças vazias do fago λ . Infelizmente, esse vetor contém apenas um sítio de restrição com *EcoRI* para a clonagem. Outros derivados com mais sítios de restrição para clonagem foram preparados como, por exemplo, pLAFR3 (Staskawicz et al., 1987) e pCP13 (Darzins & Chackrabarty, 1984). Outros plasmídeos de uso generalizado com aplicações diversas são o pKT230 (Bagdasarian et al., 1981), o pSUP104 (Priefer et al., 1985) e o pLA2917 (Allen & Hanson, 1985), utilizados com sucesso para a construção de bibliotecas genômicas de *R. etli* (Araujo, 1993), *R. l. bv. phaseoli* (Beattie, 1991) e *R. tropici* (Milner et al., 1992). Os fragmentos clonados normalmente inativam um gene para resistência a antibióticos por sua inserção nesses vetores. Recentemente, foram desenvolvidos diversos plasmídeos destinados à análise da atividade de promotores em *Rhizobium*. A maioria desses plasmídeos são modificações de plasmídeos dos grupos de incompatibilidade P e Q, contendo a seqüência que codifica para a produção de β -galactosidase (*lacZ*) e sítios únicos de restrição em seu terminal 5', que permitem a inserção de DNA dos rizóbios em estudo (Spaink et al., 1987; Labes et al., 1990). Foram, também, construídos vários vetores de expressão gênica com amplo espectro de hospedeiros. Estes são derivados de pSUP104 e contêm promotores, como por exemplo o do gene para resistência à kanamicina, imediatamente acima (“upstream”) de um sítio de clonagem múltipla, no qual se pode clonar a seqüência gênica de interesse (Labes et al., 1990).

Plasmídeos que podem ser transferidos, mas não podem ser mantidos nos rizóbios são extremamente úteis para a inserção de transposons como o Tn5. Esses plasmídeos têm uma estreita gama de hospedeiros, mas contêm genes de mobilização provenientes de um plasmídeo com muitos hospedeiros. Podem-se transferir esses plasmídeos através de conjugações em que a estirpe doadora (normalmente *Escherichia coli*) contém os genes de transferência (*tra*) *in trans* (contido em uma molécula de DNA diferente daquela que contém o gene de interesse ou o transposon). Quando transferido para o rizóbio, o transposon se solta do plasmídeo com uma certa freqüência e se insere, ao acaso, no genoma, enquanto o plasmídeo é perdido, por incompatibilidade, da população de rizóbios. Se o transposon se inserir em um gene ativo, ele causará sua inativação. Esta propriedade transformou os transposons em armas poderosas para a execução de mutagênese, ao acaso, de genes rizobianos (Martinez et al., 1990). A primeira transferência do Tn5 para o rizóbio foi relatada por Beringer et al. (1978) mas, hoje, existem vetores mais confiáveis para essa finalidade, como pSUP101 e pSUP102 (Simon et al., 1986).

A região central da molécula do Tn5 não é essencial para a transposição ou inserção. Por isso, esse transposon tem servido como veículo para a inserção de seqüências gênicas úteis como genes marcadores (Simon et al., 1986; Cresswell et al., 1994) ou genes de mobilização (Simon, 1984). O último caso é particularmente útil porque os plasmídeos nativos dos rizóbios (que normalmente não são transmissíveis), contendo a seqüência Tn5-Mob, podem ser mobilizados e transferidos para outras

estirpes, desde que os genes de transferência estejam presentes *in trans* no doador, o que pode ser obtido mais facilmente, com a introdução do plasmídeo auxiliar com ampla gama de hospedeiros, RP4-4, na estirpe doadora (Simon, 1984).

Um outro derivado do transposon Tn5, contendo as genes *sacR* e *sacB* de *Bacillus subtilis*, tem sido muito útil na seleção de rizóbios que sofreram a cura de um de seus plasmídeos nativos. Este derivado foi desenvolvido por Hynes et al. (1989, 1990) e se beneficia do fato que os genes *sacR* e *sacB* tornam as bactérias Gram-negativas, que os carregam, incapazes de metabolizar a sacarose como fonte de carbono. Uma estirpe de *Rhizobium* marcada com Tn5-Sac em um de seus plasmídeos é exposta a um meio contendo uma alta concentração de sacarose. As colônias que crescerem nesse meio são então analisadas quanto à perda do plasmídeo marcado com o Tn5-Sac.

Finalmente, o transposon Tn5 também tem sido utilizado para a introdução de genes úteis, de outros organismos, nos rizóbios (e em outras bactérias Gram-negativas). Exemplos desses genes incluem a α -toxina de *Bacillus thuringiensis*, com propriedades inseticidas, para o controle biológico de insetos que se alimentam especificamente de nódulos radiculares (Skøt et al., 1990, 1994). O Tn5 inserido no genoma do *Rhizobium* é mantido de forma mais estável que um plasmídeo com ampla gama de hospedeiros. Os plasmídeos são perdidos com muita facilidade de seus hospedeiros se não houver pressão seletiva constante para sua presença (Triplett & Sadowsky, 1992; Skøt et al., 1994).

10.3.3. Transferência de Genes para o *Rhizobium*

Ao contrário do que acontece para *Escherichia coli*, não existem métodos eficientes para a transformação genética de *Rhizobium*. A clonagem e a manipulação do DNA são realizadas em *E. coli* como hospedeiro e os plasmídeos são, subseqüentemente, transferidos para os rizóbios por conjugação. Entretanto, muitos plasmídeos com ampla gama de hospedeiros só podem ser mobilizados se houver genes de transferência *in trans*. Existem duas maneiras de se atingir esse objetivo: 1) Através de cruzamentos triparentais que incluem a estirpe doadora e uma outra estirpe auxiliar (*tra*⁺) de *E. coli*. Um plasmídeo auxiliar bastante utilizado é pRK2013 (Ditta et al., 1980); 2) Através de cruzamentos biparentais quando a estirpe doadora de *E. coli* carrega os genes de transferência em seu genoma. A estirpe S17-1 tem todo o plasmídeo RP4 incorporado ao seu cromossomo (Simon et al., 1983), sendo a doadora preferencial de plasmídeos não transmissíveis, de ampla gama de hospedeiros, para o *Rhizobium*. A seguir, serão descritos dois métodos para a realização de cruzamentos bi ou triparentais em *Rhizobium*, através de conjugação.

Método N° 1

Dia 1

Inocular um tubo com meio TY sólido inclinado com a cultura de *Rhizobium* apropriada e deixar crescer a 28° C (culturas de *Bradyrhizobium* devem ser iniciadas de 4 a 6 dias antes da conjugação).

Dia 2

Inocular um frasco contendo 5 mL de meio LB líquido (adicionado dos antibióticos apropriados) com a estirpe doadora de *E. coli*, e incubar por uma noite a 37° C com aeração vigorosa (200 rpm).

Dia 3

1. Transferir 1 mL da cultura de *E. coli* para um tubo para microcentrifuga esterilizado e centrifugar por 1 min. Descartar o sobrenadante e ressuspender as células em 200 µL de solução de NaCl a 0,8%. Não usar agitador do tipo “vórtex”, apenas tocar os tubos com os dedos para ajudar a ressuspensão.

2. Colher as células de *Rhizobium* dos tubos inclinados suspendendo-as em 3 mL de água destilada esterilizada.

3. Misturar 100 µL da suspensão de células de *Rhizobium* com 100 µL da suspensão de células de *E. coli* em um tubo para microcentrifuga esterilizado. Com uma pipeta transferir a mistura para um filtro de nitrocelulose de 25 mm de diâmetro colocado sobre uma placa de Petri contendo meio TY sólido, sem antibióticos. Deixar a placa, sem a tampa, em uma câmara de fluxo laminar até que o líquido na superfície do filtro seque (cerca de 15 a 30 min). Repor a tampa na placa e incubar por 24 horas a 28° C. Alternativamente, a mistura de células pode ser forçada sobre o filtro de nitrocelulose com a ajuda de uma seringa; neste caso, a membrana é retirada do suporte com uma pinça e transferida para uma placa com TY sólido para incubação.

Dia 4

1. Transferir com uma pinça de pontas chatas o filtro de nitrocelulose contendo as células para um frasco esterilizado contendo 3 mL de água destilada esterilizada, e agitar vigorosamente em agitador tipo “vórtex” para ressuspendê-las completamente.

2. Fazer diluições apropriadas (ex.: 10⁻², 10⁻⁴ e 10⁻⁶) em água destilada esterilizada. Espalhar 100 µL da diluição 10⁻⁶ em uma placa de TY ou MS contendo apenas o antibiótico para a checagem da estirpe doadora de *E. coli*. O número de colônias que aparecerem nessa placa indica a concentração de células recipientes de *Rhizobium* na mistura. Espalhar 100 µL de uma ou mais das outras diluições, dependendo da frequência esperada para a transferência do plasmídeo, em placas com TY ou MS, contendo antibiótico para a checagem de *E. coli* e, também, o antibiótico para a seleção positiva do plasmídeo em questão. Deixar incubando a 28° C até que apareçam colônias.

3. Após o aparecimento de colônias nessas placas, elas devem ser purificadas em meio seletivo repetidamente para remover células de *E. coli* que tenham permanecido na mistura.

Comentários: no caso de cruzamentos triparentais, misturar 75 µL de cada uma das três estirpes de bactérias antes de aplicar a mistura sobre os filtros de nitrocelulose. Se não houver disponibilidade de filtros de nitrocelulose, a mistura pode ser aplicada diretamente sobre a superfície do meio, tornando-se ligeiramente mais difícil a recuperação quantitativa das células (este problema pode ser

contornado aumentando-se o número de cruzamentos nos casos em que se deseja obter um número elevado de transconjugantes). O plaqueamento em meio definido, como por exemplo o MS, auxilia na contraseleção das estirpes de *E. coli* empregadas como doadoras, já que a maioria dessas estirpes é portadora de mutações que as tornam auxotróficas, isto é, incapazes de crescer em meio de cultura definido. Nos casos de conjugações entre duas estirpes de *Rhizobium*, ambas são crescidas em meio TY.

Método Nº 2 (Selvaraj & Iyer, 1983)

1. Repicar as estirpes a serem utilizadas para placas seletivas (contendo antibióticos aos quais as estirpes sejam resistentes; se não houver resistência a antibióticos, usar meio sem seleção). *Rhizobium* é multiplicado em meio de cultura YM, e *E. coli* em LB com pH 7,5, ambos em placas. É importante lembrar que *E. coli* cresce durante uma noite a 37° C, e portanto deve ser retirada da incubadora e armazenada em geladeira até que o *Rhizobium* multiplique-se.

2. Repicar as estirpes das placas acima para placas de meio de cultura rico, porém com pouco carbono. A conjugação é mais efetiva quando as bactérias são multiplicadas em meio rico, pois o baixo teor de carbono reduz a produção de exopolissacarídeos pelo *Rhizobium*. Os rizóbios são repicados para placas de TY, e *E. coli* para placas de LB; se houver marcas de resistência a antibióticos, elas devem ser usadas nesta etapa. Crescer o *Rhizobium* a 28° C por 48 a 72 horas, e *E. coli* a 37° C por 24 horas. A maneira mais fácil de se proceder é repicar o *Rhizobium* em um dia, e *E. coli* um ou dois dias depois. NÃO USAR CULTURAS VELHAS.

3. Após crescimento, ressuspender, separadamente, mais ou menos 1/4 de uma alça de platina de cada estirpe em 3 mL a 5 mL de água destilada esterilizada, em tubos de ensaio esterilizados. Ajustar a densidade óptica das suspensões para 0,1 (absorbância a 600 nm) com água esterilizada.

4. Misturar 1 mL de cada suspensão (recipiente + doador no caso de conjugação biparental, ou recipiente + doador + assistente, no caso de conjugação triparental) com densidade óptica de 0,1 em um tubo de ensaio esterilizado e agitar levemente. A mistura pode, então, ser forçada através de um filtro de nitrocelulose esterilizado com uma seringa esteril. Este método propicia melhor aproveitamento das suspensões em conjugação, mas diminui o número de eventos considerados independentes. A membrana é, então, colocada, com a face contendo as bactérias voltada para cima sobre uma placa de meio de cultura TY sem antibióticos, e incubada por 24 horas a 28° C.

Alternativamente, podem-se pingar, com pipetador, gotas de 10 a 20 µL sobre placas de meio de cultura TY sem antibióticos. Cada gota é considerada um cruzamento independente e cada placa pode receber até 10 gotas. As placas são, então, incubadas a 28° C por 24 horas.

5. Após a incubação, transferir cada membrana filtrante ou cada grupo de 5 a 10 gotas depositadas na superfície da placa para um tubo de ensaio contendo 1 mL de água destilada esterilizada. Agitar o tubo vigorosamente. Espalhar alíquotas de 100 µL na superfície das placas seletivas. Pode ser necessário fazer uma ou duas diluições decimais para obter maior quantidade de colônias

transconjugantes isoladas. A maior parte das estirpes de *E. coli* usadas em procedimentos genéticos é auxotrófica para certos nutrientes e sua checagem é facilmente efetuada por se usar meio de cultura mínimo (ex.: BSM) para o espalhe das células mutagenizadas. Incubar as placas a 28° C por tempo necessário para multiplicação do rizóbio.

6. Fazer diluições decimais das suspensões obtidas dos filtros ou gotas, após a conjugação, para que se possa estimar o número de células recipientes e calcular as freqüências. O cálculo da freqüência de ocorrência das mutações é um dado fundamental em trabalhos de genética microbiana.

7. Confirmar as marcas de resistência a antibióticos e a pureza dos transconjugantes selecionados para trabalhos futuros. Fazer estoques dos transconjugantes de interesse adicionando 15% de glicerol esterilizado para proteção das bactérias, e manter os estoques no congelador a -20° C.

10.4. Extração de DNA de *Rhizobium*

Tendo-se obtido e purificado os transconjugantes putativos de *Rhizobium*, a presença dos genes introduzidos deve ser verificada. Para isso normalmente se emprega a análise de Southern (“Southern blot”), que envolve a hibridização de fragmentos de DNA, após digestão por endonucleases de restrição. O primeiro método de extração descrito a seguir é derivado daquele descrito por Chua et al. (1985). Apesar de ter sido desenvolvido para *Rhizobium*, este método pode ser empregado com sucesso para outras bactérias Gram-negativas, como *Agrobacterium*, *Pseudomonas* e *Acetobacter*. O segundo método foi descrito e desenvolvido por Cook et al. (1989) para *Pseudomonas*, e adapta-se muito bem ao *Rhizobium*.

Método Nº 1

1. Inocular um frasco contendo 5 mL de meio PA líquido com células retiradas de uma placa nova e deixar multiplicar por dois a três dias a 28° C, com aeração vigorosa.

2. Colher as células por centrifugação em um tubo apropriado, esterilizado, a 8000 rpm, a 20° C. Descartar o sobrenadante e ressuspender as células em 5 mL de T₁₀E₁ (10mM TrisCl pH 8,0; 1 mM Na₂EDTA). Adicionar 17,5 µL de lisozima (30 mg/mL em T₁₀E₁) e deixar incubando a 37° C por 30 min, com agitação.

3. Adicionar 30 µL de proteinase K (20 mg/mL em T₁₀E₁) e 250 µL de sarkosyl (10% em T₁₀E₁), e deixar incubar até o dia seguinte em um banho-maria a 50° C.

4. Transferir 750 µL para um tubo de microcentrifuga, pipetando para dentro e para fora para cortar o DNA.

5. Extrair duas vezes o DNA com uma mistura de fenol:clorofórmio (1:1), e duas vezes com clorofórmio. Para fazer a extração, adicionar ao primeiro tubo (com 750 µL) uma mesma medida de fenol:clorofórmio, agitar no “vórtex” e centrifugar por 5 min. Transferir cuidadosamente (usar ponteiras de pipetadores com as pontas cortadas ou uma pipeta de 5 mL invertida) o sobrenadante para um outro

tubo de microcentrífuga e repetir a operação. TER CUIDADO PARA NÃO TRANSFERIR A INTERFACE, pois ela contém proteínas desnaturadas e lixo celular. Após a segunda extração, transferir a fase aquosa para um novo tubo e adicionar um volume igual de clorofórmio. Misturar por inversão (não leve ao “vórtex”) e centrifugue por 5 min. Transferir o sobrenadante para um outro tubo e repita a operação.

6. Após a segunda extração com clorofórmio transferir 500 μL da fase aquosa (superior) para um tubo de microcentrífuga esterilizado e adicionar 50 μL de uma solução 3 M de acetato de sódio e 1 mL de etanol p.a. gelado. Misturar bem (por inversão) e levar à incubação até o dia seguinte a -20°C (o DNA deve precipitar nesta etapa).

7. Centrifugar por 10 min em microcentrífuga e redissolver o pélete, após secagem, em 50 μL de $T_{10}E_1$ (a secagem pode ser realizada em dessecador a vácuo ou em concentradores a vácuo do tipo “Speedvac”). Determinar a concentração de DNA na amostra.

Método N° 2

1. Multiplicar as bactérias em 5 mL de meio de cultura TY ou YM líquido (com 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antibiótico se houver resistência) até o final da fase logarítmica, ou começo da fase estacionária.

2. Transferir 1,5 mL para um tubo de microcentrífuga esterilizado e centrifugar na velocidade máxima por 2 min.

3. Lavar as células duas vezes com uma solução 1 M de NaCl para remover o excesso de polissacarídeos, e depois lavá-las uma vez com tampão TEN (ver a seguir), para remover o excesso de NaCl.

4. Se for necessário interromper a extração, parar aqui e guardar as células no freezer a -20°C até o momento da extração.

5. Ressuspender o pélete em 400 μL de tampão TEN.

6. Adicionar 13,6 μL de uma solução de sarkosyl a 30%, e 4 μL de uma solução de proteinase-K a 10 mg/mL, em água (a solução de proteinase K deve ser pré-digerida a 37°C por 1 hora).

7. Misturar tudo no vórtex e deixe incubar a 37°C por 1 hora, ou até que haja diminuição da turbidez da suspensão (nem sempre se detecta diminuição da turbidez, mas as células estarão rompidas).

8. Adicionar 400 μL de uma solução 4 M de acetato de amônio e misturar bem, no vortex.

9. Extrair com um volume aproximadamente igual de fenol tamponado (ver a seguir), misturando muito bem, no vórtex.

10. Centrifugar por 3 min na velocidade máxima; o DNA estará na fase superior, aquosa.

11. Transferir cuidadosamente a fase aquosa para outro tubo de microcentrífuga usando ponteiras de pipetas com as pontas cortadas (não se deve forçar o DNA a passar pelo pequeno orifício da ponteira, pois isso pode causar sua fragmentação). Tomar o cuidado de não transferir material da interface. Manter uma idéia do volume transferido.

12. Repetir a extração mais duas vezes, sempre adicionando um volume aproximadamente igual de fenol tamponado, e sempre transferindo a fase aquosa para um novo tubo de microcentrifuga.
13. Após a última extração, adicionar um volume igual de clorofórmio e misturar bem, sem passar no vórtex.
14. Centrifugar na velocidade máxima por 1 minuto e transferir a fase superior, aquosa, para um novo tubo de microcentrifuga.
15. Adicionar um volume igual de isopropanol e misturar bem, sem passar no vórtex. O DNA vai precipitar agora. Deixar incubando por 10 minutos à temperatura ambiente.
16. Centrifugar por 5 minutos na velocidade máxima e descartar o sobrenadante.
17. Ressuspender o pélete em 100-200 μ L de solução 0,1 M de acetato de sódio com pH 6,0.
18. Adicionar 2 volumes de ETANOL ABSOLUTO FRIO para reprecipitar o DNA.
19. Centrifugar por 5 minutos na velocidade máxima e descartar o sobrenadante.
20. Deixar o pellet secar para remover o excesso de etanol.
21. Ressuspender o pélete em 50 μ L de tampão TE com pH 8,0. Pode ser necessário deixar o pélete resuspender por 24 horas. Depois disso, guardar o DNA no freezer a -20° C.

Fenol tamponado (também pode ser adquirido pronto)

1. Derreter fenol de alta qualidade a 65° C.
2. Misturar volumes iguais de fenol derretido e uma solução 1 M de TRIS, pH 8,0.
3. Adicionar 8-hydroxiquinolina para a concentração de 0,1%.
4. Decantar a camada de TRIS e repetir a extração mais duas vezes.
5. Extrair com solução 0,1 M de TRIS a pH 8,0, três vezes.
6. Decantar a camada de TRIS e guardar o fenol tamponado em garrafas escuras, recoberto com uma fina camada fresquinha de solução 0,1 M de TRIS a pH 8,0, em geladeira.

Tampão TEN

- 50 mM TRIS, pH 7,5
- 10 mM NaCl
- 10 mM EDTA, pH 8,0

10.5. Detecção de Produtos Gênicos em *Rhizobium*

Os produtos gênicos resultantes da expressão de genes introduzidos no *Rhizobium* são, geralmente, proteínas. Se houver disponibilidade de anticorpos específicos para os produtos gênicos, em sua forma purificada, pode-se empregar análise do tipo “immunoblot” para detectar e quantificar a expressão do produto no *Rhizobium*. Neste tipo de análise as proteínas são separadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS, transferidas para membranas de nitrocelulose e fixadas, e as membranas são tratadas com os anticorpos marcados por radioatividade ou por métodos enzimáticos.

Os métodos descritos a seguir foram empregados, com sucesso, na análise da expressão da toxina inseticida de *Bacillus thuringiensis*, transferida para o *Rhizobium* por engenharia genética (Skøt et al., 1990, 1994). Os volumes descritos na preparação dos géis de SDS-poliacrilamida para eletroforese são suficientes para dois minigéis a serem corridos no aparelho “Mini Protean II” da fábrica Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, EUA). Foi empregada a célula “Trans-Blot” da mesma Bio-Rad para a transferência eletroforética das proteínas para as membranas de nitrocelulose. Se forem utilizados outros equipamentos para a realização desta etapa os volumes deverão ser ajustados.

10.5.1. Extração das proteínas do *Rhizobium*

1. Inocular 5 mL de TY líquido com a estirpe apropriada de *Rhizobium*, e deixar multiplicar a 28° C com aeração vigorosa (200 rpm) por 3 dias.

2. Transferir a suspensão para tubos de polipropileno para centrifuga, com capacidade para 10 mL, e centrifugar a 14.000 rpm por 15 min, a 20° C. Ressuspender o pélete em 1 mL de solução de NaCl a 1% (p/v) e transferir para um tubo de microcentrifuga.

3. Colher as células por centrifugação durante cinco minutos na microcentrifuga. Descartar o sobrenadante e ressuspender as células em 200 µL de tampão TES/glicerol³. **MANTER OS TUBOS EM GELO A PARTIR DESTES PONTOS.**

4. Passar as células por um sonicador, aplicando-se três pulsos de 1 min cada, verificando que os tubos são mantidos frios. Verificar também se a suspensão está clarificando (um sinal de que as células estão sendo rompidas).

5. Precipitar o lixo celular por centrifugação, em microcentrifuga, durante 10 min. Transferir o sobrenadante para um novo tubo e descartar o pélete, que contém os envelopes celulares e outros materiais insolúveis.

6. Determinar a concentração de proteína no sobrenadante e identificar o tubo corretamente.

7. Transferir 50 µL para um novo tubo para microcentrifuga, com tampa de rosca, adicionar 25 µL de tampão de solubilização (6 M de uréia, 5,76 M de β-mercaptoetanol) e 25 µL de tampão de gel 4X (0,25 M de TrisCl pH 6,8; 8% de SDS; 2 mg/mL azul de bromofenol). Identificar o tubo e lembrar-se de que a concentração de proteína aqui é a metade daquela no tubo com o sobrenadante original.

8. As amostras estão prontas para serem analisadas em gel de poli(acrilamida)/SDS.

Tampões:

1) Tampão de gel 4X (5 mL)

Azul de bromofenol	10 g
1 M TrisCl, pH 6,8	1 mL
10% SDS	4 mL

³ Quando estiver tentando a identificação de produtos gênicos com propriedades inseticidas de *B. thuringiensis* em *Rhizobium*, este tampão deve ser substituído por: 50 mM NaHCO₃ e 1 µL/mL de β-mercaptoetanol.

2) Tampão TES/Glicerol (100 mL)	
0,25 M TES pH 7,2	25 mL
β -mercaptoetanol	100 μ L
40% Glicerol	3,75 mL
2 M Acetato de Magnésio	0,25 mL
água destilada esterilizada	para 100 mL
3) Tampão de solubilização (10 mL)	
Uréia	3,6 g
β -mercaptoetanol	4 mL
água destilada esterilizada	para 10 mL

10.5.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) e Análise “Immunoblot” de Proteínas em *Rhizobium*

Tampões e soluções

1. Tampão de corrida

150 mM TrisCl pH 8,9 (8,5 g Trizma)
4 mL 10% SDS
água destilada para 100 mL

2. Tampão de empilhamento

60 mM TrisCl pH 6,7 (7,26 g Trizma)
1 mL 10% SDS
água destilada para 100 mL

3. Tampão de eletrodo

3 g Trizma
20 mL 10% SDS
14,4 g Glicina
água destilada para 1000 mL

4. Tampão de transferência

2,42 g Trizma
11,55 g Glicina
200 mL Metanol
Água destilada para 1000 mL

Dissolver a Trizma e a glicina em aproximadamente 500 mL de água destilada. Elevar o volume a 800 mL e adicionar o metanol depois.

5. Solução salina tamponada (TBS)

10 mM Tris-HCl pH 7,4 (2,42 g Trizma)

140 mM NaCl

água destilada para 2000 mL

Dissolver a Trizma e NaCl em água destilada, ajustar o pH para 7,4 com 1 M HCl e completar o volume para 2000 mL.

6. Estoque de acrilamida a 30% (50 mL)

14,6 g acrilamida

0,4 g N,N metileno bisacrilamida

CUIDADO: a acrilamida não polimerizada é extremamente tóxica; dissolver os reagentes em água, completar o volume para 50 mL e guardar a solução em frasco escuro ou coberto com alumínio, a 4° C. Usar máscaras e luvas ao manusear acrilamida e bis.

7. Persulfato de amônio a 10%

100 mg Persulfato de amônio

1 mL água destilada

Preparar esta solução diariamente.

8. Tampão para fosfatase alcalina

100 mM TrisCl pH 9,5

100 mM NaCl

5 mM MgCl₂

água destilada para 1000 mL

9. Tetrazólio nitroblue (NBT)

Dissolver 250 mg de NBT em 5 mL de 70% dimetilformamida.

Guardar a 4° C.

10. Bromocloroindolilfosfato (BCIP)

Dissolver 250 mg BCIP em 5 mL de 100% dimetilformamida.

Guardar a -20° C.

Método:

1. Montar o aparelho para gel conforme descrito pelo fabricante. As placas de vidro devem estar absolutamente limpas. Limpá-las com água destilada seguida por etanol, e enxugá-las. Não deixar impressões digitais nas placas.

2. Preparar os géis de corrida e de empilhamento de acordo com a Tabela 10.1, mas lembrar-se de que o TEMED e o persulfato de amônio são catalisadores do processo de polimerização, devendo, portanto, ser adicionados quando o gel estiver pronto para ser vertido.

TABELA 10.1. Volumes (em mL) dos ingredientes necessários para o preparo de géis de corrida e empilhamento para o aparelho Mini Protean II da fábrica Bio-Rad (de acordo com instruções do fabricante).

Componente	Gel de corrida		Gel de empilhamento	
	10%	12,5%	15%	5%
Água destilada	3,33	2,67	2,00	2,38
Estoque de acrilamida a 30%	2,67	3,33	4,00	0,63
Tampão de corrida	2,00	2,00	-	-
Tampão de empilhamento	-	-	2,00	1,00
TEMED	0,008	0,008	0,008	0,005
10% Persulfato de amônio	0,080	0,080	0,080	0,040

3. Adicionar o TEMED e APS à solução do gel de corrida, misturar, e transferir para o molde do gel com uma pipeta tipo Pasteur. Esperar que o líquido se assente. Para eliminar irregularidades na interface ar/gel e acelerar a polimerização cobrir com uma mistura de água:butanol a 1:1. Esperar polimerizar por 1 hora.

4. Quando o gel estiver polimerizado decantar a mistura de água:butanol e enxaguar toda a superfície com bastante água destilada. Secar, gentilmente, com papel de filtro. Juntar o TEMED e APS à solução para o gel de empilhamento, misturar, e transferir para cima do gel de corrida. Introduzir o pente formador de cavidades e aguardar até que o gel esteja polimerizado (1 hora). Ao retirar o pente lavar bem as cavidades com água destilada.

DICAS: As soluções de poli(acrilamida) para o preparo de géis devem ser desgaseificadas sob vácuo por 15 min, antes da adição do TEMED e APS, pois a presença de oxigênio pode interferir com a polimerização, atrasando-a. Para se saber se a polimerização está ocorrendo, deixar o restante das soluções para o preparo dos géis polimerizando nos recipientes onde foram preparadas (esta etapa é necessária de qualquer modo, pois não se deve descartar acrilamida não polimerizada nas redes de escoamento do laboratório).

5. Ferver as amostras a serem analisadas (com exceção dos marcadores moleculares pré-coloridos que podem ser adquiridos da Bio-Rad ou outros fornecedores) por 5 min e deixar resfriar à temperatura ambiente.

6. Transferir o suporte com os géis para o tanque de eletroforese e encher com o tampão de eletrodo. Certificar-se de que não há bolhas de ar sob o gel, pois elas podem interferir na passagem da corrente elétrica; as bolhas devem ser eliminadas pelo uso de uma seringa com a agulha dobrada. Transferir as amostras para o gel com uma seringa ou pipetador automático. O máximo volume de amostra que pode ser aplicado (neste aparelho) é de 16 μL .

7. Correr o gel sob corrente de 200 V por aproximadamente, 45 min a 1 hora, ou até que a linha azul do indicador tenha acabado de sair do gel.

8. Parar a eletroforese e separar as duas placas de vidro de modo a retirar o gel. Cortar fora a parte correspondente ao gel de empilhamento e transferir o gel de corrida para um recipiente contendo tampão de transferência frio. Deixar permanecer por pelo menos 30 min a 4° C.

9. Umedecer o papel absorvente, os papéis de filtro (em pedaços de 10 cm x 7,5 cm) em tampão de transferência frio. Usar luvas. Preparar o sanduíche de transferência (Figura 10.1). Transferir todo o conjunto para o tanque. Encher o recipiente plástico com gelo e colocá-lo próximo ao conjunto no tanque. Encher o tanque com tampão de transferência frio até que a superfície do líquido esteja acima dos orifícios mais altos no aparelho. Por uma barra para agitador magnético dentro do tanque, tampar e transferir para um agitador magnético. Proceder à transferência a 100V por 1 hora. Se possível, manter todo o conjunto refrigerado durante a transferência.

10. Desmontar o conjunto e transferir o filtro de nitrocelulose para um recipiente contendo TBS. Deixar incubando em um agitador orbital por 5 a 10 min.

11. Descartar o TBS e adicionar 100 mL de TBS com 2% (p/v) de leite em pó desnatado (agente bloqueador). Deixar incubando até o dia seguinte a 4° C. Depois, enxaguar algumas vezes com TBS.

12. Incubação com o anticorpo primário: descartar o TBS e adicionar 20 mL de TBS com 3% (p/v) de albumina de soro bovino. Juntar 20 μL (1:1000, a quantidade pode variar de acordo com o título do anti-soro) do anti-soro primário. Deixar incubando em um agitador orbital por 45 a 90 min.

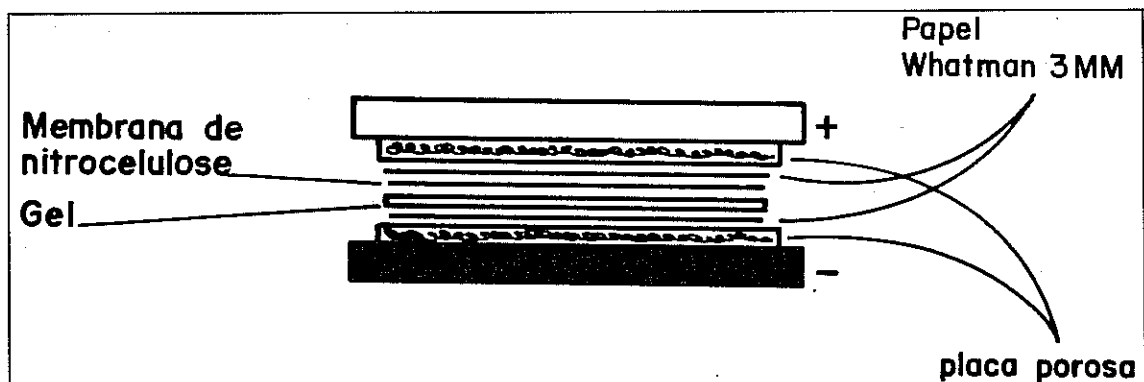


FIGURA 10.1. "Sanduíche" de transferência para detecção imunológica de produtos gênicos em membrana de nitrocelulose.

13. Enxaguar com seis trocas de TBS durante 30 min (6 x 5 min).
14. Incubação com o anticorpo secundário: descartar o TBS do último enxágüe e adicionar 20 mL de TBS contendo 3% (p/v) de albumina de soro bovino. Juntar 10 µL do anti-soro secundário e deixar incubando num agitador orbital por 45 min.
15. Enxaguar 3X por 5 min com TBS.
16. Descartar o TBS do último, enxaguar e deixar incubando com tampão para fosfatase alcalina por 2 min.
17. Descartar o tampão e deixar colorir com 10 mL de reagente de fosfatase alcalina:
 - 10 mL de tampão para fosfatase alcalina
 - 66 µL de tetrazólio nitroblue (NBT)
 - 66 µL de bromocloroindolilfosfato (BCIP)

Deixar incubando no escuro sem agitação. Para parar a reação, descartar o reagente e enxaguar com T₁₀E₁.

Comentários: o anti-soro secundário, obviamente, deve ser composto de imunoglobulinas do mesmo animal que foi utilizado para gerar o antisoro primário. Existem, também, outras opções, além da marcação com fosfatase alcalina, para a obtenção de sinais. Por exemplo, a peroxidase da raiz-forte (*Nasturtium amaracea*) também é muito popular.

10.6. Considerações Finais

O objetivo deste capítulo foi a compilação de métodos específicos para estudos de biologia molecular em *Rhizobium*. Outros métodos de uso mais geral em biologia molecular, como clonagem, hibridização de Southern, e extração e purificação de vetores de *E. coli* para clonagem são disponíveis em livros de metodologia em biologia molecular como por exemplo Maniatis et al. (1982) e Berger & Kimmel (1987). O fato de alguns métodos não estarem listados para trabalhos com *Rhizobium*, não significa que não sejam adequados. Entretanto, é sempre recomendável a realização de experimentos-piloto a fim de verificar se a metodologia escolhida se aplica convenientemente a cada situação.

10.7. Referências Bibliográficas

- ALLEN, L.N.; HANSON, R.S. Construction of broad-host-range cosmid cloning vectors: identification of genes necessary for growth of *Methylobacterium organophilum* on methanol. **J. Bacteriol.**, v.161, p.955-962, 1985.
- ARAUJO, R.S. **Mutational analysis of the cell surface and nodulation competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli***. Madison: University of Wisconsin, 1993. 118p. (Tese de Doutorado)

- BAGDASARIAN, M.; LURZ, R.; RUKERT, B.; FRANKLIN, F.C.H.; BAGDASARIAN, M.; FREY, J.; TIMMIS, K.N. Specific purpose plasmid cloning vectors II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. **Gene**, v.16, p.237-247, 1981.
- BEATTIE, G.A. **Quantitative and molecular analysis of nodulation competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli***. Madison: University of Wisconsin, 1991. (Tese de Doutorado).
- BERGER, S.L.; KIMMEL, A.R., ed. Guide to molecular cloning techniques. **Methods in Enzymol.**, Vol.152. San Diego: Academic Press Inc, 1987. 813p.
- BERGERSEN, F.J. Growth of *Rhizobium* on synthetic medium. **Aust. J. Biol. Sci.**, v.14, p.349-360, 1961.
- BERINGER, J.E. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **J. Gen. Microbiol.**, v.84, p.188-198, 1974.
- BERINGER, J.E.; BEYNON, J.L.; BUCHANAN-WOLLASTON, A.V.; JOHNSTON, A.W.B. Transfer of the drug-resistance transposon Tn5 to *Rhizobium*. **Nature**, v.276, p.633-634, 1978.
- CHUA, K-Y.; PANKHURST, C.E.; MACDONALD, P.E.; HOPCROFT, D.H.; JARVIS, B.D.W.; SCOTT, D.B. Isolation and characterisation of transposon Tn5-induced symbiotic mutants of *Rhizobium loti*. **J. Bacteriol.**, v.162, p.335-343, 1985.
- COOK, D.; BARLOW, E.; SEQUEIRA, L. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v.2, p.113-121, 1989.
- CRESSWELL, A.; SKØT, L.; COOKSON, A. The construction, detection and use of bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* strains. **J. Appl. Bacteriol.** (in press).
- DARZINS, A.; CHAKRABARTY, A.M. Cloning of genes controlling alginate biosynthesis from a mucoid cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v.159, p.9-18, 1984.
- DIEBOLD, R.; NOEL, K.D. *Rhizobium leguminosarum* exopolysaccharide mutants: biochemical and genetic analyses and symbiotic behavior on three hosts. **J. Bacteriol.**, v.171, p.4821-4830, 1989.
- DITTA, G.; STANFIELD, S.; CORBIN, D.; HELINSKI, D.R. Broad host range DNA cloning system from Gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.77, p.7347-7351, 1980.

- ECKHARDT, T. A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. **Plasmid**, v.1, p.584-588, 1978.
- FISHER, F.F.; LONG, S.R. *Rhizobium*-plant signal exchange. **Nature**, v.357, p.655-660, 1992.
- FRIEDMAN, A.M.; LONG, S.R.; BROWN, S.E.; BUIKEMA, W.J.; AUSUBEL, F.M. Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. **Gene**, v.18, p.289-296, 1982.
- HENNECKE, H. Nitrogen fixation genes involved in the *Bradyrhizobium japonicum*-soybean symbiosis. **FEBS Lett.**, v.268, p.422-462, 1990.
- HIRSCH, P.R.; VAN MONTAGU, M.; JOHNSTON, A.W.B.; BREWIN, N.J.; SCHELL, J. Physical identification of bacteriocinogenic, nodulation and other plasmids in strains of *Rhizobium leguminosarum*. **J. Gen. Microbiol.**, v.120, p.403-412, 1980.
- HOLMES, D.S.; QUIGLEY, M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. **Anal. Biochem.**, v.114, p.193-197, 1981.
- HYNES, M.F.; MCGREGOR, N.F. Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. **Mol. Microbiol.**, v.4, p.567-574, 1990.
- HYNES, M.F.; QUANDT, J.; O'CONNELL, M.P.; PÜHLER, A. Direct selection for curing and deletion of *Rhizobium* plasmids using transposons carrying the *Bacillus subtilis sacB* gene. **Gene**, v.78, p.111-120, 1989.
- JORDAN, D.C. Rhizobiaceae. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. ed., **Bergeys Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, v.1, p.234-244, 1984.
- LABES, M.; PÜHLER, A.; SIMON, R. A new family of RSF1010-derived expression and *lac*-fusion broad-host-range vectors for Gram-negative bacteria. **Gene**, v.89, p.37-46, 1990.
- LEROUGE, P.; ROCHE, P.; FAUCHER, C.; MAILLET, F.; TRUCHET, G.; PROMÉ, J.C.; DENARIE, J. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. **Nature**, v.344, p.781-784, 1990.
- MANIATIS, T.; SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. **Molecular cloning. A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1982.
- MARTINEZ, E.; ROMERO, D.; PALACIOS, R. The *Rhizobium* genome. **CRC Crit. Rev. Plant Sci.**, v.9, p.59-93, 1990.

- MILNER, J.L.; ARAUJO, R.S.; HANDELSMAN, J. Molecular and symbiotic characterization of exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium tropici* strain CIAT899. **Mol. Microbiol.**, v.6, n.21, p.3137-3147, 1992.
- MYTTON, L.R.; SKØT, L. Breeding for improved symbiotic nitrogen fixation. In: HAYWAR, M.D.; BOSEMARK, N.O.; ROMAGOSA, I. ed., **Plant Breeding. Principles and Prospects**. London: Chapman and Hall, 1993. p.451-472.
- PRIEFER, U.B.; SIMON, R.; PÜHLER, A. Extension of the host range of *Escherichia coli* vectors by incorporation of RSF1010 replication and mobilization functions. **J. Bacteriol.**, v.163, p.324-330, 1985.
- SELVARAJ, G.; IYER, V.N. Suicide plasmid vehicles for insertion mutagenesis in *Rhizobium meliloti* and related bacteria. **J. Bacteriol.**, v.156, p.1292-1300, 1983.
- SIMON, R. High frequency mobilization of Gram-negative bacterial replicons by the *in vitro* constructed Tn5-Mob transposon. **Mol. Gen. Genet.**, v.196, p.413-420, 1984.
- SIMON, R.; O'CONNELL, M.; LABES, M.; PÜHLER, A. Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other Gram-negative bacteria. **Meth. Enzymol.**, v.118, p.640-659, 1986.
- SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilisation system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. **Biotechnology**, v.1, p.784-791, 1983.
- SIMON, R.; QUANDT, J.; KLIPP, W. New derivatives of transposon Tn5 suitable for mobilization of replicons, generation of operon fusions and induction of genes in Gram-negative bacteria. **Gene**, v.80, p.161-169, 1989.
- SKØT, L.; HARRISON, S.P.; NATH, A.; MYTTON, L.R.; CLIFFORD, B.C. Expression of insecticidal activity in *Rhizobium* containing the δ -endotoxin gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. **Pl. Soil**, v.127, p.285-295, 1990.
- SKØT, L.; TIMMS, E.; MYTTON, L.R. The effect of toxin-producing *Rhizobium* strains, on larvae of *Sitona flavescens* feeding on legume roots and nodules. **Pl. Soil** (in press).
- SPAINK, H.P. Rhizobial lipo-oligosaccharides: answers and and questions. **Plant Mol. Biol.**, v.20, p.977-986, 1992.
- SPAINK, H.P.; OKKER, R.J.H.; WIJFFELMAN, C.A.; PEES, E.; LUGTENBERG, B.J.J. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* sym plasmid PRL1JI. **Plant Mol. Biol.**, v.9, p.27-39, 1987.

- STASKAWICZ, B.; DAHLBECK, D.; KEEN, N.; NAPOLI, C. Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv *glycinea*. **J. Bacteriol.**, v.169, p.5789-5794, 1987.
- THOMAS, C.M. ed., **Promiscuous plasmids of Gram-negative bacteria**. London & San Diego: Academic Press. Inc, s/a. 276p.
- TRIPLETT, E.W. The molecular genetics of nodulation competitiveness in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v.3, p.199-206, 1990.
- TRIPLETT, E.W.; SADOWSKY, M.J. Genetics of competition for nodulation of legumes. **Ann. Rev. Microbiol.**, v.46, p.399-428, 1992.
- VINCENT, J.M. **A Manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164p.

CAPÍTULO 11

GERAÇÃO E ANÁLISE DE MUTANTES DE *RHIZOBIUM* E *BRADYRHIZOBIUM*

Ricardo S. Araujo¹

11.1. Introdução

A análise genética de mutantes é uma ferramenta poderosa para se estudar a relação entre características de um organismo ou sistema biológico. Uma de suas maiores utilidades é a capacidade de gerar evidências sobre a relação entre locos genéticos e seus respectivos fenótipos e sobre a relação causal entre dois ou mais fenótipos controlados pelo(s) mesmo(s) loco(s) genético(s).

A execução de uma análise genética, normalmente, envolve a geração e a análise, por meio de recombinação e complementação, de diferentes mutações. Esse trabalho pode ter aplicações tais como: a) a quantificação e mapeamento dos genes associados a uma determinada característica; b) a análise da regulagem de expressão gênica; c) a caracterização bioquímica das funções de produtos gênicos *in vivo*; d) as análises de processos metabólicos celulares; e e) a criação de mutantes com propriedades alteradas de forma a terem maior utilidade em determinados processos industriais.

Em termos práticos a análise de mutantes permitiu, entre outros exemplos, a identificação e clonagem dos genes ligados à nodulação em *Rhizobium* (Long et al., 1982), os estudos sobre o papel dos exopolissacarídeos (EPS) na nodulação da alfafa pelo *R. meliloti* (Leigh et al., 1985) e a identificação de regiões genéticas responsáveis pela virulência e patogenicidade em *Pseudomonas solanacearum* (Huang & Sequeira, 1990; Huang et al., 1990). As possibilidades de emprego das análises de mutantes são inúmeras. O que é necessário é que se disponha de métodos para mutagenizar o organismo de interesse, de métodos para selecionar mutantes com o novo fenótipo desejado, e de recursos para realização de testes de recombinação e/ou restauração fenotípica por complementação através de bibliotecas genômicas. Os procedimentos descritos neste capítulo são derivados de métodos aplicados a bactérias Gram-negativas e foram empregados com sucesso em análise genética de *Rhizobium* (Long et al., 1982; Beattie, 1991; Milner et al., 1992; Araujo, 1993). Algumas das estirpes de *Escherichia coli* e alguns plasmídeos empregados em estudos genéticos de *Rhizobium* estão listados na Tabela 11.1.

¹ Pesquisador, Ph.D., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP), Cx. Postal 179, CEP 74001-970, Goiânia, GO.

TABELA 11.1. Relação de algumas estirpes de *Escherichia coli* e plasmídeos empregados em análises genéticas de *Rhizobium*.

Estirpe/Plasmídeo	Finalidade	Referências
<i>Escherichia coli</i>		Beattie (1991)
DH1	Estocagem de biblioteca genômica	Milner et al. (1992)
DH5 α	Auxiliar em conjugações	Araujo (1993) Milner et al. (1992)
HB101	Estocagem de biblioteca genômica	Noel et al. (1988)
LE392	Estocagem de biblioteca genômica	Araujo (1993)
Plasmídeos		Cava et al. (1989)
pJB3	Mobilização cromossômica, homogenotização	Diebold & Noel (1989) Milner et al. (1992) Araujo (1993)
pRK2013	Auxiliar em conjugações	Cava et al. (1989) Diebold & Noel (1989) Beattie (1991) Milner et al. (1992) Araujo (1993)
pGS9	Doador do transposon Tn5	Milner et al. (1992) Araujo (1993)
pSUP2021	Doador do transposon Tn5	Cava et al. (1989) Diebold & Noel (1989)
pSUP104	Eliminação de outros plasmídeos por incompatibilidade; homogenotização	Milner et al. (1992)
pLAFR1	Cosmídeo para construção de bibliotecas genômicas	Cava et al. (1989) Diebold & Noel (1989)
pLAFR3	Cosmídeo para construção de bibliotecas genômicas	Beattie (1991)
pLA2917	Cosmídeo para construção de bibliotecas genômicas	Beattie (1991) Milner et al. (1992) Araujo (1993)

11.2. Métodos Básicos em Genética

A geração de mutantes é apenas o primeiro passo de uma análise genética. O próximo passo é reconhecerem-se e isolarem-se as mutantes desejadas. Os métodos mais comuns são os seguintes:

1) “Screenings” - aqui se analisam diversos isolados bacterianos quanto à ocorrência natural de um fenótipo de interesse, só que neste caso não se faz seleção, pois não se está exigindo a ocorrência daquele fenótipo específico. Os “screenings” são utilizados com mais frequência quando as propriedades de crescimento das mutantes não são afetadas pela mutação. Há dois tipos de “screenings”: a) conservadores, como nos casos em que se procura uma mutante que produza níveis alterados de uma enzima; esse ensaio exige testes bioquímicos relativamente complicados que limitam o número de mutantes que podem ser analisadas com rapidez, o que diminui a possibilidade de se detectarem mutações de baixa frequência de ocorrência; b) “screenings” fáceis, que envolvem o plaqueamento em réplicas a partir de uma placa-matriz, permitindo testar diversas colônias, ao mesmo tempo, em diferentes condições.

Nota: é preciso que se leve em consideração se o teste que avaliará as mutantes é destrutivo. Se o procedimento exigir a morte das células é necessário que se mantenha uma placa-matriz de onde se possam recuperar as mutantes de interesse após o ensaio.

2) Enriquecimentos - nestes casos, são identificadas condições de crescimento que limitam o desenvolvimento da população de organismos de interesse, enquanto os demais crescem. Ao final, é adicionada uma substância para matar as células indesejadas, separando os sobreviventes constituídos dos organismos de interesse. Um exemplo típico é a adição de penicilina ou cicloserina. Entretanto, é necessário ter cuidado para que a população de mutantes de interesse não seja afetada por essa substância.

3) Seleções - condições pré-estabelecidas, em que prosperam apenas os organismos de interesse, podem ser empregadas como forma de exercer pressão seletiva para favorecer o crescimento das mutantes. Um exemplo é a utilização de meio seletivo de cultura, onde só crescerão aqueles organismos com o fenótipo exigido pela seleção. A pressão seletiva pode ser exercida por resistência a bacteriófagos, resistência a antibióticos, prototrofismo (capacidade de crescer em meio de cultura definido), etc.

Para que a análise bioquímica de mutantes ou a análise genética das mutações naquelas estirpes possam gerar informações confiáveis é preciso, primeiro, que se compreenda a natureza da mutagênese e a maneira como ela pode gerar mutantes úteis à análise genética. Para entender este aspecto é importante que se tenha uma noção das frequências esperadas para cada tipo de mutação. Por exemplo, considere-se a taxa natural de mutação, em bactérias entéricas, para a substituição de uma base por outra no DNA (mutação por substituição de base). Observa-se, empiricamente, que a taxa de mutação é de aproximadamente 10^{-8} por par de base por geração. Considerando-se que

Escherichia coli tem aproximadamente $5 \cdot 10^6$ pares de bases, há cerca de 10^{-1} pares de bases replicados, erroneamente, por geração de *E. coli*, o que é uma frequência muito baixa.

Há três fatores que contribuem para que a frequência calculada acima seja baixa: a) a ocorrência de erros na polimerização (síntese) do DNA está na ordem de 10^{-4} ; b) a DNA-polimerase (enzima que sintetiza o DNA) atua como uma exonuclease, fazendo a “edição” do DNA recém-sintetizado, reduzindo a frequência de ocorrência de erros em cerca de 10^2 , fazendo com que a frequência acumulada até aqui seja de 10^{-6} ; e c) as células contêm um mecanismo de reparo que reconhece e corrige erros no pareamento de bases nas novas fitas de DNA, aumentando a fidelidade de replicação em cerca de 10^3 vezes novamente. Isso faz com que a frequência acumulada seja, então, de 10^{-8} , ou seja, apenas uma em cada 10^8 células apresentará, espontaneamente, um fenótipo mutante. A frequência de ocorrência de determinadas mutações, entretanto, pode ser aumentada pela indução por meio de agentes mutagênicos.

Uma vez que a substituição de uma única base pode gerar uma mutante em cada 10^8 células, a mesma frequência pode ser observada para uma outra substituição de base que promova a reversão ao fenótipo original. A frequência de reversão de mutações espontâneas é, normalmente, igual à frequência de sua ocorrência.

11.3. Tipos de Agentes Mutagênicos

Vários agentes mutagênicos têm sido empregados para a geração de mutantes em *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Os agentes químicos, normalmente, induzem a ocorrência de mutações por substituição de bases. Os antibióticos promovem o aparecimento de mutantes espontâneas cuja marca pode ser útil em estudos posteriores; a resistência a antibióticos pode, também, ser adquirida quando as células são mutagenizadas com transpósons (a resistência é uma marca do transpóson) ou quando recebem DNA clonado em vetores marcados. Os transpósons são os melhores agentes mutagênicos porque se inserem, ao acaso, no genoma dos rizóbios gerando, principalmente, mutações com perda de função e que podem ser facilmente mapeadas em análises genéticas.

11.3.1. Agentes químicos

Os agentes químicos mais comumente empregados são a nitrosoguanidina (NTG) e o etilmetanossulfonato (EMS). Ambos acarretam mutações por substituição de bases que não dependem da síntese ativa de DNA para serem fixadas.

Procedimento para obtenção de mutantes induzidas por NTG:

- 1) crescer 10 mL da cultura apropriada até o meio da fase logarítmica de crescimento, em meio TY ou YM;

2) centrifugar as células por 5 min a 5.000 g, e ressuspender o pellet em um volume igual de tampão TRIS-ácido maleico com pH 6,0:

Tris	6,0 g
ácido maleico	5,8 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,25 mg

Adicionar água destilada para completar 1 L, ajustar o pH para 6,0 e autoclavar por 15 min a 121° C.

Após resfriamento para cerca de 50° C, adicionar, assepticamente:

MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 g
Ca(NO ₃) ₂	5,0 mg

3) adicionar à suspensão de células uma solução recém-preparada de NTG a 1 mg/mL, em água esterilizada, de modo a obter a concentração final de 100 µg/mL. Incubar a 28° C, sem agitação, por 30 min;

4) centrifugar a suspensão tratada e ressuspender as células em um volume igual de meio de cultura mínimo (ex.: BSM);

5) recentrifugar as células e ressuspendê-las novamente em meio mínimo. Este procedimento promove um alto grau de mutagenicidade sem a mortalidade excessiva de células que ocorre quando as células são tratadas em caldos de cultura mais ricos, e é particularmente útil para o isolamento de mutantes auxotróficas.

Nota: algumas estirpes de bactérias são mais sensíveis que outras ao tratamento com NTG; pode ser necessária a elaboração de curvas de mortalidade das células de acordo com a concentração de NTG utilizada e com o tempo de incubação. Para isso, incubam-se suspensões com diferentes concentrações finais de NTG, durante diferentes intervalos de tempo, e contam-se os números de sobreviventes em cada incubação. A mutagênese é mais eficiente quando o tratamento mata cerca de 90% das células tratadas.

Procedimento para obtenção de mutantes induzidas por EMS:

1) crescer uma cultura da bactéria a ser mutagenizada, em meio TY ou YM, até o final da fase logarítmica de crescimento;

2) misturar um volume da cultura a um volume igual de uma solução recém-preparada de EMS (0,1 mL de EMS em 2,5 mL de meio de cultura mínimo), pré-aquecido a 28° C;

3) agitar a mistura, por 1 ou 2 horas, a 28° C;

4) fazer uma diluição decimal (10X) da cultura em meio de cultura mínimo e deixar crescer por algumas horas. Dependendo do tipo de mutantes desejadas, pode-se fazer um enriquecimento ou plaquear diluições para detecção direta das mutantes.

Nota: como no caso anterior, pode ser necessária a elaboração de uma curva de mortalidade para determinarem-se as melhores condições para a mutagenização de culturas com EMS. O tempo de crescimento da cultura após o tratamento com EMS e adição de meio de cultura deve ser o mínimo necessário para que ocorra a fixação da mutação. Entretanto, quanto maior for esse tempo, maior será a chance de se detectar a mesma mutação, multiplicada de forma clonal pelo crescimento a partir da primeira célula mutante.

11.3.2. Antibióticos

Cada um dos antibióticos comumente empregados em microbiologia tem um alvo e um modo de ação diferentes nas células (Tabela 11.2). Assim, é importante que, quando se deseja utilizar a resistência a antibióticos como marcação básica de uma estirpe para análise genética, esse antibiótico não interfira nos possíveis mecanismos fisiológicos em estudo. Por exemplo, já que a resistência à tetraciclina envolve a alteração de um sistema ligado ao transporte de substâncias para o interior das células, mutantes com resistência espontânea à tetraciclina não devem ser empregados em estudos sobre transporte celular.

TABELA 11.2. Modo de ação dos antibióticos mais comumente empregados em microbiologia e mecanismos de resistência de bactérias a esses antibióticos.¹

Antibiótico	Modo de ação	Mecanismo de resistência
Ampicilina (Ap)	derivada da penicilina, mata as células em crescimento por interferir nas etapas finais da síntese da parede celular.	o gene <i>bla</i> codifica uma enzima de atividade periplásmica que quebra e inativa o antibiótico.
Cloranfenicol (Cm)	agente bacteriostático que interfere com a síntese de proteínas em bactérias por impedir a formação de ligação peptídica.	o gene <i>cat</i> codifica uma enzima que modifica e inativa o antibiótico.
Estreptomicina (Sm)	agente bactericida que se liga à subunidade 30S dos ribossomos e provoca erros na leitura do mRNA.	o gene <i>str</i> codifica uma enzima que modifica e inativa o antibiótico.
Kanamicina (Km)	agente bactericida que se liga aos ribossomos 70S e provoca erros na leitura do mRNA.	o gene <i>kan</i> codifica uma enzima que modifica o antibiótico e previne sua interação com os ribossomos.
Tetraciclina	agente bacteriostático que inibe a síntese de proteínas por interferir com a subunidade 30S dos ribossomos.	o gene <i>tet</i> codifica uma enzima que modifica a membrana celular e impede o transporte do antibiótico para o interior da célula.

¹ As informações sobre como preparar soluções estoque de antibióticos se encontram no capítulo 7.

Procedimento para obtenção de mutantes espontâneas com resistência a antibióticos:

- 1) preparar placas com meio YM ou TY sólido, adicionando os antibióticos desejados, nas concentrações apropriadas. Preparar, também, placas sem antibióticos, para fins de controle e cálculos de freqüências. Guardar as placas a 4° C até a utilização, deixando-as equilibrar, à temperatura ambiente, por cerca de duas horas antes de espalhar as culturas;
- 2) inocular as estirpes a serem mutagenizadas em tubos de ensaio ou frascos contendo 3 mL a 5 mL de meio YM ou TY líquido, sem antibióticos. Crescer a 28° C, com aeração, até o começo da fase estacionária de crescimento;
- 3) espalhar, com alça de Drigalsky (bastão de vidro dobrado), 100 µL das culturas na superfície das placas com antibióticos. Fazer, também, uma série de diluições decimais para efetuar a contagem do número de células originais através do plaqueamento em meio de cultura sem antibióticos.
- 4) incubar as placas a 28° C, até o aparecimento das colônias;
- 5) contar o número de colônias nas placas sem antibióticos e o número de colônias mutantes nas placas seletivas e calcular a freqüência de mutação. Por exemplo:

Concentração de células na suspensão original = $3,6 \cdot 10^9$ UFC/mL

Volume plaqueado = 100 µL = 0,1 mL

Quantidade de células plaqueadas = $3,6 \cdot 10^9$ UFC/mL . 0,1 mL = $3,6 \cdot 10^8$ UFC

Número de colônias mutantes obtidas = 5

Freqüência = $5/3,6 \cdot 10^8 = 1,3 \cdot 10^{-8}$, ou seja, foram obtidas 1,3 mutantes para cada 10^8 células mutagenizadas;

- 6) confirmar a resistência das mutantes aos antibióticos riscando colônias isoladas para a obtenção de culturas puras em placas seletivas;
- 7) checar a estabilidade da mutação de cada colônia selecionada crescendo-a por dois ciclos de gerações (duas repicagens) em placas sem antibióticos, seguidos por uma repicagem em meio seletivo;
- 8) estocar adequadamente as culturas. Culturas empregadas em análises genéticas devem, preferencialmente, ser estocadas sob 10% DMSO (dimetilsulfóxido) a -80° C, ou sob 15% glicerol a -20° C.

11.3.3. Transposons

Transposons são elementos genéticos móveis cuja seqüência de DNA contém os genes necessários à transposição, que se excluem e se reinserem no genoma do hospedeiro, acarretando mutações. Os transposons contêm, ainda, genes para resistência a antibióticos flanqueados por seqüências repetitivas de DNA que podem ou não participar na transposição do elemento. São as propriedades genéticas dos transposons que os tornam os candidatos ideais para a geração de mutantes definidas para a análise genética de características relevantes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*.

Mutagênese:

Sabendo-se que os transpósons se inserem em novos sítios, no DNA, com uma certa frequência, pode-se esperar que se encontrem colônias mutantes em uma cultura que, originalmente, contenha o transposon (por exemplo, em um sítio genético “desinteressante”), procurando-se por fenótipos “interessantes”, diferentes do original. Essas mutantes teriam sua origem na transposição do elemento genético contido na estirpe original. Apesar de funcionar, este procedimento não é o melhor porque: a) como tanto a estirpe original quanto a mutante contêm o transposon, não há como exercer pressão seletiva para a presença do elemento, impedindo que se saiba se o fenótipo mutante é decorrente da transposição ou de uma outra mutação espontânea; b) as mutações por transposição, normalmente, acarretam perdas de função dos genes afetados, o que dificulta o estabelecimento de critérios de seleção para o fenótipo mutante; c) a ocorrência de mutações espontâneas pode ser mais freqüente que a transposição.

Para solucionar esses problemas, basta que o transposon seja introduzido nas células quando são mutagenizadas, de forma que todas as células que o contiverem, e que tiverem também a marca de resistência ao antibiótico, conferida pelo transposon, sejam originárias de eventos mutagênicos (isto é, transposições) independentes. Isso permite que se tenha uma pressão de seleção positiva em favor das mutantes (as células não-mutagenizadas não resistem ao antibiótico), de modo que cada sobrevivente carregue uma cópia do transposon.

A melhor maneira de introduzir transposons em células de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* é através de um vetor não replicativo. Esses vetores não podem ser mantidos em uma célula que já contenha outros plasmídeos incompatíveis. Assim, a única forma de uma célula adquirir uma cópia do transpósion, é se este se excluir do plasmídeo onde se encontra e se inserir no genoma hospedeiro. Normalmente, realizam-se cruzamentos triparentais (capítulo 10), onde a estirpe de *E. coli* portadora do vetor do transposon é a doadora, uma segunda estirpe de *E. coli*, portadora do plasmídeo pRK2013 é a auxiliar e a estirpe a ser mutagenizada é a recipiente.

A detecção dos fenótipos mutantes deve ser associada à seleção para resistência ao antibiótico, conferida pelo transposon. Deve-se, também, utilizar meio de cultura definido (ex.: BSM; capítulo 10) para eliminar os transconjugantes auxotróficos (incapazes de crescer em meio sintético) e as estirpes de *E. coli*.

Os transposons, como mutagênicos, são relativamente “limpos”, pois não causam muitas alterações no genoma quando comparados a outros agentes mutagênicos. Além disso, quando um transposon é empregado para gerar mutantes, a região mutagenizada pode ser detectada pela hibridização com sondas específicas para a seqüência do transposon e, posteriormente, isolada. Esse fragmento, por sua vez, pode ser empregado como sonda para identificar, no genoma original, a região correspondente à função alterada, dando um passo fundamental para a clonagem de genes.

11.4. Bibliotecas Genômicas

Bibliotecas genômicas são coleções de vetores, contendo clones do DNA genômico de uma determinada estirpe, empregadas em análise de complementação por restauração fenotípica. As bibliotecas genômicas que melhor funcionam em *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* são aquelas elaboradas em cosmídeos (plasmídeos que contêm o sítio *cos*, ligado ao empacotamento do DNA do bacteriófago λ). Os cosmídeos permitem a clonagem de grandes fragmentos de DNA (um genoma do bacteriófago λ contém 48 kb) e se mantêm e se replicam nos rizóbios.

Construção de bibliotecas genômicas

Apesar de trabalhoso, não é difícil construir uma biblioteca genômica. São necessários o DNA genômico, braços de vetores preparados (tratados com fosfatase alcalina para prevenir reanelamento do vetor), cabeças vazias de bacteriófago λ , e as bactérias participantes. As diferentes etapas para a construção de uma biblioteca genômica são de domínio comum, e já se encontram descritas em manuais de biologia molecular (ex.: Maniatis et al., 1982). Os braços de vetores e as cabeças vazias de bacteriófago λ podem ser preparados no laboratório ou adquiridos diretamente de fornecedores.

Em *Rhizobium*, foram utilizadas, com sucesso, bibliotecas genômicas construídas nos vetores pLAFR1 (Long et al., 1982; Cava et al., 1989; Diebold & Noel, 1989), pLAFR3 (Beattie, 1991) e pLA2917 (Milner et al., 1992; Araujo, 1993). Os três vetores apresentam a resistência à tetraciclina como marca para seleção. Entretanto, a estabilidade dos cosmídeos nos rizóbios é muito baixa, sendo facilmente perdidos em cultura, na rizosfera ou nos nódulos se não houver pressão seletiva, ou se o clone não contiver DNA essencial à bactéria naquelas condições.

11.5. Análise de Complementação ou Restauração Fenotípica

A restauração do fenótipo original a certas mutantes, por meio de complementação com bibliotecas genômicas permite não apenas a confirmação de correlações entre fenótipos, como até a clonagem de genes envolvidos com as funções celulares alteradas pelas mutações. Esse procedimento foi adotado para identificar e clonar genes envolvidos com a nodulação em *R. meliloti* (Long et al., 1982) e com a patogenicidade de *Pseudomonas solanacearum* (Huang & Sequeira, 1990; Huang et al., 1990).

Para esta análise, uma estirpe de *E. coli* contendo a biblioteca genômica é conjugada em massa (por cruzamento triparental) com a coleção de mutantes de *Rhizobium* em estudo. Após a conjugação os transconjugantes são observados, quanto à restauração de seu fenótipo, em placas com meio seletivo à presença dos cosmídeos, e que favoreça a expressão fenotípica desejada. As colônias com fenótipo original podem ser selecionadas, e os clones restauradores dos fenótipos podem, então, ser analisados por restrição, subclonagem, etc. é interessante ressaltar que todos os procedimentos de análise de clones devem ser feitos em *E. coli*, que é mais maleável em manipulações genéticas. Por essa razão, os cosmídeos restauradores dos fenótipos das mutantes devem ser isolados (utilizando um dos protoco-

los para isolamento de plasmídeos descritos no capítulo 10) e utilizados para transformar *E. coli*, que poderá ser empregada nas análises futuras.

11.6. Considerações Finais

Neste capítulo foram apresentadas, resumidamente, certas técnicas para a geração e a análise genética de mutantes em *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Essas técnicas não são as únicas que funcionam, mas são algumas que funcionam em estudos das bactérias simbiotes das leguminosas. Quase todos os procedimentos terão que ser ajustados de acordo com a(s) estirpe(s) com que se trabalha, de forma a otimizar os resultados, razão pela qual não são apresentados em detalhe. Cabe ao estudioso da genética de bactérias e ao interessado em análises genéticas dos rizóbios escolher e adequar os métodos para a análise de seu sistema biológico.

11.7. Referências Bibliográficas

- ARAUJO, R.S. **Mutational analysis of the cell surface and nodulation competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*.** Madison: University of Wisconsin, 1993. (Tese de Doutorado).
- BEATTIE, G.A. **Quantitative and molecular analysis of nodulation competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*.** Madison: University of Wisconsin, 1991. (Tese Doutorado).
- CAVA, J.R.; ELIAS, P.M.; TUROWSKI, D.A.; NOEL, K.D. *Rhizobium leguminosarum* CFN42 genetic regions encoding lipopolysaccharide structures essential for complete nodule development on bean plants. **J. Bacteriol.**, v.171, p.8-15, 1989.
- DIEBOLD, R.; NOEL, K.D. *Rhizobium leguminosarum* exopolysaccharide mutants: biochemical and genetic analyses and symbiotic behavior on three hosts. **J. Bacteriol.**, v.171, p.4821-4830, 1989.
- HUANG, Y.; SEQUEIRA, L. Identification of a locus that regulates multiple functions in *Pseudomonas solanacearum*. **J. Bacteriol.**, v.172, p.4728-4731, 1990.
- HUANG, Y.; XU, P.; SEQUEIRA, L. A second cluster of genes that specify pathogenicity and host response in *Pseudomonas solanacearum*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v.3, p.48-53, 1990.
- LEIGH, J.A.; SIGNER, E.R.; WALKER, G.C. Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.82, p.6231-6235, 1985.
- LONG, S.R.; BUIKEMA, W.J.; AUSUBEL, F.M. Cloning of *Rhizobium meliloti* nodulation genes by direct complementation of Nod⁻ mutants. **Nature**, v.298, p.485-488, 1982.

- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545p.
- MILNER, J.L.; ARAUJO, R.S.; HANDELSMAN, J. Molecular and symbiotic characterization of exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium tropici* strain CIAT899. **Mol. Microbiol.**, v.6, n.21, p.3137-3147, 1992.
- NOEL, K.D.; DIEBOLD, R.J.; CAVA, J.R.; BRINK, B.A. Rhizobial purine and pyrimidine auxotrophs: nutrient supplementation, genetic analysis, and the symbiotic requirement for de novo purine biosynthesis. **Arch. Microbiol.**, v.149, p.499-506, 1988.

QUANTIFICAÇÃO DA COMPETITIVIDADE NODULAR DE
RHIZOBIUM E BRADYRHIZOBIUM

Ricardo S. Araujo¹

12.1. Introdução

A inconsistência dos resultados da inoculação de sementes de leguminosas com *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, em nível de campo, faz com que a adoção dessa tecnologia de baixo custo seja, muitas vezes, encarada com ceticismo pelos produtores. Muitos dos casos de insucesso da inoculação são atribuídos à baixa competitividade das estirpes de bactérias inoculadas, que não são capazes de prevalecer nos nódulos do hospedeiro (Baldwin & Fred, 1929; Nicol & Thornton, 1941; Weaver & Frederick, 1974; Meade et al., 1985; Triplett & Sadowsky, 1992). Esse quadro é particularmente sério quando o cultivo é realizado em solos que contenham uma determinada quantidade de bactérias naturalizadas capazes de nodular aquela espécie de planta. Por essa razão, é importante que os programas visando a seleção de inoculantes para leguminosas considerem, também, a competitividade nodular das bactérias em teste, o que demanda a existência de métodos simples e confiáveis para análise.

Considera-se competitividade nodular como a capacidade de uma determinada estirpe de estar presente na maioria dos nódulos do hospedeiro, mesmo representando a minoria numérica na população de bactérias que fazem contato com as raízes. Este conceito permite a aplicação de modelos matemáticos que relacionam a ocupação nodular com a representatividade de cada estirpe no inóculo. O modelo que será descrito neste capítulo foi desenvolvido por Beattie et al. (1989), e pode ser aplicado tanto para estirpes isogênicas, testadas sob condições controladas, como para estudos de campo sobre a competitividade de estirpes promissoras para produzir inoculantes. A interpretação dos resultados é simples, fornecendo uma medida da competitividade de cada estirpe, e permitindo determinar a dose de inoculante adequada para melhorar a ocupação dos nódulos pelo inoculante no campo.

¹ Pesquisador, Ph.D., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP), Cx. Postal 179, CEP 74001-970, Goiânia, GO.

12.2. O Modelo de Beattie et al. (1989)

Este modelo aplica um tratamento de regressão linear para interpretar a interdependência entre a ocupação nodular e a proporcionalidade entre duas estirpes no inóculo, ou entre uma estirpe inoculada e a população naturalizada de rizóbios nos casos de estudos com solo. A equação que descreve essa interdependência é:

$$\log \frac{P_A}{P_B} = IC_{A:B} + k \log \frac{I_A}{I_B} \quad (\text{Equação 1})$$

onde:

P_A = percentagem de nódulos ocupados pela estirpe A;

P_B = percentagem de nódulos ocupados pela estirpe B;

$IC_{A:B}$ = índice de competitividade (ponto onde a reta intercepta o eixo das ordenadas);

k = constante (inclinação da reta);

I_A = concentração de células da estirpe A no inóculo (nº/mL);

I_B = concentração de células da estirpe B no inóculo.

O modelo acima foi testado com um par de estirpes de *Rhizobium* que nodulam o feijoeiro, e foi capaz de descrever a competitividade relativa dessas estirpes sob condições de câmara de crescimento, casa de vegetação e de campo. Maiores detalhes sobre o seu desenvolvimento podem ser encontrados em Beattie et al. (1989).

12.3. Aplicações do Modelo para os Estudos com Estirpes Isogênicas

As aplicações descritas aqui foram empregadas com sucesso para estudar a correlação entre determinados fenótipos e a competitividade nodular de *Rhizobium* spp. para o feijoeiro (Milner et al., 1992; Araujo, 1993). Em estudos como esses, onde se pretende determinar se uma estirpe é mais competitiva que uma outra para estudar a correlação entre fenótipos, o mais indicado é a realização de uma análise genética de mutantes definidas (mutantes apenas no fenótipo em estudo) e independentes, e suas variantes com o fenótipo restaurado por clones específicos de bibliotecas genômicas das estirpes originais. A aplicação do modelo permite quantificar o grau de alteração na competitividade em consequência da mutação.

No exemplo de Araujo (1993) buscava-se estabelecer uma correlação entre a capacidade de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Rlp) e *R. etli* (Re) de produzir exopolissacarídeos (EPS) e sua competitividade nodular. Foram geradas duas coleções de mutantes independentes (ver capítulo 11), por inserção do transpóson Tn5, deficientes na produção de colônias gomosas quando crescidas a 28°C, em meio de cultura rico em carbono (YM, ver capítulo 2). Foram também empregadas variantes

cujos fenótipos haviam sido restaurados por clones específicos de bibliotecas genômicas das estirpes originais.

Procedimento:

1 - Partindo de uma estirpe original (com ou sem uma marca de resistência a antibiótico), gerar mutantes por inserção do transposon Tn5 (ou outro), definidas quanto ao fenótipo desejado (é necessário que o fenótipo mutante seja discernível, de alguma forma, do original). Selecionar mutantes independentes para estudos posteriores.

Nota: em análises genéticas é importante que se estude o maior número possível de mutantes independentes para estabelecer correlações concretas; basta que apenas uma mutante fuja à regra para impedir uma conclusão sobre a correlação entre fenótipos.

2 - Se houver uma biblioteca genômica disponível, obter as variantes com fenótipos restaurados e reservá-las para análise.

Nota: todas as estirpes (originais e mutantes) empregadas em análises como essas devem ser estocadas sob condições favoráveis à manutenção de suas propriedades genéticas (liofilização, congelamento a -80° C, ou em nitrogênio líquido).

3 - Certificar-se de que as mutantes apresentam apenas um fenótipo mutante, aquele que se quer estudar. As demais características e propriedades das mutantes devem ser idênticas às das estirpes originais.

4 - Para os ensaios de competitividade, crescer culturas da estirpe original, das mutantes e suas variantes em tubos de ensaio ou frascos contendo meio YM ou TY líquidos, sem antibióticos, por três dias, a 28° C, com aeração (para *Bradyrhizobium* crescer por cinco a sete dias).

5 - Preparar diluições das culturas, em água destilada esterilizada, de forma a obter suspensões com uma absorbância a 600 nm (A_{600}) igual a 0,1.

Nota: para culturas cuja correlação entre absorbância e concentração de células é conhecida, pode-se pular a próxima etapa, necessária para equalizar as concentrações de células no inóculo.

6 - Fazer a contagem do número de bactérias/mL nessas suspensões em hemacitômetro ou câmara de Petroff-Hauser, ao microscópio. Ajustar as suspensões com água destilada esterilizada de forma a obter a mesma concentração de células em todas.

7 - Fazer diluições apropriadas das suspensões para contar o número de células por plaqueamento em meio de cultura específico (adicionar os antibióticos apropriados). Esses números serão necessários para determinar as proporções celulares nas suspensões empregadas para a inoculação.

8 - Partindo das suspensões ajustadas, fazer diluições de cinco a 1000 vezes, conforme a necessidade, em água destilada esterilizada. Por exemplo, podem-se fazer as diluições 5X, 10X, 20X, 50X, 100X, 500X e 1000X. Um volume de cerca de 100 mL de cada diluição é adequado. Fazer a contagem da concentração de células nas suspensões diluídas como no item 7. O número de diluições necessárias vai depender do número de tratamentos desejados. Cada tratamento é a mistura de uma mutante ou variante com a estirpe original, como por exemplo, nas combinações a seguir:

<u>Estirpe Original</u>	:	<u>Mutante ou Variante</u>
1	:	1000
1	:	500
1	:	100
1	:	50
1	:	20
1	:	10
1	:	5
1	:	1
5	:	1
10	:	1
		etc.

O número de tratamentos vai variar com o número de mutantes em teste. Pode-se diminuir o número de combinações de cada par, mas são necessárias pelo menos três combinações por par, incluindo a mistura na proporção 1:1 e uma outra em cada direção. O modelo se aplica melhor quando são utilizadas pelo menos cinco combinações.

9 - Preparar as plantas hospedeiras (sementes ou plântulas), esterilizadas, de acordo com um dos métodos descritos no capítulo 3. Serão necessárias oito a dez plantas (unidades experimentais) por tratamento.

10 - Preparar as misturas da estirpe original com cada mutante ou variante, como nos exemplos a seguir:

a) 500 Original : Mutante 1

Tomar 6 mL da suspensão da estirpe original com $A_{600} = 0,1$ e misturar com 6 mL da diluição 500X da mutante; agitar vigorosamente e empregar para inoculação em seguida. Não armazenar misturas antes da inoculação.

b) 1 Original : Mutante 20

Tomar 6 mL da diluição 20X da estirpe original e misturar com 6 mL da suspensão da mutante com $A_{600} = 0,1$. Proceder como no exemplo anterior.

11 - Inocular as sementes ou plântulas correspondentes a cada tratamento com 1 mL das misturas imediatamente após serem preparadas. Inocular o mesmo número de repetições com as suspensões individuais ($A_{600} = 0,1$) para fins de controle.

12 - Após inocular todas as sementes ou plântulas, levá-las à câmara de crescimento ou casa de vegetação, e mantê-las de acordo com os procedimentos recomendados no capítulo 3.

13 - Para plantas que nodulam rapidamente (ex.: soja, feijão, caupi) a colheita pode ser realizada 21 dias após o plantio/inoculação. Na colheita, remover as plantas de seu substrato e lavar bem as raízes em água corrente. Destacar seis nódulos de cada uma das oito plantas para análise.

Nota: caso haja necessidade, os nódulos podem ser armazenados para análise posterior. Para isso, transferir os nódulos de cada planta para tubos de microcentrifuga devidamente identificados e adicionar cerca de 500 μL de solução de glicerol a 15%, levando-os ao congelador. Esses nódulos deverão ser processados em no máximo 30 dias. Para estocagens mais longas os nódulos podem ser armazenados sobre CaCl_2 anidro.

A amostra deve ser de no mínimo 48 nódulos. Havendo falta de espaço ou material podem-se utilizar seis unidades experimentais por tratamento, colhendo-se oito nódulos de cada planta.

14 - Processar os nódulos para identificação de seus ocupantes de acordo com métodos de rotina como resistência a antibióticos (Beattie & Handelsman, 1989), sorologia (ver capítulo 8), perfil eletroforético em géis de poliacrilamida (Kamicker & Brill, 1983), etc. Computar as duplas ocupações, acrescentando-as aos dados de ocupação individual por cada uma das estirpes. Transformar esses dados em percentagem de nódulos ocupados por cada estirpe, e calcular a proporção $P_{\text{ORIG}}:P_{\text{MUT}}$ e seu logaritmo decimal. Após a obtenção desses dados, resgatar os resultados das contagens de números de células nas suspensões inoculantes.

15 - Calcular a proporção de células em cada uma das misturas; calcular o logaritmo decimal dessa proporção.

Ex.: mistura 1 Original : Mutante 50 (proporção teórica)

nº células/mL da diluição 50X da estirpe original: $5,21 \cdot 10^5$

nº células/mL da suspensão da mutante com $A_{600} = 0,1$: $2,25 \cdot 10^7$

proporção $I_{\text{ORIG}}:I_{\text{MUT}} = 5,21 \cdot 10^5 / 2,25 \cdot 10^7 = 1/43,2$ (proporção calculada)

$\log I_{\text{ORIG}}:I_{\text{MUT}} = -1,635$

16 - Elaborar as curvas de competição utilizando as percentagens de nódulos ocupados por cada estirpe, em cada combinação, no eixo das ordenadas (Y) e os valores dos logaritmos decimais das proporções de inóculo no eixo das abscissas (X). Uma curva de competição característica de um par de estirpes igualmente competitivas, elaborada a partir de dados teóricos (gerados pela aplicação do modelo) é representada na Figura 12.1. O ponto de interseção das duas curvas indica a composição de inóculo necessária para que cada estirpe ocupe 50% dos nódulos do hospedeiro. Como as duas estirpes do exemplo são igualmente competitivas, cada uma ocupará 50% dos nódulos quando representar 50% do inóculo (proporção 1:1; $\log = 0$).

Quando uma mutante é significativamente menos competitiva que a estirpe original, o ponto de interseção das curvas se desloca para uma proporção de inóculo que favoreça a mutante (Figura 12.2a). Se a restauração do fenótipo da mutante estiver associada à restauração da competitividade, o ponto de interseção das curvas se deslocará novamente em direção ao zero (Figura 12.2b). As curvas de competição são excelente recurso visual para caracterizar a competitividade de um par de estirpes.

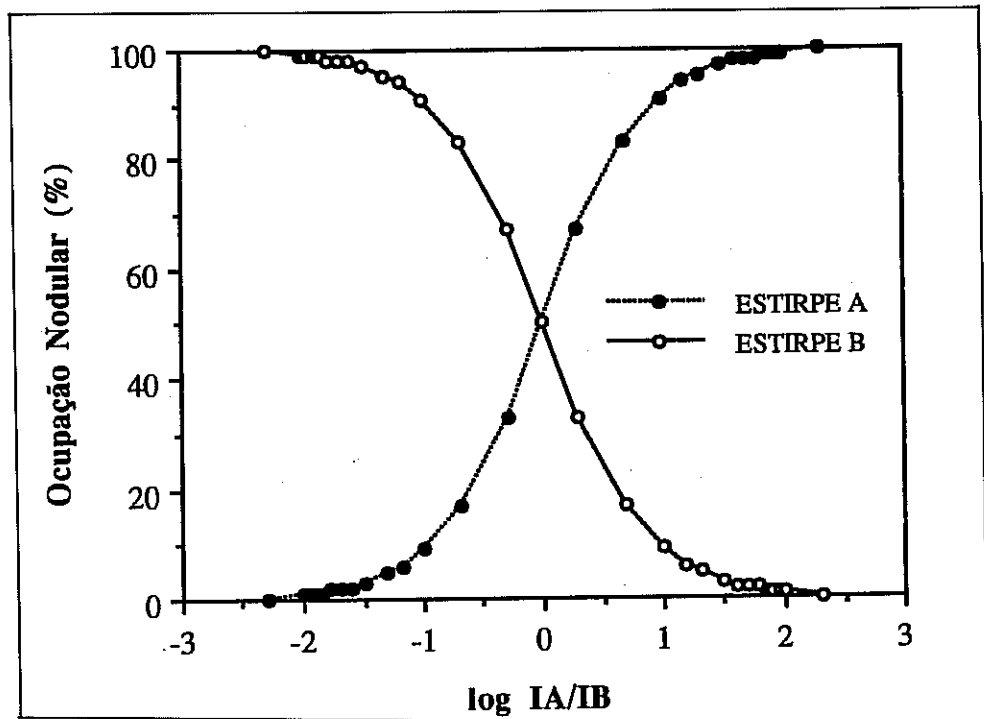


FIGURA 12.1. Curva teórica de competição pela nodulação entre duas estirpes igualmente competitivas.

17 - Para aplicar o modelo, utilizar os seguintes valores:

$$X = \log I_{\text{ORIG}}:I_{\text{MUT}}$$

$$Y = \log P_{\text{ORIG}}:P_{\text{MUT}}$$

Utilizando um programa de análise estatística por computador, ou a calculadora, fazer a regressão de Y sobre X. A transformação em log permite a linearização, gerando uma equação de primeiro grau. O índice de competitividade ($IC_{\text{ORIG:MUT}}$) equivale ao ponto de interseção da reta no eixo das ordenadas. No caso de duas estirpes igualmente competitivas a reta passará pela origem, e IC será igual a zero. Se, na análise de variância da regressão, for observado que os dados descrevem uma reta que não passa pela origem ($b_0 \neq 0$), conclui-se que há uma diferença significativa na competitividade das estirpes em teste. Assim, se:

$IC_{\text{ORIG:MUT}} > 0$, a mutante é menos competitiva que a estirpe original;

$IC_{\text{ORIG:MUT}} = 0$, as duas estirpes são igualmente competitivas;

$IC_{\text{ORIG:MUT}} < 0$, a mutante é mais competitiva que a estirpe original.

A interpretação dessa análise permite dizer se a mutação que deu origem ao novo fenótipo alterou também, significativamente, a competitividade da estirpe, possibilitando o estabelecimento de correlações entre fenótipos.

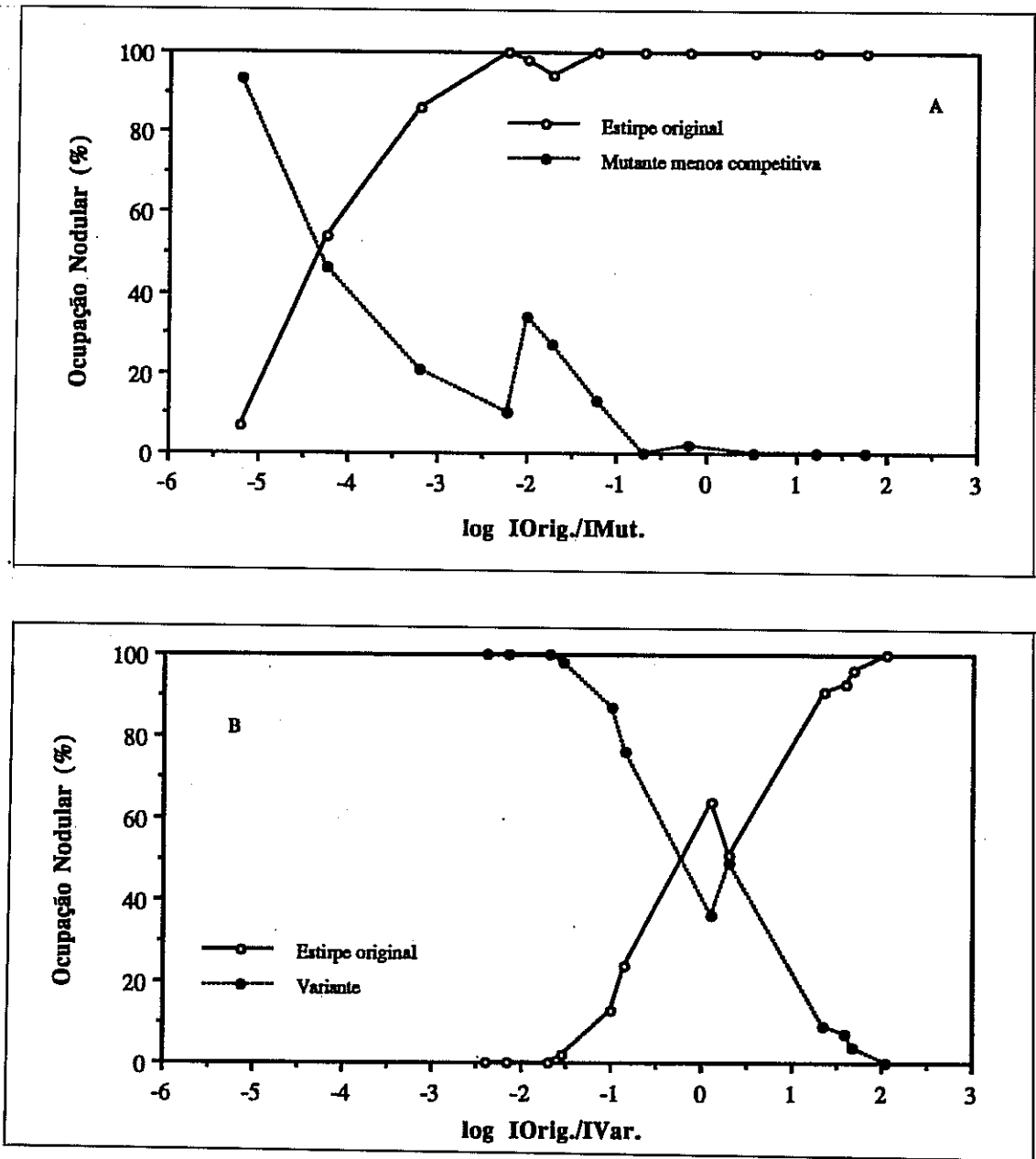


FIGURA 12.2. Curvas reais de competição entre a estirpe original e uma mutante menos competitiva (A) e entre a estirpe original e a variante com fenótipo restaurado (B).

12.4. Aplicação do Modelo para Estudos de Competitividade no Solo

O modelo de Beattie et al. (1989) também pode ser aplicado para avaliar o desempenho de inoculantes quanto à habilidade de competir com as populações naturalizadas de rizóbios homólogos. Nesses casos também se aplicam diferentes proporções de inóculo de acordo com o tamanho da população naturalizada. Esta análise, entretanto, não permite inferir sobre correlações entre fenótipos e a competitividade nodular das estirpes no solo, pois a população naturalizada de rizóbios é, provavelmente, muito heterogênea, o que implica em que o inoculante e as bactérias naturalizadas sejam diferentes em diversos fenótipos que podem interferir na competitividade. Os efeitos de certos fenótipos sobre a competitividade no solo só poderão ser estudados se forem testadas mutantes também (os testes com organismos geneticamente alterados não devem ser realizados no campo sem os devidos cuidados).

Procedimento:

1 - Antes de mais nada é preciso conhecer o tamanho da população de rizóbios homólogos no solo onde será realizado o experimento. O melhor é que se tenha uma noção ou estimativa da concentração desses rizóbios/g de solo antes do experimento. Caso não seja possível, a contagem deve ser realizada paralelamente ao experimento.

Nota: não se deve guardar o solo para esperar o resultado da contagem, pois isso pode alterar a concentração de bactérias até o momento de plantio do experimento.

2 - Determinar a concentração de rizóbios homólogos/g de solo pela técnica do número mais provável (NPM - capítulo 3), utilizando o mesmo hospedeiro (espécie e cultivar) do experimento.

3 - Crescer as culturas de bactérias como descrito anteriormente, e preparar as suspensões com $A_{600} = 0,1$.

4 - Calcular a concentração de células nas suspensões com $A_{600} = 0,1$ por contagem em hemacitômetro ou câmara de Petroff-Hauser. Fazer também a contagem por plaqueamento em meio de cultura específico.

Nota: uma suspensão com $A_{600} = 0,1$ tem uma concentração de células na ordem de grandeza de 10^7 , variando com a estirpe. Se o solo contiver uma população alta, na ordem de grandeza de 10^6 , e for desejável utilizar, de acordo com o experimento um $I_{INOC}/I_{SOLO} = 10$, será necessário calcular a concentração de células na cultura original para determinar a diluição necessária para obter a concentração desejada.

5 - Preparar as suspensões diluídas conforme descrito anteriormente, de acordo com a necessidade para obter as diferentes proporções de inóculo em relação à população do solo. Para esses cálculos considera-se que uma semente, ao ser plantada, é exposta a aproximadamente 1 g de solo. Assim, o número de céls./g de solo é igual ao número de céls./semente. Esse número deve ser utilizado para cálculo das proporções de inóculo, que serão obtidas dividindo-se o número de céls./mL da suspensão diluída pelo número/g de solo (equivalente ao número de células/semente).

6 - No caso de experimentos em vasos com solo, inocular as sementes aplicando 1 mL das suspensões diretamente sobre as mesmas, imediatamente após o plantio. Se os experimentos forem plantados no campo, uma alternativa para facilitar a inoculação é umedecer as sementes com as suspensões de inóculo (diluídas como necessário) e polvilhá-las com turfa seca, esterilizada, para recobri-las. Nesses casos, é importante:

a) contar o número de sementes a serem inoculadas de forma a ajustar o volume de inóculo de acordo com a concentração para que cada semente receba, ao ser plantada, o número de células necessário para fornecer a proporção $I_{\text{INOC}}/I_{\text{SOLO}}$ desejada;

b) fazer a contagem, em placas, do número de células realmente aplicado a cada semente, em cada tratamento. Esses dados serão os mais importantes para cálculos do $I_{\text{INOC}}/I_{\text{SOLO}}$ para a aplicação do modelo.

7 - Manter as plantas de acordo com os procedimentos adequados para cada situação. É importante dar às plantas todas as condições apropriadas para crescimento (adubação, irrigação, tratos culturais, etc.). Colher as plantas a partir de 30 dias após o plantio/inoculação. Coletar os nódulos e processá-los como descrito anteriormente. No caso de plantas crescidas em solo, os nódulos que devem ser amostrados são aqueles distribuídos por uma distância de até 2 cm ao redor da coroa da planta, visto que são esses nódulos que são normalmente induzidos pelo inoculante. Os nódulos nas raízes secundárias servirão para dar uma noção da migração do inóculo pelo solo, mas não devem ser analisados para inferir sobre a competitividade dos inoculantes.

8 - De posse dos dados, elaborar as curvas de competição e aplicar o modelo matemático, conforme descrito anteriormente, para calcular o IC das estirpes inoculadas em relação à população do solo. As curvas de competição, nesses casos, permitem ainda determinar a dose de inóculo necessária para se conseguir que as estirpes inoculadas ocupem a maioria dos nódulos do hospedeiro, o que serve de subsídio para a elaboração de estratégias para a inoculação em massa.

12.5. Considerações Finais

O esquema de análise sugerido neste capítulo proporciona uma boa base para inferência sobre a competitividade nodular entre duas estirpes isogênicas ou entre estirpes inoculantes e a população de rizóbios do solo, e se aplica a análises genéticas de correlações entre fenótipos bacterianos e sua competitividade nodular, no caso de estirpes isogênicas. É possível, também, determinar a dose de inóculo que se deve empregar para que certas estirpes ocupem a maioria dos nódulos do hospedeiro quando utilizadas como inoculantes em solos com populações estabelecidas de rizóbios homólogos. Entretanto, essa análise não oferece uma medida da contribuição da maior competitividade de certas estirpes para a fixação do nitrogênio e a nutrição da planta hospedeira.

O modelo também não leva em conta os eventos que ocorrem na espermosfera (região de influência da semente em germinação) e que podem influenciar os rizóbios entre a inoculação e a infecção dos pelos radiculares. Dados como estes e como aqueles provenientes da análise nutricional das plantas devem sempre acompanhar as inferências sobre a competitividade nodular dos rizóbios.

12.6. Referências Bibliográficas

- ARAUJO, R.S. **Mutational analysis of the cell surface and nodulation competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli***. Madison: University of Wisconsin, 1993. 118p. (Tese de Doutorado).
- BALDWIN, I.L.; FRED, E.B. Strain variation in the root nodule bacteria of clover, *Rhizobium trifolii*. **J. Bacteriol.**, v.17, p.17-18, 1929.
- BEATTIE, G.A.; CALYTON, M.K.; HANDELSMAN, J. Quantitative comparison of the laboratory and field competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.55, p.2755-2761, 1989.
- BEATTIE, G.A.; HANDELSMAN, J. A rapid method for the isolation and identification of *Rhizobium* from root nodules. **J. Microbiol. Met.**, v.9, p.29-33, 1989.
- MEADE, J.; HIGGINS, P.; O'GARA, F. Studies on the inoculation and competitiveness of a *Rhizobium leguminosarum* strain in soils containing indigenous rhizobia. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.49, p.899-903, 1985.
- MILNER, J.L.; ARAUJO, R.S.; HANDELSMAN, J. Molecular and symbiotic characterization of exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium tropici* strain CIAT899. **Mol. Microbiol.**, v.6, p.3137-3147, 1992.
- NICOL, H.; THORNTON, H.G. Competition between related strains of nodule bacteria and its influence on infection of the legume host. **Proc. R. Soc. London**, v.130, p.32-59, 1941.
- TRIPLETT, E.W.; SADOWSKY, M.J. Genetics of competition for nodulation of legumes. **Ann. Rev. Microbiol.**, v.46, p.399-428, 1992.
- WEAVER, R.W.; FREDERICK, L.R. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merrill. I. Greenhouse studies. **Agron.J.**, v.66, p.229-232, 1974.

METABOLISMO DO CARBONO E DO NITROGÊNIO NOS NÓDULOS

*Mariangela Hungria¹***13.1. Assimilação Inicial da Amônia nos Nódulos****13.1.1. Introdução**

Após os estádios iniciais de infecção e formação dos nódulos, ocorre o desenvolvimento das enzimas responsáveis pela redução e assimilação do nitrogênio atmosférico (N_2). O primeiro produto estável, no processo da fixação do N_2 , é a amônia, que é transferida do bacteróide, através da membrana peribacteroidal, para o citosol da planta hospedeira (Bergersen, 1965; Bergersen & Turner, 1967). As reações de assimilação são, então, mediadas pela glutamina sintetase (GS, E.C. 6.3.1.2) e pela glutamato sintase (GOGAT-NADH, E.C.1.4.1.14 e GOGAT-dependente de ferredoxina, E.C.1.4.7.1), que já podem ser detectadas na fase inicial de estabelecimento dos nódulos (Atkins et al., 1980, 1984; Mifflin & Cullimore, 1984; Hungria et al., 1991). Mais de 95% da atividade dessas enzimas está localizada no citosol dos nódulos (Atkins et al., 1980; Mifflin & Cullimore, 1984; Hungria et al., 1991).

Inicialmente, a GS adiciona amônia ao ácido glutâmico, com a hidrólise concomitante de ATP e a formação da glutamina, que é o produto orgânico inicial da fixação do N_2 . Devido ao baixo K_m da GS para a amônia (200 nM), essa é considerada a via principal de assimilação desse composto nos nódulos (Boland et al., 1982; Shelp & Atkins, 1984; Atkins, 1991). Na reação seguinte, o N-amida da glutamina é adicionado, pela ação da GOGAT, a uma molécula de α -cetoglutarato (ácido 2-oxoglutárico), gerando duas moléculas de glutamato. Essas duas moléculas podem ser, novamente, receptoras da amônia, ou podem ser usadas, posteriormente, como doadoras de amida.

Tem sido sugerido, freqüentemente, que a ineficiência de certos sistemas simbióticos, como o do feijão e o declínio na atividade fixadora do N_2 , sob condições de estresse (ex: temperaturas elevadas e baixa umidade do solo) estão relacionados com o decréscimo nas taxas fotossintéticas do hospedeiro ou com a ineficiência do complexo da dinitrogenase (discutido na revisão de Neves & Hungria, 1987). Pelo menos no caso da simbiose feijão-*Rhizobium*, porém, os baixos níveis de atividade da GS e da GOGAT podem ser os fatores limitantes à fixação do N_2 e são afetados tanto pela estirpe de rizóbio (Hungria et al., 1991) como pela cultivar do hospedeiro (Pacovsky & Hungria, 1990). Foi constatado, por exemplo, que o período inicial de estresse de N, em feijoeiro nodulado, estava relacionado com um atraso no estabelecimento da atividade da GS e GOGAT e não no estabelecimento da atividade da dinitrogenase (Hungria et al., 1991). Em temperaturas elevadas, também foi observado que a queda nas atividades da GS e da GOGAT antecedia à queda na atividade da dinitrogenase, sendo responsável pelo colapso da atividade fixadora dos nódulos (Hungria, 1993).

¹ Pesquisadora. Ph.D., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), Cx. Postal 1061, CEP 86001-970, Londrina, PR.

Atividades elevadas da glutamato desidrogenase (GDH) já foram detectadas nos nódulos de leguminosas (Shelp & Atkins, 1984; Hungria & Wallsgrove, dados não publicados) e a assimilação, via GDH, seria pela adição da amônia ao ácido 2-oxoglutarato, gerando glutamato. Entretanto, devido às baixas concentrações de amônia encontradas nos nódulos e ao K_m elevado da enzima, de $14\mu\text{M}$, é pouco provável que essa via de assimilação seja utilizada (Streeter, 1989; Atkins, 1991). A constatação de níveis elevados de atividade nos nódulos, porém, deixa dúvidas sobre a ação da GDH, que talvez possa ser importante, sob condições de estresse (Atkins et al., 1984), ou durante a senescência dos nódulos (Sutton, 1983).

A seguir, serão descritas algumas metodologias para avaliar, nos nódulos, a atividade das enzimas responsáveis pela assimilação da amônia. Este capítulo foi baseado em estudos enzimáticos conduzidos com nódulos do feijoeiro (Hungria et al., 1991).

13.1.2. Coleta de Nódulos

Os nódulos devem, de preferência, ser coletados no momento da análise, sendo mantidos, desde a coleta, em temperaturas de 0°C a 4°C , no tampão de homogeneização. No caso de análises posteriores à coleta, os nódulos devem ser imediatamente preservados em nitrogênio líquido ou em congelador a -80°C . Alguns testes, em Rothamsted, mostraram que houve manutenção nas atividades da GS, GOGAT e GDH de nódulos de feijão preservados em nitrogênio líquido por cinco anos. Quando o estudo permitir, é preferível utilizar nódulos novos pois, nos estádios mais tardios, a presença de tecidos senescentes e fenóis dificulta os ensaios.

13.1.3. Extração das Enzimas

O fracionamento do tecido nodular é essencial, possibilitando a separação da fração bacteroidal da fração contendo o citosol da planta hospedeira. É importante salientar, novamente, que é essencial que EM TODOS OS PASSOS DA METODOLOGIA E QUE TODOS OS MATERIAIS EMPREGADOS DURANTE A EXTRAÇÃO, COMO TAMPÕES, ALMOFARIZ, ETC., SEJAM MANTIDOS EM TEMPERATURAS ENTRE 0° E 4°C .

13.1.3.1. Soluções de extração e homogeneização

A seguir, serão descritas três soluções (tampão de extração) que mostraram bons resultados na extração das enzimas dos nódulos de leguminosas:

a) Solução de Farden & Robertson (1980)

- tampão fosfato, 0,05 M, ajustado a pH 7,2 com KOH
- sacarose, 0,4 M
- ditioneitol (DTT), 10 mM

b) Solução de Kendall et al. (1986), para a Glutamina Sintetase

Utilizada, por Hungria et al.(1991), para os nódulos de feijoeiro.

b.1) Solução tampão (A)

- 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (Tris, Trizma)-HCl, 50 mM, pH 7,7 a 7,8
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10mM
- etanodiol, 10 %

(Para 250 mL de solução, colocar 1,97 g de Tris; 0,6162 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; e 25 mL de etanodiol)

b.2) Solução de extração, pH 7,7 a 7,8

- solução tampão (A) +
- L-glutamato (ácido glutâmico), 5mM
- ditioneitol, 5 mM (adicionar depois de acertar o pH e um pouco antes de usar)
- Triton X-100, 0,05 %

(Para 250 mL de solução, colocar 0,184 g de glutamato; 0,125 mL de Triton e 0,193 g de DTT)

c) Solução de Hungria et al. (1991), para Glutamato Sintase

- tampão fosfato, 50 mM e etanodiol, a 10%. Ajustar o pH para 7,5 (solução A)
- ditioneitol, 5 mM (0,19 g/25 mL)
- mercaptoetanol, 1% (0,25 mL/25 mL)
- EDTA, 5 mM (0,036 g/25 mL)
- fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), 0,5 mM (dissolver em um pouco de isopropanol e, depois, adicionar ao tampão) (0,002 g/25 mL)
- Triton X-100, 0,05% (0,0125 mL/25 mL)

d) Solução de Thomas & Sprent (1984)

- tampão fosfato, 0,1 M, pH 8,0
- KCl, 10mM
- MgCl_2 , 1mM
- glutathione, 5 mM
- Na_2EDTA , 1 mM
- polivenilpirrolidona (PVP), 0,5 % (peso/volume, p/v) - pode-se utilizar tanto o PVP solúvel (por exemplo, o Kollidon 25, PM 25.000, BASF), como o PVP insolúvel (como o Polyclar AT) mas, neste último caso, o produto deve ficar, por 12 horas, em uma solução de HCl, 3 M, com uma relação entre o peso de HCl e o peso do PVP de 3/1.

Observações:

- a) o DTT é usado para proteger os grupos -SH das proteínas;
- b) substâncias como o etanodiol, glicerol e açúcar ajudam a estabilizar a enzima;
- c) o Triton ajuda a romper as membranas;
- d) o PMSF é um inibidor de proteases;
- e) o EDTA tem por finalidade quelar os cátions.

13.1.3.2. Procedimentos para a extração das frações do nódulo

a) Método de Farden & Robertson (1980)

- coletar, aproximadamente, 20 g de nódulos, colocando-os diretamente no tampão de extração;
- secar o excesso de água em filtro de papel e pesar os nódulos;
- macerá-los em dois volumes (p/v) de tampão de homogeneização (seção 13.1.3.1, ou outro). A homogeneização pode ser em homogeneizador ou em almofariz;
- filtrar em camada dupla de talagarça ("cheesecloth"), previamente umedecida com tampão resfriado;
- centrifugar, a 250 g, por 5 min, para produzir um pélete ("pellet") contendo grãos de amido e parede celular;
- remover o sobrenadante e centrifugar, a 8.000 g, por 5 minutos, para que se produza um pélete de bacteróides;
- deixar o sobrenadante decantar e, então, centrifugar, a 30.000 g, por 30 min, para produzir um pélete contendo uma pequena proporção de bacteróides, mitocôndrias e membranas da planta e o sobrenadante, onde se localizam as proteínas solúveis do citoplasma da planta (fração do citosol da planta);
- suspender os bacteróides em 10 volumes (volume/volume, v/v) de meio de homogeneização e centrifugar, a 8.000 g, por 5 min, para produzir: 1) um pélete de bacteróides com pouca contaminação de grãos de amido e 2) organelas e membranas de planta;
- se necessário, repetir os passos de suspensão e homogeneização.

b) Método de Hungria et al. (1991)

Foram conseguidos bons resultados com um método mais simples, que consiste em:

- utilizar, aproximadamente, 0,5 g de nódulos (e apenas uma "pitada" de PVP, caso esse não tenha sido utilizado no tampão de extração);
- macerar os nódulos em tampão, a 4° C, de modo que o volume final fique entre 4 mL e 5 mL;
- transferir para o tubo da centrífuga (mantido a 4° C);
- centrifugar a 5.000 rpm, ou 20.000 g, por 30 min (a 4° C);
- coletar, cuidadosamente, o sobrenadante do tubo, para medir o volume;
- passar por coluna de Sephadex G-25, previamente dessalinizada com, aproximadamente, 10 mL do tampão de extração.

c) Outros

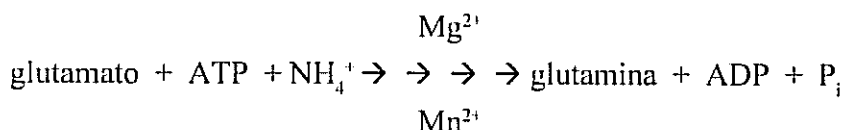
Os procedimentos anteriormente citados permitem a separação das frações do bacteróide e do citosol dos nódulos. No caso de estudos em que os nódulos precisam de um fracionamento maior, particularmente para a localização das enzimas, são utilizados outros métodos, como o do gradiente com sacarose (Farden & Robertson, 1980).

13.1.4. Atividade da Glutamina Sintetase (GS, E.C. 6.3.1.2)

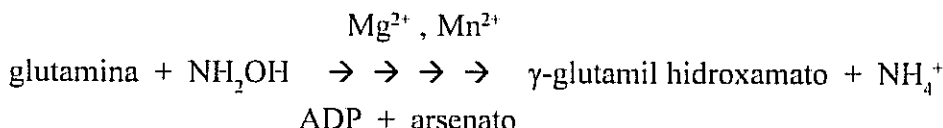
13.1.4.1. Ensaio da GS transferase

Princípio

A reação representativa da ação da glutamina sintetase é expressa por:



A enzima GS também catalisa a formação de γ -glutamil hidroxamato pela reação da transferase:



A seguir, será descrita a metodologia utilizada por Hungria et al. (1991). O ensaio é baseado no trabalho conduzido por Cullimore & Sims (1980), onde o γ -glutamil-hidroxamato é determinado segundo Ferguson & Sims (1971).

Reagentes

a) Solução de extração e homogeneização

- ver seção 13.1.3.1, item b.

b) Solução da transferase

b.1) Solução para o ensaio

Preparar 50 mL de solução, com pH ajustado a 6,4, contendo:

- Tris-HCl, 0,3 g
- L-glutamina, 0,45 g
- hidroxilamina-HCl, 0,13 g
- adenosina difosfato (sódica) (ADP-Na), 1,2 mg
- MnCl_2 , 12,5 mg ou $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 15,0 mg

b.2) Solução de arsenato de sódio

- arsenato de sódio a 6,4%, com pH 6,4 (6,4 g em 100 mL de tampão Tris-HCl, com pH ajustado a 6,4).

b.3) Solução dessalinizante

- colocar, aproximadamente, 2 mL de Sephadex G-25 em água (a relação deve ser de 5 mL de Sephadex por g de material a ser analisado). Deixar uma noite com água ou tampão;
- usar o tampão descrito na seção 13.1.3.1(b.1) + ditioneitol, 5 mM. O pH deve ser ajustado a 7,7;
- fazer a dessalinização com, aproximadamente, 10 mL do tampão.

b.4) Solução de cloreto férrico (FeCl_3)

- FeCl_3 , 0,37 M;
 - HCl, 0,67 M;
 - ácido tricloroacético (TCA), 0,2 M TCA;
- Filtrar em dois papéis de filtro e manter em vidro escuro.

Procedimento

a) Dessanilização

- realizar a extração conforme descrito nas seções 13.1.3.1 e 13.1.3.2;
- depois de centrifugar a 5.000 rpm, ou 20.000 g, por 30 min, retirar, cuidadosamente, do tubo de centrifuga, 500 μL do produto centrifugado;
- colocar na coluna dessanilizada;
- colocar, cuidadosamente, 450 μL da solução de dessalinização;
- colocar mais 750 μL da solução de dessalinização;
- coletar o material.

b) Condução do ensaio

- conduzir o ensaio a 30° C;
- colocar 450 μL da solução para o ensaio;
- adicionar 50 μL de arsenato de sódio;
- adicionar o extrato para avaliar a atividade (no caso de nódulos novos de feijão, foram utilizados 10 μL a 20 μL do extrato de nódulos);
- incubar, por 10 min, a 30° C;
- parar a reação com a adição de 500 μL do reagente de cloreto férrico (FeCl_3);
- centrifugar, em microcentrifuga, por 10 min;
- fazer a leitura da absorbância no comprimento de 505 nm (densidade óptica, D.O.).

c) Cálculo da atividade da GS

- preparar padrões de γ -glutamil hidroxamato. Pode-se utilizar alíquotas de 0 mL a 0,4 mL de um padrão de uma solução de γ -glutamil hidroxamato, a 10 mM;
- certificar-se de que o padrão é de boa procedência, sem impurezas;
- expressar o resultado em nmols de γ -glutamil hidroxamato formados/min.(mg de proteína). Para análise da proteína, ver seção 13.3;
- a concentração também pode ser determinada pelo coeficiente de extinção do γ -glutamil hidroxamato:

$$\epsilon_{505} \text{ } \gamma\text{-glutamil hidroxamato} = 4,66 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol.}$$

Essa seria, portanto, a absorvância de uma solução 1 M de γ -glutamil hidroxamato, lida em uma cubeta de 1 cm de espessura.

Exemplo de cálculo:

- supondo que foram utilizados 50 μ L do extrato - o fator de correção para 1 mL é 20;
- supondo que foram colocados 500 μ L do extrato na coluna de dessanilização, sendo coletados 750 μ L após a passagem do tampão de dessanilização - o fator de correção é 1,5;
- a atividade da GS seria, então, dada por:

$$\text{nmols.}\gamma\text{-glutamil/min (g de peso fresco)} = \frac{\text{D.O.} \times 20 \times \text{volume do sobrenadante} \times 1,5}{\text{peso dos nódulos} \times \text{tempo de incubação} \times 4,66}$$

Observações:

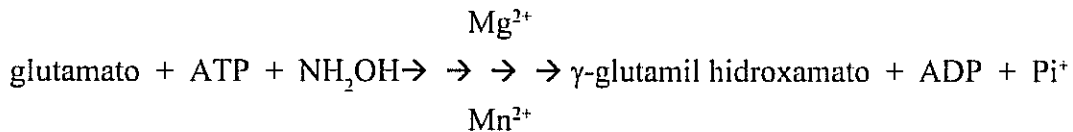
- a) para cada experimento, é necessário determinar as condições que otimizam a atividade enzimática;
- b) os testes devem iniciar com a escolha da relação entre o tampão do extrato e o tecido a ser analisado;
- c) a temperatura de condução do ensaio deve se aproximar das condições de crescimento das plantas. De um modo geral, as temperaturas mais utilizadas estão em torno de 25° C. No caso dos nódulos de feijão, foi utilizada a temperatura de 30° C, pois as plantas estavam crescendo nessas condições;
- d) as concentrações dos extratos também devem ser testadas. No caso dos nódulos de feijão, por exemplo, utilizando-se 0 μ L, 5 μ L, 10 μ L, 20 μ L e 50 μ L de extrato de nódulos, obteve-se uma $r^2 = 0,984$. Deve-se procurar utilizar a concentração que forneça uma leitura de densidade óptica entre 0,5 e 0,7 pois, em ensaios colorimétricos, essa é a faixa com melhor linearidade e confiança. No caso dos nódulos do feijoeiro, 10 μ L do extrato permitiram uma densidade óptica de 0,744 e, por isso, essa foi a concentração escolhida;
- e) o tempo de incubação também deve ser investigado. No caso dos nódulos do feijão, foram testados os tempos de 0 min, 5 min, 10 min, 15 min e 20 min. A correlação obtida foi de $r^2 = 0,996$ e o tempo escolhido foi o de 10 min de incubação, que permitiu a leitura da D.O. de 0,721;

- f) o padrão, neste e em todos os ensaios descritos neste capítulo, deve ser preparado em água destilada e deionizada;
- g) o ensaio GS-transferase não pode ser utilizado para comparar as atividades da GS em diferentes partes da planta como, por exemplo, GS nas folhas, raízes, caule, nódulos, etc. Neste caso, deve-se utilizar o ensaio biossintético. Com o ensaio da transferase, pode-se apenas comparar a GS de um tipo de órgão, por exemplo, GS dos nódulos.

13.1.4.2. Ensaio semibiossintético

Princípio

O ensaio detecta a reação representada por:



O método descrito a seguir é baseado em Cullimore et al.(1982) e foi utilizado por Hungria et al. (1991).

Reagentes

a) Solução de extração e dessalinização

- a mesma descrita na seção 13.1.3.1, item b.

b) Soluções para o ensaio

- tampão Tris-HCl, 50 mM, pH 7,7 (1,97 g/250 mL).

Preparar, nesse tampão, quatro soluções:

- MgSO₄·7H₂O, 0,1 M (0,493 g/20 mL);

- hidroxilamina-HCl (NH₂OH-HCl), 0,05 M (0,035 g/10 mL);

- ATP, 0,1 M (0,055 g/1 mL);

- L-glutamato, 0,1 M (0,169 g/10 mL);

(todas as soluções devem ser feitas diariamente e com pH ajustado para pH 7,7, com KOH);

- solução de cloreto férrico (FeCl₃) (a mesma do ensaio GS-transferase, seção 13.1.4.1, item b.4.

Procedimento

- adicionar 50 µL de cada um dos reagentes: MgSO₄·7H₂O; NH₂OH-HCl; ATP; e glutamato;

- adicionar o extrato a ser analisado (geralmente, até 100 µL);

- completar o volume com tampão. O volume final pode ser de até 500 µL;

- incubar, por um período de 10 min a 40 min (no caso de nódulos de feijão, foram 30 min a 30° C);
- parar a reação com a solução de FeCl₃;
- centrifugar, em microcentrifuga, por 10 min;
- ler a absorbância em 505 nm.

13.1.5. Atividade da Glutamato Sintase (GOGAT)

13.1.5.1. GOGAT-NADH (NADH-GOGAT, E.C. 1.4.1.14), método de Hungria et al. (1991)

Princípio

A glutamato sintase, também chamada de 2-oxoglutarato amino transferase, catalisa a reação representada por:

GOGAT



O ensaio descrito a seguir foi utilizado em nódulos do feijoeiro por Hungria et al. (1991).

Reagentes

a) Solução de extração e homogeneização

- ver seção 13.1.3.1.

b) Solução de dessalinização

- solução do item a) + ditiotreitól, 5 mM + mercaptoetanol, 1%.

c) Soluções para o ensaio

- tampão fosfato, 200 mM, pH 7,5;
- mercaptoetanol, 2% (0,2 mL/10 mL);
- 2-oxoglutarato ou ácido α -cetoglutárico, 10 mM, pH 7,5 (0,0146g/10mL); neutralizar com KOH;
- NADH, 1 mM, pH 7,5 (0,035g/5 mL);
- EDTA, 1mM (0,0029 g/10 mL);
- glutamina, 100 mM (0,146 g/10 mL).

Procedimentos

- Adicionar 0,05 mL do extrato.

Preparar uma mistura de reação contendo, em um volume total de 1 mL, os seguintes reagentes, com as respectivas concentrações finais:

- tampão fosfato, 100 mM, pH 7,5 (0,5 mL);
- mercaptoetanol, 1% (0,1 mL);
- 2-oxoglutarato, 1 mM (0,1 mL);

- NADH, 0,1 mM (0,1 mL);
- EDTA, 0,1 mM (0,1 mL);
- conduzir o ensaio a 30° C e ler a absorbância, a 340 nm, antes e depois da adição de glutamina, 5,0 mM (0,05 mL).

Cálculos:

- realizados conforme especificado para GS;
- a atividade é expressa em $\mu\text{mol NADH oxidado/min (mg proteína)}$:

$$\epsilon_{340} = 6,22 \cdot 10^3 \text{ L /mol.(cm)}.$$

13.1.5.2. GOGAT-NADH, método de Farden & Robertson (1980)

Reagentes

- tampão HEPES-KOH, 0,2 M, pH 8,6, contendo mercaptoetanol, 2%;
- 2-oxoglutarato, 10 mM (neutralizar com KOH);
- NADH (ou NADP), 1 mM;
- L-glutamina, 100 mM.

Procedimento

- realizar o ensaio em uma célula de espectrofotômetro de 1 mL, adicionando:
- 0,5 mL de tampão;
- 0,1 mL de 2-oxoglutarato;
- 0,1 mL de NADH;
- 0,05 mL do extrato;
- 0,2 mL de água destilada e deionizada;
- o decréscimo na absorbância, a 340 nm, é monitorado, a 25° C, antes e após a adição de 0,05 mL da solução de glutamina.

13.1.5.3. GOGAT-dependente de ferredoxina (E.C. 1.4.7.1.)

A GOGAT-dependente de ferredoxina foi relatada em folhas de algumas plantas (Wallsgrave et al., 1982) mas, em nódulos de feijoeiro, representou somente 3,2% a 4,5% da atividade da GOGAT-NADH (Hungria et al., 1991). Aparentemente, portanto, sua importância é pequena e, caso haja interesse, a metodologia foi descrita por Hungria et al. (1991).

13.2. Outras Enzimas Envolvidas na Assimilação do N nos Nódulos

Aqui não serão fornecidos detalhes sobre diversas enzimas envolvidas na assimilação dos compostos nitrogenados após a ação da GOGAT pois, devido à alta correlação encontrada com o desempe-

nho simbiótico, mais atenção foi dada às atividades da GS/GOGAT-NADH. Para a atividade das demais enzimas, existem diversos trabalhos específicos. Serão citados, aqui, apenas os ensaios da glutamato desidrogenase e da alantoinase.

13.2.1. Glutamato Desidrogenase (GDH, NAD⁺, E.C. 1.4.1.2; NAD(P)⁺, E.C. 1.4.1.3; NADP⁺, E.C. 1.4.1.4)

A seguir, será descrito o método utilizado por Hungria (dados não publicados) em nódulos de feijoeiro:

Reagentes

a) Tampão de extração

Bons resultados foram conseguidos com um tampão contendo:

- Tris-HCl, 50 mM, pH 7,5;
- CaSO₄.2H₂O, 1 mM.

(para 250 mL, colocar 1,97 g de Tris e 0,043 g de CaSO₄.2H₂O)

b) Dessalinização

- utilizar o mesmo tampão descrito no item a.

c) Reagentes para o ensaio (todos preparados no tampão descrito no item a)

- 2-oxoglutarato, 0,33 M (0,048 g/1 mL);
- NADH, 1 mM (0,071 g/10 mL);
- NH₄Cl, 3 M (1,6047 g/10 mL).

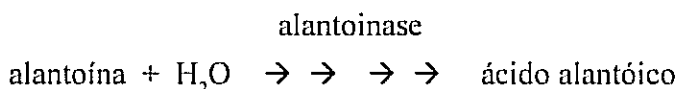
Procedimento

Adicionar, em uma célula de espectrofotômetro, de 1 mL:

- 0,70 mL da solução tampão;
- 0,05 mL de NH₄Cl;
- 0,10 mL de NaDH;
- 0,10 mL do extrato;
- deixar estabilizar por 3 a 4 min;
- adicionar 0,05 mL de 2-oxoglutarato; e
- monitorar a atividade, a 30° C, através da leitura da densidade óptica a 340 nm.

13.2.2. Alantoinase (E.C. 3.5.2.5)

A metodologia, aqui descrita, foi utilizada por Thomas & Schrader (1981) e avalia a reação:

Reagentesa) Tampão do ensaio (TE)

- Tris-HCl, 80 mM, pH 8,0, 7,424 g/L;
- MnSO₄·2H₂O, 0,3 mM, 0,025 g/L.

b) Solução de alantoína

- preparar uma solução estoque de alantoína, 83,33 mM;
- colocar 0,3 mL da solução estoque em um volume final de 1,0 mL (\cong 25 mM) (pesar 0,1317 g de alantoína e dissolver em 10 mL de tampão do ensaio. Dissolver duas gotas de KOH, 4 N e trazer o pH de volta a 8,0, com ácido diluído).

Procedimento

- realizar as adições conforme o esquema exposto adiante;
- iniciar o ensaio com a adição de alantoína;
- incubar por 15 min, a 30° C;
- parar a reação colocando os tubos em água gelada e adicionando 1 gota de HCl concentrado;
- retirar uma alíquota de 0,25 mL da mistura de reação para determinar o ácido alantóico formado (seção 3.4.3).

Tubos	1 + 2	3 + 4	5 + 6	7 + 8	9 + 10
TE	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Alantoína, 83 mM	–	0,3	0,3	0,3	0,3
Enzima	–	–	0,05	0,05	0,05
			(fervido)		
Água	0,5	0,2	0,15	0,15	0,15
Tratamento	branco	controle sem enzima	controle fervido	extrato	extrato

13.3. Análise de Teor Protéico

A determinação do teor protéico dos extratos de nódulos é importante, para expressar as atividades enzimáticas por miligrama de proteína. Os dois métodos descritos a seguir são sensíveis a até 1 µg de proteína.

a) Metodologia modificada de Lowry

Reagentes

- a) 2 g de Na₂CO₃ em 100 mL de NaOH, 0,1 M;
- b) 1 g de CuSO₄.5H₂O em 100 mL de água destilada;
- c) 2 g de tartarato de Na ou K em 100 mL de água destilada;
- d) 0,5 mL da solução (b) + 0,5 mL da solução (c) + 50 mL da solução (a);
- e) reagente de Folin - reagente fenol folin-ciocalteu diluído, na proporção de 1/2, v/v em água destilada;
- f) NaOH, 0,5 N.

Procedimento

- colocar, em um tubo de ensaio, 0,5 mL de amostra e 0,5 mL de NaOH, 0,5 N;
- colocar os tubos, por 15 min, em água fervente;
- esperar cerca de 15 min e adicionar 4,5 mL da solução (d);
- aguardar 10 min e adicionar o reagente (e);
- esperar 30 min e ler a absorbância a 600 nm.

Observações

- a) Existem kits prontos que facilitam a análise do teor de proteína, pois incluem o padrão e os reagentes (ex., Bio-Rad protein assay, 500-0002, baseado no método de Lowry).

b) Método de Bradflord (1976)

Reagentes

- qualquer tampão com pH 7,0 a 8,0;
- Coomassie brilhante azul ("Coomassie brilliant blue") G-250 - 100 mg dissolvidos em 50 mL de etanol a 95%. Adicionar, então, 100 mL de ácido fosfórico a 85% (v/v). Guardar este preparado concentrado. Antes de usar, fazer a diluição 15/100 (v/v);
- padrão - albumina de soro bovino (bovine serum albumin, BSA) - 1 mg/mL. Fazer uma curva padrão com 10 µg a 100 µg de proteína + tampão.

Procedimento

- adicionar 50 µL do extrato de proteína a 5 mL do reagente;
- misturar;
- ler a absorbância, no comprimento de onda de 595 nm, após 2 min e antes de 1 hora.

13.4. Análise dos Compostos Nitrogenados da Seiva do Xilema

13.4.1. Introdução

Os produtos nitrogenados sintetizados nos nódulos são exportados rapidamente para a parte aérea do hospedeiro, via xilema, pelo fluxo da transpiração. As leguminosas mais representativas para o Brasil, a soja e o feijão, quando noduladas, transportam o N proveniente da fixação biológica do N_2 principalmente na forma de N-ureído (alantoína e ácido alantóico). A composição da seiva do xilema de leguminosas noduladas, em termos de compostos nitrogenados, pode ser encontrada em algumas revisões e trabalhos, como os de Sprent (1984), Neves & Hungria (1987) e Atkins (1991). Essa análise dos compostos nitrogenados na seiva do xilema é importante em estudos fisiológicos, mostrando as variações metabólicas que ocorrem devido ao microssimbionte e ao hospedeiro, alterações metabólicas por estresses ambientais, etc (ex: Hungria et al., 1985 a,b, 1989; Hungria & Neves, 1986 a,b,c; Hungria & Franco, 1988, 1993; Thomas & Hungria, 1988; Hungria, 1993).

Também tem sido sugerido que a análise dos compostos nitrogenados da seiva do xilema, tanto em condições de campo como em casa de vegetação, pode ser utilizada para a quantificação da fixação biológica do N_2 . Isso foi proposto para as leguminosas que transportam ureídos pois, em diversos experimentos, foi encontrada uma correlação positiva e significativa entre a concentração de ureídos na seiva do xilema e as estimativas do N_2 proveniente da fixação obtidas pelas técnicas de redução do acetileno, diluição isotópica de ^{15}N e acúmulo de N total nos tecidos (Herridge, 1982, 1984; van Berkum et al., 1985; Hungria et al., 1985a; Hungria & Neves, 1986b).

Não restam dúvidas sobre as utilidades dessas análises, particularmente para o melhor conhecimento do metabolismo da simbiose leguminosa-rizóbio. São análises colorimétricas, fáceis e que podem ser conduzidas com os equipamentos básicos de um laboratório de microbiologia, mas que podem fornecer informações importantes e com grau elevado de precisão.

13.4.2. Coleta da Seiva do Xilema

Para que a coleta da seiva seja bem sucedida, as plantas devem estar com um bom suprimento de água. Durante o ciclo das plantas, a melhor época de coleta é até o período de enchimento dos grãos. Após esse estágio, a quantidade exsudada diminui substancialmente. De modo geral, a seiva flui mais facilmente nas primeiras horas da manhã, mas o pesquisador constatará, para cada simbiose estudada, as condições que favorecem a exsudação. No caso dos estudos com soja e feijão, foi observado que a coleta era facilitada se, na véspera da coleta, ao final da tarde, as plantas recebessem água.

No momento da coleta, as plantas devem ser cortadas na altura do nó cotiledonar e, então, lavadas com água destilada e secas com lenço de papel. A coleta manual é facilitada pelo uso de micropipetas capilares, calibradas, de 10 μ L a 100 μ L. Mas podem ser usadas, também, pipetas Pasteur ou micropipetas capilares, sem graduação. Ao tocar o caule da planta com a micropipeta, a seiva sobe, imediatamente, por capilaridade. Caso seja difícil conseguir o volume adequado de seiva, pode-se

utilizar, cuidadosamente, uma micro-seringa (50 μ L a 200 μ L) ou mesmo uma seringa de 1 mL, como as empregadas para administrar insulina. A seringa, porém, deve apenas aspirar cuidadosamente a seiva, cuidando-se para não romper as células. Nos países temperados e nos estudos com determinadas leguminosas, a coleta de seiva exsudada naturalmente é difícil e, em diversos laboratórios, como o da Dra. Janet Sprent, na Universidade de Dundee, na Escócia, é utilizada uma bomba de vácuo para sugar a seiva que, neste caso, é extraída da parte aérea cortada. Esse método da extração a vácuo da seiva do xilema da parte aérea é baseado na técnica de Bollard (1953) e, segundo testes conduzidos por esses pesquisadores, não provoca modificações na composição da seiva.

Para facilitar a manipulação posterior, o material coletado deve ser guardado em tubos de microcentrifuga (1 mL a 5 mL). Deve-se levar, para a casa de vegetação ou para o campo, um recipiente de isopor com gelo, onde os tubos devem ser mantidos. Para monitorar a quantidade exsudada, utilizar um cronômetro. Se a micropipeta for calibrada, a avaliação da quantidade exsudada poderá ser feita instantaneamente. Na ausência de micropipetas calibradas, ou se muitas plantas estiverem sendo manipuladas, coletar apenas o material e, depois, no laboratório, com uma microseringa, medir o volume coletado. A coleta de 100 μ L de seiva é suficiente para diversas análises, incluindo as repetições, visto que cada análise requer, apenas, 5 μ L. A coleta da seiva deve ser feita por apenas 20 min a 30 min, pois, após esse período, são observadas alterações na sua composição.

Em experimentos conduzidos no campo, com parcelas distantes, pode-se fazer um "canudo" em volta do caule de, aproximadamente, 1 cm a 2 cm, com fita isolante ou similar, evitando a perda de seiva.

A seiva coletada deve ser transferida, o mais depressa possível, para um congelador, onde deve ser mantida até o momento das análises. Se possível, dividir a seiva em, pelo menos, dois tubos pois, em cada análise, deve-se descongelar a seiva e o congelamento e descongelamento freqüentes podem alterar a composição da mesma. No momento das análises, descongelar o material e retirar as alíquotas o mais depressa possível, retornando o material para o congelador.

A coleta da seiva do xilema é, certamente, o passo mais crítico dessas análises. Às vezes, as plantas são extremamente "temperamentais". Certamente, "dicas" como molhar as plantas na véspera e coletar a seiva pela manhã facilitam a coleta e, nas nossas condições, até hoje não foi preciso usar uma bomba de vácuo. Muitas vezes, porém, é difícil coletar seiva de alguns tratamentos, como da testemunha não inoculada e sem receber N mineral, às vezes, em experimentos para avaliar a composição da seiva durante o dia ou durante o ciclo da planta, pode ser difícil coletar seiva nas horas mais quentes do dia ou no final do ciclo reprodutivo. Entretanto, devido ao volume pequeno necessário para cada análise, com certeza poderão ser coletados pelo menos 30 μ L de seiva, que são suficientes para a análise do N total e do N-uréido na seiva, com três repetições. Em casos de extrema dificuldade, tentar uma bomba a vácuo e, caso esse procedimento também não apresente os resultados esperados, a análise dos ureídeos poderá ser feita com os tecidos das plantas, conforme será descrito no seção 13.5.

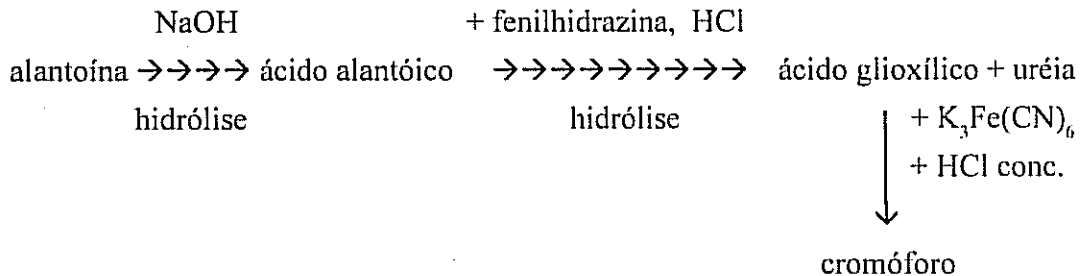
Em todas as análises descritas aqui, utilizaram-se 5 µL de seiva. Em caso de preferência pelo trabalho com volumes maiores, fazer a diluição da seiva, antes da análise, para o volume desejável. De um modo geral, essa diluição pode ser feita com até 0,245 mL de água, completando 0,250 mL. Anotar a diluição realizada para o cálculo final.

13.4.3. Análise do N-ureído

Princípio

A análise do N da seiva sob a forma de N-ureídos é baseada na metodologia de Vogels & van der Drift (1970). Por essa técnica, os ureídos são estimados pela hidrólise seletiva (ácida ou alcalina) a glioxilato, pela reação Rimini-Schryve, seguida pela medida do glioxilato resultante.

Representação da reação de Rimini-Schryver:



É interessante procurar ler pelo menos dois artigos clássicos sobre essa metodologia: Young & Conway (1942) e Vogels & van der Drift (1970).

Reagentes

- NaOH, 0,5 N;
- HCl, 0,15 N e 0,65 N;
- HCl concentrado (pré-resfriado a 0° C);
- Tampão fosfato, 0,4 M, pH 7,0;
- 0,066 g de fenilhidrazina em 20 mL de água destilada (preparar antes de cada análise);
- 0,417 g de ferricianeto de K em 25 mL de água destilada (preparar antes de cada análise).

Procedimento

a) Hidrólise alcalina da alantoína seguida pela hidrólise ácida do ácido alantóico

- à amostra de seiva adicionar água destilada para completar um volume de 0,75 mL;
- acrescentar 0,25 mL de NaOH, 0,5 N. Misturar em um agitador tipo vórtex;
- aquecer, em banho-maria ou água fervente, a 100° C, por 8 min;

- resfriar, em cubos de gelo, gelo picado ou água gelada;
- acidionar 0,25 mL de HCl, 0,65 N e aquecer, por 4 min, a 100° C;
- resfriar novamente e, com os tubos no gelo, adicionar 0,25 mL de tampão fosfato, 0,4 M, pH 7,0 e 0,25 mL de fenilhidrazina;
- misturar em um vórtex. Deixar os tubos, à temperatura ambiente, por 5 min;
- colocar os tubos em água gelada e adicionar 1,25 mL de HCl, concentrado e pré-resfriado e, em seguida, 0,25 mL de ferricianeto de potássio, também pré-resfriado a 0° C; misturar;
- remover os tubos do gelo e em seguida realizar a leitura da absorbância a 535 nm após 10 min. Todas as leituras devem ser feitas em 20 min a 30 min, pois, após esse período, começa a ocorrer perda da cor.

b) Hidrólise ácida do ácido alantóico

- à amostra de seiva (5 µL) adicionar água para completar um volume de 1,00 mL;
- adicionar 0,25 mL de HCl, 0,15 M;
- aquecer a 100° C, por 4 min;
- resfriar e adicionar 0,25 mL de tampão fosfato e 0,25 mL de fenilhidrazina; e
- a partir dessa etapa, proceder como na análise da alantoína, no item de adição da fenilhidrazina.

Padrões

Uma série de padrões deve ser feita SEMPRE, PARA CADA ESTANTE DE TUBOS. JAMAIS UTILIZAR AS LEITURAS DOS PADRÕES DE OUTRA ESTANTE, ainda que as estantes tenham sido analisadas simultaneamente. Somente assim haverá confiança nos resultados, já que essa é uma análise extremamente sensível. A seguir, uma série de padrões que podem ser utilizados:

Padrões

Alantoína, 0,5 mM (0,0079g/100mL água)

Tubos	1 + 2	3 + 4	5 + 6	7 + 8	9 + 10	11 + 12
mL alantoína	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25
mL água	0,75	0,70	0,65	0,60	0,55	0,50
nmols alantoína	0	25	50	75	100	125

Ácido Alantóico (alantoato de potássio), 0,5 mM (0,0197 g/100 mL)

Tubos	1 + 2	3 + 4	5 + 6	7 + 8	9 + 10	11 + 12
mL ác. alantóico	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25
mL água	1,00	0,95	0,90	0,85	0,80	0,75
nmols ác. alant.	0	25	50	75	100	125

Cálculos:

nmols de N-ureído/mL de seiva = $(1/b) \times 200 \times 4 \times D.O.$

onde:

- b..... coeficiente obtido pela regressão linear entre as concentrações dos padrões e as leituras da densidade óptica
- 200 fator de conversão para transformar 5 μ L em 1 mL
Caso seja usado um outro volume de amostra, modificar esse fator
- 4 correção para o N do glioxilato
- D.O. densidade óptica da mostra

Para expressar o resultado em μ mols de N-ureído/mL de seiva, apenas dividi-lo por 1000.

Para expressar o resultado em taxa de exsudação ou taxa de transporte de N-ureído:

$$\begin{array}{ccccc}
 \text{taxa de exsudação da planta} & \times & \text{concentração na seiva} & = & \text{taxa de transporte} \\
 \downarrow & & \downarrow & & \downarrow \\
 \text{mL de seiva/planta (min)} & \times & \mu\text{mol N-ureído/mL seiva} & = & \mu\text{mol N-ureído/pl. (min)}
 \end{array}$$

Observações

- a) conforme foi discutido anteriormente, todos os padrões devem ser preparados em água destilada e deionizada;
- b) reagentes: cuidado com a fenilhidrazina (cancerígena), com o ferricianeto de potássio (tóxico e venenoso) e com o ácido clorídrico. JAMAIS pipetar esses reagentes com a boca;
- c) tampão fosfato: o importante é que ele esteja na concentração de 0,4 M e com pH 7,0. O tampão pode ser preparado como fosfato mono ou dibásico, desde que na concentração de 0,4 M e com o pH ajustado a 7,0. É comum, porém, preparar uma solução de cada um dos fosfatos que, ao serem misturados, darão a concentração e pH desejáveis. Desde que os tampões não sejam muito antigos e tenham sido guardados em refrigerador, a mistura proporciona o pH adequado, sem a necessidade de checagem em potenciômetro. Nos apêndices deste livro, é fornecida uma tabela com os cálculos para a preparação das soluções de tampão fosfato;
- d) escolha dos tubos: as análises são realizadas em tubos de vidro refratário do tipo pyrex, para resistir ao aquecimento e resfriamento. Não importa a capacidade do tubo, mas um volume mínimo de 8 mL facilita a manipulação das amostras. Normalmente, os tubos são colocados em uma estante, com capacidade para 40 deles. Se possível, usar tubos com tampa rosqueável, para impedir a evaporação durante o aquecimento a 100° C. Embora a capacidade dos tubos não influencie nos resultados é importante que, em cada estante, todos sejam homogêneos. Tubos mais grossos ou mais finos apresentam capacidade diferente de aquecimento e resfriamento, o que altera os resultados;

- e) banho-maria: é desejável ter um banho-maria com um bom controle para a temperatura de 100° C. Na falta deste, pode-se utilizar água fervente em um bico de Bunsen, fogareiro ou mesmo em uma autoclave aberta. Muito cuidado, entretanto, deve ser tomado para que o calor seja uniformemente distribuído para os tubos. Para isso, utilizar algum material que permita a boa distribuição do calor, como chapas de amianto. Caso contrário, os tubos que ficarem em contato mais próximo à chama apresentarão temperatura diferente, alterando os resultados;
- f) exemplos de alguns valores de 1/b obtidos, em um espectrofotômetro Perkin-Elmer, para os padrões de alantoína: 121,06; 114,36; 129,76; 111,00;
- g) nesta análise colorimétrica e nas seguintes, os tubos devem ser colocados em duplicata. Se os valores, entre as duplicatas, diferirem em um mais de 10%, repetir a análise.

13.4.4. Análise do N-Amônio

O método é baseado em Mitchell (1972), mas a solução de hipoclorito de sódio é substituída por dicloroisocianurato de sódio (Felker, 1977) pois, sob condições tropicais, a solução de hipoclorito perde, rapidamente, seu poder oxidante.

Reagentes

- solução A - 5,00 g de fenol + 25 mg de nitroprussiato de sódio em 500 mL de água destilada;
- solução B - 15,00 g de NaOH + 0,31 g de dicloroisocianurato de sódio em 500 mL de água.

Procedimento

À amostra de seiva (5 µL) adicionar água destilada até completar 0,5 mL. Adicionar, então, 2,5 mL da solução A e 2,5 mL da solução B. Misturar. Após 30 min, ler a absorbância no comprimento de onda de 630 nm.

Padrão

NH₄Cl (cloreto de amônio), 5 mM (0,02674 g/100 mL).

Tubos	1 + 2	3 + 4	5 + 6	7 + 8	9 + 10	11 + 12	13 + 14
mL NH ₄ ⁺	0,00	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10
mL água	0,50	0,49	0,48	0,46	0,44	0,42	0,40
nmols NH ₄ ⁺	0	50	100	200	300	400	500

Cálculos

$$\text{nmols de N- NH}_4^+/\text{mL de seiva} = (1/b) \times \text{D.O.} \times 200$$

Para mais detalhes, ver cálculos na seção de N-ureído (13.4.3).

13.4.5. Análise do N-Amida

O método estima o N-amida da glutamina sem incluir o N-amino. O N- NH₄⁺ é estimado, após a hidrólise, que é realizada segundo Thomas et al. (1979).

13.4.5.1. N-amida, segundo Thomas et al. (1979)Reagentes:

Mistura para a digestão de Kjeldahl (segundo Bohley, 1967)

- 203,0 g de Na₂SO₄·10H₂O, dissolvidos em 300 mL de água destilada;
- 230 mL de H₂SO₄ concentrado;
- 5,4 g de HgCl₂, dissolvidos em 200 mL de água destilada;
- misturar as soluções e acertar para um volume final de 1 litro.

Procedimento

- colocar as amostras de seiva (5 µL) em tubos de ensaio e adicionar 50 µL da mistura de digestão de Kjeldahl;
- colocar os tubos em banho-maria, a 100° C, por 1 hora após a hidrólise, completar o volume a 0,5 mL, com água destilada, e proceder como na análise para N-NH₄⁺ (seção 13.4.4).

Padrão

Glutamina, 5 mM (0,0731g/100mL).

Tubos	1 + 2	3 + 4	5 + 6	7 + 8	9 + 10	11+ 12	13+ 14	15+ 16	17+ 18
mL glutamina	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,10
mL água	0,10	0,09	0,08	0,07	0,06	0,05	0,04	0,02	0,00
nmols N-amida	0	50	100	150	200	250	300	400	500

Cálculos

$$\text{nmols de N- amida/mL de seiva} = (1/b) \times \text{D.O.} \times 200$$

Para mais detalhes, ver cálculos de N-ureído (seção 13.4.3).

Observação:

As amostras também podem ser digeridas em um bloco digestor. Como os tubos são pequenos, pode-se colocar areia para firmá-los no bloco.

13.4.5.2. N-amida, segundo Boddey et al. (1987)

Reagentes

- ácido sulfúrico concentrado, 1/3 (v/v);
- solução A e solução B da metodologia para determinação do N-NH₄⁺ (seção 13.4.4).

Procedimento

- diluir 5 µL de seiva em 95 µL de água;
- adicionar 50 µL de ácido sulfúrico 1/3;
- deixar em água fervente por 1 hora;
- resfriar à temperatura ambiente;
- adicionar 0,4 mL de água;
- proceder à análise como na metodologia para NH₄⁺ (seção 13.3.4).

13.4.6. Análise do N-Amino

A metodologia usada é uma modificação feita por Boddey et al. (1987) do método de Matheson et al. (1961). A hidridantina é preparada segundo Connel et al. (1955).

Reagentes

- dissolver 10 g de ninidrina em 250 mL de ácido acético, 0,5 M, a 30° C;
- adicionar 5 g de ácido ascórbico;
- aquecer a solução a 65° C, até que apareça uma suspensão densa de cristais de hidridantina;
- após 10 min, adicionar mais 2 g de ácido ascórbico e a manter a temperatura a 65° C por mais 5 min;
- resfriar a suspensão, rapidamente, e filtrar;
- lavar os cristais, duas vezes, com água destilada;
- secar, a vácuo, em dessecador contendo ácido sulfúrico concentrado.

Preparo da ninidrinahidridantina

- dissolver 3,8 g de ninidrina em 675 mL de 2-metoxietanol;
- adicionar 300 mL de água e 125 mL de tampão de acetato de sódio, 4M, ajustado a pH 5,5;
- retirar o gás da solução agitando a garrafa, em vácuo, por 15 min;
- preencher o espaço gasoso da garrafa com nitrogênio;

- resfriar a solução até, aproximadamente, 5° C;
- adicionar 0,6 g de hidridantina agitando, ocasionalmente, por algumas horas, mantendo-se a temperatura de 5° C.

Procedimento

- adicionar, em um tubo, 1 mL do reagente de ninidrina-hidridantina a 5 µL da seiva;
- colocar os tubos em banho-maria, a 100° C, por 20 min;
- resfriar os tubos e adicionar, então, 1,5 mL de etanol a 50%;
- misturar, esperar 30 min e ler a absorbância a 570 nm.

Padrão

Alanina, 2mM (0,0178g/100mL).

Tubos	1 + 2	3 + 4	5 + 6	7 + 8	9 + 10	11 + 12
mL alanina	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
mL água	0,05	0,04	0,03	0,02	0,01	0,00
nmols alanina	0	20	40	60	80	105

Cálculos

$$\text{nmols N-amino/mL de seiva} = (1/b) \times \text{D.O.} \times 200$$

Para mais detalhes, ver cálculos de N-ureído.

Observações

Existem metodologias que utilizam apenas ninidrina. Após inúmeras testes, foi constatada a grande instabilidade desse reagente nas condições tropicais de temperatura e umidade. Desse modo, o preparo do reagente de ninidrina-hidridantina, embora laborioso, é essencial. Além disso, uma vez preparado o reagente, este pode ser mantido, no congelador, por alguns meses.

13.4.7. Análise do N-Nitrato

O procedimento utilizado é o de Cataldo et al. (1975), reduzindo-se os valores para 1/4 dos mencionados por esses autores.

Reagentes

- solução de ácido salicílico a 5% - adicionar 5 g de ácido salicílico em 100 mL de ácido sulfúrico concentrado;
- NaOH, 2 M.

Procedimento

- misturar 5 µL da amostra de seiva com 0,2 mL da solução de ácido salicílico a 5%;
- após 20 min na temperatura ambiente colocar, lentamente, 4,75 mL de NaOH, 2 M, para que a amostra atinja pH superior a 12;
- resfriar em temperatura ambiente;
- ler a absorbância a 410 nm.

Padrão e cálculo

KNO₃, 5mM, concentrações finais de 0 a 500 nmols de N-NO₃⁻.

Para os cálculos, ver seção 13.4.3.

13.4.8. Análise do N total [O procedimento é baseado no método de Bohley (1967)].

Procedimento

Colocar 5 µL de seiva nos tubos de ensaio e adicionar 50 µL da mistura de digestão de Kjeldahl (13.4.5.1). Colocar os tubos em bloco digestor a 150°C para evaporar o excesso de água por cerca de 60min. Aumentar a temperatura para 300°C por 1h30m. Resfriar em temperatura ambiente e adicionar 0,5mL de água destilada. Proceder como na análise de N-amônio(13.4.4). Se o bloco digestor for para tubos grandes, completar o espaço dos orifícios com areia para firmar os tubos.

13.5. Análise do N-ureído nos Tecidos

13.5.1. Análise em Tecido Seco

Reagentes

- ver seção 13.4.3.

Procedimento

- secar o material a 60° C, até atingir peso (massa) constante;
- moer o material de modo a passar por peneira de 60 a 100 mesh;
- adicionar, em um tubo, 0,1 g a 0,5 g do material seco, 5 mL de tampão fosfato, 0,1 M, pH 7,0 e, aproximadamente, 2,5 mL de etanol (relação aproximada de 2/1, tampão/etanol);
- aquecer os tubos em banho-maria a 80° C, por 5 min, não deixando ferver;
- misturar. Esperar, aproximadamente, 1 hora. Filtrar em, pelo menos, duas camadas de talagarça;
- centrifugar, em microcentrífuga, por cerca de 5 min (10.000 g);
- certificar-se de que todos os extratos estão limpos, isto é, livres de qualquer suspensão, especialmente se for usado muito etanol;
- usar 0,05 mL a 0,25 mL para as análises de alantoína e ácido alantóico, que devem ser realizadas conforme descrito na seção 13.4.3.

Padrão

- ver seção 13.4.3.

Cálculos

No caso das quantidades aqui mencionadas, os cálculos estão detalhados a seguir. Modificações devem ser feitas de acordo com as quantidades de tampão, tecido e amostras utilizadas.

$$\text{nmol N-ureído/g de massa seca} = (1/b) \times 100 \times 4 \times \text{D.O} \times (1/\text{massa seca})$$

onde:

1/b, 4 e D.O ver seção 13.4.3.

100 fator de conversão quando se usam 5 mL de tampão e se retiram 0,05 mL para a análise

Para expressar o resultado em μmols de N-ureído/g, apenas dividir o resultado por 1000.

Para expressar o resultado em μg de N-ureído/g, multiplicar por 14.

13.5.2. Análise em Tecido Fresco

Reagentes

- ver seção 13.4.3.

Procedimento

- homogeneizar cerca de 1 g de tecido fresco em 7 mL de tampão fosfato, 0,1 M, pH 7,0. A homogeneização pode ser num almofariz (se o material for congelado com nitrogênio líquido, a homogeneização é facilitada) ou em um homogeneizador;
- filtrar em pelo menos duas camadas de talagarça;
- se possível, passar em colunas de dessalinização Sephadex G-25;
- proceder como na análise de tecido seco.

Observações

- Patterson et al. (1982) desenvolveram uma metodologia adaptável ao auto-analisador. Essa metodologia pode ser usada em caso de grande número de amostras. Uma representação esquemática do auto-analisador, proposta por Glenister & LaRue (1987), pode ser vista na Figura 13.1.
- Outra alternativa é o “método da mancha”, também desenvolvido por Glenister & LaRue (1986), na qual o teor de ureído é estimado pela maceração de um segmento do pecíolo em um papel de filtro, seguida pela coloração dada pelo reagente *p*-dimetilamino cinamaldeído.

13.6. Carboidratos nos Nódulos

13.6.1. Introdução

O amido é um polissacarídeo de glicose que consiste de 70% a 90% de amilopectina (α -1,4-glucano, com cadeias laterais de glicose) e 10% a 30% de amilose (α -D-1,4-glucano). O amido fica armazenado nos amiloplastos e pode ser hidrolisado, pelas amilases, em cadeias α -D-1,4-glicosídicas.

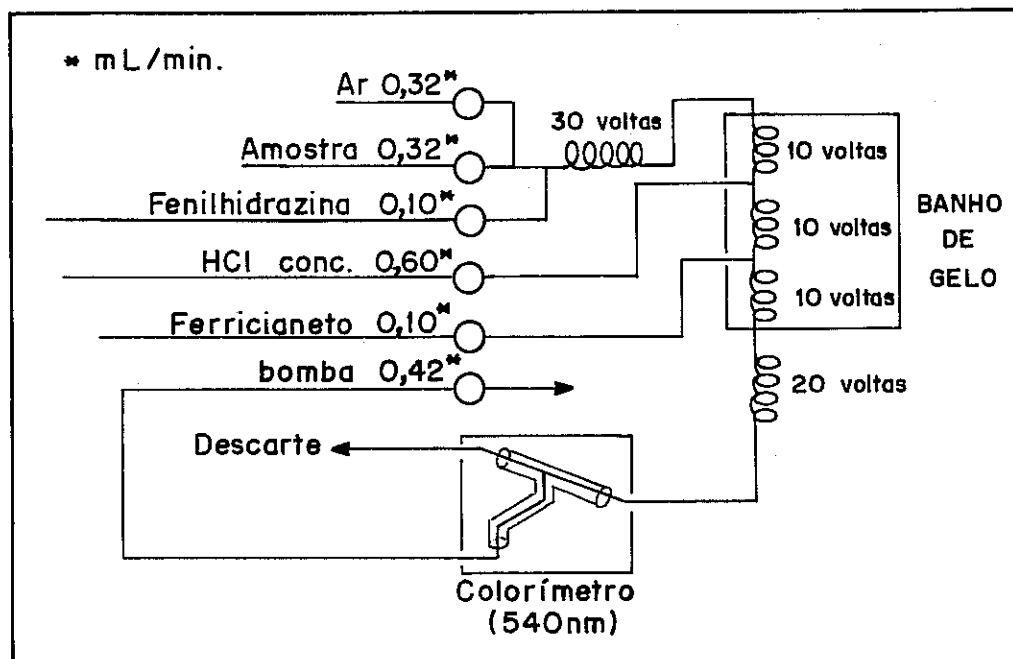
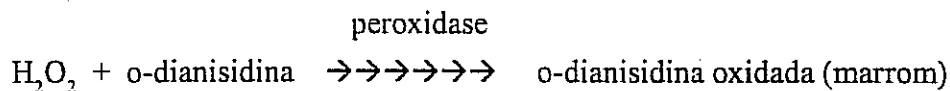
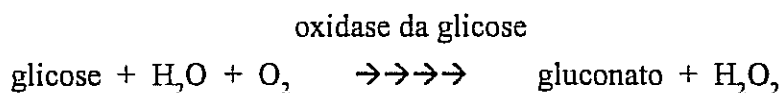


FIGURA 13.1. Representação esquemática do auto-analisador para ureídos. Segundo Glenister & LaRue (1987).

Tanto o ensaio simples do teor de amido quanto o ensaio enzimático são possíveis, mas o enzimático permite a avaliação simultânea dos açúcares solúveis e outros compostos, como os aminoácidos. Inicialmente, os carboidratos solúveis, não estruturais, são extraídos com etanol ou metanol-clorofórmio-água e determinados pelo método da antrona. Em seguida, o resíduo do tecido é preparado e incubado com amiloglucosidase (endoamilase), para converter o amido em glicose, que pode ser determinada, colorimetricamente, em um ensaio enzimático.

O princípio das reações pode ser representado por:



Os métodos descritos, a seguir, foram desenvolvidos com base nos trabalhos de Haissig & Dickson (1979) e Ou-Lee & Setter (1985) e foram utilizados na determinação do teor de carboidratos nos nódulos de *Aeschynomene* e *Sesbania* (Hungria et al., 1992).

13.6.2. Determinação do Teor de Carboidratos Solúveis e Insolúveis

As análises devem ser programadas para três dias:

- dia 1 - extração dos açúcares. Secagem dos resíduos dos tecidos durante a noite;
- dia 2 - determinação colorimétrica dos açúcares. Hidrólise do amido durante a noite;
- dia 3 - determinação colorimétrica do amido hidrolisado (= açúcar).

13.6.2.1. Extração

Reagentes

- etanol a 80% (v/v), aquecido a 70° C, em banho-maria, 10 mL/amostra.

Procedimento

- colocar alíquotas com, aproximadamente, 20 mg de nódulos congelados, em 5 mL de etanol a 70° C;
- colocar no banho de ultra-som, por 10 segundos, e deixar, à temperatura ambiente, por 10 minutos;
- centrifugar, a 2.800 rpm ou 1.400 g, por 10 min, e coletar o sobrenadante;
- lavar o pélete duas vezes, cada uma com 2.5 mL de etanol quente. Agitar os tubos no vórtex;
- coletar os sobrenadantes. Os sobrenadantes podem ser armazenadas no refrigerador, para a análise dos açúcares solúveis. O pélete também pode ser armazenado no refrigerador, para a análise do amido.

13.6.2.2. Determinação dos açúcares solúveis

Reagentes

- reagente de antrona (5 mL/amostra) - 2,0 g de antrona misturada com 1 L de ácido sulfúrico concentrado. Os resíduos deste ensaio são tóxicos e poluentes, por isso devem ser eliminados, de modo a não causar poluição. Materiais contaminados, como papéis, podem ser neutralizados com bicarbonato de sódio e descartados normalmente;
- padrões de glicose - pode-se utilizar o estoque do kit para determinação da glicose (Sigma 510-A) ou preparar uma solução estoque de 1.000 mg/L (sempre nova) e, então, diluições desse padrão.

Padrão

Glicose, 1000 mg/L, preparado em 80% de etanol

μL do padrão	0	100	200	500	1000	1500	2000
mL de etanol a 80%	10,0	9,9	9,8	9,5	9,0	8,5	8,0
concentração final (mg/L)	0	10	20	50	100	150	200

Procedimento

- colocar 600 μ L de etanol a 80% nos tubos;
- transferir 400 μ L, de cada extrato obtido no etanol, para um tubo numerado correspondente;
- colocar 1 mL, de cada padrão de glicose, nos tubos dos padrões;
- CUIDADOSAMENTE, colocar o reagente de antrona em um repipetador e ajustar o volume para 5 mL. Colocar o repipetador em gelo moído ou água gelada;
- adicionar 5 mL do reagente antrona a cada tubo e, imediatamente, colocá-lo no vórtex (direcionar a boca do tubo para o outro lado, para não espirrar antrona). A reação libera muito calor, por isso colocar a estante com os tubos em gelo ou água gelada;
- colocar a estante com os tubos em água fervente por 12 min;
- remover da água fervente e colocar no gelo, para que a reação pare, até que todos os tubos estejam resfriados;
- colocar a estante à temperatura ambiente, por 15 min;
- agitar cada tubo no vórtex;
- ler a absorbância, em 625 nm, no espaço de uma hora. De preferência, usar células descartáveis.

Cálculos

- correr os padrões, fazer a regressão e calcular os valores de r^2 e b;
- a concentração de carboidratos solúveis é obtida pela equação:

$$\text{mg de carboidrato/g de peso fresco} = 1/b \times f \times \text{D.O.} \times 1/\text{peso fresco}$$

onde f é o fator de correção para a diluição usada. Por exemplo, se o volume era de 10 mL e foram utilizados 400 μ L na análise, $f = 25$.

13.6.2.3. Determinação do amido

Reagentes

a) Tampão acetato de sódio-ácido acético-fluoreto de sódio (NaAc-AcAc-NaF) :

- acetato de sódio - NaAc.3H₂O, 0,1 M (13,608 g/L);
- fluoreto de sódio, 20 mM (0,84 g/L);
- colocar o NaAc e o NaF em 800 mL de água. Adicionar ácido acético, 0,1 M (ou ácido acético glacial) até que o pH atinja o valor de 4,5. Completar o volume a 1000 mL com a solução NaAc-NaF. Conferir o pH.

b) Tampão de amiloglucosidase

- preparar a diluição, em NaAc-AcAc-NaF para dar uma concentração de 15 U/mL (por exemplo, no caso da enzima da Boehring com, aproximadamente. 6U/mg, colocar 250 mg em 100 mL de tampão NaAc-AcAc-NaF).

c) Determinação colorimétrica da glicose com o kit da Sigma (510-A)

O kit contém as enzimas PGO, peroxidase, oxidase da glicose, padrão de glicose e o-dianisidina-(HCl)₂. Com um kit podem-se fazer, aproximadamente, 200 amostras.

Seguir as instruções do kit para o preparo dos reagentes.

No caso do kit 510-A:

- adicionar uma cápsula de PGO em 100 mL de água. Guardar em um frasco escuro, no refrigerador (por menos de um mês);
- adicionar 20 mL de água ao frasco de o-dianisidina (50 mg). Cuidado, produto cancerígeno. Guardar no refrigerador (por menos de três meses);
- misturar 100 mL da solução de PGO com 1,6 mL do reagente de o-dianisidina (por menos de um mês).

d) Padrão de amido

Lavar 3 g de amido de batata com etanol a 80% (ou solução fria de metanol/clorofórmio/água, 12/5/3). Liofilizar cuidadosamente (ebulioscopia!). Guardar dessecado, no congelador.

Para preparar o padrão:

- pesar 0,25 g de amido de batata limpo e seco;
- molhar com 1 mL de etanol a 95%;
- adicionar 25 mL de tampão NaAc-AcAc-NaF;
- aquecer até a fervura;
- resfriar em banho-maria;
- completar a 50 mL com o tampão NaAc-AcAc-NaF;
- essa solução estoque contém 5 g/L de amido (0,5%) e é estável por cerca de uma semana, à temperatura ambiente. Não congelar. Agitar bem, antes de usar.

Padrão

Amido, 5 g/L

mL do padrão	0,0	0,4	1,2	2,0	6,0	10,0	15,0
mL do tampão NaAc-AcAc-NaF	100	99,6	98,8	98,0	94,0	90,0	75,0
Concentração (mg/L)	0	20	60	100	300	500	750

d) Padrões de glicose

- os mesmos descritos na seção 13.6.2.2, exceto que o etanol é trocado pelo tampão NaAc-AcAc-NaF.

Procedimento

- tomar as primeiras 20 amostras;
- adicionar 4 mL do tampão NaAc-AcAc-NaF a cada tubo;
- colocar 4 mL de cada padrão de amido por estante de tubos;
- colocar os tubos em água fervente por, exatamente, 15 minutos. Usar bolas de gude para cobrir os tubos;
- remover, rapidamente, e esfriar em água gelada;
- adicionar 1 mL do tampão de amiloglucosidase;
- agitar no vórtex, ou colocar no banho de ultra-som, apenas o tempo suficiente para misturar o pélete na solução;
- tampar cada tubo e incubar a 50° C por, exatamente, 24 horas;
(não é conveniente fazer mais de 30 amostras por estante, uma vez que a incubação precisa ser feita por, exatamente, 24 horas);
- após 24 horas, remover da incubadora e agitar no vórtex;
- centrifugar, a 2.800 rpm ou 1.100 g, por 10 min;
- tomar 200 µL de cada amostra e do padrão de amido e adicionar 300 µL do tampão NaAc-AcAc-NaF (procurar a proporção adequada para cada tipo de material);
- preparar os padrões de glucose usando 500 µL de cada concentração;
- adicionar 5 mL do reagente de o-dianisidina-PGO, agitar no vórtex e incubar a 37° C, em banho-maria, por 30 min;
- ler em espectrofotômetro, a 450 nm, nos próximos 30 min.

Cálculos

- ler os padrões, fazer as regressões e calcular 1/b e r²;
- obter a D.O. e, pelos valores obtidos na regressão, transformar em mg glucose/L.

$$\text{mg de glucose equivalente/g de peso seco} = \frac{\text{leitura (mg/L)}}{\text{amostra(g)}} \times \frac{0,005 \text{ L}}{\text{peso seco da amostra}} \times 5$$

onde:

0,005 diluição da extração em litros

5 fator de diluição pela adição do reagente de o-dianisidina.

13.7. Atividade da Fosfoenol Piruvato Carboxilase (PEP carboxilase)

13.7.1. Introdução

A atividade da fosfoenol piruvato carboxilase (phosphoenol pyruvate carboxylase, PEP), em nódulos, pode afetar substancialmente a eficiência da simbiose, pela economia de carbono nos nódulos.

los. Em nódulos de soja, por exemplo, King et al. (1986) calcularam que 66% da atividade da PEP carboxilase estavam envolvidos na produção de ácidos orgânicos. Estes, por sua vez, quando oxidados, permitiam a economia de até 48% ATPs equivalentes.

O ensaio descrito a seguir foi modificado de Maxwell et al. (1984) e testado em nódulos de *Aeschynomene*, *Sesbania* (Hungria et al., 1992) e feijão (Hungria, 1993).

13.7.2. Avaliação da Atividade da PEP carboxilase

Reagentes

Para produzir o $^{14}\text{CO}_2$:

- $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (42 a 52 mCi/mmol);
- ácido láctico, 4 M.

Colocar o carbonato em um frasco e injetar o ácido láctico. A reação vai gerar $^{14}\text{CO}_2$. Para verificar a radioatividade, colocar 1 mL de monoctanolamina em um frasco hermeticamente fechado e 1 mL da amostra de gás. Realizar a leitura em aparelho de cintilação líquida. Para o ensaio, fazer a reação estequiométrica e, de acordo com o volume do frasco utilizado, produzir 10 $\mu\text{Ci/mL}$.

Procedimento

- coletar cerca de 100 mg de nódulos frescos e colocar em um frasco que possa ser hermeticamente fechado contendo, no fundo, um pedaço de papel de filtro umedecido;
- fechar o frasco e trocar parte da atmosfera para CO_2 puro, para estabelecer uma concentração elevada
- colocar 1 mL do $^{14}\text{CO}_2$ produzido (10 $\mu\text{Ci/mL}$);
- incubar por 30 min, na temperatura de crescimento das plantas;
- após a incubação, terminar a reação pela injeção de 1,5 mL de etanol a 70° C nos frascos e abri-los em uma capela para gases, para liberar qualquer $^{14}\text{CO}_2$ que não tenha reagido. A reação também pode ser parada pela adição de 1 mL de HCl, 2 M;
- homogeneizar os nódulos em etanol, a 50% e, a seguir, fazer a extração em banho-maria a 45° C por 20 min;
- centrifugar as amostras a 18.100 g por 15 min;
- tratar uma alíquota do sobrenadante com HCl, 0,2 M, para determinar a radioatividade estável em ácido. Secar as amostras sob fluxo;
- colocar 10 mL de líquido de cintilação e realizar a leitura em aparelho de cintilação líquida.

13.8. Considerações Finais

O estudo dos mecanismos envolvidos no metabolismo do carbono e do nitrogênio, nos nódulos, é importante não só em termos fisiológicos, como também para a seleção dos sistemas mais econômicos energeticamente. Estirpes de rizóbio e plantas hospedeiras podem ser, então, investigadas

e selecionadas para o melhor desempenho simbiótico. Algumas dessas análises, como a da porcentagem de N-ureído transportado na seiva do xilema, são também úteis na quantificação das taxas de fixação do N₂. Esses ensaios são, de modo geral, extremamente fáceis e acessíveis a qualquer laboratório de microbiologia, e trazem informações extremamente úteis tanto ao nível básico como ao nível aplicado.

13.9. Referências Bibliográficas

- ATKINS, C. A. Ammonia assimilation and export of nitrogen from the legume nodule. In: DILWORTH, M. J.; GLENN, A. R. ed. **Biology and Biochemistry of nitrogen fixation**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p.293-319.
- ATKINS, C. A.; RAINBIRD, R. M.; PATE, J. S. Evidence for a purine pathway of ureide synthesis in N₂-fixing cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Z. Pflanzenphysiol**, v.97, p.249-260, 1980.
- ATKINS, C. A.; SHELP, B. J.; KUO, J.; PEOPLES, M. B.; PATE, J. S. Nitrogen nutrition and the development and senescence of nodules on cowpea seedlings. **Planta**, v.162, p.316-326, 1984.
- BERGERSEN, F. J. Ammonia - an early stable product of nitrogen fixation by soybean root nodule. **Aust. J. Biol. Sci.**, v. 18, p.1-9, 1965.
- BERGERSEN, F. J.; TURNER, G. L. Nitrogen fixation by the bacteroid fraction of breis of soybean root nodules. **Biochim. Biophys. Acta**, v.141, p.507-515, 1967.
- BODDEY, R. M.; PEREIRA, J. A. R.; HUNGRIA, M.; THOMAS, R. J.; NEVES, M. C. P. Methods for the study of nitrogen assimilation and transport in grain legumes. **MIRCEN J.**, v.3, p.3-22, 1987.
- BOHLEY, P. von. Reihenbestimmungen von stickstoff in ultramikromabstab; Kjeldahlveraschung und phenol-hypochlorit-reaktion. **Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.**, v.348, p.100-110, 1967.
- BOLAND, M. J.; HANKS, J. F.; REYNOLDS, P. H. S.; BLEVINS, D. G.; TOLBERT, N. E.; SCHUBERT, K. R. Subcellular organization of ureide biogenesis from glycolytic intermediates and ammonium in nitrogen-fixing soybean nodules. **Planta**, v.155, p.45-51, 1982.
- BOLLARD, E. G. The use of tracheal sap in the study of apple tree nutrition. **J. Exp. Bot.**, v.4, p.363-368, 1953.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-254, 1976.

- CATALDO, D.A.; HAROON, M.; SCHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Comm. Sci. Pl. Anal.**, v.6, p.71-80, 1975.
- CONNEL, J. E.; DIXON, G. H.; HANES, C. S. Quantitative chromatographic methods for the study of enzyme transpeptidation reactions. **Can. J. Biochem. Physiol.**, v.33, p.416-27, 1955.
- CULLIMORE, J. V.; LEA, P. J.; MIFLIN, B. J. Multiple forms of glutamine synthetase in the plant fraction of Phaseolus root nodules. **Israel J. Bot.**, v.31, p.155-162, 1982.
- CULLIMORE, J. V.; SIMS, A. P. An association between photorespiration and proteins catabolism: studies with *Chlamydomonas*. **Planta**, v.150, p.392-396, 1980.
- FARDEN, K. J. F.; ROBERTSON, J. G. Methods for studying enzymes involved in metabolism related to nitrogenase. In: BERGERSEN, F. J. ed. **Methods for evaluating biological nitrogen fixation**. Chichester: John Wiley & Sons, 1980. p.265-314.
- FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts. **Anal. Chem.**, v.49, p.1080, 1977
- FERGUSON, A. R.; SIMS, A. P. Inactivation *in vivo* of glutamine synthetase and NAD specific glutamate dehydrogenase: its role in the regulation of glutamine synthesis in yeasts. **J. Gen. Microbiol.**, v.69, p.423-427, 1971.
- GLENISTER, R.; LaRUE, T. A spot test for estimating ureides in soybean petioles. **Expl. Agric.**, v.22, p.405-416, 1986.
- GLENISTER, R.; LaRUE, T. Measuring ureides. In: ELKAN, G. H. ed. **Symbiotic nitrogen fixation technology**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1987. p. 307-320.
- HAISSIG, B. E.; DICKSON, R. E. Starch measurement in plant tissue using enzymatic hydrolysis. **Physiol. Plant.**, v.47, p.151-157, 1979.
- HERRIDGE, D. F. Use of the ureide technique to describe the nitrogen economy of field-grown soybeans. **Plant Physiol.**, v.70, p.7-11, 1982.
- HERRIDGE, D. F. Effects of nitrate and plant development on the abundance of nitrogenous solutes in root-bleeding and vacuum extracted exudates of soybean. **Crop. Sci.**, v.25, p.173-178, 1984.
- HUNGRIA, M. Efeito das temperaturas elevadas nos passos iniciais da infecção e nodulação do feijoeiro. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 4, 1993, Londrina. **Resumos**. Londrina: IAPAR, 1993. p.132.
- HUNGRIA, M.; FRANCO, A. A. Nodule senescence in *Phaseolus vulgaris*. **Trop. Agric.**, v.65, p.341-346, 1988.

- HUNGRIA, M.; FRANCO, A. A.. Effects of high temperatures on nodulation and N₂ fixation by *Phaseolus vulgaris* L. **Pl. Soil**, v.149, p.95-102, 1993.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P. Efeito da manipulação de fotossintatos na fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro. **Pesq. agropec. bras**, v.21, p.9-24, 1986a.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P. Interações entre cultivares de *Phaseolus vulgaris* e estirpes de *Rhizobium* na fixação e transporte do nitrogênio. **Pesq. agropec. bras**, v.21, p.127-140, 1986b.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P. Ontogenia da fixação biológica do nitrogênio em *Phaseolus vulgaris*. **Pesq. agropec. bras.**, v.21, p.715-730, 1986c.
- HUNGRIA, M.; EAGLESHAM, A. R. J.; HARDY, R. W. F. Physiological comparisons of root and stem nodules of *Aeschynomene scabra* and *Sesbania rostrata*. **Pl. Soil**, v.139, p.7-13, 1992.
- HUNGRIA, M.; BARRADAS, C. A.; WALLSGROVE, R. M. Nitrogen fixation, assimilation and transport during the initial growth stage of *Phaseolus vulgaris*. **J. Exp. Bot.**, v.42, p. 839-844, 1991.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P.; DÖBEREINER, J. 1989. Relative efficiency, ureide transport and harvest index in soybeans inoculated with isogenic HUP mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. **Biol. Fert. Soils**, v.7, p.325-329, 1989.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P.; VICTORIA, R. L. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro. I- Atividade da nitrogenase, da nitrato redutase e transporte do nitrogênio na seiva do xilema. **Rev. bras. Ci. Solo**, v.9, p.193-200, 1985a.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P.; VICTORIA, R. L. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro. II. Absorção e translocação do N mineral e do N₂ fixado. **Rev. bras. Ci. Solo**, v.9, p.201-209, 1985b.
- KENDALL, A. C.; WALLSGROVE, R. M.; HALL, N. P.; TURNER, J. C.; LEA, P. J. Carbon and nitrogen metabolism in barley (*Hordeum vulgare* L.) mutants lacking ferredoxin-dependent glutamate synthase. **Planta**, v.168, p.316-323, 1986.
- KING, B. J.; LAYZELL, D. B.; CANVIN, D. T. The role of dark carbon dioxide fixation in root nodules of soybean. **Plant Physiol.**, v.81, p.200-205, 1986.
- MATHESON, A. T.; TIGANE, E.; HANES, C.S. Quantitative chromatographic methods: an improved ninhydrin-hydrindantin reagent. **Can. J. Biochem. Physiol.**, v.39, p.417-25, 1961.
- MAXWELL, C. A.; VANCE, C. P.; HEICHEL, G. H.; STADE, S. CO₂ fixation in alfalfa and birdsfoot trefoil root nodules and partitioning for ¹⁴C to the plant. **Crop Sci.**, v.24, p.257-264, 1984.

- MIFLIN, B. J.; CULLIMORE, J. V. Nitrogen assimilation in the legume-*Rhizobium* symbiosis: A joint endeavour. In: VERMA, D. P. S.; HOHN, T. ed. **Genes Involved in Microbe Plant Interactions**. Wien: Springer-Verlag, 1984. p.129-178.
- MITCHELL, H.T. Microdetermination of nitrogen in plant tissues. **J. Ass. Off. Agric. Chem.**, v.55, p.1-3, 1972.
- NEVES, M. C. P.; HUNGRIA, M. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. **CRC Crit. Rev. Plant Sci.**, v.6, p.267-321, 1987.
- OU-LEE, T.-M; SETTER, T. L. Enzyme activities of starch and sucrose pathways and growth of apical and basal maize kernels. **Plant Physiol.**, v.79, p.848-851, 1985.
- PACOVSKY, R. S.; HUNGRIA, M. Glutamine synthetase may limit nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. In: GRESSHOFF, P. M.; ROTH, L. E.; STACEY, G.; NEWTON, W. E. ed. **Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives**. New York-London: Chapman and Hall, 1990. p.359.
- PATTERSON, T. G.; GLENISTER, R.; LaRUE, T. A. Simple estimative of ureides in soybean tissue. **Anal. Biochem.**, v.119, p.90-95, 1982.
- SHELP, B. J. ; ATKINS, C. A. Subcellular location of enzymes of ammonia assimilation and asparagine synthesis in root nodules of *Lupinus albus* L. **Plant Sci. Lett.**, v.36, p.225-230, 1984.
- SPRENT, J. I. **The biology of nitrogen-fixing organisms**. London: Mc Graw-Hill Book Company (UK) Limited, 1984. 196p.
- STREETER, J. G. Estimation of ammonium concentration in the cytosol of soybean nodules. **Plant Physiol.**, v.90, p.779-782, 1989.
- SUTTON, W. D. Nodule development and senescence. In: BROUGHTON, W.J., ed. **Nitrogen Fixation**. Oxford: Clarendon Press, Oxford, 1983. p.144-212.
- THOMAS, R. J.; HUNGRIA, M. Effect of potassium on nitrogen fixation, nitrogen transport and nitrogen harvest index of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **J. Plant Nutr.**, v.11, p.175-188, 1988.
- THOMAS, R. J.; SCHRADER, L. E. The assimilation of ureides in shoot tissues of soybeans. I. Changes in allantoinase activity and ureide contents in leaves and fruits. **Plant Physiol.**, v.67, p.973-976, 1981.
- THOMAS, R. J.; SPRENT, J. I. The effects of temperature on vegetative and early reproductive growth of a cold-tolerant and a cold-sensitive line of *Phaseolus vulgaris* L. 2. Nodular uricase, allantoinase, xylem transport of N and assimilation in shoot tissues. **Ann. Bot.**, v. 53, p.589-597, 1984.

- THOMAS, R. J.; FELLER, U.; ERISMANN, K. H. The effect of different inorganic nitrogen sources and plant age on the composition of bleeding sap of *Phaseolus vulgaris*. **New Phytol.**, v.82, p.657-69, 1979.
- van BERKUM, P.; SLOGER, C.; WEBER, D. F.; CREGAN, P. B.; KEYSER, H. H. Relationship between ureide N and N₂ fixation, aboveground N accumulation, acetylene reduction, and nodule mass in greenhouse and field studies with *Glycine max* L. (Merr). **Plant Physiol.**, v.77, p.53-58, 1985.
- VOGELS, G. D.; van der DRIFT, C. Differential analysis of glyoxylate derivatives. **Anal. Biochem.**, v.33, p.143-57, 1970.
- WALLSGROVE, R. M.; LEA, P. J.; MIFLIN, B. J. The development of NAD(P)H-dependent and ferredoxin-dependent glutamate synthase in greening barley and pea leaves. **Planta**, v.154, p.473-476, 1982.
- YOUNG, E. G.; CONWAY, C. F. On the estimation of allantoin by the Rimini-Schryver reaction. **J. Biol. Chem.**, v.142, p.839-853, 1942.

CAPÍTULO 14

IDENTIFICAÇÃO DE PARÂMETROS RELACIONADOS COM A EFICIÊNCIA E CAPACIDADE COMPETITIVA DO RIZÓBIO

Mariangela Hungria¹

Milton A. T. Vargas²

Allert R. Suhet¹

José R. R. Peres³

Iêda C. Mendes³

14.1. Introdução

Conforme discutido no capítulo 4, os estudos pioneiros sobre isolamento e seleção de estirpes de rizóbio foram conduzidos pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC) onde, na década de 20, foi criada a Seção de Bacteriologia. Nessa época, o IAC iniciou a distribuição dos primeiros inoculantes “nacionais”, que eram produzidos com estirpes importadas dos Estados Unidos e Austrália. Em 1949, a Secretaria de Agricultura do Estado do Rio Grande do Sul começou a produzir inoculantes para a soja, também com estirpes isoladas de inoculantes de outros países (Freire, 1982; Döbereiner & Franco, 1994). Muitas vezes, esses inoculantes não eram eficientes e a estratégia, então, passou a ser a de realizar o isolamento de estirpes “adaptadas” aos solos brasileiros. Como exemplo, tem-se a SEMIA 566, que foi isolada, em 1966, de uma área onde a soja havia recebido inoculante norte-americano. Essa estirpe passou, então, a ser recomendada, comercialmente, até 1978, com grande sucesso (J. R. J. Freire, comunicação pessoal).

Hoje, várias instituições brasileiras estão envolvidas no processo de seleção de bactérias fixadoras de N_2 para diversas leguminosas, embora os estudos estejam concentrados, principalmente, em estirpes para a soja e o feijão. Mas, nas reuniões bianuais, que decidem a recomendação nacional de estirpes de rizóbio (capítulo 6), fica evidente que, ainda hoje, a seleção vem sendo conduzida avaliando-se apenas o rendimento final da cultura e, algumas vezes, a ocupação dos nódulos pelas estirpes introduzidas. Certamente, esses parâmetros são os mais importantes em termos agronômicos e econômicos, mas o conhecimento das características fisiológicas, bioquímicas e genéticas do microssimbionte, responsáveis pela maior eficiência e capacidade competitiva, pode agilizar o processo de seleção de estirpes.

¹ Pesquisadora, Ph.D., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSO), Cx. Postal 1061, CEP 86001-970, Londrina, PR.

² Pesquisador, Ph.D., EMBRAPA-Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados (CPAC), Cx. Postal 700023, CEP 73301-970, Planaltina, DF.

³ Pesquisadores, M.Sc., EMBRAPA-CPAC.

Há relatos de obtenção de estirpes mutantes mais eficientes e competitivas, em outros países, pelo uso de técnicas de engenharia genética. Alguns dos parâmetros relacionados com a eficiência dessas mutantes são a maior atividade do complexo da dinitrogenase e a presença da enzima hidrogenase (Maier & Brill, 1978; Albrecht et al., 1979; Zablóćiewicz et al., 1980; Hanus et al., 1981; Williams & Phillips, 1983; Maier & Graham, 1990). Em relação à competitividade, as mutantes apresentam diferenças na mobilidade, quimiotaxia e produção de polissacarídeos extra-celulares (Liu et al., 1989; Catlow et al., 1990; Triplett, 1990a,b; Zdor & Pueppke, 1991), entre outras. Para maiores detalhes, consultar revisões recentes de Araujo (1994) e Hungria et al. (1994).

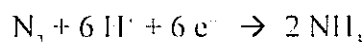
No Brasil, embora não tenham sido obtidas mutantes geneticamente engenheiradas, diversos trabalhos indicam que existe uma grande variabilidade natural entre estirpes de rizóbio, permitindo a seleção de isolados mais eficientes e competitivos (Döbereiner et al., 1970; Scotti et al., 1982; Peres et al., 1984; Neves et al., 1985; Hungria & Neves, 1986b; Barradas & Hungria, 1989; Boddey & Hungria, 1990; Vargas et al., 1992).

Neste capítulo, serão discutidas algumas características, particularmente dos rizóbios brasileiros isolados da soja e feijão, que correlacionam com a maior eficiência e capacidade competitiva e que contribuirão para a melhor nutrição nitrogenada das plantas hospedeiras (Figuras 14.1 e 14.2).

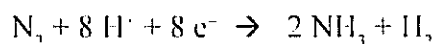
14.2. Atividade da Dinitrogenase

14.2.1. O Método da Atividade da Redução do Acetileno (ARA)

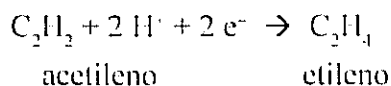
A reação de redução do N_2 , catalisada pelo complexo enzimático da dinitrogenase, pode ser representada por:



Concomitantemente à redução do N_2 a NH_3 , porém, ocorre uma redução de prótons a H_2 consumindo, obrigatoriamente, um mínimo de 25% dos elétrons totais alocados para a dinitrogenase. A reação de redução do N_2 , então, passa a ser representada por:



A dinitrogenase também reduz diversos outros substratos que apresentam tripla ligação, como o acetileno, que é reduzido a etileno:



O acetileno é um substrato alternativo muito útil, pois o etileno é facilmente analisado por cromatografia gasosa. Pela facilidade de manipulação de centenas de amostras a um baixo custo, essa metodologia foi amplamente empregada, desde a sua divulgação, na década de 60 (capítulo 22). Hoje, os ensaios com plantas noduladas apresentam sérias restrições (ver capítulo 22), mas o método da ARA ainda pode ser utilizado como um teste rápido de avaliação da atividade enzimática e para avaliações, em laboratório, das bactérias em vida livre (na ausência do hospedeiro) (Giller & Wilson, 1993).



FIGURA 14.1. Folhas de soja, aos 25 dias após a emergência, inoculada com uma estirpe eficiente (à esquerda) e não inoculada (à direita).



FIGURA 14.2. Soja sem inóculo (frente) e com inóculo de uma combinação de estirpes eficientes (fundo), na região do Cerrado, em primeiro ano de plantio.

14.2.2. ARA *in vitro*

Princípio

Com o desenvolvimento de metodologias que permitiram a avaliação da ARA *in vitro* (Kurz & LaRue, 1975; McComb et al., 1975; Pagan et al., 1975), surgiu a possibilidade de selecionar, no laboratório, estirpes com maior atividade da dinitrogenase.

A seleção para a ARA *in vitro*, porém, apresenta alguns problemas: 1) estirpes de crescimento rápido dificilmente expressam a atividade *in vitro*; 2) algumas estirpes de crescimento lento, como *B. elkanii*, também não expressam atividade da dinitrogenase *in vitro* (Huber et al., 1984); e 3) a manutenção de uma pO₂ adequada é crucial, para não desnaturar a dinitrogenase.

Procedimento

a) ARA em *Azorhizobium caulinodans*

Essa espécie apresenta a particularidade de fixar N₂ *in vitro*, em meio isento de N (Dreyfus et al., 1983).

Meio de cultura

Meio para expressão da atividade da dinitrogenase *in vitro* (Dreyfus et al., 1983)

lactato de sódio	10 g
K ₂ HPO ₄	1,67 g
KH ₂ PO ₄	0,87 g
NaCl	0,05 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂	40 mg
FeCl ₃	4 mg
MoO ₄ Na.2H ₂ O	5 mg
biotina	10 mg
ácido nicotínico	20 mg
ácido pantotênico	10 mg

micronutrientes

Completar para 1 litro, com água destilada, e acertar o pH para 6,8.

- no ensaio conduzido por Dreyfus e colaboradores, as estirpes cresceram em meio líquido, foram centrifugadas, suspensas em meio mínimo e incubadas em atmosfera contendo argônio ou nitrogênio, com 3% de oxigênio. A desrepressão da dinitrogenase ocorreu após três horas. A ARA máxima foi de 29 nmoles de C₂H₄/(mg proteína).min;

- os micronutrientes desse meio não foram especificados pelos autores. Podem ser utilizadas, porém, várias soluções de micronutrientes (ver capítulo 4).

b) método para *Bradyrhizobium* BTAi 1 (Hungria et al., 1993a)

Princípio

Foi utilizado o meio de Dreyfus et al. (1983), mas modificado quanto à concentração de ácido nicotínico (40 mg/L) e à fonte de carbono (10g/L de glucose). A concentração de O₂ ideal para o crescimento das bactérias e atividade da dinitrogenase foi conseguida pelo crescimento em meio semi-sólido (2 g/L de ágar), que fornece condições adequadas de oxigenação (capítulo 16). A utilização do meio semi-sólido permite, ainda, a manipulação, simultânea, de um grande número de amostras. O método detectou a ARA na estirpe BTAi 1, *A. caulinodans* e outras estirpes de *Bradyrhizobium*.

Procedimento

- crescer as bactérias em tubos contendo o meio (utilizar tubos do tipo “vacutainer”) e vedá-los com rolhas de algodão;
- no momento da análise, trocar o algodão por rolhas herméticas, injetar 15% de acetileno e proceder à retirada das amostras, após o período desejado.

Nos ensaios de Hungria et al. (1993a), a atividade foi detectada a partir de 5 min após a injeção do acetileno, em culturas com 1 a 7 dias após o repique.

c) outros métodos

- método de Pagan et al. (1975): detectaram ARA em rizóbio de crescimento lento. A pO₂ adequada esteve entre 0,15 e 0,20 atm;
- Kurz & La Rue (1975): detectaram ARA em estirpes de crescimento rápido, após 14 dias, com adição de 100 mg/L de KNO₃. Diversos autores, porém, não conseguiram repetir os resultados com outras estirpes de crescimento rápido;
- Bergersen et al. (1976): descrevem um meio para ARA *in vitro* e recomendam uma concentração de O₂ de 1 μM.

14.2.3. ARA em Nódulos Destacados

Princípio

Existe uma variabilidade elevada, na eficiência de fixação de N₂ (avaliada pela ARA), entre isolados de uma mesma estirpe de rizóbio (Peres et al., 1984). A identificação dos nódulos contendo estirpes com características desejáveis era, inicialmente, baseada em critérios empíricos, tais como o tamanho e posição de nódulos na raiz principal. Certamente essas características são desejáveis e um

ponto de partida para a seleção de estirpes mais eficientes. No caso da soja, por exemplo, uma boa nodulação na raiz principal é o primeiro indicativo de uma simbiose eficiente (Figura 14.3). Métodos mais adequados, entretanto, precisam ser identificados e Peres et al. (1981) desenvolveram uma metodologia simples de escolha de nódulos para isolamento, que passou a ser adotada pela maioria dos laboratórios do País. Essa metodologia baseia-se na observação, feita por esses autores, de que existe uma grande variabilidade na eficiência de fixação de N_2 (avaliada pela ARA), entre isolados de uma mesma estirpe de rizóbio. A ARA, de nódulos individuais, é avaliada por cromatografia gasosa e permite a análise de um grande número de nódulos em um único dia (200 a 300 nódulos), sendo separados, para isolamento, apenas aqueles que apresentam os níveis mais elevados de ARA.

Esse método foi utilizado, com sucesso, em várias leguminosas, incluindo a soja (Peres et al., 1984, 1993), leguminosas arbóreas (Farias et al., 1984), leucena (Peres et al., 1986), lentilha (Vargas et al., 1994) e feijoeiro (Hungria et al., 1993b; Sá et al., 1993) e vem sendo utilizado, desde 1980, em todos os trabalhos de seleção de estirpes conduzidos no Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados. Na Figura 14.4, pode-se verificar o crescimento de soja inoculada com subestirpes da SEMIA 5019 (=29w), isoladas a partir de nódulos que apresentaram diferentes taxas de ARA.



FIGURA 14.3. Raízes de soja inoculadas com diversas estirpes para verificar a nodulação na raiz principal.



FIGURA 14.4. Plantas de soja, inoculadas com subestirpes da SEMIA 5019 (=29w) que foram isoladas de nódulos que apresentaram taxas de ARA de 0,3 μmol , 0,9 μmol ou 1,8 μmol de $\text{C}_2\text{H}_4/\text{g}$ nódulo(h).

Procedimento

- coletar raízes de leguminosas com sistema radicular e nódulos intactos;
- sacudir, delicadamente, o excesso de solo aderido às raízes. Com o auxílio de uma tesoura, destacar tantos nódulos quanto possível, conservando um pequeno pedaço de raiz junto a cada nódulo. Escolher nódulos jovens, mas bem desenvolvidos. O melhor estágio para a coleta de nódulos, com alta atividade, é um pouco antes do início da floração. Escolher aqueles com, aproximadamente, o mesmo tamanho;
- imediatamente após o nódulo ser destacado, colocar o mesmo num frasco do tipo “vacutainer”, de pequeno volume (em torno de 6 mL), previamente numerado. Tampar e adicionar acetileno, na proporção de 10% do volume do frasco. Marcar o tempo após a injeção de acetileno;
- após 30 min de incubação, retirar 0,2 mL da amostra de cada frasco e injetar em cromatógrafo a gás, equipado com detector de ionização de chama;
- medir a altura ou área dos picos de etileno;
- pesar os nódulos frescos;
- calcular a atividade específica dos nódulos (conforme será visto adiante) pelo peso dos nódulos;
- proceder ao isolamento dos rizóbios dos nódulos que apresentaram alta atividade específica (5% dos nódulos ou menos).

14.2.4. ARA em Raízes Destacadas

Princípio

A ARA, em raízes destacadas, foi amplamente utilizada para a identificação de sistemas simbióticos mais eficientes (ex. de utilização no Brasil: Hungria et al., 1985a, 1993b; Hungria &

Neves, 1986b,c, 1987a; Hungria & Franco, 1988; Barradas & Hungria, 1989; Boddey & Hungria, 1990). Hoje, entretanto, sabe-se que essa técnica apresenta sérias restrições (ver capítulo 22) e, embora diversas simbioses não apresentem declínio na ARA pelo acetileno (Hungria & Neves, 1987a), deve-se evitar a sua utilização, já que o método tem sido sujeito a críticas na comunidade científica. Entretanto, para auxiliar a interpretação dos resultados de diversos trabalhos publicados e para análises rápidas e comparativas, as considerações gerais de Hardy et al. (1968) e Mague & Burris (1972) serão descritas a seguir:

Procedimento

- realizar a coleta pela manhã, após as primeiras horas de luz, para permitir que fotossintatos sejam fornecidos às raízes;
- separar a parte aérea da raiz, na altura do nó cotiledonar, para diminuir o volume da amostra e impedir uma possível produção de etileno pela parte aérea;
- colocar as raízes em mamadeiras, de 250 mL a 300 mL, onde ocupem, no máximo, 20% do volume, a fim de não haver esgotamento do O₂ e alteração das reações enzimáticas;
- as mamadeiras devem ser fechadas, hermeticamente, com rolhas do tipo “suba seal”;
- de modo geral, uma pC₂H₂ de 0,1 atm a 0,2 atm é suficiente para saturar a dinitrogenase, por isso 10 a 15 % da atmosfera são preenchidos com acetileno. Quando necessário, fazer um ensaio preliminar, para determinar a concentração de C₂H₂ necessária para saturar a dinitrogenase;
- após 30 min, retirar as amostras, em seringas de 1 mL, de plástico descartável. As amostras devem ser armazenadas em rolhas de borracha numeradas e o tempo entre a coleta e a retirada das amostras não deve ultrapassar uma hora;
- proceder à leitura em cromatógrafo a gás com chama de hidrogênio. Pode-se utilizar uma coluna de aço inoxidável com 0,32 cm (1/8 polegada) de diâmetro externo por 50 cm de comprimento contendo Poropak N (80 a 100 mesh) e operada a 40° C, com o N₂ como gás de arraste a um fluxo de 40 mL/min;
- realizar três tipos de controle: 1) frascos com raízes noduladas sem a adição de C₂H₂, para verificar a produção natural de etileno; 2) frascos com atmosfera local + 12% de C₂H₂, a fim de verificar a absorção e desaparecimento de C₂H₂ no sistema; e 3) frascos com amostra da atmosfera local, para verificar a existência de etileno no local do experimento.

Cálculos

- inicialmente, realizar a correção, do volume das amostras, para as condições normais de temperatura e pressão (CNTP):

$$\frac{760 \text{ mm Hg} \times 22400 \text{ mL}}{273^{\circ} \text{K}} = \frac{\text{atm local} \times v'}{301^{\circ} \text{K}}$$

- 1 mol de gás nas CNTP tem 22,4 L;
- se, por exemplo, o ensaio for feito ao nível do mar (atm = 760 mm) e a 28 °C (=301°K):

$$v' = 24.697 \text{ mL}$$

- utilizar um padrão de C₂H₄. Se, por exemplo, o padrão tiver 109 ppm de C₂H₄ e forem injetados, no cromatógrafo, 0,5 mL do padrão:

$$\begin{array}{rcl} 109 \text{ mL C}_2\text{H}_4 & - & 1\,000\,000 \text{ mL de gás} \\ x & - & 0,5 \text{ mL} \\ x = 54,5 \times 10^{-6} \text{ mL de C}_2\text{H}_4 & & \end{array}$$

$$\begin{array}{rcl} 1 \text{ mol C}_2\text{H}_4 & - & 24.697 \text{ mL} \\ y & - & 54,5 \times 10^{-6} \text{ mL} \\ y = 2,2067 \text{ nmols de C}_2\text{H}_4 & & \end{array}$$

$$\begin{array}{rcl} 2,2067 \text{ nmols} & - & 13,60 \text{ cm (exemplo de altura do pico)} \\ z & - & 1 \text{ cm} \\ z = 0,0016225 \text{ nmols} & & \end{array}$$

Para qualquer amostra, portanto:

$$\text{C}_2\text{H}_4 \text{ (nmols/h)} = K \times Z \times \frac{1}{\text{volume injetado}} \times X \times \frac{1}{\text{tempo de incubação}}$$

onde K... leitura (cm) x atenuação.

14.3. Menor Perda de Elétrons pela Evolução do H₂

Princípio

Conforme exposto acima, o processo de evolução do H₂ ocorre, simultaneamente, com a redução do N₂, consumindo elétrons e ATP que, de outro modo, poderiam estar sendo usados para a síntese de amônia. Algumas estirpes alocam os elétrons de um modo mais eficiente e, outras, possuem uma segunda enzima, a hidrogenase, capaz de reciclar esse hidrogênio e oxidá-lo, recuperando parte da energia perdida pela evolução do H₂ (revisado por Evans et al., 1987; Neves & Hungria, 1987).

Estirpes que apresentam a enzima hidrogenase (Hup^+) são, portanto, mais eficientes, energeticamente, do que as estirpes Hup^- , havendo relatos de que podem contribuir com maior acúmulo de N nos grãos (Albrecht et al., 1979; Zablutowicz et al., 1980; Hanus et al., 1981; Neves et al., 1985; Hungria & Neves, 1986b, 1987a; Hungria et al., 1989).

14.3.1. Detecção dos Genes da Hidrogenase (*hup*)

A detecção do genes *hup* pode ser feita pela hibridização com sondas específicas contendo esses genes, segundo Minamisawa (1990) e Minamisawa et al. (1992).

14.3.2. Expressão da Atividade da Hidrogenase *in vitro*

Princípio

Algumas estirpes conseguem expressar a hidrogenase *in vitro*. Do mesmo modo que para a atividade da dinitrogenase (avaliada pela ARA), a expressão dos genes *hup* é observada nas estirpes de crescimento lento.

a) Meio de cultura para avaliar a expressão da hidrogenase *in vitro*, segundo Maier et al. (1978)

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	150 mg
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	150 mg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	250 mg
NH_4Cl	100 mg
FeEDTA	28 mg
$MnSO_4 \cdot H_2O$	10 mg
H_3BO_3	3 mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2 mg
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25 mg
KI	0,78 mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,04 mg
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025 mg
inositol	100 mg
tiamina-HCl	10 mg
piridoxina-HCl	1 mg
ácido nicotínico	1 mg
sacarose	0,5 g

arabinose	1.0 g
gluconato de sódio	0,5 mg
glutamato de sódio	0,5 g
extrato de levedura	0,1 g
ágar	12 g

ajustar o pH para 5,5 com HCl.

Procedimento

Maier et al. (1978) utilizaram esse meio com *B. japonicum*. Com base nesse método, Boddey & Hungria (1994a) também detectaram a atividade da hidrogenase, *in vitro*, com diversas estirpes de soja, conforme descrito a seguir:

- crescer as bactérias, por sete dias, a 28° C, em meio de extrato de levedura-manitol (YM ou EM, capítulo 2);
- transferir 400 µL da cultura para um tubo de 10 mL (tipo vacutainer) contendo 7 mL do meio de Maier et al. (1978), com 1,2 % de ágar;
- após sete dias, trocar as rolhas de algodão por rolhas de borracha e injetar H₂, de modo a resultar em uma atmosfera final com 0,5%. Após o equilíbrio, retirar 0,5 mL de cada tubo, para a análise da concentração inicial de H₂. Incubar por um período de 18 horas, a 28° C. Retirar, então, uma amostra de 0,5 mL para leitura da concentração final de H₂. As leituras podem ser realizadas em um cromatógrafo a gás com detector de condutividade térmica ou em um analisador específico para hidrogênio. As estirpes testadas por Boddey & Hungria (1994a) foram consideradas Hup⁺ quando oxidaram entre 1,60 e 2,04 nmols de H₂/(tubo)h.

b) crescimento autotrófico em atmosfera enriquecida com H₂ (Hanus et al., 1979)

Modificando o meio de Maier et al. (1978), Hanus et al. (1979) obtiveram crescimento autotrófico de *B. japonicum* em atmosfera enriquecida com H₂.

Modificações feitas no meio de Maier et al. (1978):

Nos sais minerais:

Em vez de FeEDTA usar FeCl₃.6H₂O, 5 mg/L.

Ajustar o pH para 6,8, com NaOH.

Solução estoque de vitaminas:

tiamina - HCl	10 mg
ácido nicotínico	10 mg
piridoxina - HCl	10 mg
biotina	20 mg
inositol	5 mg

- completar, para 100 mL, com água destilada. Esterilizar por filtração. Adicionar 1 mL da solução de vitaminas por litro de meio autoclavado. O teor de C, resultante da adição dessas vitaminas, é de 0,27 µg de C/mL de meio.

Procedimento

- retirar um inóculo de culturas crescidas, por 5 dias, em meio de Maier et al. (1978). O inóculo deve ter um pequeno número de células e, para isso, realizar diluições com NaCl estéril, a 0,85%. Agitar até obter uma D.O. a 540 nm de, aproximadamente, 0,05. Inocular 0,1 mL dessa suspensão no meio de Hanus et al. (1979). Pode-se utilizar meio líquido ou sólido;
- incubar em atmosfera contendo 84% de N₂, 1% de O₂, 5% de CO₂ e 10% de H₂;
- essa atmosfera pode ser conseguida em dessecadores, através de fluxo com N₂ por vários minutos, vedação e injeção dos gases desejados. Pode-se utilizar, também, frascos de incubação anaeróbia, utilizando o mesmo procedimento. A composição dos gases deve ser monitorada durante o crescimento das bactérias;
- o crescimento será observado somente nas estirpes Hup⁺.

c) detecção da hidrogenase pelo método do azul de metileno

Solução de azul de metileno para detecção da hidrogenase:

tampão fosfato	50 mM, pH 8,0
azul de metileno	1,0 g/L
NaF	6,3 g/L
EDTA-Sódio	1,49 g/L
ácido malônico	0,021 g/L
ácido indolacético	0,037 g/L

Procedimento

- crescer as culturas;
- “copiar” as culturas em um papel de filtro;
- colocar o papel de filtro em uma placa contendo a solução de azul de metileno;
- retirar o excesso de meio;
- incubar em atmosfera com H_2 por 15 min;
- as culturas Hup⁻ ficam com a coloração branca.

Observação

- Este método pode ser utilizado para detectar mutantes em uma placa.

d) deteccção da hidrogenase pelo método de Haugland et al. (1983)

Meio de cultura e solução para o ensaio

Meio de Repaske & Maier (1976) modificado por Haugland et al. (1983)

KH_2PO_4 - tampão	pH 6,8
$Fe (NH_4)_2 (SO_4)_2$	0,02 mg/L
$ZnCl_2$	0,1 μ g/L
$MnCl_2$	2 μ g/L
Na_2MoO_4	0,2 μ g/L
tiamina - HCl	1 μ g/L
ácido nicotínico	1 μ g/L
biotina	1,5 μ g/L

Solução para detecccção da hidrogenase (Haugland et al., 1983)

ácido indolacético	200 mg/L
ácido malônico	200 mg/L
azul de metileno	10 mg/L
KH_2PO_4	50 mg/L
$MgCl_2$	2,5 mg/L

Ajustar o pH para 5,6, com KOH.

Procedimento

- cultivar as colônias em meio de Maier et al. (1978) ou de Repaske & Maier (1976), modificado por Haugland et al. (1983);

- incubar as colônias, por quatro a cinco dias, a 26°C, sob atmosfera composta de 5,5 % H₂, 5 % CO₂, 0,7 % O₂ e balanceada com N₂;
- transferir as colônias para papel de filtro, conforme descrito no procedimento anterior;
- colocar os filtros em placas de Petri contendo 0,8 mL de uma solução para detecção da hidrogenase de Haugland et al. (1983);
- após 15 min, retirar o excesso com pipeta Pasteur;
- incubar no ar por 45 min, para equilibrar;
- incubar, num fluxo de 150 mL/min de H₂, por 1 a 3 horas.

14.3.3. Expressão da Hidrogenase em Simbiose

14.3.3.1. Evolução do hidrogênio pelos nódulos

Princípio

A avaliação da energia perdida pela evolução do H₂ e a capacidade da hidrogenase reciclar parte da energia perdida tomou maior impulso após o estudo clássico de Schubert & Evans (1976), que definiram o termo eficiência relativa (ER):

$$ER = \frac{\text{elétrons utilizados para a redução do N}_2}{\text{fluxo total de elétrons para a dinitrogenase}}$$

Experimentalmente, essa eficiência pode ser calculada conforme a fórmula abaixo, que se baseia no princípio de que, na presença do acetileno (C₂H₂), todos os elétrons são alocados para a redução desse gás.

$$ER = 1 - \frac{\text{H}_2 \text{ evoluído (ar)}}{\text{C}_2\text{H}_2 \text{ reduzido}}$$

ou, ainda, segundo a fórmula representada abaixo, visto que, em uma atmosfera sem N₂, todos os elétrons são alocados para a evolução do H₂.

$$ER = 1 - \frac{\text{H}_2 \text{ evoluído (ar)}}{\text{H}_2 \text{ evoluído em uma atmosfera sem N}_2}$$

Schubert & Evans (1976) constataram que os sistemas simbióticos estudados diferiam em sua eficiência relativa e que algumas estirpes do gênero *Bradyrhizobium* eram capazes de reciclar todo o H₂ produzido pela dinitrogenase, ao contrário das espécies de *Rhizobium*. Em diversos trabalhos condu-

zidos no Brasil, com feijão e soja, foi constatado que os sistemas simbióticos com maior produção de grãos e acúmulo de N total na parte aérea apresentam maior eficiência relativa (Hungria et al., 1985a, 1989; Neves et al., 1985; Hungria & Neves, 1986a,b,c, 1987a,b).

Alguns trabalhos já demonstraram que o fenótipo Hup, pelo menos na simbiose com a soja, é consistente com a presença dos genes estruturais *hup* (Minamisawa, 1990; Minamisawa et al., 1992). Desse modo, na falta de equipamento ou material para a hibridização, o fenótipo *in vivo* pode ser analisado com maior facilidade.

A interpretação dos resultados, porém, deve ser feita com cautela, devido à limitação relacionada à utilização do método de atividade de redução do acetileno (ver capítulo 22)

Procedimento

- utilizar nódulos destacados com pequenos segmentos radiculares (± 2 cm). O segmento de raiz preso ao nódulo impede a injúria e permite um suprimento de energia, para não haver queda na evolução do H_2 ;
- colocar os nódulos em frascos de vidro de, aproximadamente, 30 mL, de modo a não ocuparem mais de 20% do seu volume. No fundo do frasco, colocar um pedaço de papel de filtro umedecido. Esses dois procedimentos visam evitar o estresse de oxigenação e dessecação;
- fechar os frascos, hermeticamente, com rolhas do tipo “suba seal” e incubar, por 30 min, em temperatura ambiente;
- retirar as amostras em seringas de plástico e armazenar, pelo tempo máximo de 1 hora. Fazer a leitura em cromatógrafo a gás, por condutividade térmica. Pode-se utilizar uma coluna de aço inoxidável, com 0,32 cm (1/8 polegada) de diâmetro externo por 100 cm de comprimento, preenchida com peneira molecular 5 Å (80 a 100 mesh) e operada a 40° C usando o argônio, como gás de arraste, a um fluxo de 25 mL/min.

- Cálculo

O mesmo do método de ARA, apenas modificando a concentração do padrão.

14.3.3.2. Atividade da hidrogenase *in vivo*

A determinação pode ser feita em raízes noduladas, utilizando-se o radioisótopo 3H_2 . Em relação às normas de segurança para trabalhar com radioisótopos, ver capítulo 1. O método descrito a seguir foi utilizado em nódulos de feijoeiro (Hungria & Eaglesham, dados não publicados).

- coletar, aproximadamente, 100 mg de nódulos frescos e colocá-los sobre papel de filtro umedecido, em um frasco onde ocupem cerca de 20% do volume;
- fechar os frascos com tampas perfuráveis, do tipo “suba seal”;
- injetar, em cada frasco, acetileno para completar 10% do volume. O acetileno bloqueia a evolução de hidrogênio pela dinitrogenase, mas não inibe a atividade da hidrogenase;

- injetar H_2 nos frascos, na concentração de 2.5%, para saturar a enzima, e 20 μL de 3H_2 (aproximadamente 210 $\mu\text{Ci/mL}$) para iniciar o ensaio;
- incubar, por 30 min, na temperatura de crescimento das plantas;
- abrir os frascos, para liberar o excesso de 3H_2 , por cerca de 15 min;
- adicionar 0,5 mL de água e 1,0 mL de solubilizador de tecido. Fechar os frascos, agitar e incubar por 24 horas no escuro;
- abrir os frascos, adicionar 0,15 mL de HCl, 5 N, para neutralizar o solubilizador, seguidos por 10 mL de fluido de cintilação;
- borbulhar H_2 para retirar qualquer excesso de 3H_2 dissolvido;
- determinar a radioatividade em um aparelho para cintilação. Para isso, retirar, com seringas plásticas, 1 mL da solução a ser analisada e transferir para recipientes para contagem em aparelho de cintilação líquida. Adicionar 5 mL do coquetel de cintilação, misturar bem e deixar repousar, por 15 min, no cintilador. Iniciar as contagens;
- como controle, utilizar nódulos fervidos, por cinco minutos, para desnaturar as enzimas. A radioatividade absorvida nos tecidos desse controle será descontada da radioatividade dos nódulos.

14.4. Fosfoenol Piruvato Carboxilase

Conforme discutido no capítulo 13, a fosfoenol piruvato carboxilase (PEP) está envolvida no metabolismo do carbono nos nódulos. Sistemas simbióticos mais eficientes também mostram maior atividade da PEP (Hungria, 1993), portanto esse parece ser um parâmetro importante a ser considerado nos programas de seleção. O procedimento para determinar a atividade da PEP está descrito no capítulo 13.

14.5. Sensibilidade à Asparagina em Meio de Cultura

Princípio

Um dos trabalhos pioneiros, na identificação de parâmetros relacionados à maior eficiência das estirpes, foi conduzido com 24 estirpes de *B. japonicum* por Döbereiner et al. (1970). Foi sugerido, nesse trabalho, que as estirpes poderiam ser divididas em três grupos: ineficientes, eficientes e de eficiência excepcional. As estirpes excepcionais (R54a,b,c e R11a, do Brasil, e CB1809, da Austrália), que apresentavam maior eficiência de fixação de N_2 (mg de N_2 fixado/g de nódulo), também apresentavam maior sensibilidade a concentrações crescentes de asparagina (aumento de 3 mM para 7 mM) em meio de cultura (Döbereiner et al., 1970).

Procedimento

O método descrito a seguir é uma modificação feita por Boddey & Hungria (1994a):

- inocular as bactérias em meio YM líquido (capítulo 2);
- quando atingirem a fase estacionária, transferir 1 mL da cultura para um tubo contendo 5 mL do meio YM (sem corante), suplementado com 3 mM de asparagina e 1 mL para um tubo contendo 7 mM de asparagina;
- após 10 dias, constatar o crescimento, através de leitura da D.O. a 600 nm.

Observação

Os resultados obtidos por Boddey & Hungria (1994a) apresentaram boa correlação com a divisão das estirpes em *B. japonicum* (inibidas) e *B. elkanii*, (não inibidas), mas não confirmaram os resultados encontrados nas estirpes utilizadas por Döbereiner et al. (1970). Isso pode indicar alterações genéticas nas estirpes estocadas ou reagentes diferentes empregados na confecção do meio de cultura.

14.6. Teor de Leghemoglobina nos Nódulos

Princípio

Em outro trabalho pioneiro, conduzido por Pedrosa et al. (1970), foi observado que, nas simbioses com as estirpes mais eficientes, a concentração de leghemoglobina nos nódulos foi 13% superior à dos nódulos formados por estirpes ineficientes.

Procedimento

Existem inúmeras metodologias sofisticadas que avaliam a atividade da leghemoglobina e seu estado de oxidação e que não serão mencionadas aqui. Para uma verificação rápida e fácil do teor de leghemoglobina nos nódulos, porém, pode ser utilizada a metodologia de Dardarwall et al. (1982):

- destacar cerca de 4 g de nódulos e homogeneizar em um almofriz, em banho de gelo, com 20 mL de tampão Tris-HCl (pH 8,9);
- centrifugar a 10.000 rpm e 4° C, por 30 min;
- reduzir alíquotas de 3 mL do sobrenadante com excesso de ditionato de sódio;
- determinar a densidade óptica a 550 nm.

14.7. Atividade da Glutamina Sintetase e Glutamato Sintase

Princípio

Conforme discutido no capítulo 13, os primeiros passos na assimilação da amônia proveniente da fixação do N₂, pelos bacteróides, ocorrem via glutamina sintetase e glutamato sintase. Em feijão, o estudo de algumas simbioses com estirpes ineficientes mostrou que a limitação estava nos níveis de atividade da glutamina sintetase(GS) e da glutamato sintase, e não na atividade da dinitrogenase (Hungria et al., 1991a). A GS foi significativamente superior (52%) nos nódulos das estirpes que acumularam

mais N na parte aérea havendo, também, uma alta correlação entre a atividade da GS e a atividade de específica dos nódulos ($r = 0,82^{**}$, Pacovsky & Hungria, 1990). Por isso, foi sugerido que a seleção poderia ser feita pela avaliação da atividade das enzimas de assimilação do N nos nódulos, particularmente da GS.

Procedimento

Ver capítulo 13.

14.8. Transporte de Ureídos na Seiva do Xilema

No capítulo 13, também foi discutido que o metabolismo e a síntese de ureídos estão relacionadas à eficiência do sistema simbiótico. Isso pode ser devido à baixa relação C:N dos ureídos, de 1:1 e às evidências de que há um menor gasto energético envolvido na sua síntese. As simbioses que transportam mais ureídos, portanto, seriam mais eficientes energeticamente (Neves & Hungria, 1987). Experimentos conduzidos com feijão (Hungria & Neves, 1986 a,b,c, 1987a) e soja (Neves et al., 1985; Hungria et al., 1989) mostraram que algumas estirpes mais eficientes e cultivares com maior potencial de fixação transportavam uma maior porcentagem do N total na seiva do xilema sob a forma dos ureídos. Em feijão, por exemplo, as correlações encontradas entre a %N-ureído na seiva do xilema e o índice de colheita do N nos grãos ($r = 0,903^{**}$, Hungria & Neves, 1986c; $r = 0,925^{**}$, Hungria & Neves, 1987b) e índice de colheita para o N ($r = 0,887^{**}$, Hungria & Neves, 1987a) foram elevadas. Também ficou comprovado que o ureído é mais facilmente translocado para os grãos do que o N mineral (Hungria et al., 1985b; Hungria & Neves, 1987b), havendo menor perda de N nas folhas senescentes das plantas que transportam mais ureídos via xilema (Hungria & Neves, 1986c, 1987b).

Procedimento

A análise de N-ureídos na seiva do xilema, ou nos tecidos da planta, é fácil, barata e pode ser conduzida em qualquer laboratório de microbiologia. A metodologia está descrita no capítulo 13.

14.9. Precocidade para Nodulação e Fixação do N_2

Princípio

As plântulas precisam sincronizar o período em que as reservas de C e N dos cotilédones esgotam e a fixação do N_2 inicia. A falta de sincronização entre esses dois processos normalmente provoca um estresse inicial de nitrogênio, entre os 15 e 22 dias após a emergência, comum em leguminosas epigeas, como a soja e o feijão (Sprent & Thomas, 1984; Hungria & Thomas, 1987). Particularmente no caso do feijoeiro, que é uma cultura de ciclo curto, o atraso no estabelecimento da nodulação e essa deficiência temporária de nitrogênio podem afetar, substancialmente, a produtividade das plantas. Foi observado, porém, que diversas estirpes conseguem estabelecer nódulos funcionais

mais precocemente do que outras, contribuindo com maiores taxas de fixação durante o ciclo das plantas (Barradas & Hungria, 1989; Barradas et al., 1989).

Procedimento

Barradas & Hungria (1989) e Barradas et al. (1990) conseguiram selecionar estirpes precoces pelo plantio em vasos de Leonard modificados (capítulo 3) e avaliações, particularmente do teor de N-ureído na seiva do xilema e acúmulo de N total nos tecidos, em coletas realizadas aos 16 e 17 dias após a emergência. Posteriormente, o desempenho dessas estirpes deve ser testado, primeiramente sob condições axênicas e, depois, na presença de outros microrganismos.

14.10. Senescência Tardia dos Nódulos

Princípio

Outro problema que afeta a maximização da fixação biológica do N₂ é a senescência precoce dos nódulos, que inicia logo após a floração, justamente no período de maior demanda de N pelas plantas (Sutton, 1983). Ainda há discussão sobre os fatores fisiológicos e genéticos que seriam responsáveis pelo início da senescência (Neves & Hungria, 1987) mas, no caso do feijão, foi possível selecionar estirpes que sofrem senescência tardia dos nódulos, permitindo maior acúmulo de N nas vagens (Hungria & Franco, 1988; Barradas et al., 1989; Boddey & Hungria, 1990).

Procedimento

Conduzir o ensaio com as estirpes em vasos de Leonard modificados (capítulo 3). No período médio de enchimento dos grãos, selecionar as estirpes mais ativas, particularmente pelos parâmetros de : % N-ureído na seiva do xilema $[(N\text{-ureído}/N\text{ total}) \times 100]$ e pela classificação dos nódulos. Essa classificação pode incluir as seguintes categorias: nódulos muito pequenos e róseos (novos), nódulos grandes e com coloração interna rósea (ativos), nódulos com coloração interna marrom (início de senescência), nódulos completamente senescidos e nódulos brancos ou verdes (ineficientes). Em um dos experimentos, por exemplo, a média dos resultados obtidos em três coletas, aos 35, 45 e 55 dias após a emergência, mostrou que uma estirpe com senescência tardia apresentou 36 % dos nódulos ativos, enquanto que, com uma menos tardia, apenas 22% dos nódulos estavam ativos (Hungria & Franco, 1988).

14.11. Isolamento de Estirpes mais Competitivas

14.11.1. Teste de Isolados Contra uma Estirpe de Capacidade Competitiva Elevada

Princípio

Existem estirpes conhecidas e cuja capacidade competitiva é elevada. Quando se deseja saber se uma estirpe é competitiva ou não, um dos primeiros métodos a ser empregado é o do teste de

competitividade, da estirpe a ser investigada, contra uma estirpe altamente competitiva. No caso da soja, normalmente tem sido utilizada a SEMIA 5019, a SEMIA 587 e a SEMIA 566. No caso do feijão, a CIAT 899.

Procedimento

Os experimentos são, geralmente, conduzidos em condições estéreis, em vasos de Leonard modificados, ou no sistema em frascos com solução nutritiva (capítulo 3):

- crescer as estirpes a serem investigadas e a estirpe controle até uma concentração de 10^8 - 10^9 céls./mL;
- igualar o número de células da estirpe investigada e da estirpe de referência pela densidade óptica;
- misturar as duas estirpes. As proporções normalmente empregadas são de 1:1, 10:1 e 1:10;
- coletar as plantas, após 3 a 4 semanas;
- destacar os nódulos e determinar a porcentagem de nódulos ocupados pelas estirpes;
- de modo geral, é utilizada a técnica da sorologia. Neste caso, a porcentagem de ocupação dos nódulos pelas estirpes é facilmente visualizada pela aglutinação ou não com o anti-soro (Figura 14.5) e detalhes sobre a metodologia são dados no capítulo 8. No caso de baixa nodulação, utilizar todos os nódulos das plantas e, no caso de nodulação elevada, 40 nódulos por planta;
- se estiverem disponíveis mutantes da estirpe referência com marcas de resistência a antibióticos mas que sejam, comprovadamente, isogênicas somente para esse fator, elas poderão ser utilizadas.

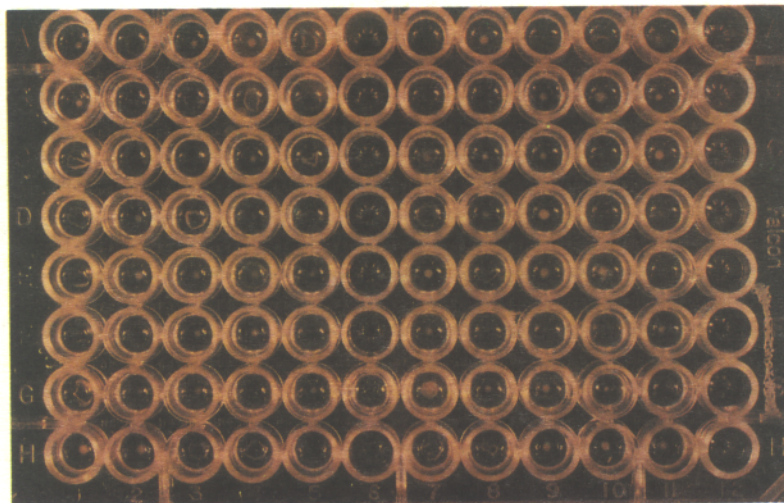


FIGURA 14.5. Placa utilizada em ensaios de sorologia, para a identificação da porcentagem de nódulos ocupados pelas estirpes. Quando a reação é positiva, ocorre precipitação das células com o anti-soro (ver capítulo 8).

14.11.2. Identificação das Estirpes Presentes no Solo em maior Porcentagem pelo Perfil Protéico (segundo R. S. Araujo)

Uma forma relativamente simples de se obterem isolados de rizóbios com maior capacidade competitiva é buscar, dentro de uma população estabelecida no solo, aqueles que ocupam a maior parte dos nódulos do hospedeiro. Neste aspecto é importante ressaltar o papel da planta hospedeira no sentido de exercer pressão de seleção, sobre a população de rizóbio do solo, favorecendo os mais competitivos.

Para o isolamento desses rizóbios, devem-se seguir alguns passos simples:

1) identificar uma área (campo) onde haja população estabelecida de rizóbios capazes de nodular a leguminosa em estudo; é importante verificar se há nodulação espontânea abundante nessas plantas;

2) coletar amostras dos nódulos espontâneos. O tamanho da amostra deve ser proporcional ao tamanho da área em estudo, podendo-se, inclusive, estabelecer subamostras dentro de uma área, como por exemplo, a de um pivô central de 100 ha;

3) o próximo passo é a aplicação de um método que permita a identificação rápida dos isolados dos nódulos. No Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia do Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP)/EMBRAPA, tem sido adotado o perfil de proteínas após eletroforese em gel de policriamida com SDS como forma de identificar os isolados.

O procedimento é descrito a seguir, e foi adaptado de Kamicker & Brill (1986):

1) isolar as bactérias dos nódulos (capítulo 2) e certificar-se de sua pureza. Identificar cada isolado adequadamente;

2) repicar os isolados para placas com meio YM sem antibióticos; podem ser riscados até oito isolados por placa. Incubar as placas a 28°C até obter crescimento;

3) repicar as culturas das placas frescas para tubos de ensaio contendo 3 mL de meio TY líquido e crescer a 28°C por 2 dias (crescimento rápido) ou 5 dias (crescimento lento);

4) após o crescimento, transferir 1,5 mL de cada cultura para tubos de microcentrifuga esterilizados, e centrifugar por 30 segundos apenas para precipitar as células;

5) lavar as células uma vez com 1 mL de TRIS-HCl 10 mM, pH 7,6 centrifugando novamente por 30 segundos após a lavagem;

6) ressuspender as células em 200 µL de uma mistura 1:1(v/v) de tampão TRIS-HCl 10 mM, pH 7,6 e tampão de amostra.

Tampão de amostra:

Glicerol	10% (v/v)
β-mercaptoetanol	5% (v/v)
SDS	3% (p/v)
Azul de bromofenol	0,01% (p/v)
Dissolver em 62 mM TRIS-HCl, pH 6,8	

7) após a ressuspensão das células, aquecer em água fervente ou câmara de vapor por 10 a 15 min. CUIDADO, as tampas de alguns tubos podem abrir-se durante a fervura;

8) os extratos podem ser empregados para eletroforese imediatamente, ou podem ser estocados a -20°C até o momento da corrida. Neste caso, devem-se ferver os extratos novamente antes de usá-los.

Os procedimentos para a eletroforese estão descritos no capítulo 10.

14.11.3. Avaliação da Capacidade Competitiva pela Mudança nos Fenótipos Radiculares

Princípio

Os primeiros estádios da nodulação requerem a indução de diversos genes que são organizados em unidades transcricionais do rizóbio, chamadas genes *nod* (nodulação). Alguns desses genes, como *nodA, B, C* e *D* são conservados entre diversas espécies de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (Djordjevic et al., 1985; Egelhoff et al., 1985; Marvel et al., 1985). A indução da transcrição do operon *nodDABC* é ativada por sinais moleculares exsudados pelas sementes em germinação e pelas raízes de diversas leguminosas. Esses sinais moleculares primários foram identificados como flavonóides, que são compostos fenólicos pertencentes ao metabolismo dos fenilpropanóides (Firmin et al., 1986; Peters et al., 1986; Kossak et al., 1987; Hungria et al., 1991b,c). Em resposta aos sinais enviados pela planta hospedeira, as bactérias produzem outras moléculas, que foram identificadas como lipo-oligossacarídeos e chamados de fatores Nod (Lerouge et al., 1990; Sanjuan et al., 1993). Esses compostos provocam alterações nos fenótipos das raízes, como encurvamento e aumento no número de pêlos radiculares, que são essenciais à nodulação; esse assunto foi, recentemente, revisado por Hungria (1994). Embora ainda não se saiba se existe uma correlação direta entre o desempenho das estirpes e sua capacidade de emitir sinais moleculares, há indicações de que as estirpes que causam o fenótipo *Hai* (hair induction) são mais competitivas (Nishi & Hungria, 1993).

Procedimento

- crescer as bactérias em meio YM até a concentração de 10^5 céls./mL;
- desinfestar as sementes e pré-germiná-las por 2 dias (capítulo 3);
- incubar as sementes por 30 min (1 mL/semente) com as bactérias e semeá-las em meio nutriente-ágar, contendo 8 g de ágar/L e solução nutritiva isenta de N, adicionando-se 0,5 mL/L da solução estoque com as seguintes concentrações (M): $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,0; KH_2PO_4 , 1,0; citrato de Fe, 0,02; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5; K_2SO_4 , 0,5; $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,002; H_3BO_3 , 0,004; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,0004; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0002; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,0002, pH final ajustado a 6,8 (Somasegaran & Hoben, 1985);

- aos 15 dias após o plantio, retirar, cuidadosamente, as plantas do meio nutriente-ágar e verificar os seguintes parâmetros: deformação da raiz principal (Tsr, thick and short root), aumento no número pêlos radiculares (Hai, hair induction, determinado pelo número de pêlos radiculares por campo da câmara de Neubauer), pêlos radiculares deformados (Had, hair deformation, avaliado pelo comprimento e espessura dos pêlos radiculares) e pêlos encurvados (Hac, hair curling, avaliado pela presença ou ausência de encurvamento dos pêlos radiculares). Alguns desses fenótipos podem ser vistos na Figura 14.6;
- avaliar Tsr pelo comprimento e espessura da raiz principal (Zaat et al., 1987);
- investigar Hai, Had e Hac pela coloração com 0,01% de azul de metileno (peso/volume) em água deionizada, incubação por 15 min em câmara úmida à temperatura ambiente e lavagem cuidadosa por, pelo menos, três vezes em água deionizada (Vasse & Truchet, 1984).

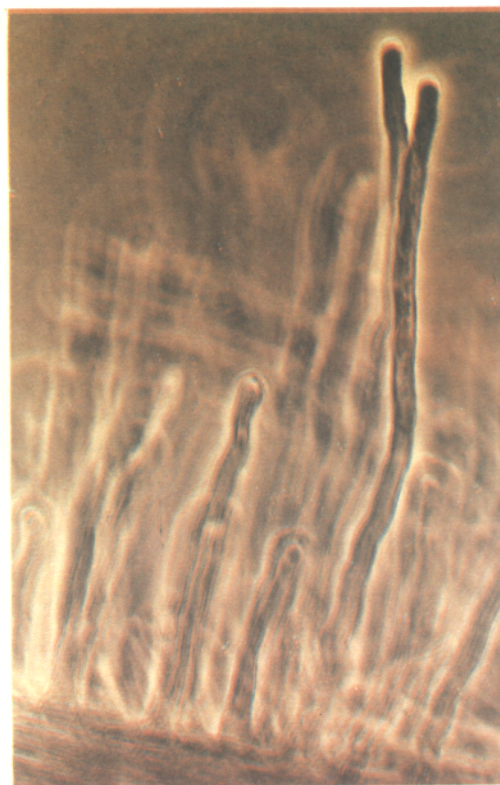
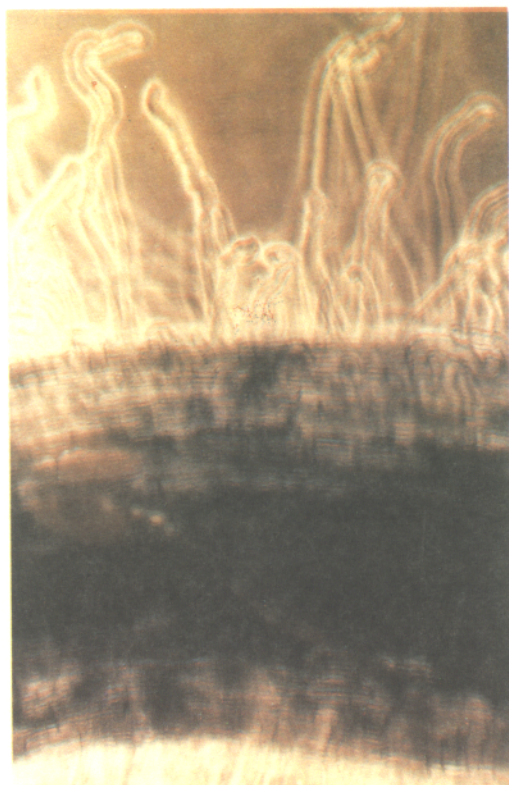


FIGURA 14.6. Raiz de soja sem inóculo (a) e com inóculo (b) da estirpe SEMIA 5080. Na raiz inoculada, pode-se observar o aumento no número de pêlos radiculares e diversas modificações no fenótipo desses pêlos, tais como o Had e Hac. Cortesia de Catalina Y. M. Nishi.

14.12. Espécies de Rizóbio mais Eficientes

14.12.1. Nodulação da soja: *Bradyrhizobium japonicum* X *Bradyrhizobium elkanii*

14.12.1.1. Conhecimento atual

Nos últimos anos de pesquisa, foram relatadas diferenças marcantes entre estirpes de *B. japonicum*. Em relação ao genoma, foram encontradas diferenças na estabilidade térmica da fita dupla de DNA (Hollis et al., 1981), na hibridização com *nifDH* (Stanley et al., 1985; Rumjanek et al., 1993a), com seqüências homólogas dos genes *nod* (Stanley et al., 1985), com os genes *nifDK* e *nifE* (Minamisawa, 1990; Minamisawa et al., 1992), com o gene *hup* (Minamisawa, 1990; Minamisawa et al., 1992), com as seqüências gênicas 16S rRNA (Young et al., 1991; Rumjanek et al., 1993b) e com as seqüências RS₅ (Minamisawa et al., 1992).

Quanto às características fenotípicas *in vitro*, foram encontradas diferenças na morfologia das colônias (Fuhrmann, 1990), composição dos ácidos graxos e resistência a níveis elevados de alguns antibióticos (Kuykendall et al., 1988), composição dos polissacarídeos extra-celulares (Huber et al., 1984; Minamisawa, 1989), produção de rizobiotoxina (Minamisawa, 1989), síntese de ácido indol acético (AIA) (Minamisawa & Fukai, 1991; Minamisawa et al., 1992), expressão da dinitrogenase (Huber et al., 1984), presença dos genes *hup* (Minamisawa, 1990; Minamisawa et al., 1992), entre outros. Também foram observadas diversas diferenças em simbiose e as mais relevantes foram a nodulação de cultivares contendo o genes *Rj₁* e *rj₁rj₁*, toxidez pela rizobiotoxina (Devine et al., 1983, 1990; Kuykendall et al., 1992) e expressão da hidrogenase (Minamisawa & Fukai, 1991). Essas diferenças, que estão resumidas na Tabela 14.1, levaram Kuykendall et al. (1992) a sugerir a subdivisão das estirpes de crescimento lento, que nodulam a soja, em duas espécies: *Bradyrhizobium japonicum*, com as estirpes do grupo ou genótipo I, cuja estirpe padrão é a ATCC 10324 (=USDA 6), e *Bradyrhizobium elkanii*, que incluiria as estirpes do grupo ou genótipo II e teria, como padrão, a estirpe ATCC 49852 (= USDA 76).

Minamisawa (1989) classificou as estirpes do genótipo I (GT I) como eficientes e as do genótipo II (GT II) como ineficientes baseado, principalmente, na produção de rizobiotoxina e ausência da hidrogenase. Há, ainda, indicações de que as estirpes do genótipo II apresentariam inferioridade simbiótica, com menor matéria de nódulos e da parte aérea secas, menor fixação de N₂ e menores concentrações de clorofila e proteína nas folhas (Fuhrmann, 1990; Teaney & Fuhrmann, 1992; Vasilas & Fuhrmann, 1993). Recentemente, Boddey & Hungria (1994b) também observaram que, sob condições axênicas (isto é, na ausência de microrganismos estranhos), as estirpes classificadas na espécie *B. japonicum* apresentaram maior precocidade de fixação do N₂ e taxas mais elevadas de fixação de N₂, no pré-florescimento, do que as estirpes da espécie *B. elkanii*.

TABELA 14.1. Algumas diferenças encontradas entre as espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*.

Característica	<i>B. japonicum</i>	<i>B. elkanii</i>	Referência
Morfologia das colônias	sem colônias com bordas irregulares e planas	aparecem colônias com bordas irregulares e planas	Fuhrmann (1990)
Composição dos ácidos graxos	1,3% 16:1 cis 9, 3,6% 16:1 C, 8,8% 16:0, 1,2% 19:1 ciclopropano e 81,2% 18:1	0,5% 16:1C, 11,1% 16:0, 0,8% 17:0 ciclopropano, 24,7% 19:0 ciclopropano e 62,3% 18:1	Kuykendall et al. (1988)
Resistência a níveis elevados de antibióticos ($\mu\text{g/ml}$)	não	rifampicina (500), tetraciclina (100), estreptomicina (250), cloranfenicol (500), eritromicina (250), carbenicilina (500), ácido nalidixico (50)	Kuykendall et al. (1988)
Composição dos polissacarídeos extracelulares	glucose, manose, galactose, 4- <i>O</i> -metil-galactose, ácido galacturônico	predomínio de ramnose, ácido 4- <i>O</i> -metilglucurônico	Huber et al. (1984)
Síntese de rizobiotoxina	não	sim	Minamisawa (1989)
Síntese de ácido indolacético <i>in vitro</i> em meio com ou sem triptofano	não	sim	Minamisawa & Fukai (1991), Minamisawa et al. (1992)
Atividade da dinitrogenase <i>in vitro</i>	não	sim	Huber et al. (1984)
Assimilação do N <i>in vitro</i>	isoenzima GSII	isoenzima GSI	Rumjanek et al. (1993a)
Genótipo <i>hup</i>	sim	não	Minamisawa (1990)
Fenótipo <i>Hup</i>	sim	não	Minamisawa (1989)
Presença, em simbiose, do citocromo <i>aa3</i>	não	sim	Keister & Marsh (1990)
Nodula soja com o alelo <i>Rj₁</i>	sim	não	Devine et al. (1990)
Nodula soja com o par de alelo <i>rj1rj1</i>	não	sim	Devine et al. (1983)
Nodula amendoim	não	sim	Devine et al. (1983)
Eficiência de fixação do N ₂	maior	menor	Fuhrmann (1990), Teaney & Fuhrmann (1992), Vasilas & Fuhrmann (1993), Boddey & Hungria (1994b)
Competitividade com <i>G. max</i>	maior	menor	Minamisawa et al. (1993), Boddey & Hungria (1994b)
Competitividade com <i>G. soja</i> e <i>Macroptilium atropurpureum</i>	menor	maior	Minamisawa et al. (1993)

Já em relação à competitividade, há controvérsias. Na espécie *B. elkanii*, é possível que a produção de rizobiotoxina possa ser vantajosa para a sobrevivência das estirpes, ajudando-as na competição com outros microrganismos do solo (Minamisawa, 1990). Quanto ao fenótipo Hup, embora haja indicações de que as estirpes Hup⁺ são mais eficientes energeticamente do que as estirpes Hup⁻, estas últimas parecem constituir a maioria dos isolados do solo (Brewin, 1984), o que também poderia indicar alguma vantagem em termos de competitividade. Em um estudo conduzido por Minamisawa et al. (1993), as estirpes pertencentes ao GTI foram mais competitivas do que as estirpes do GTII em diversas cultivares de *G. max*, exceto a cv. Peking, enquanto que as estirpes do GTII apresentaram maior competitividade em *Glycine soja* e *Macroptilium atropurpureum*. Em relação ao estudo conduzido no Brasil, Boddey & Hungria (1994b) observaram que as estirpes de *B. japonicum* são mais competitivas do que as de *B. elkanii*. Entretanto, diversas estirpes, classificadas em um genótipo misto entre as duas espécies, foram mais competitivas do que as de *B. japonicum*.

Os dados de Boddey & Hungria (1994a,b) demonstram, claramente, que é vantajoso selecionar estirpes pertencentes à espécie *B. japonicum* (genótipo I), que são mais eficientes e ao genótipo misto, que são mais competitivas. Resta a decisão, então, de quais parâmetros poderiam ser mais facilmente empregados para o enquadramento das estirpes nas duas espécies. Através de uma análise dos parâmetros obtidos em diversos trabalhos, da repetibilidade e consistência dos resultados entre autores e das condições de muitos laboratórios brasileiros podem ser recomendadas, hoje, as análises de composição dos polissacarídeos extracelulares, resistência intrínseca a níveis elevados de antibióticos, síntese de rizobiotoxina e ácido indol acético *in vivo* ou *in vitro*, presença da hidrogenase pela hibridização com os genes *hup* ou pelo fenótipo Hup, além da hibridização específica com algumas seqüências genéticas, como o *nifDK*, *nifE*, *RS₅* e 16S rRNA (Stanley et al., 1985; Kuykendall et al., 1988; Minamisawa, 1989, 1990; Minamisawa & Fukai, 1991; Minamisawa et al., 1992; Rumjanek et al., 1993b; Boddey & Hungria, 1994a,b). Para a identificação inicial de diversos isolados, porém, deve-se considerar a sugestão de Minamisawa et al. (1992), da análise de ácido indol acético *in vitro*, por ser uma análise fácil, envolvendo custos baixos e que apresenta alta correlação com a divisão em genótipos ou espécies. A seguir serão descritas as metodologias utilizadas por Boddey & Hungria (1994a) para diferenciar as espécies de *Bradyrhizobium* que nodulam a soja.

14.12.1.2. Características, *in vitro*, para diferenciar as duas espécies

14.12.1.2.1. Resistência intrínseca a níveis elevados de alguns antibióticos

Princípio

A resistência intrínseca a antibióticos é uma característica genética das estirpes e, segundo Kuykendall et al. (1988), somente as estirpes pertencentes ao genótipo II conseguem crescer em meio contendo níveis elevados de alguns antibióticos.

Procedimento

- Preparar meio YM sólido ou líquido. Os antibióticos e as concentrações que diferenciam as espécies, segundo Kuykendall et al. (1988) são: 500 µg/mL de rifampicina, 50 µg/mL de ácido nalidíxico, 100 µg/mL de tetraciclina, 250 µg/mL de eritromicina, 500 µg/mL de cloranfenicol, 100 µg/mL de estreptomicina e 500 µg/mL de carbenicilina. O preparo dos meios contendo antibióticos está descrito no capítulo 7;
- crescer as estirpes em meio YM até atingirem concentrações de 10^4 a 10^5 céls./mL. No caso de meio líquido, transferir 20 µL de cada cultura para tubos contendo 5 mL de meio com antibiótico e tubo com meio sem antibiótico. No caso de meio sólido, transferir 10 µL para as placas;
- avaliar o crescimento, conforme descrito no capítulo 7.

14.12.1.2.2. Síntese de ácido indolacético (AIA)

Princípio

Segundo Minamisawa & Fukai (1991) e Minamisawa et al. (1992), as estirpes do grupo II sintetizam ácido indolacético (AIA) *in vitro*, acumulando mais de 20 µM no meio (geralmente concentrações superiores a 50 µM, atingindo até 250 µM), enquanto que os valores acumulados pelas estirpes do genótipo I são < 2 µM de AIA, mesmo em meio enriquecido com triptofano.

Usando a metodologia descrita a seguir, Boddey & Hungria (1994b) constataram, na análise de 40 estirpes, que as que se enquadravam no genótipo I acumularam entre 4 µM e 7 µM de AIA, as estirpes do genótipo misto acumularam entre 7 µM e 15 µM e as do genótipo II, entre 24 e 34 µM.

Procedimento

- inocular as bactérias em meio Tris-YMRT (Owens & Wright, 1964; Minamisawa & Fukai, 1991), com a seguinte composição (por litro): manitol, 10,0 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g; Tris, 1,21 g; extrato de levedura, 0,2 g; ácido casamino, 1,0 g; pH ajustado a 6,8. Suplementar o meio com 0,3 mM de triptofano, esterilizado por filtração (0,2 µm), para incrementar a produção de AIA (Minamisawa et al., 1992);
- crescer as bactérias, por 10 dias, a 28°C. As bactérias devem ser crescidas no escuro, pois a luz provoca oxidação do AIA;
- detectar a concentração de AIA, colorimetricamente, segundo o método de Gordon & Weber (1951), modificado por Minamisawa et al. (1992), com a adição de duas partes de FeCl_3 , 0,01 M, em 35% de HClO_4 para uma parte do sobrenadante da bactéria (v/v). Realizar a leitura da D.O. a 530 nm, após 25 min.

14.12.1.2.3. Expressão da hidrogenase

Princípio e Procedimento

- ver seção 14.3.2.

14.12.1.2.4. Composição dos polissacarídeos extracelulares

Princípio

Minamisawa (1989) observou que estirpes de *Bradyrhizobium* menos eficientes, e que se caracterizavam por serem Hup⁻ e RT⁺, produziam polissacarídeos extracelulares (= exopolissacarídeos, EPS) com ramnose e ácido glucurônico, e pequena quantidade de glicose e manose. Já as estirpes eficientes, produziam EPS com glicose, manose, galactose, 4-*O*-metil-galactose e ácido galacturônico. A composição do EPS não foi utilizada na análise das estirpes brasileiras, por isso será apenas mencionado o método descrito por Minamisawa (1989).

Procedimento

- crescer as bactérias, por 7 dias, em meio líquido definido (Minamisawa, 1989);
- centrifugar as células, ressuspendê-las e dialisá-las, conforme metodologia descrita por Minamisawa (1989);
- avaliar a composição da EPS por cromatografia gasosa (GC), conforme Minamisawa (1989), procurando identificar e quantificar, por comparação com padrões comerciais, as frações correspondentes à glicose, manose, galactose, 4-*O*-metil-galactose e ácido galacturônico.

14.12.1.3. Características, *in vivo*, para diferenciar as duas espécies

14.12.1.3.1. Expressão da hidrogenase

Princípio

Conforme discutido na seção 14.3.3, a análise da expressão da hidrogenase em simbiose é mais fácil do que a detecção do genes *hup*. O fenótipo Hup é restrito ao genótipo I, embora nem todas as estirpes do grupo I sejam Hup⁺ (Minamisawa et al., 1992).

Procedimento

- ver seção 14.3.3.

14.12.1.3.2. Bioensaio de toxidez de rizobiotoxina em alfafa

Princípio

Vários relatos de isolados provenientes dos Estados Unidos, África, América Central e América do Sul têm apontado a existência de estirpes que nodulam a soja e produzem rizobiotoxina [2-amino-4-(2-amino-3-hidropropoxi)-trans-but-3-enóico, PM=190]. Essa toxina, uma vez sintetizada nos nódulos, leva à indução de clorose nas folhas novas de soja (La Favre & Eaglesham, 1986). A dihidrorizobiotoxina, PM 192, também tem sido associada com a clorose das folhas. A produção dessas toxinas se restringe ao genótipo II (Minamisawa, 1989; Minamisawa & Fukai, 1991). O procedimento descrito a seguir foi baseado em Minamisawa & Fukai (1991) e utilizado por Boddey & Hungria (1994a).

Procedimento

- crescer as bactérias em meio YM por , aproximadamente, 7 dias (10^8 céls./mL);
- centrifugá-las, a 9.000 g, por 20 min;
- adicionar, ao sobrenadante, ágar na concentração de 1,5% (p/v) e ajustar o pH para 7,5;
- como controle, utilizar plantas crescendo em tampão Tris, 10 mM, com pH ajustado a 7,5;
- autoclavar, a 120°C, por 20 min e resfriar;
- desinfestar sementes de alfafa (conforme capítulo 3) e semeá-las no meio solidificado;
- crescer a 28° C, por 8 dias, com luz contínua. O crescimento, na luz, visa a oxidar o AIA. Como a rizobiotoxina não é afetada pela luz, os efeitos observados ficarão restritos à ação da rizobiotoxina
- coletar as plântulas de alfafa e avaliar o comprimento das raízes, em relação ao controle;
- as raízes de alfafa, na presença da rizobiotoxina, têm seu crescimento substancialmente reduzido.

14.12.1.3.3. Bioensaio de toxidez de rizobiotoxina em soja

- crescer as estirpes em meio YM, a 28°C, por 7 dias (10^8 céls./mL);
- desinfestar as sementes de soja (capítulo 3) e incubá-las, por 30 min, com 1 mL do inóculo/semente. Uma cultivar sensível à rizobiotoxina é a Lee (Johnson & Means, 1960), e Boddey & Hungria (1994b) observaram, facilmente, os sintomas na cv. BR-16;
- como controle, recomenda-se utilizar as estirpes USDA 31 (causa clorose leve), USDA 94 (sintomas médios) e USDA 76 (clorose acentuada);
- semeá-las em vasos de Leonard modificados ou frascos com papel de filtro e solução nutritiva isenta de N (capítulo 3);
- os sintomas de clorose devem ser observados após 14 e 28 dias (La Favre & Eaglesham, 1986).

14.12.1.3.4. Restrição da nodulação pelo alelo *Rj₁*

Princípio

O gene *Rj₁* está presente nas cultivares Hill, Dunfield, Dare, Amsoy 71 e Tracy, que apresentam nodulação ineficaz (proliferação do córtex sem formação de nódulos) com as bactérias pertencentes ao grupo II (Devine et al., 1990; Kuykendall et al., 1992). Os resultados, porém, devem ser interpretados com cautela, pois Sadowsky & Cregan (1992) observaram que a restrição também pode ser encontrada em estirpes do grupo I.

Procedimento

- crescer as estirpes em meio YM, por 7 dias (10^8 céls./mL);
- proceder à inoculação na cultivar Hill, que possui o alelo *Rj₁*, ou qualquer outra cultivar que possua esse gene.

14.12.1.3.5. Repressão da nodulação pelo par de alelos *rj,rj*

Princípio

Devine et al. (1983) constataram que as estirpes do grupo II nodulavam soja “não nodulante”, que possuem o alelo *rj,rj*. Esses resultados foram confirmados em estudos com algumas estirpes do genótipo II utilizadas nos estudos de Rumjanek et al. (1993a), mas não foram confirmados plenamente por La Favre & Eaglesham (1986).

Procedimento

O mesmo da seção 14.12.1.2.4, mas somente utilizando uma cultivar de soja que possua o par de genes *rj,rj*, como a cultivar Clark.

Observação

- as estirpes do genótipo II também possuem a habilidade de nodular amendoim (*Arachis hypogea*) (Devine et al., 1983).

14.12.2. Nodulação do feijão: *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* X *Rhizobium tropici* X *Rhizobium etli*

14.12.2.1. Conhecimento atual

As estirpes que nodulam o feijão foram as que mostraram maiores alterações, em termos taxonômicos, nos últimos anos. Até 1984, todas as bactérias que nodulavam o feijão eram classificadas como *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (Jordan, 1984). A partir da década de 80, o grupo de pesquisas do Centro de Fixação do Nitrogênio, em Cuernavaca, no México, iniciou uma série de pesquisas que mostraram grandes diferenças fisiológicas, bioquímicas e genéticas entre as estirpes de feijão. As características diferenciais, encontradas em diversos trabalhos, permitiram a divisão das estirpes em dois tipos, conforme pode ser visto na Tabela 14.2.

TABELA 14.2. Características diferenciais entre estirpes do Tipo I e do Tipo II que nodulam o feijoeiro. Segundo Martínez et al. (1985, 1988, 1991) e Brom et al. (1988).

Tipo I	Tipo II
Específica do feijoeiro	Além do feijoeiro, pode nodular outras espécies arbóreas, como a leucena
Cópias múltiplas dos genes da dinitrogenase, <i>nifH</i>	Um única cópia do gene <i>nifH</i>
Hibridiza com o gene <i>psi</i> (polysacharide inhibition)	Não hibridiza com o gene <i>psi</i>
Transconjugantes de <i>Agrobacterium</i> , contendo plasmídeos simbióticos, apresentam o fenótipo Fix ⁻	Fenótipos Fix ⁺ com <i>Agrobacterium</i>
Geneticamente instável	Geneticamente estável

Essas diferenças e o baixo nível de hibridização DNA-DNA com outras espécies de *Rhizobium* levaram à subdivisão dos dois tipos em duas espécies, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. tropici* (Martínez-Romero et al., 1991). Esta última ainda podia ser subdividida em dois tipos, II A e II B. Algumas características que diferenciam essas espécies estão listadas na Tabela 14.3.

TABELA 14.3. Algumas características fenotípicas que diferenciam as espécies que nodulam feijão (Martínez-Romero et al., 1991).

Característica	<i>R. l. bv. phaseoli</i>	<i>R. tropici</i>	
		Tipo II A	Tipo II B
Nodulação de leucena	–	+	+
Crescimento em meio LB*, PY* sem Ca, PY com antibióticos ou meio mínimo com arginina, hipoxantina ou sorbitol	–	–	+
Temperatura máxima de crescimento em placa	35° C	37° C	40° C
Mobilidade em ágar a 0,3 %	+	–	+
Morfologia em YM	transparente, branca	úmida transparente,	opaca, úmida

* Para a composição dos meios, ver capítulo 10.

Recentemente, uma nova espécie foi definida, *R. etli* (Segovia et al., 1993), que inclui a maioria das estirpes antes classificadas como *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. Segundo Young et al. (1993), a designação *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* deve ser usada somente para as estirpes que estejam estreitamente relacionadas com os genes cromossomais dos outros biovars desta espécie como, por exemplo, a estirpe JI8002.

14.12.2.2. Testes para a Classificação das Espécies

Até recentemente, as estirpes utilizadas em estudos e inoculantes para o feijoeiro apresentavam problemas de estabilidade genética e, com poucos anos de laboratório, perdiam a sua eficiência e até a capacidade de nodulação. Com os estudos expostos na seção anterior, porém, ficou demonstrado que as estirpes pertencentes à espécie *R. tropici* são mais estáveis geneticamente, toleram temperatu-

ras elevadas e acidez do solo. Em relação à competitividade, existem controvérsias entre resultados obtidos em instituições brasileiras e mexicanas, sobre qual das três espécies seria a mais competitiva. Entretanto, não se pode pensar em aumentar a competitividade de estirpes geneticamente instáveis. Por isso, recomenda-se que sejam obtidas estirpes mais competitivas (utilizando os mesmos métodos descritos para a soja) dentro da espécie *R. tropici*.

A classificação das estirpes na espécie *R. tropici* pode ser feita, preliminarmente, pela verificação da nodulação em leucena. Após isso, outras características fenotípicas, expostas na Tabela 14.3, podem ser observadas. No caso de seleção para estirpes tolerantes a temperaturas elevadas, há indicações de que o Tipo II B é mais tolerante. O crescimento em meio LB, portanto, pode facilitar os programas de seleção de estirpes termo-tolerantes.

14.13. Considerações Finais

O processo de seleção de estirpes mais eficientes e competitivas é dinâmico e técnicas que permitam a identificação de genótipos com melhor desempenho são de extrema importância. Alguns métodos fáceis, como o da síntese de AIA *in vitro* para *Bradyrhizobium* (soja) e o teste de nodulação em leucena (feijão) podem identificar as espécies que apresentam maior probabilidade de serem eficientes e/ou competitivas. Outros parâmetros, como a presença da hidrogenase e o teor de N-ureído transportado na seiva do xilema, devem ser considerados nos programas de seleção, pois há indicações fortes de que contribuem para a maior eficiência da simbiose.

14.14. Referências Bibliográficas

- ALBRECHT, S. L.; MAIER, R. J.; HANUS, F. J.; RUSSELL, S. A.; ELMERICH, D. W.; EVANS, H. J. Hydrogenase of *Rhizobium japonicum* increases nitrogen fixation by nodulated soybeans. *Science*, v.203, p.1255-1257, 1979.
- ARAUJO, R. S. Fixação biológica do nitrogênio em feijão. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. ed. **Microrganismos de Importância Agrícola**. Brasília: EMBRAPA, 1994. p.91-120.
- BARRADAS, C. A. A.; HUNGRIA, M. Seleção de estirpes de *Rhizobium* para o feijoeiro. I-Precocidade para nodulação e fixação do nitrogênio. *Turrialba*, v.39, p.236-242, 1989.
- BARRADAS, C. A. A.; BODDEY, L. H.; HUNGRIA, M. Seleção de cultivares de feijão e estirpes de *Rhizobium* para nodulação precoce e senescência tardia dos nódulos. *Rev. bras. Ci. Solo*, v.13, p.169-179, 1989.
- BERGERSEN, F. J.; TURNER, G. L.; GIBSON, A. H.; DUDMAN, W. R. Nitrogenase activity and respiration of cultures of *Rhizobium* spp. with special reference to concentration of dissolved oxygen. *Biochim. Biophys. Acta*, v.44, p.164-174, 1976.

- BODDEY, L. H.; HUNGRIA, M. Seleção de estirpes de *Rhizobium* para o feijoeiro: II. Senescência tardia dos nódulos. **Turrialba**, v.40, p.33-39, 1990.
- BODDEY, L. H.; HUNGRIA, M. Classificação de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* em genótipo I e II baseada em características fenotípicas e genotípicas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3, 1994, Londrina. **Resumos**. Londrina: IAPAR, 1994a. p.66.
- BODDEY, L. H.; HUNGRIA, M. Relação entre a divisão de *B. japonicum* em genótipos e a eficiência e capacidade competitiva das estirpes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3, 1994, Londrina. **Resumos**. Londrina: IAPAR, 1994b. p.63.
- BREWEN, N. J. Hydrogenase and energy efficiency in nitrogen-fixing symbionts. In: VERMA, D. P. S.; HOHN, T. ed. **Genes Involved in Plant-Microbe-Interactions**. New York: Springer-Verlag, 1984. p.179-203.
- BROM, S.; MARTÍNEZ, E.; D'AVILA, G.; PALACIOS, R. Narrow- and broad-host-range symbiotic plasmids of *Rhizobium* spp. strains that nodulate *Phaseolus vulgaris*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.54, p.1280-1283, 1988.
- CATLOW, H. Y.; GLENN, A. R.; DILWORTH, M. J. The use of transposon-induced non-motile mutants in assessing the significance of motility of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* for movement in soils. **Soil Biol. Biochem.**, v.22, p.331-336, 1990.
- DARDARWALL, K. R.; GROVER, R.; TAURO, P. Uptake hydrogenase in *Rhizobium* and leghemoglobin in cowpea miscellany hosts. **Arch. Microbiol.**, v.133, p.303-306, 1982.
- DEVINE, T. E.; KUYKENDALL, L. D.; BREITHAUPT, B. H. Nodule-like structures induced on peanut by chlorosis producing strains of *Rhizobium* classified as *R. japonicum*. **Crop Sci.**, v.23, p.394-397, 1983.
- DEVINE, T. E.; KUYKENDALL, L. D.; O'NEILL, J. J. The *Rj₁* allele in soybean represses nodulation by chlorosis-inducing bradyrhizobia classified as DNA homology group II by antibiotic resistance profiles. **Theor. Appl. Genet.**, v.80, p.33-37, 1990.
- DÖBEREINER, J.; FRANCO, A. A. Breve histórico da microbiologia do solo no Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3, 1994, Londrina. **Resumos**. Londrina: IAPAR, 1994. Resumo 5.
- DÖBEREINER, J.; FRANCO, A. A.; GUZMÁN, I. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. **Pesq. agropec. bras.**, v.5, p.155-161, 1970.

- DJORDJEVIC, M. A.; SCHOFIELD, P. R.; RIDGE, R. W.; MORRISON, N. A.; BASSAM, B.J.; PLAZINSKI, J.; ROLFE, B.G. *Rhizobium* nodulation involved in root hair curling (Hac) are functionally conserved. **Plant Mol. Biol.**, v.4, p. 147-160, 1985.
- DREYFUS, L. B.; ELMERICH, C.; DOMMERGYES, Y. R. Free-living *Rhizobium* strain able to grow on N₂ as the sole nitrogen source. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.45, p. 711-713, 1983.
- EGELHOFF, T. T.; FISCHER, R. F.; JACOBS, T. W.; MULLIGAN, J. T.; LONG, S. R. Nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* 1021 nodulation genes: *nodD* is read divergently from *nodABC*. **DNA**, v.4, p.241-248, 1985.
- EVANS, H. J.; HARKER, A. R.; PAPEN, H.; RUSSELL, S. A.; HANUS, F. J.; ZUBER, M. Physiology, biochemistry and genetics of the uptake hydrogenase in rhizobia. **Ann. Rev. Microbiol.**, v.41, p.335-361, 1987.
- FARIAS, S. M.; MOREIRA, V. C. G.; FRANCO, A. A. Seleção de estirpes de *Rhizobium* para espécies leguminosas florestais. **Pesq. agropec. bras.**, v.19, p.175-179, 1984.
- FIRMIN, J. L.; WILSON, K. E.; ROSSEN, L.; JOHNSTON, A. W. B. Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants. **Nature**, v.324, p.90-92, 1986.
- FREIRE, J. R. J. Research into the *Rhizobium*/Leguminosae symbiosis in Latin America. **Pl. Soil**, v.67, p.227-239, 1982.
- FUHRMANN, J. Symbiotic effectiveness of indigenous soybean bradyrhizobia as related to serological, morphological, rhizobitoxine, and hydrogenase phenotypes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.56, p.224-229, 1990.
- GILLER, K. E.; WILSON, K. J. **Nitrogen Fixation in Tropical Cropping Systems**. Wallingford: CAB International, 1993. 313p.
- GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiol.**, v.26, p.192-195, 1951.
- HANUS, F. J.; ALBRECHT, S. L.; ZABLOTOWICZ, R. M.; ELMERICH, D. W.; RUSSELL, S. A.; EVANS, H. J. Yield and N content of soybean seed as influenced by *Rhizobium japonicum* inoculants possessing the hydrogenase characteristic. **Agron. J.**, v.73, p.368-372, 1981.
- HANUS, F. J.; MAIER, R. J.; EVANS, H. J. Autotrophic growth of the H₂-uptake positive strains of *Rhizobium japonicum* in an atmosphere supplied with hydrogen gas. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.76, p.1788-1792, 1979.

- HARDY, R. W. F.; HOLSTEN, R. D.; JACKSON, E.K.; BURNS, R. C. The acetylene - ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. **Plant Physiol.**, v.43, p.1185-207, 1968.
- HAUGLAND, R. A.; HANUS, F. J.; CANTRELL, M. A.; EVANS, H. J. Rapid colony screening method for identifying hydrogenase activity in *Rhizobium japonicum*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.45, p.892-897, 1983.
- HOLLIS, A. B.; KLOOS, W. E.; ELKAN, G. H. DNA:DNA hybridization studies of *Rhizobium japonicum* and related *Rhizobiaceae*. **J. Gen. Microbiol.**, v.123, p.215-222, 1981.
- HUBER, T. A.; AGARWAL, A. K.; KEISTER, D. L. Extracellular polysaccharide composition, *ex planta* nitrogenase activity, and DNA homology in *Rhizobium japonicum*. **J. Bacteriol.**, v.58, p.1168-1171, 1984.
- HUNGRIA, M. Efeito das temperaturas elevadas nos passos iniciais da infecção e nodulação do feijoeiro. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DO FEIJÃO, 4, 1993, Londrina. **Resumos**. Londrina: IAPAR, 1993. p.132
- HUNGRIA, M. Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. **Rev. bras. Ci. Solo**, no prelo, 1994.
- HUNGRIA, M. ; FRANCO, A. A. Nodule senescence in *Phaseolus vulgaris*. **Trop. Agric.**, v.65, p.341-346, 1988.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P. Efeito da manipulação de fotossintatos na fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro. **Pesq. agropec. bras.**, v.21, p.9-24, 1986a
- HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P. Interações entre cultivares de *Phaseolus vulgaris* e estirpes de *Rhizobium* na fixação e transporte do nitrogênio. **Pesq. agropec. bras.**, v.21, p.127-140, 1986b.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P. Ontogenia da fixação biológica do nitrogênio em *Phaseolus vulgaris*. **Pesq. agropec. bras.**, v.21, p.715-730, 1986c.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P. Cultivar and *Rhizobium* strain effects on nitrogen fixation and transport in *Phaseolus vulgaris* L. **Pl. Soil**, v.103, p.111-121, 1987a.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P. Partitioning of nitrogen fixation from biological fixation and fertilizer in *Phaseolus vulgaris*. **Physiol. Plant.**, v.69, p.55-63, 1987b.
- HUNGRIA, M.; THOMAS, R. J. Effects of cotyledons and nitrate on nitrogen assimilation of *Phaseolus vulgaris* L. **MIRCEN J.**, v.3, p.411-419, 1987.

- HUNGRIA, M.; BARRADAS, C. A.; WALLSGROVE, R. M. Nitrogen fixation, assimilation and transport during the initial growth stage of *Phaseolus vulgaris*. **J. Exp. Bot.**, v.42, p.839-844, 1991.
- HUNGRIA, M.; ELLIS, J. M.; HARDY, R. W. F.; EAGLESHAM, A. R. J. Light-stimulated $^{14}\text{CO}_2$ uptake and acetylene reduction by bacteriochlorophyll containing stem nodule isolate BTAi1. **Biol. Fert. Soils**, v.15, p.208-214, 1993a.
- HUNGRIA, M.; FRANCO, A. A.; SPRENT, J. I. New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. **Pl. Soil**, v.149, p.95-102, 1993b.
- HUNGRIA, M.; JOSEPH, C. M.; PHILLIPS, D. A. Anthocyanidins and Flavonols, major nod gene inducers from seeds of a black-seeded common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Physiol.**, v.97, p.751-758, 1991b.
- HUNGRIA, M.; JOSEPH, C. M.; PHILLIPS, D. A. *Rhizobium nod* gene inducers exuded naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Physiol.**, v.97, p.759-764, 1991c.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P. ; DÖBEREINER, J. Relative efficiency, ureide transport and harvest index in soybeans inoculated with isogenic HUP mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. **Biol. Fert. Soils**, v.7, p.325-329, 1989.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P.; VICTORIA, R.L. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro. I- Atividade da nitrogenase, da nitrato redutase e transporte do nitrogênio na seiva do xilema. **Rev. bras. Ci. Solo**, v.9, p.193-200, 1985a.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P.; VICTORIA, R.L. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro. II- Absorção e translocação do N mineral e do N_2 fixado. **Rev. bras. Ci. Solo**, v.9, p.201-209, 1985b.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. ed. **Microrganismos de Importância Agrícola**. Brasília: EMBRAPA, 1994. p.9-90.
- JOHNSON, H. W.; MEANS, U. M. Interactions between genotypes of soybeans and genotypes of nodulating bacteria. **Agron. J.**, v.52, p.651-654, 1960.
- JORDAN, D. C. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: KRIEG, N. R. ; HOLT, J. G. ed. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore-London: Williams & Wilkins Co.,1984. p.235-244.
- KAMICKER, B.J.; BRILL, W.J. Identification of *Bradyrhizobium japonicum* nodule isolates from Wisconsin soybean farms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.51, n.3, p.487-492, 1986.

- KEISTER, D. L.; MARSH, S. S. Hemoproteins of *Bradyrhizobium japonicum* cultured cells and bacteroids. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.56, p.2736-2741, 1990.
- KOSSLAK, R. M.; BOOKLAND, R.; BARKEI, J.; PAAREN, H. E.; APPELBAUM, E. R. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common nod genes by isoflavone isolated from *Glycine max*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.84, p.7428-7432, 1987.
- KURZ, W. G. W.; LaRUE, T. A. Nitrogenase activity in rhizobia in absence of plant host. **Nature**, v.256, p.407-408, 1975.
- KUYKENDALL, L. D.; ROY, M. A.; O'NEILL, J. J.; DEVINE, T. E. Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.38, p.358-361, 1988.
- KUYKENDALL, L. D.; SAXINA, B.; DEVINE, T. E.; UDELL, S. E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Can. J. Microbiol.**, v.38, p.501-505, 1992.
- LA FAVRE, J. S.; EAGLESHAM, A. R. J. Rhizobitoxine: a phytotoxin of unknown function which is commonly produced by bradyrhizobia. **Pl. Soil**, v.92, p.443-452, 1986.
- LEROUGE, P.; ROCHE, P.; FAUCHER, C.; MAILLET, F.; TRUCHET, G.; PROMÉ, J.-C.; DÉNARIÉ, J. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide. **Nature**, v.344, p.781-784, 1990.
- LIU, R.; TRAN, V. M.; SCHMIDT, E. L. Nodulation competitiveness of a nonmotile Tn7 mutant of *Bradyrhizobium japonicum* in nonsterile soil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.55, p.1895-1900, 1989.
- MAGUE, T. H.; BURRIS, R.H. Reduction of acetylene and nitrogen by field grown soybeans. **New Phytol.**, v.71, p.275-86, 1972.
- MAIER, R. J.; BRILL, W. J. Mutant strains of *Rhizobium japonicum* with increased ability to fix nitrogen for soybean. **Science**, v.201, p.448-450, 1978.
- MAIER, R. J.; GRAHAM, L. Mutant strains of *Bradyrhizobium japonicum* with increased symbiotic N₂ fixation rates and altered Mo metabolism properties. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.56, p.2341-2346, 1990.
- MAIER, R. J.; CAMPBELL, N. E. R.; HANUS, F. J.; SIMPSON, F. B.; RUSSELL, S. A.; EVANS, H. J. Expression of hydrogenase activity in free-living *Rhizobium japonicum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.75, p.3258-3262, 1978.

- MARTÍNEZ, E.; FLORES, M.; BROM, S.; ROMERO, D.; DÁVILA, G.; PALACIOS, R. *Rhizobium phaseoli* : a molecular genetics view. **Pl. Soil**, v.108, p.179-184, 1988.
- MARTÍNEZ, E.; PARDO, M. A.; PALACIOS, R.; CEVALLOS, M. A. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. **J. Gen. Microbiol.**, v.131, p.1779-1786, 1985.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; GRAHAM, P.; PARDO, M. A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.41, p.417-426, 1991.
- MARVEL, D. J.; KULDAU, G.; HIRSCH, A.; RICHARDS, E.; TORREY, J. G.; AUSUBEL, F. M. Conservation of nodulation genes between *Rhizobium meliloti* and a slow-growing *Rhizobium* strain that nodulates a nonlegume host. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.82, p.5841-5845, 1985.
- McCOMB, J. A.; ELLIOT, J.; DILWORTH, M. J. Acetylene by *Rhizobium* in pure culture. **Nature**, v.256, p.409-410, 1975.
- MINAMISAWA, K. Comparison of extracellular polysaccharide composition, rhizobitoxine production and hydrogenase phenotype among various strains of *Bradyrhizobium japonicum*. **Plant Cell Physiol.**, v.30, p.877-884, 1989.
- MINAMISAWA, K. Division of rhizobitoxine-producing and hydrogen-uptake positive strains of *Bradyrhizobium japonicum* by *nifDKE* sequence divergence. **Plant Cell Physiol.**, v.31, p.81-89, 1990.
- MINAMISAWA, K.; FUKAI, K. Production of indole-3-acetic acid by *Bradyrhizobium japonicum*: a correlation with genotype grouping and rhizobitoxine production. **Plant Cell Physiol.**, v.32, p.1-9, 1991.
- MINAMISAWA, K.; ONODERA, S.; KOBAYASHI, N.; TANIMURA, Y.; YUHASHI, K.; AKAO, S. Competitiveness of different genotype groups of indigenous *Bradyrhizobium japonicum* for nodule occupancy. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W. E. ed. **New Horizons in Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p.632.
- MINAMISAWA, K.; SEKI, T.; ONODERA, S.; KUBOTA, M.; ASAMI, T. Genetic relatedness of *Bradyrhizobium japonicum* field isolates as revealed by repeated sequences and various other characteristics. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.58, p.2832-2839, 1992.
- NEVES, M. C. P.; HUNGRIA, M. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. **CRC Crit.Rev. Plant Sci.**, v.6, p.267-321, 1987.

- NEVES, M. C. P.; DIDONET, A. D.; DUQUE, F. F.; DÖBEREINER, J. *Rhizobium* strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. **J. Exp. Bot.**, v. 36, p.1179-1192, 1985.
- NISHI, C. Y. M.; HUNGRIA, M. **Eficiência da fixação biológica do N₂ e capacidade competitiva das estirpes SEMIA 566, SEMIA 586, SEMIA 5079 e SEMIA 5080 inoculadas em soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1993. 13p. (EMBRAPA-CNPSO. Pesquisa em Andamento, 15).
- OWENS, L. D.; WRIGHT, D. A. Rhizobial-induced chlorosis in soybeans: isolation, production in nodules and varietal specificity of the toxin. **Plant Physiol.**, v.40, p.927-930, 1964.
- PACOVSKY, R. S.; HUNGRIA, M. Glutamine synthetase may limit nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. In: GRESSHOFF, P. M.; ROTH, L. E.; STACEY, G.; NEWTON, W. E. ed. **Nitrogen fixation: Achievements and Objectives**. New York: Chapman and Hall, 1990. p.359.
- PAGAN, J. D.; CHILD, J. J.; SCOWCROFT, W. R.; GIBSON, A. H. Nitrogen fixation by *Rhizobium* cultured on a defined medium. **Nature**, v.256, p.406-407, 1975.
- PEDROSA, F. O.; NASCIMENTO, A. J.; ALVAHYDO, R.; DÖBEREINER, J. Teores de leg-hemoglobina e de molibdênio nos nódulos de soja (*Glycine max*) inoculada com estirpes de *Rhizobium japonicum* de eficiência normal e excepcional. **Pesq. agropec. bras.**, v.5, p.373-379, 1970.
- PERES, J. R. R.; MENDES, I. C.; SUHET, A. R.; VARGAS, M. A. T. Eficiência e competitividade de estirpes de rizóbio para soja em solos de cerrado. **R. bras. Ci. Solo**, v.17, p.357-363, 1993.
- PERES, J. R. R.; SUHET, A. R.; VARGAS, M. A. T. **Inoculação de leucena nos Cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1986. 3p. (EMBRAPA-CPAC. Comunicado Técnico, 47).
- PERES, J. R. R.; SUHET, A. R.; VARGAS, M. A. T. Fixação de nitrogênio atmosférico pela ervilha em solos de cerrados. **Inf. agropec.**, v.14, p.16-19, 1989.
- PERES, J. R. R.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R. Variação na eficiência em fixar N₂ dentro da mesma estirpe de *R. japonicum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 18, 1981, Salvador. **Resumos**. Salvador: SBCS, 1981. p.34.
- PERES, J. R. R.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R. Variabilidade na eficiência de fixar nitrogênio entre isolados de uma mesma estirpe de *Rhizobium japonicum*. **R. bras. Ci. Solo**, v. 8, p.193-196, 1984.
- PETERS, N. K.; FROST, J. W.; LONG, S. R. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. **Science**, v.233, p.977-980, 1986.
- REPASKE, R. & MAIER, R. Dense autotrophic cultures of *Alcaligenes eutrophus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.32, p.592-597, 1976.

- RUMJANEK, N. G.; DOBERT, R. C.; TRIPLETT, E. W. Characterization of Brazilian soybean inoculant as group II strains of *B. japonicum*. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W. E. ed. **New Horizons in Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993a. p.648.
- RUMJANEK, N. G.; DOBERT, R. C.; VAN BERKUM, P.; TRIPLETT, E. W. Common soybean inoculant strains in Brazil are members of *Bradyrhizobium elkanii*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.59, p.4371-4373, 1993b.
- SÁ, N. M. H.; SCOTTI, M. R.; PAIVA, E.; FRANCO, A.; DÖBEREINER, J. Selection and characterization of *Rhizobium* spp strains stable and capable of fixing nitrogen in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Rev. Microbiol.**, v. 24, p.38-46, 1993.
- SADOWSKY, M. J.; CREGAN, P. B. The soybean *Rj₁* allele restricts nodulation by *Bradyrhizobium japonicum* serogroup 123 strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.58, p.720-723, 1992.
- SANJUAN, J.; CARLSON, R. W.; BHAT, U. R.; SPAINK, H. P.; VAN BRUSSEL, T.; STOKKERMAN, T.; PETERS, K.; GLUSHKA, J.; LUGTENBERG, B. J. J.; STACEY, G. *Bradyrhizobium japonicum* strains produce multiple 2-*O*-methylfucose-containing lipo-oligosaccharide nodulating signals. In: PALACIOS, R.; MORA, J. NEWTON, W.E. ed. **New Horizons in Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1993. p.177-182.
- SCHUBERT, K. R.; EVANS, H. J. Hydrogen evolution: a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.73, p.1207-1211, 1976.
- SCOTTI, M. R. M.; SÁ, N. M. H.; VARGAS, M. A. T.; DÖBEREINER, J. Streptomycin resistance of *Rhizobium* isolates from Brazilian cerrados. **An. Acad. bras. Ci.**, v.54, p.733-738, 1982.
- SEGOVIA, L.; YOUNG, J. P. W.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.43, p.374-377, 1993.
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Methods in legume-*Rhizobium* technology**. Hawaii: Niftal, 1985. 367p
- SPRENT, J. I.; THOMAS, R. J. Nitrogen nutrition of seedling grain legumes: some taxonomic, morphological and physiological constraints. **Plant Cell Environ.**, v.7, p.637-645, 1984.
- STANLEY, J. S.; BROWN, G. G.; VERMA, D. P. S. Slow-growing *Rhizobium japonicum* comprises two highly divergent symbiotic types. **J. Bacteriol.**, v.163, p.148-154, 1985.
- SUTTON, W. D. Nodule development and senescence. In: BROUGHTON, W.J. ed. **Nitrogen Fixation**. Oxford: Clarendon Press, 1983. p.144-212.
- TEANEY, G. B.; FUHRMANN, J. J. Soybean response to nodulation by bradyrhizobia differing in rhizobitoxine phenotype. **Pl. Soil**, v.145, p.275-285, 1992.

- TRIPLETT, E. W. The molecular genetics of nodulation competitiveness in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v.3, p.199-206, 1990a.
- TRIPLETT, E. W. Construction of a symbiotically effective strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with increased nodulation competitiveness. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.56, p.98-103, 1990b.
- VARGAS, M. A. T.; MENDES, I. C.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. **Dois novas estirpes de rizóbio para a inoculação da soja**. Brasília: EMBRAPA-CPAC, 1992. 3p. (EMBRAPA-CPAC. Comunicado Técnico, 62)
- VARGAS, M.A.T.; PERES, J.R.R.; MENDES, I.C.; SUHET, A.R. Resposta de lentilha à inoculação e à adubação nitrogenada em um solo de cerrados. **R. bras. Ci. Solo**, v.18, p.147-149, 1994.
- VASILAS, B. L. ; FUHRMANN, J. J. Field response of soybean to nodulation by a rhizobiotoxine-producing strain of *Bradyrhizobium*. **Agron. J.**, v.85, p.302-305, 1993.
- VASSE, J:M.; TRUCHET, G.L. The *Rhizobium*-legume symbiosis: observation of root infection by bright-field microscopy after staining with methylene blue. **Planta**, v.161, p.487-489, 1984.
- YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the phototropic *Rhizobium* strain BTAi 1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **J. Bacteriol.**, v.173, p.2271-2277, 1991.
- YOUNG, P. J. W.; MARTÍNEZ, E.; BARNET, Y.; COOPER, J.; LINDSTRÖM, K. Report from the taxonomy meeting, subcommittee on *Agrobacterium* and *Rhizobium*. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W. E. ed. **New Horizons in Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1993. p.777-778.
- WILLIAMS, L. E.; PHILLIPS, D. A. Increased soybean productivity with a *Rhizobium japonicum* mutant. **Crop Sci.**, v.23, p.246-250, 1983.
- ZAAT, S. A. J.; VAN BRUSSEL, A. A. N.; TAK, T.; PEES, E.; LUGTENBERG, B. J. J. Flavonoids induce *Rhizobium leguminosarum* to produce *nodDABC* gene-related factors that cause thick, short roots and root hair responses on common vetch. **J. Bacteriol.**, v.169, p.3388-3391, 1987.
- ZABLOTOWICZ, R. M.; RUSSEL, S. A.; EVANS, H. J. Effect of the hydrogenase system in *Rhizobium japonicum* on the nitrogen fixation and growth of soybeans at different stages of development. **Agron. J.**, v.72, p.555-559, 1980.
- ZDOR, R. E.; PUEPPKE, S. G. Nodulation competitiveness of Tn5-induced mutants of *Rhizobium fredii* USDA 208 that are altered in motility and extracellular polysaccharide production. **Can. J. Microbiol.**, v.37, p.52-58, 1991.

CAPÍTULO 15

TÉCNICAS DE MELHORAMENTO DA PLANTA HOSPEDEIRA PARA INCREMENTAR A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO: O CASO DO FEIJOEIRO

Pedro A. Arraes Pereira¹

15.1. Introdução

Embora, na maioria das leguminosas, a deficiência de nitrogênio possa ser tão limitante à produtividade, como as doenças, nos programas de melhoramento, geralmente, a resistência a doenças tem sido prioritária em relação a fatores que aumentam a eficiência da fixação de N_2 (Pereira et al., 1993).

O método mais simples de melhoramento para aumentar a capacidade de fixação do feijoeiro é identificar "landraces" (mistura de linhas puras que são cultivadas, há longo tempo, pelos agricultores) com alta capacidade de fixação de N_2 adaptadas para a região. Muitas vezes, estas landraces possuem defeitos, como baixa resistência a algumas doenças e baixo potencial produtivo. Assim, cabe ao melhorista transferir, usando métodos apropriados de melhoramento, essas outras características das cultivares locais com alta capacidade de fixação de N_2 . Por outro lado, se as cultivares de feijão recomendadas não apresentarem alta capacidade de fixação de N_2 , o melhorista deve traçar uma estratégia para conseguir incorporar o alto potencial de fixação de N_2 nas cultivares locais.

Nestes últimos 15 anos, diversos estudos de muitos programas identificaram genótipos de feijão superiores para fixação biológica de N_2 . Progenitores superiores com maior capacidade de fixação de N_2 são encontrados, com razoável abundância, nos diferentes tipos de grão comercialmente aceitos no Brasil (Franco & Döbereiner, 1967; Pessanha et al., 1972; Westerman & Kolar, 1978; Graham & Rosas, 1979; Pereira, 1982; Attewell & Bliss, 1985; St. Clair, 1986; Pereira & Bliss, 1989; Pereira et al., 1993).

São poucos, porém, os estudos sobre herdabilidade e os efeitos da interação genótipos x ambiente conduzidos com caracteres relacionados à fixação de N_2 pelo feijoeiro em condições de campo. Um desses estudos indica que a interação entre famílias e anos para o caractere da atividade da nitrogenase, avaliado pelo método de redução de acetileno, foi significativa em condições de campo (McFerson, 1983), assim como a herdabilidade, no sentido amplo, para redução de acetileno e produtividade. Entretanto, as estimativas da herdabilidade para características relacionadas com a fixação de N_2 são de intermediárias a baixas, sugerindo métodos de melhoramento em que as unidades de seleção possam ser avaliadas em vários ambientes.

¹ Pesquisador, Ph.D., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP), Cx. Postal 179, CEP 74001-970, Goiânia, GO.

Finalmente, para identificação de "landraces" ou das famílias de feijão superiores para fixação biológica de N_2 , o ponto mais importante é que os ensaios de competição de cultivares devem ser conduzidos em solos com baixo teor de nitrogênio, para favorecer o processo de seleção de famílias superiores para fixação de N_2 .

15.2. Técnicas de Híbridação do Feijoeiro

A maioria dos cruzamentos   efetuada em casa de vegeta o e telados, pois as condi es de temperatura são mais favoráveis para o sucesso da hibrida o. As sementes de feijão podem ser semeadas em vasos de plástico ou de cerâmica contendo um substrato adequado para o crescimento das plantas.

As sementes devem ser inoculadas com uma estirpe efetiva de rizóbio, além das quantidades adequadas de N, P e K e dos micronutrientes Ca, Zn, Bo, Mg e Mo, particularmente importantes para o crescimento das plantas de feijão. Solos com alto teor de alumínio e baixo pH devem ser evitados. O pH do solo deve estar na faixa de 6 a 6,5.

As plantas de feijão são bastante sensíveis ao excesso e   falta de  gua. A falta de água pode causar o aborto de flores e de pequenas vagens já fertilizadas (Coyne, 1968). A alta umidade reduz a disseca o das flores, depois da emascula o, e conduz a uma alta porcentagem de pega dos cruzamentos. A rega das bancadas e do piso das casas de vegeta o, em dias de muito calor, aumenta a propor o de sucesso nos cruzamentos.

Quando são efetuados cruzamentos de feijões silvestres, ou culturas de ciclos muito diferentes, com feijão cultivado, torna-se importante o escalonamento do plantio dos progenitores machos e fêmeas, para que haja coincidência da flora o. Neste aspecto, deve-se observar que o feijoeiro comum   uma planta originária de dias curtos e baixas latitudes.

A faixa de temperatura ótima para reprodu o do feijoeiro varia entre 15  C e 27  C. Temperaturas abaixo de 15  C podem ocasionar botões florais muito reduzidos, dificultando a opera o do cruzamento; enquanto temperaturas acima de 30  C são danosas   flora o e   reprodu o.

Outro aspecto essencial para o sucesso dos cruzamentos   que as plantas estejam livres de doenças e pragas. Na casa de vegeta o, particularmente, ocorrem com mais freq ncia o ódio, podridões radiculares, ácaros, minador-da-folha e mosca-branca. Assim, a aplica o de defensivos adequados torna-se imprescindível.

O feijoeiro comum   uma espécie de autopoliniza o, na qual pode-se assumir que, em condi es de casa de vegeta o, não há ocorrência de fecunda o cruzada. A autopoliniza o do feijoeiro ocorre no final do período de forma o do botão floral, mais freqüentemente   noite. Logo após a autopoliniza o, o tubo polínico inicia o seu desenvolvimento (Williams, 1962). A abertura das flores ocorre nas primeiras horas da manhã, sendo este horário o mais apropriado para se fazer os cruzamentos. Para se fazer uma hibrida o artificial   necessário uma pinça fina, um pequeno vidro com álcool, fita adesiva transparente e etiquetas de relojoeiro.

O estigma é receptivo dois dias antes e um dia depois da antese. Os botões florais mais desenvolvidos, e que normalmente apresentam estrias na base, são os que devem ser escolhidos como fêmeas. Após a escolha dos botões, deve-se segurá-los com dedo o polegar e o indicador, abrir o estandarte com a pinça e forçar as asas para baixo até que o estigma saia fora da guilha, possibilitando a inserção junto ao estigma da flor fêmea de um estigma coberto de pólen da planta macho (Figura 15.1).

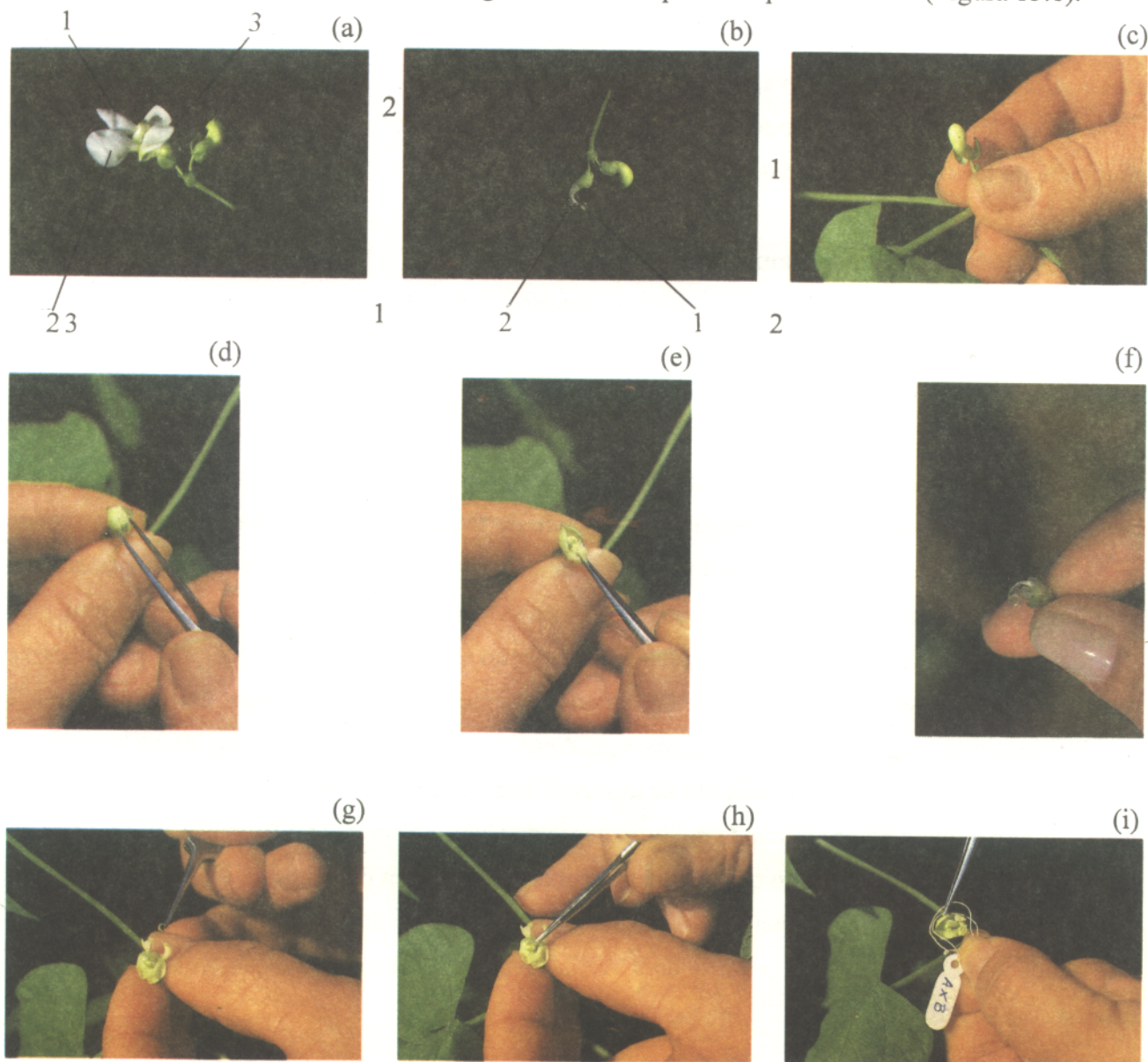


FIGURA 15.1. Estrutura floral do feijoeiro e etapas no cruzamento do feijao: (a) estrutura floral do feijoeiro: 1) guilha; 2) estandarte; e 3) asas; (b) 1) estigma; e 2) anteras; (c) botão floral no estágio ideal para fazer cruzamento; (d) abertura da flor para fazer cruzamento; (e) pressão das asas com a pinça para o aparecimento do estigma; (f) estigma coberto de grão de pólen a ser usado para a polinização; (g) e (h) polinização inserindo-se o estigma com grão de pólen junto ao estigma da flor; e (i) etiquetagem da flor.

Em seguida, para evitar dissecação, borrifa-se com um pulverizador de plantas ornamentais e coloca-se fita isolante transparente no botão floral polinizado. Para identificar o cruzamento, usam-se as etiquetas de relojoeiro, sempre com o nome da fêmea em primeiro lugar e, depois, o do macho. É importante retirar todos os outros botões florais do mesmo ráculo onde foi feito o cruzamento. Diariamente, deve-se eliminar as flores abertas e as pequenas vagens provenientes de autopolinização. Nunca se deve fazer muitos cruzamentos por planta, para evitar competição entre as vagens e propiciar maior número de sementes por vagem.

A polinização cruzada pode ser feita com ou sem emasculação (Buishand, 1956). Entretanto, a eficiência da técnica sem emasculação é muito maior.

15.2.1. Método do Retrocruzamento Modificado

O método do retrocruzamento modificado, que originalmente foi proposto para estimar o número de genes que controlam uma característica quantitativa (Wehrhahn & Allard, 1965), tem sido usado para transferir genes de "background" exótico para o feijão cultivado (McFerson, 1983; Pereira & Bliss, 1989).

O método consiste em se fazer um cruzamento entre progenitor com características agrônômicas apropriadas e um progenitor com alta capacidade de fixação de N_2 (Figura 15.2). Produzem-se cerca de dez sementes F_1 , que são usadas como plantas macho para fazer o primeiro retrocruzamento com o pai recorrente, planta fêmea. Neste caso, é necessário fazer em torno de 20 cruzamentos para obterem-se 60-100 sementes RC_1 . Essas sementes deverão ser plantadas individualmente em vasos e consideradas plantas fêmeas para o segundo retrocruzamento, quando cada planta, individualmente, é cruzada com o pai recorrente pela segunda vez. Após, as sementes RC_2 , obtidas de cada uma das plantas RC_1 , são avançadas pelo método de descendência de uma semente.

A experiência do programa de melhoramento do Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP) indica que, mesmo quando se usam cruzamentos bem distantes, como feijões silvestres com feijões cultivados, com apenas um retrocruzamento e duas autofecundações, as famílias são surpreendentemente uniformes, permitindo a avaliação da capacidade de fixação biológica de N_2 em ensaios com repetição.

15.2.2. Método da Descendência Única e suas Variações

Após a publicação do artigo que descreve este método, divulgado na década de 60 (Brim, 1966), quase todos os melhoristas de soja passaram a usá-lo intensivamente.

No caso do feijoeiro comum, mais recentemente, o SSD e, também, o método de linhas derivadas de F_2 têm sido utilizados para o melhoramento de diversas características, entre elas, a capacidade de fixação de N_2 .

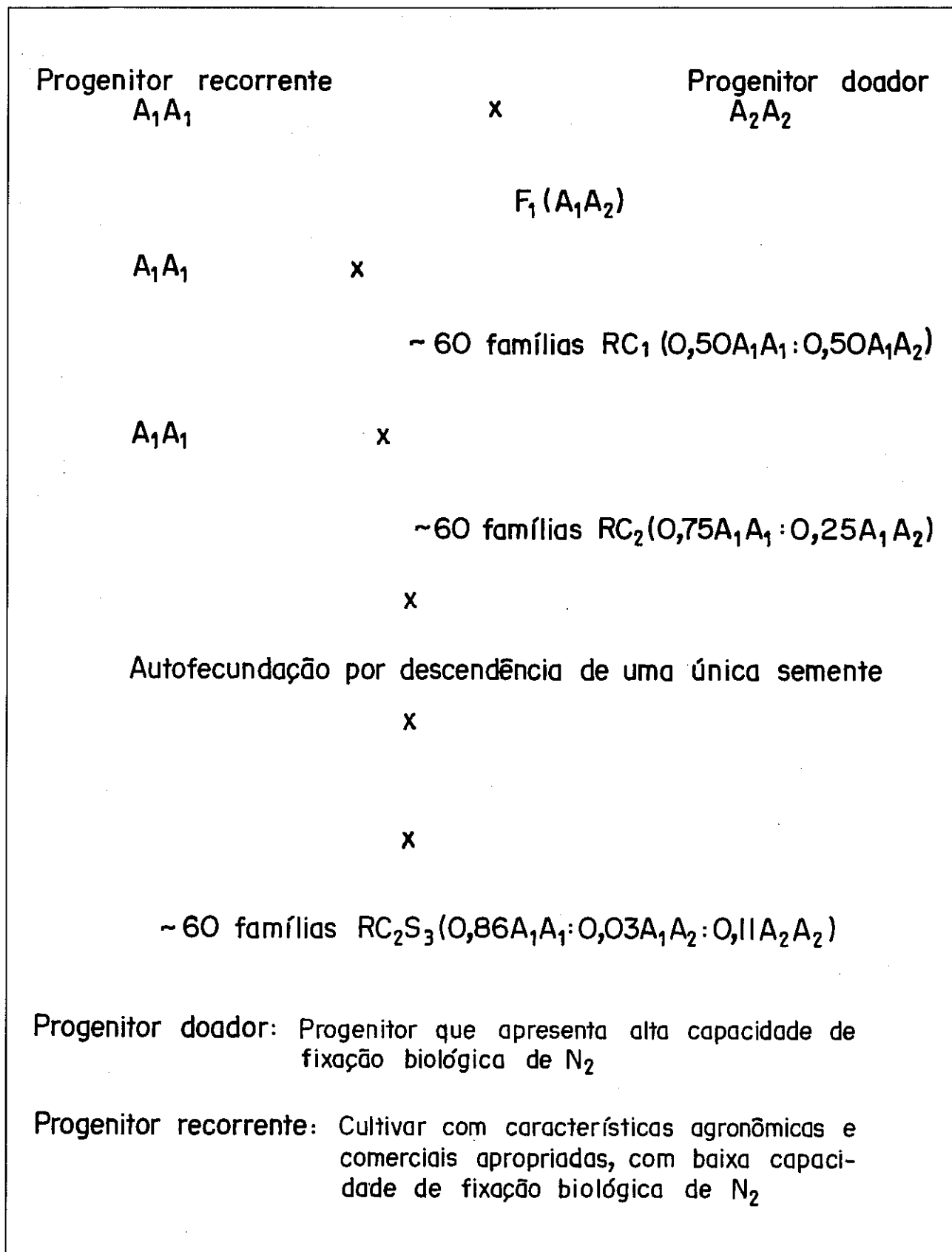


FIGURA 15.2. Método de retrocruzamento modificado.

O método consiste em fazer um cruzamento entre um progenitor com características agrônômicas desejáveis e um progenitor com alta capacidade de fixação biológica de N_2 . Produz-se em torno de 60-100 sementes F_1 que devem ser conduzidas por descendência única até a pelo menos a geração F_5 , quando as famílias F_5 podem ser avaliadas quanto à capacidade de fixação de N_2 (Figura 15.3).

Outra possibilidade é o método de famílias derivadas de F_2 . Em vez de avançarem-se as gerações F_3 , F_4 sem nenhuma seleção para fixação de N_2 , pode-se avaliar as famílias F_3 provenientes das sementes F_2 usando-se testemunhas intercalares que podem ser os pais usados no cruzamento. Colhe-se, assim, cada família em "bulk" e a partir da geração F_4 já se tem número de sementes suficientes por famílias para se avaliar a fixação em diversos ambientes (Figura 15.4).

15.3. Critérios de Seleção

A escolha do critério de seleção é uma das mais importantes decisões em um programa de melhoramento visando aumentar a fixação biológica de N_2 . A necessidade de se avaliar um grande número de plantas requer que o critério de seleção possua qualidades essenciais, como precisão, eficiência e reprodutividade em relação ao "ranking" das unidades de seleção.

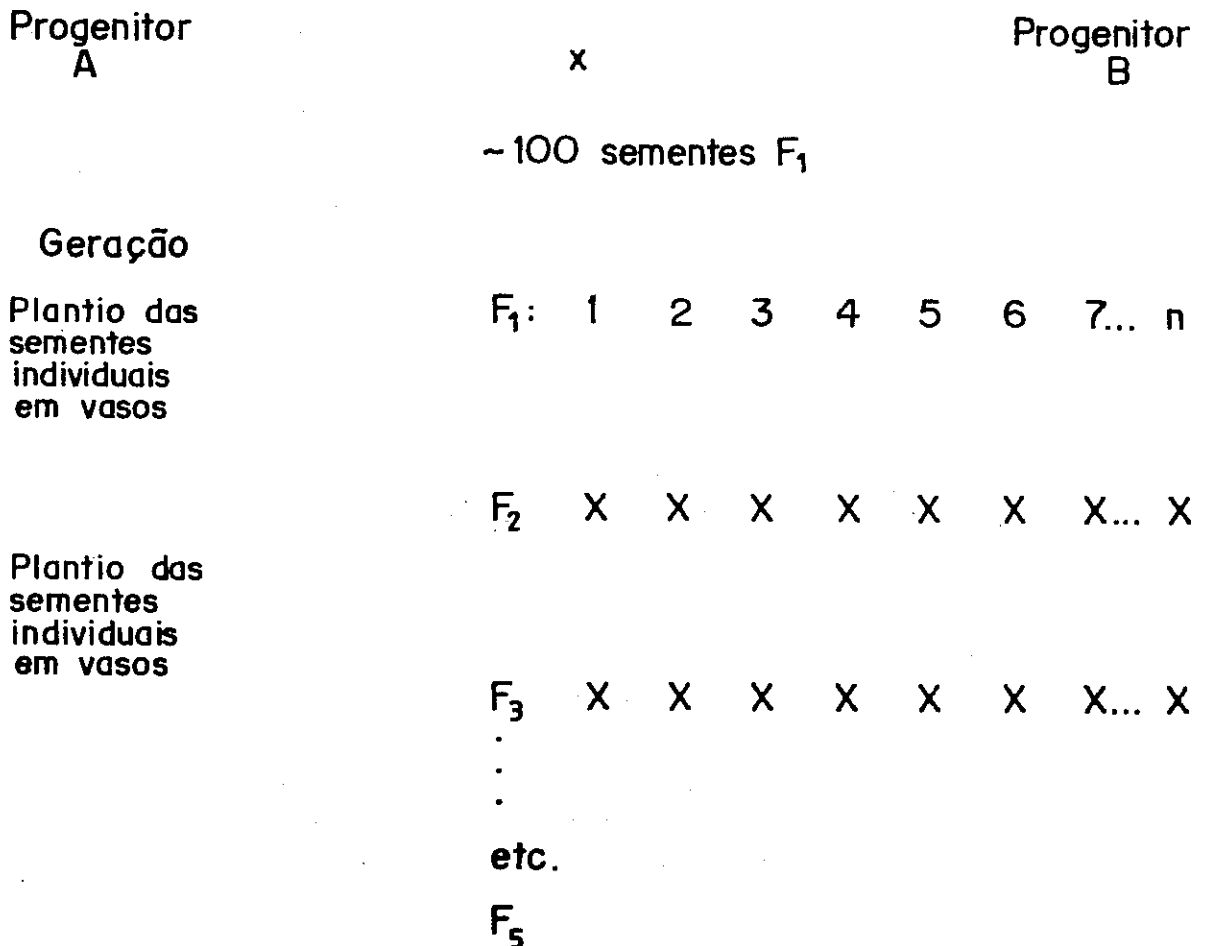


FIGURA 15.3. Método de descendência de uma semente.

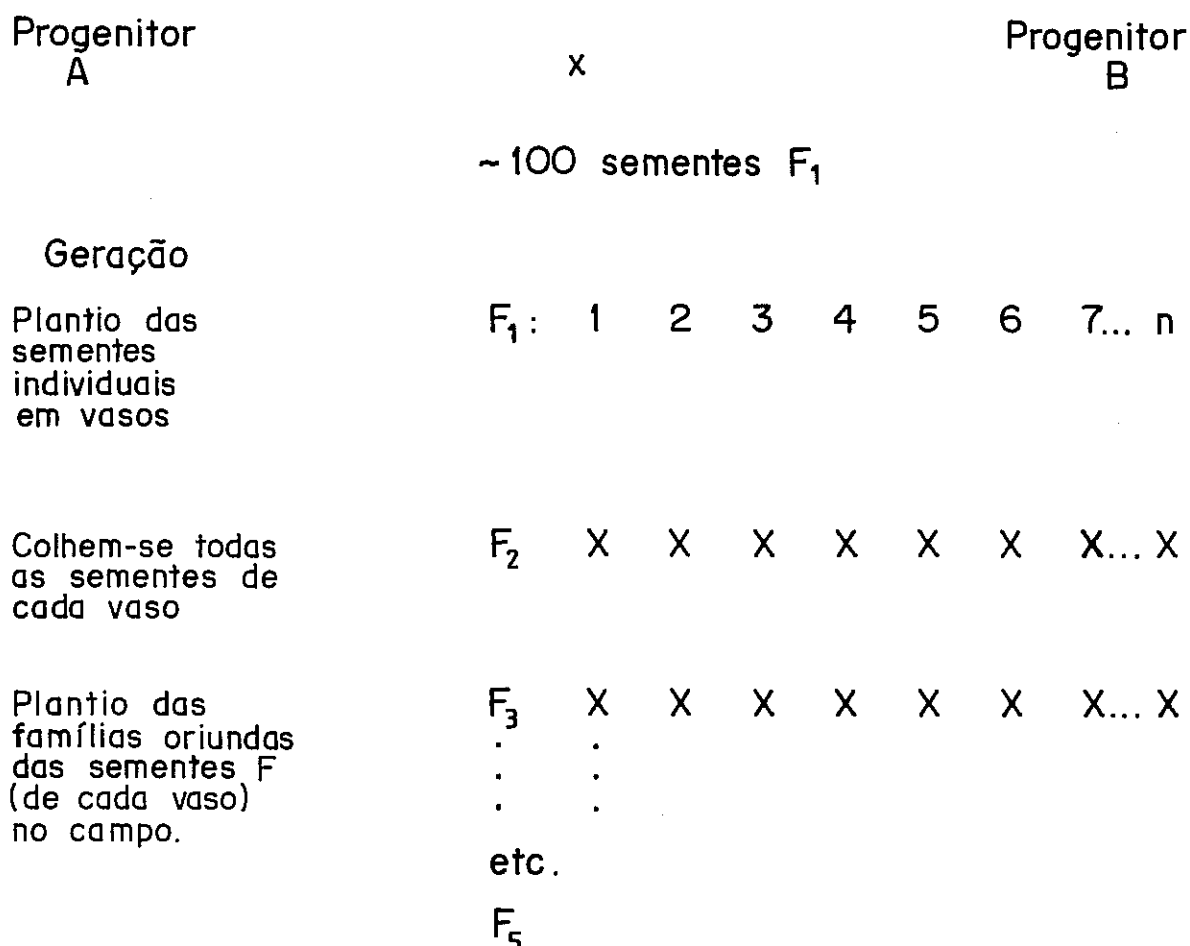


FIGURA 15.4. Método de famílias derivadas de F_1 .

Para avaliar a fixação de N_2 , podem-se dividir os critérios de seleção em dois grandes grupos: métodos diretos e métodos indiretos.

15.3.1. Métodos Diretos

São os métodos em que se usa a técnica do isótopo de nitrogênio (^{15}N). Pela sua complexidade e alto custo, este método tem aplicação limitada em programas de melhoramento, em que o número de genótipos avaliados é muito grande. Entretanto, ele pode ser útil para discriminar progenitores para os cruzamentos e linhagens superiores, geradas após diversos ciclos de seleção.

15.3.2. Métodos Indiretos

São os métodos que têm maior aplicabilidade em programas de melhoramento genético. O peso da parte aérea seca e o nitrogênio total no estágio R_7 de desenvolvimento do feijoeiro e a produtividade são os critérios que têm sido usados mais extensivamente na avaliação da capacidade de fixação de N_2 em populações segregantes. Outro critério bastante eficiente é o nitrogênio total nos

grãos, que combina o teor de N com a produtividade de grãos. Os métodos que envolvem o acúmulo de peso seco e o conteúdo de nitrogênio do feijoeiro aumentam bastante a precisão com o uso de plantas não nodulantes de feijão como testemunhas na avaliação das populações segregantes. Estas plantas não nodulantes, além de possibilitarem o conhecimento do status de nitrogênio do solo, propiciam uma estimativa bastante precisa da quantidade de nitrogênio fixada pelas populações segregantes.

As características relacionadas com a nodulação, assim como o método de redução de acetileno, também têm aplicação limitada em programas de melhoramento genético, pois são bastante trabalhosos, devido ao problema de amostragem do sistema radicular no campo. Conseqüentemente, apresentam baixa reprodutibilidade, o que dificulta a seleção dos genótipos promissores.

15.4. Referências Bibliográficas

- ATTEWELL, J.; BLISS, F.A. Host plant characteristics of common bean lines selected using indirect measures of N_2 fixation. In: EVANS, H.J.; BOTTOMLEY, P.S.; NEWTON, W.E. ed. **Nitrogen fixation research progress**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985. p.3-9.
- BRIM, C.A. A modified pedigree method of selection in soybeans. **Crop Sci.**, v.6, p.220, 1966.
- BUIHAND, T.S. The crossing of beans (*Phaseolus* spp.). **Euphytica**, v.5, p.41-50, 1956.
- COYNE, D.P. Species hybridization in *Phaseolus*. **J. Hered.**, v.55, p.5-6, 1964.
- FRANCO, A.A.; DÖBEREINER, J. Especificidade hospedeira na simbiose com *Rhizobium* - feijão e influência de diferentes nutrientes. **Pesq. agropec. bras.**, v.2, p.467-474, 1967.
- GRAHAM, P.H.; ROSAS, J.C. Phosphorus fertilization and symbiotic nitrogen fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Agron. J.**, v.71, p.925-927, 1979.
- MCFERSON J.R. **Genetic and breeding studies of dinitrogen fixation in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Madison: University of Wisconsin, 1983. 146p. (Tese de Doutorado).
- PEREIRA, P.A.A. Fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro. **Inf. Agropec.**, v.8, p.41-48, 1982.
- PEREIRA, P.A.A.; BLISS, F.A. Selection of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) for N_2 fixation at different levels of available P under field and environment-controlled conditions. **Pl. Soil**, v.115, p.72-82, 1989.
- PEREIRA, P.A.A.; MIRANDA, B.D.; ATTEWELL, J.R.; KMIĘCIK, K.A.; BLISS, F.A. Selection for increased nodule number in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Pl. Soil**, v.148, p.203-209, 1993.

- PESSANHA, G.G.; FRANCO, A.A.; DÖBEREINER, J.; GROSZMAN, A.; BRITTO, D.P. Correlação negativa da nodulação com a produção de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos onde o nitrogênio é fator limitante. **Pesq. agropec. bras.**, v.7, p.49-56, 1972.
- ST. CLAIR, D.A. **Segregation, selection and population improvement for ¹⁵N-determined dinitrogen fixation ability in common bean**. Madison: University of Wisconsin, 1986. 90p.(Tese de Doutorado).
- WESTERMAN, D.T.; KOLAR, J.J. Symbiotic N₂ (C₂H₂) fixation by bean. **Crop Sci.**, v.18, p.986-990, 1978.
- WEHRHAHN, C.; ALLARD, R.W. The detection and measurement of the effect of individual genes involved in the inheritance of a quantitative character in wheat. **Genetic**, v.51, p.109-119, 1965.
- WILLIAMS, D.D.F. **Influence of soil moisture level on flower abscission, on ovule abortion and seed development in the snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Madison: University of Wisconsin, 1962. (Tese de Doutorado).

PARTE III. DIAZOTRÓFICOS ASSOCIATIVOS

CAPÍTULO 16

MÉTODOS DE ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS ASSOCIATIVOS FIXADORES DE N₂

Fátima Maria S. Moreira¹

16.1. Introdução

Várias espécies de microrganismos fixadores de N₂ não formam simbiose com plantas e podem viver livremente no solo ou estabelecendo relações denominadas associativas, menos especializadas do que as simbioses, com diversas plantas (Döbereiner & De Polli, 1980).

Atualmente são conhecidas as associações: *Azotobacter paspali* - *Paspalum notatum* (Döbereiner, 1966, 1970); *Derxia* e gramíneas (Campelo & Döbereiner, 1970), *Beijerinckia* spp. e cana-de-açúcar (Döbereiner, 1961; Ruschel, 1981); *Azospirillum* spp. (*A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*) e monocotiledôneas (gramíneas, cereais e palmeiras); (Bulow & Döbereiner, 1975; Döbereiner & Day, 1976; Vlassak & Reynders, 1978; Baldani & Döbereiner, 1979; Magalhães et al., 1983; Magalhães & Döbereiner, 1984); *Bacillus* spp. (*B. polymixa* e *B. azotofixans*) com cereais e gramíneas (Neal & Larson, 1976; Seldin et al., 1984, 1985; Heulin, 1992); *Pseudomonas* sp. e arroz (Barraquio & Watanabe, 1979; Barraquio et al., 1983); *Campylobacter* spp. e *Spartina alterniflora* (McClung & Patriquin, 1980); *Herbaspirillum seropedicae* e cereais (Baldani et al., 1986) e *Acetobacter diazotrophicus* e cana-de-açúcar (Cavalcante & Döbereiner, 1988; Gillis et al., 1989). Com exceção de *Campylobacter* (que ocorre em pântanos salinos), todas estas espécies ocorrem em solos agrícolas.

Esses microrganismos são, geralmente, aeróbios e têm como sistemas de proteção da nitrogenase contra o O₂ os seguintes mecanismos:

a) proteção respiratória - Dalton & Postgate (1969) foram os primeiros a sugerirem que a alta atividade respiratória encontrada em *Azotobacter* spp. seria um mecanismo de proteção do sítio da nitrogenase contra o O₂. As células de *Azotobacter* são capazes de ajustar, até um certo nível, seu coeficiente respiratório, de modo a manter a concentração de O₂ na superfície da célula igual a zero. Isto significa, por exemplo, que se a pO₂ de uma cultura de *Azotobacter*, fixando N₂, for aumentada, as células passam a respirar mais rapidamente, procurando consumir todo o oxigênio através de respiração não acoplada à geração de ATP e gastando excessivamente as fontes de carbono.

¹ Professora Adjunta, Ph.D., Escola Superior de Agricultura de Lavras, Cx. Postal 37, CEP 37200-000, Lavras, MG.

- b) proteção conformacional da nitrogenase - também em *Azotobacter* sp., existem formas da nitrogenase conformacionalmente protegidas, ou seja, se a pO₂ na cultura aumentar além da capacidade respiratória das células, a enzima muda a sua forma parcial para proteger os pontos sensíveis ao oxigênio. Dalton & Postgate (1969) explicam o mecanismo em termos de “switch off” (desliga) e “switch on” (liga). Assim, quando há excesso de O₂ a enzima se “desliga” e se o oxigênio cair a uma pO₂ satisfatória, a enzima “liga”, voltando então a sua forma ativa.
- c) produção de polissacarídeos extracelulares - muitas espécies produzem quantidades copiosas de polissacarídeos extracelulares, e sua composição varia entre as espécies (Mulder & Brotonegoro, 1974). Células de *Derxia* spp. e *Beijerinckia* spp., por exemplo, produzem abundantemente um tipo de goma que torna suas colônias, em determinadas condições, extremamente elásticas. Acredita-se que a produção de polissacarídeos serve para impedir o acesso de O₂ ao centro das colônias.
- d) tamanho das células - as células de algumas espécies, como *Azotobacter*, têm geralmente tamanho maior em relação à média das bactérias (1,5 μm a 2,0 μm). A baixa relação superfície/conteúdo celular seria um modo de impedir o excesso de absorção de O₂ (Mulder & Brotonegoro, 1974).
- e) locomoção para sítios de pO₂ adequada - por não possuírem mecanismos de proteção mais eficientes, certas espécies de bactérias aeróbias, quando fixam N₂, são microaerofílicas quando fixam N₂. Espécies dos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum*, por exemplo, têm um movimento ondulatório típico e são capazes de crescer em meio semi-sólido, sem nitrogênio, sob pO₂ atmosférico, pois, em meios com esta consistência, ocorre um gradiente de difusão de O₂, de modo que as células podem se mover até uma zona onde a pO₂ seja adequada. Com a multiplicação das células, elas se aglomeram e se movem em direção à superfície do meio, formando uma película característica no ponto onde a pO₂ é adequada. Se, por ação mecânica, a película for quebrada, a atividade da nitrogenase cessará e só será restabelecida quando a película voltar a se formar (Döbereiner, 1980).

Graças a esses mecanismos é possível o isolamento seletivo de vários organismos aeróbios fixadores de N₂, utilizando meios de cultura sem nitrogênio na forma combinada. Só bactérias fixadoras de N₂ podem crescer utilizando N₂, embora algumas espécies necessitem de pequenas quantidades de nitrogênio combinado como estímulo inicial para o crescimento (Watanabe & Barraquio, 1979). Mesmo sem adição de N combinado ao meio de cultura, algumas espécies não fixadoras, denominadas “scavengers”, conseguem utilizar, eficientemente, traços de nitrogênio que geralmente existem nos outros compostos adicionados ao meio de cultura. Outras espécies não fixadoras também podem crescer como contaminantes à custa da amônia excretada no meio de cultura pelas bactérias fixadoras de N₂. Por isso, outras características do meio devem restringir-se às exigências da espécie fixadora de N₂ em questão, não só para favorecer seu crescimento, como também para limitar o crescimento de contaminantes.

16.2. Métodos de Isolamento e Identificação

16.2.1. *Azotobacter paspali*

Meio de cultura

Esta espécie só foi encontrada na rizosfera de *Paspalum notatum* var. *batatais*.

Meio de isolamento: LG + CaCO₃ (Döbereiner, 1970)

Sacarose	20,00 g
K ₂ HPO ₄	0,05 g
KH ₂ PO ₄	0,15 g
CaCl ₂	0,01 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,002g
FeCl ₃	0,01 g
Azul de bromotimol (0,5% em etanol)	2,0 mL
CaCO ₃	1,0 g
Ágar	15,00 g
Água	1000 mL
pH	aproximadamente 6,8 (verde)

Procedimento

Inocular as placas, contendo este meio, com 20 mg a 50 mg (por placa) de solo rizoplano de *Paspalum notatum*. Este solo pode ser espalhado diretamente das raízes para as placas ou, então, passado previamente em peneira de seda e pesado. As placas devem ser incubadas a 35°C. Após 48 horas, aparecem colônias amarelas densas, que alcalinizam o meio (tornando-o azul). Repicar as colônias isoladas para placas. Repetir este procedimento por três vezes, sempre 48 horas após repicagem para obtenção de culturas puras. As células de *A. paspali* são grandes e apresentam polimorfismo acentuado.

Alternativamente, *Azotobacter paspali* pode ser isolada em placas de sílica-gel (ver em isolamento de *Beijerinckia*) de Winogradsky, impregnadas com solução de sais com pH 6,5 e citrato de cálcio como fonte de carbono. Contudo, o meio anteriormente descrito é mais recomendado, pois fornece resultados satisfatórios, além de ser mais fácil de preparar.

Becking (1981) assinala que é fácil diferenciar *Azotobacter paspali* das outras espécies de *Azotobacter* em placas de sílica-gel com citrato de cálcio. Colônias relativamente pequenas aparecem quatro a cinco dias após a inoculação, produzindo um pigmento amarelo forte que se difunde no meio, abaixo das colônias. Elas também solubilizam o citrato de cálcio, dando aparência de pequenos buracos no meio. Posteriormente, as colônias espalham-se rapidamente.

16.2.2. *Derxia* sp.

Meio de cultura

O procedimento utilizado para isolamento de *Derxia* é o mesmo descrito para *Azotobacter paspali*, mas com as seguintes modificações do meio de cultura:

- substituir a sacarose pela mesma quantidade de glicose ou amido (20 g/L);
- omitir CaCO₃;
- adicionar 0,01 g de HCO₃.

Procedimento

O meio pode ser inoculado com pequenos pedaços de raízes ou solo (rizosférico e não rizosférico). Colônias de *Derxia* são características, apresentando coloração marrom-alaranjada e consistência elástica (Figura 16.1), dificultando a retirada de pedaços da mesma. As células apresentam polimorfismo acentuado (Figura 16.2) e podem, às vezes, estar contidas em envelopes de goma espessa (Figura 16.3). A checagem da pureza dos isolados pode ser feita, alternativamente, em meio “bata-ta” (Figura 16.4), que será descrito posteriormente, ou em meio GNA (Difco “nutrient broth” 10 g/L; glicose - 20 g/L; ágar - 20 g/L) (Figura 16.5).

Condições de alta umidade no solo parecem favorecer a ocorrência deste gênero (Campelo & Döbereiner, 1970; Magalhães, 1981).

16.2.3. *Beijerinckia* spp.

Meios de cultura e Procedimentos

Meio: sílica-gel

Misturar e agitar em partes iguais: HCl (d= 1,1) e silicato de sódio (d= 1,06). Distribuir 30 mL em cada fundo de placa e deixar solidificar por 24 a 48 horas, aproximadamente. Lavar em água corrente por 72 horas até lavagem completa do cloreto e, depois, em água destilada. A presença de cloreto pode ser verificada adicionando-se uma gota de AgNO₃ (1%) e observando a formação de um precipitado branco (indicativo de cloreto). Mergulhar, cinco vezes, em água destilada fervendo. Adicionar, em cada placa, 2 mL de solução de sais de Winogradsky (pH 6,5) com 20% de glicose recém-fervida. Colocar em estufa a 60° C, até que todo o líquido evapore, não deixando ocorrer rachaduras no meio. Inocular com 50 mg a 200 mg de solo peneirado ou pequenos pedaços de raízes de cana ou cereais.

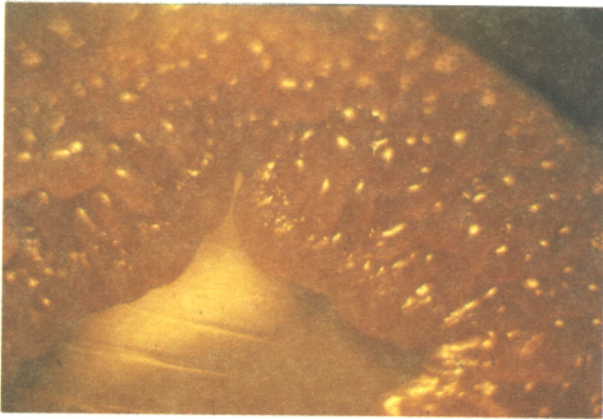


FIGURA 16.1. Colônia de *Derrxia* sp. em meio LG.



FIGURA 16.2. Células de *Derrxia* sp. em meio batata sólido.

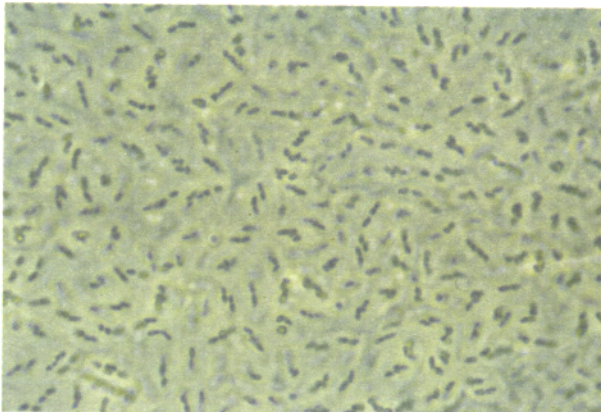


FIGURA 16.3. Células de *Derrxia* sp. em meio Nfb semi-sólido (ácido málico substituído por manitol). Observar envelopes de goma circundando as células.

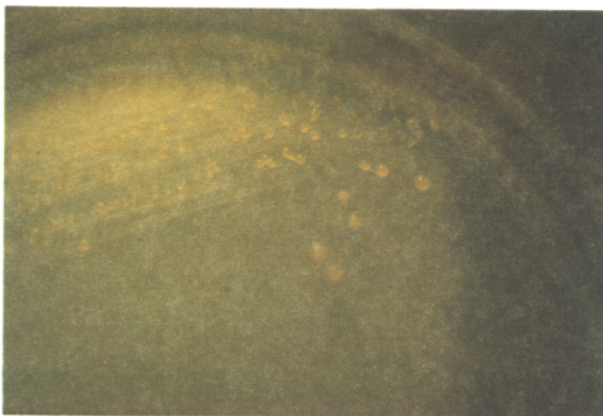


FIGURA 16.4. Colônia de *Derrxia* sp. em meio batata com 10 dias.

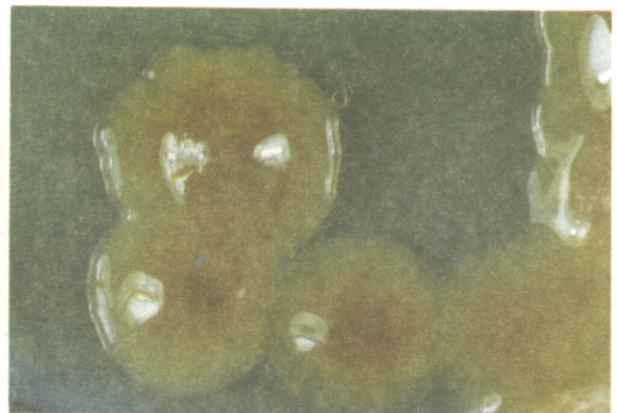


FIGURA 16.5. Colônia de *Derrxia* sp. em meio GNA com 11 dias.

Solução de sais de Winogradsky

Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,05 g
KH ₂ PO ₄	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,5 g
NaCl	2,5 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,05 g
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0,05 g

Completar com água destilada para 1000 mL e ajustar o pH para 6,5, com NaOH concentrado.

Incubar em estufa por 10 a 15 dias a 30° C. *Beijerinckia indica* e *B. fluminensis* são as espécies mais freqüentemente encontradas em solos tropicais. Colônias de *B. indica* são brancas, muito mucosas e elásticas. *B. fluminensis* produz colônias pequenas secas, irregulares, de cor bege e que não ficam elásticas.

A fixação de N₂ pode ser verificada em colônias intactas, através do método de redução de acetileno (ARA) (Dilworth, 1966). Para a purificação, dispersar as colônias em tubos com água e areia esterilizada e riscar em meio LG (sem CaCO₃).

Becking (1961) sugere, também, um meio líquido, em camada fina (de modo a possibilitar maior difusão de O₂) e extremamente ácido, pois espécies deste gênero são tolerantes à acidez. O meio apresenta a seguinte composição:

Meio de Becking para *Beijerinckia*

Glicose	20,0 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Água destilada	1000 mL
pH	5,0

O crescimento de *Beijerinckia* sp., neste meio, ocorre duas ou mais semanas após a inoculação (com solo ou raízes) e incubação a 30° C. A presença de células típicas de *Beijerinckia* pode ser confirmada ao microscópio: elas têm dois grânulos de PHB (poli β-hidroxibutirato), cada um em uma das extremidades da célula (Figura 16.6). *B. fluminensis* forma cápsula com várias células distintas e culturas mais velhas formam um líquido muito viscoso. Culturas líquidas positivas são repicadas para meio sólido com a seguinte composição:

Meio para isolamento de *Beijerinckia*

Glicose	20,0 g
K ₂ HPO ₄	0,8 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,025 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,005 g
CaCl ₂	0,05 g
Água destilada	1000 mL
pH	6,9

Neste caso, o pH é próximo à neutralidade para evitar a hidrólise do ágar em pH baixo, com a esterilização, impedindo a solidificação do meio. Neste meio e no anterior, a glicose deve ser esterilizada em separado. Dissolver em metade do volume de água e depois adicionar ao resto do meio.

Outras fontes de carbono podem substituir a glicose, de modo a estimular o crescimento de determinada espécie de *Beijerinckia* (Becking, 1984).

16.2.4. *Azospirillum* spp. (*A. lipoferum*, *A. brasilense* e *A. amazonense*) e *Herbaspirillum seropedicae*

Todas estas espécies têm a forma de bastonetes curvos, com movimento ondulatório típico e são capazes de crescer em meio semi-sólido sem nitrogênio combinado. São encontradas no solo, rizosfera e interior de raízes de várias espécies de gramíneas forrageiras e cereais. Características diferenciais entre as quatro espécies podem ser encontradas em Baldani et al. (1986).

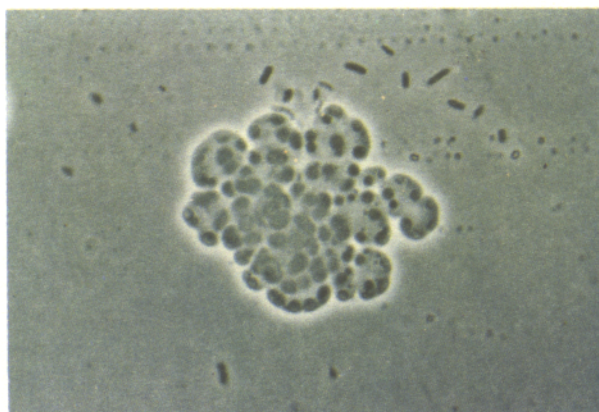


FIGURA 16.6. Cápsulas características de *Beijerinckia fluminensis*.

Meio para isolamento de *A. lipoferum*, *A. brasilense* e *H. seropedicae* (Meio Nfb)

Ácido málico	5,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,01 g
Solução de micronutrientes*	2 mL
Azul de bromotimol	(solução 0,5% em NaOH, 0,2N 2 ml)
Fe-EDTA (solução 1,64%)	4 mL
Completar com água destilada até 1000 mL e ajustar o pH para 6,8.	

Obs.: O meio semi-sólido pode ser distribuído em alíquotas de 4 mL em frasquinhos de 10 mL cada. O importante é que a relação entre a área da superfície e a profundidade do meio não exceda uma unidade (Döbereiner, 1980).

* Solução de micronutrientes

Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,2 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,235 g
H ₃ BO ₃	0,28 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,008 g

Meio semi-sólido	1,75 g de ágar/litro
Meio sólido	15 g de ágar/litro

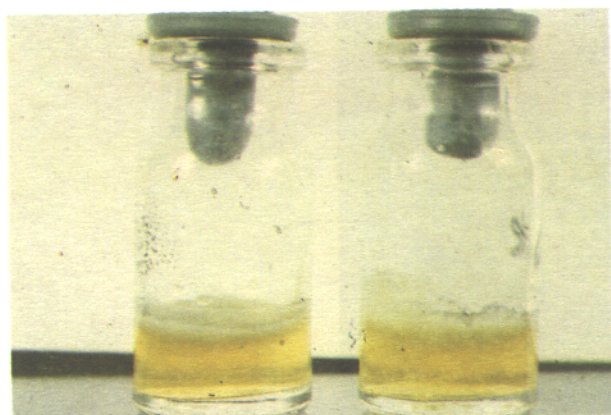


FIGURA 16.7. Película de *Azospirillum amazonense* em meio semi-sólido.

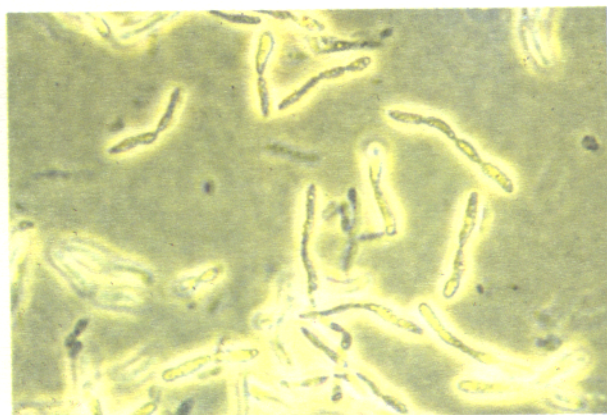


FIGURA 16.8. Células de *Azospirillum lipoferum* em meio semi-sólido com 14 dias.

16.2.4.1. Cultura de Enriquecimento

Em meio Nfb semi-sólido, colocar pequenas porções de solo, ou rizosfera, ou pequenos pedaços de raízes lavadas, ou esterilizadas superficialmente (mergulhar em solução de cloramina T a 1% por 10 min e, em seguida, lavar sucessivamente em: água, por 5 min; tampão fosfato, por 5 min; e novamente água, por 5 min, duas vezes).

A presença da(s) espécie(s) fixadora(s) pode ser confirmada pela formação de uma fina película próximo a superfície do meio (Figura 16.7) e pelo teste de redução do acetileno. Ao microscópio, as três espécies podem ser diferenciadas por sua forma. Em culturas mais velhas, *A. lipoferum* tem células grandes com polimorfismo (Figura 16.8) e movimento bem mais lento. *A. brasilense* tem células menores, com movimento muito ativo (espirilóide). As células de *H. seropedicae* são menores do que as de *A. brasilense* e têm movimento espirilóide somente perto das bolhas de ar ou na borda da lamínula.

16.2.4.2. Isolamento de *A. brasilense* e *H. seropedicae*

Repicar para meio NFb semi-sólido, aguardar a formação da película e riscar para meio NFb sólido com 50 mg/L de extrato de levedura. Após 5 dias, selecionar colônias isoladas. *A. brasilense* tem colônias turvas, secas, irregulares e densas. *H. seropedicae* tem colônias pequenas com centro mais escuro. Colônias isoladas devem ser repicadas novamente para o meio NFb semi-sólido.

A checagem de pureza deve ser feita pela medida da redução de acetileno e posterior repicagem de culturas ativas para meio batata.

Meio batata

200 g de batata

2,5 g de ácido málico + KOH

2,5 g de açúcar cristal

0,1 mg de biotina

2 mL de solução de micronutrientes do meio Nfb

Gotas de solução de azul de bromotimol a 0,5% em 0,2N de KOH.

Descascar as batatas, lavar, cortar e adicionar 300 mL de água. Colocar para cozinhar por 30 min. Paralelamente, adicionar 2,5 g de ácido málico, 50 mL de água destilada, com duas gotas de solução de azul de bromotimol a 0,5%, em KOH 0,2 N. Adicionar, aos poucos, pastilhas de KOH até o pH ficar em torno de 6,8 (verde). Em seguida, adicionar 2,5 g de açúcar cristal e 2 mL de solução de micronutrientes.

Decorridos os 30 min de cozimento da batata, filtrar a água do cozimento em algodão e adicionar à solução de ácido málico, açúcar cristal, micronutrientes e azul de bromotimol e 1 mL de vitamina, completando o volume com água destilada para 1000 mL. Em seguida, colocar 15 g de ágar.

16.2.4.3. Isolamento de *A. lipoferum* e *A. amazonense*

Repicar para frasco com NFb semi-sólido, onde o ácido málico foi substituído por glicose, na mesma quantidade. Aguardar a formação de película. Neste meio, as células de *A. lipoferum* são idênticas às células de *A. brasilense* em meio com ácido málico (*A. brasilense* não cresce em NFb glicose). Riscar em meio com NFb (mais 50 mg/L de extrato de levedura). Após 5 dias, repicar colônias isoladas para frascos com NFb glicose. Culturas com película e atividade de redução do acetileno, neste meio, devem ser checadas, quanto à pureza, em meio batata.

Em meio batata, colônias puras de *A. lipoferum* e *A. brasilense* têm, geralmente, cor creme ou levemente rosa, são secas e estruturadas (Figura 16.9). *H. seropedicae* forma colônias pequenas, levemente enrugadas, brancas, com o centro escuro e exalam odor característico.

A. amazonense cresce em meio semi-sólido formando película. Ao microscópio, as células são menores do que as de *A. brasilense* e têm movimento vibrióide muito ativo. Geralmente, podem ser observados três grânulos de PHB, em média, para cada célula. Culturas com película e atividade da redução de acetileno (ARA) devem ser repicadas, sucessivamente, para o meio LGI semi-sólido e LGI sólido.

Em meio LGI sólido, as colônias isoladas são densas, brancas e pequenas. A pureza das culturas finais em LGI semi-sólido com película e positivas na redução de acetileno deve ser checada em meio batata. Colônias características de *A. brasilense* são brancas e de bordas elevadas.

Meio LGI semi-sólido

Sacarose ou açúcar cristal	5 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,6 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,2 g
FeCl ₃	0,01 g
Azul de bromotimol (solução 0,5% em KOH 0,2 N)	5 mL
Água destilada	1000 mL
Meio semi-sólido	1,75 g de ágar/L
Meio sólido	15 g de ágar/L
Ajustar o pH para 6,0 a 6,2.	

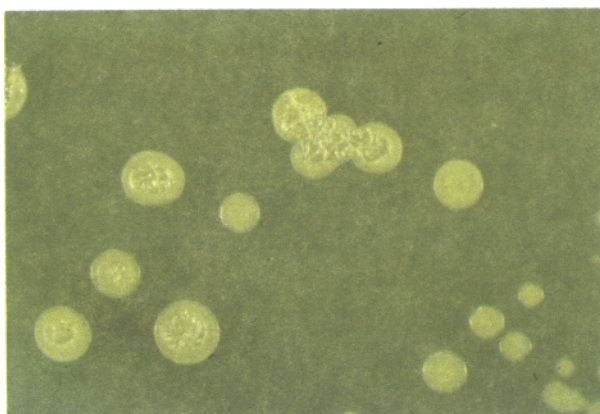


FIGURA 16.9. Colônias de *Azospirillum lipoferum* em meio batata.

16.2.5. *Acetobacter diazotrophicus* (Cavalcante & Döbereiner, 1988)

Meio de cultura

Meio de cultura para *A. diazotrophicus* (LGI-P)

Sacarose ou açúcar cristal	100 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,6 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,002 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,01 g
Azul de bromotimol (solução a 0,5% em 0,2N de KOH)	5 mL
Solução de vitaminas*	1 mL
Água destilada	1.000 mL
Extrato de levedura	50 mg
Meio semi-sólido	2,0g de ágar/L
Meio sólido	15 g de ágar/L

pH 5,5; utilizar ácido acético (solução a 10%) para atingir o pH necessário.

* Solução de vitaminas

Biotina	10 mg
Piridoxina HCl	20 mg
Água destilada	100 mL

Dissolver em banho-maria e manter na geladeira, esterilizar por filtração, para incorporação ao meio de cultura.

Meio caldo

Adicionar 1% de caldo de cana ao meio LGI-P, após dissolver o ágar.

Meio batata - P

Obter água do cozimento de 200 g de batata, conforme descrito para o meio batata.

Adicionar:

100 g de açúcar cristal,

2 mL de solução de micronutriente,

1 mL de solução vitamina,

Completar o volume para 1000 mL com água destilada

Ajustar o pH para 5,5 com ácido acético a 10%

Adicionar 25 g de ágar por litro.

Procedimento

Inocular solo de rizosfera, raízes ou colmos de cana-de-açúcar, triturados em solução de sacarose a 10% em meio LGI-P, semi-sólido, com 1% de caldo. Incubar por 10 dias, aguardando a formação de película característica branca, com fundo amarelo na superfície do meio. O meio fica descolorido. Repicar para LGI-P, semi-sólido, sem caldo. Após sete dias, repicar culturas com crescimento puro para placas de LGI - P sólido com 50 mg de extrato de levedura. Neste meio, as colônias são pequenas, irregulares e de cor laranja-avermelhada. Colônias isoladas devem ser repicadas para meio LGI-P semi-sólido sem caldo e, após 3 a 5 dias da inoculação, a pureza deve ser checada em meio batata sólido. Neste meio, colônias puras são marrom-escuras.

16.2.6. *Pseudomonas*

Meios de cultura

Meio TSA (Rovira et al., 1974)

Difco "triptic soy broth"	0,1%
Ágar (Noble Difco)	1,5% (sólido)

Meio GYE

Glicose	5 g
Extrato de levedura Difco	0,1 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g

FeSO ₄ .7H ₂ O	0,04 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0059 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02 g
H ₃ BO ₃	0,15 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,11 mg
CoSO ₄ .7H ₂ O	0,07 mg
CuSO ₄ .7H ₂ O	0,005 mg
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,004 mg
H ₂ O destilada	1.000 mL
pH	7,0
Ágar (Noble Difco)	1,75 g/L

O meio é distribuído em vidros do tipo penicilina com rolhas de algodão.

Procedimento

Raízes de arroz são lavadas para remover o solo aderido e lavadas, duas vezes, em água esterilizada.

As raízes são, então, cortadas em segmentos de 1 cm a 2 cm, agitadas vigorosamente em frascos de 250 mL contendo 100 mL de água esterilizada e 5 g de bolinhas de vidro, para remoção de bactérias do rizoplano. As raízes são, então, retiradas destes vidros, lavadas três vezes em água esterilizada e maceradas, de modo a obter uma suspensão de bactérias da rizosfera.

Suspensões diluídas de raízes, assim obtidas, ou de solo rizosférico, são espalhadas em meio TSA. Após 7 dias de incubação a 30° C, colônias isoladas, intactas, são testadas quanto à ARA, repicadas para meio GYE semi-sólido e incubadas a 30° C. Após 2 a 3 dias, observa-se a formação de película e avalia-se, novamente, a ARA, após 24 horas de incubação sob atmosfera de acetileno. A repurificação é feita em meio TSA. Neste meio, as colônias são brancas, levemente convexas, brilhantes, e com 2 mm a 3 mm de diâmetro. Após algumas semanas, elas se tornam maiores e mucosas.

Alternativamente, o isolamento pode começar por culturas de enriquecimento em meio GYE.

16.2.7. *Bacillus*

Meio de Hino & Wilson (1958)

SOLUÇÃO A

Sacarose	20 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
NaCl	0,01 g

FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,015 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,005 g
CaCO ₃	10 g
Água destilada	500 mL

SOLUÇÃO B

Ácido p-aminobenzóico	10 mg
Biotina	5 mg
KH ₂ PO ₄	0,13 g
K ₂ HPO ₄	0,17 g
Água destilada	500 mL

Autoclavar as soluções separadamente e, depois, misturá-las.

Se forem realizadas leituras de absorvância, substituir o CaCO₃ por CaCl₂ e ajustar o pH.

Adicionar 0,25 g de ácido ascórbico e uma parte/10⁶ de reazurina para indicar o potencial de oxidação-redução. Utilizar a técnica do "roll-tube" (Hungate, 1969) para obter condições anaeróbicas. Alíquotas de 0,5 mL de solo rizosférico ou macerados de raízes diluídos são adicionados ao meio.

Os tubos são, então, incubados por 5 dias a 28°C. Após este período, medir a ARA sob condições anaeróbicas.

Procedimento

Colônias dos tubos positivos são repicadas novamente para o meio checadas quanto à ARA. Este procedimento deve ser repetido pelo menos quatro vezes, ou até que células típicas de *Bacillus*, com esporos subterminais reluzentes, possam ser verificadas ao microscópio. O crescimento aeróbio destes organismos ocorre somente com nitrogênio combinado.

16.3. Contagens

Todos os microrganismos citados podem ser contados e isolados de amostras de solo ou raízes (esterilizadas ou não), diluídas em soluções salinas adequadas.

Alguns exemplos dessas soluções são:

- NaCl a 0,85% ou 0,55% em água destilada;
- 0,215% NaCl + 0,0075% KCl + 0,012% CaCl₂ + 0,05% Na₂S₂O₃·5H₂O em água destilada, pH 6,6, ajustado com NaOH 0,1N ou HCl 0,1 N;
- 0,8% NaCl + 0,034% K₂HPO₄ em água destilada, pH 7,3 ajustado da mesma forma anterior;
- solução com os sais do meio de cultivo na mesma concentração e pH;
- sacarose, a 10%, em água destilada (especialmente para *Acetobacter diazotrophicus*).

De modo geral, na contagem, é geralmente usada a diluição decimal. Para isso, ver capítulo 1.

16.4. Referências Bibliográficas

- BALDANI, J. I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae*. gen. nov., sp. nov., a root - associated nitrogen-fixing bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.36, n.1, p.86-93, 1986.
- BARRAQUIO, W. L.; WATANABE, I. New type of nitrogen-fixing bacterium from rice roots and its distribution. **IRRI Saturday Seminar**, 1979. p. 1-34.
- BARRAQUIO, W. L.; LADHA, J. K. & WATANABE, I. Isolation and identification of N₂-fixing *Pseudomonas* associated with wetland rice. **Can. J. Microbiol.**, v.29, p.867-873, 1983.
- BECKING, J. H. Studies on nitrogen fixing bacteria of the genus *Beijerinckia*. I. Geographical distribution in soils. **Pl. Soil**, v.14, n.1, p.49-81, 1961.
- BECKING, J. H. The family *Azotobacteriaceae*. In: STARR, M. P. et al., eds. **The Prokaryotes; a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria**. Berlin: Springer-Verlag, p.795-812, 1981.
- BECKING, J. Genus *Beijerinckia* Derx 1950. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G., eds. **Bergey's manual of Systematic Bacteriology**, 1. Baltimore-London: Williams & Wilkins Co., 1984. p 311-321.
- BULLOW, J. F. W. von; DÖBEREINER, J. Potencial for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.72, p.2389-2393, 1975.
- CAMPELO, A. B.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Derxia* sp. em solos de alguns estados brasileiros. **Pesq. agropec. bras.**, v.5, p.327-332, 1970.
- CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Pl. Soil**, v.108, p.23-31, 1988.
- DALTON, H.; POSTGATE, J.R. Effect of oxygen on growth of *Azotobacter chroococum* in batch and continuous cultures. **J. Gen. Microbiol.**, v.4, p.463-473, 1969.
- DILWORTH, M. J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. **Biochem. biophys. Acta**, v.127, p.285-294, 1966.
- DÖBEREINER, J. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugarcane. **Pl. Soil**, v.15, p.211-217, 1961.
- DÖBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp. n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. **Pesq. agropec. bras.**, v.1, p.357-365, 1966.

- DÖBEREINER, J. Further research on *Azotobacter paspali* and its variety specific occurrence in the rhizosphere of *Paspalum notatum*. **Flugge Zentralbl. Bakt. Parasitenk.**, v.II, n.124, p.224-230, 1970.
- DÖBEREINER, J. Forage grasses and grain crops. In: BERGERSEN, F. J., ed. **Methods for evaluating biological nitrogen-fixation**. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 1980. p.535-555.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbioses in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: NEWTON W.E. ; NYMAN C. J., ed. **Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation**. Washington: Washington State University Press, 1976. p. 518-538.
- GILLIS, M.; KERSTERS, B.; HOSTE, D. J.; KROPPENSTEDT, R. M.; STEPHAN, M. P.; TEIXEIRA, K. R. S.; DÖBEREINER, J.; DE LEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov. a nitrogen fixing acetic acid bacterium associated with sugar cane. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.39, p.361-364, 1989.
- HEULIN, T. Adaptation des *Bacillus* fixateurs d'azote a la rhizosphere des graminees : une idee qui fait son chemin. In: **INTERACTION plantes - microorganismes**. France: IFS, 1992. p. 68-82.
- HINO, S.; WILSON, P. W. Nitrogen fixation by a facultative *Bacillus*. **J. Bacteriol.**, v.75, p.403-408, 1958.
- HUNGATE, R. E. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: NORRIS, J.R.; RIBBONE, D.Y., ed. **Methods in Microbiology**, vol. 3B. New York: Academic Press, 1969. p.117-132.
- MAGALHÃES, F. M. M. Nitrogen-fixing bacteria isolated from diverse soils and grass roots in Amazonia. In: VOSE, P. B.; RUSHEL, A. P. ed. **Associative N₂-fixation**, 2. Boca Raton: CRC Press Inc. , 1981. p. 39-48
- MAGALHÃES, F. M. M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. **Rev. Microbiol.**, v.15, n.4, p.246-252, 1984.
- MAGALHÃES, F. M. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J.R.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant *Azospirillum* species. **An. Acad. bras. Ci.**, v.55, p.417-430, 1983.
- Mc CLUNG, C.R.; PATRIQUIN, D.G. Isolation of a nitrogen-fixing *Campylobacter* species from the roots of *Spartina alterniflora* Loisel. **Can. J. Microbiol.**, v.26, n.8, p.881-886, 1980.
- MULDER, E. G.; BROTONEGORO, S. Free- living heterotrophic nitrogen fixing bacteria. In: QUISPÉL, A. ed. **The Biology of Nitrogen Fixation**, 3. Amsterdam: N. Holland Publications Co, 1974. p.37-84.

- NEAL, J. L. ; LARSON, R. I. Acetylene reduction by bacteria isolated from the rhizosphere of wheat. **Soil Biol. Biochem.**, v.8, p.151-155, 1976.
- ROVIRA, A.D.; NEWMAN, H.J.; BOWEN, G.; CAMPBELL, R. Quantitative Assessment of the rhizoplane microflora by direct microscopy. **Soil Biol. Biochem.**, v.6, p.211-216, 1974.
- RUSCHEL, A. P. Associative N₂-fixation by sugarcane In: VOSE, P.B.; RUSCHEL, A. P. **Associative N₂ fixation**, 2. Boca Raton: CRC Press, 1981. p.81-90.
- 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.**, v.34, p.451-456, 1984.
- VLASSAK, K.; REYNDERS, L. Conversions of tryptophan to auxins by *Azospirillum* spp. STEENBOCK-KETTERING INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF NITROGEN FIXATION, Madison, 1978. **Proceedings**. Madison: Univ. of Wisconsin, 1978. p. 44.
- WATANABE, I.; BARRAQUIO, W. L. Low levels of fixed nitrogen required for isolation of free-living N₂-fixing organisms from rice roots. **Nature**, v. 277, p.565-566, 1979.

PARTE IV. OUTRAS BACTÉRIAS DO SOLO

CAPÍTULO 17

MICROORGANISMOS AMONIFICADORES E NITRIFICADORES

*Diva de Souza Andrade*¹

*Mario Miyazawa*²

*Paulo José Hamakawa*¹

17.1. Introdução

A mineralização do nitrogênio no solo (amonificação e nitrificação) é um processo essencialmente microbiológico. As duas fases apresentam a mesma importância, porque as plantas são capazes de absorver o nitrogênio nas duas formas (NH_4^+ e NO_3^-) e, quando não existe adição de adubos nitrogenados (exemplo: sulfato de amônio), a nitrificação depende da taxa de amonificação para o fornecimento do substrato (NH_4^+).

A amonificação pode ser definida como a liberação da amônia (NH_3) de compostos orgânicos nitrogenados ($\text{R-N}_2 \rightarrow \text{NH}_4^+$), que são usados por um grupo diversificado de microrganismos heterotróficos como fonte de carbono e nitrogênio, sendo essa uma etapa importante no ciclo do nitrogênio no solo, porque torna disponível este elemento às plantas. A estimativa desses microrganismos amonificadores normalmente é realizada pelas inoculações de suspensões diluídas de solo, em meio líquido de cultura (Saratchandra, 1978) e a determinação do número de células viáveis pela utilização de tabelas do Número Mais Provável (NMP) (capítulo 3). Paralelamente, é possível avaliar a atividade desses microrganismos no solo através da determinação do nitrogênio ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) formado durante um determinado período de incubação da amostra de solo (Schuster & Schroder, 1990) e, também, com a adição de uma fonte de N orgânico (Alef & Kleiner, 1986, 1987; Miyazawa et al., 1994).

Na segunda etapa da mineralização do nitrogênio ocorre a nitrificação autotrófica, considerada agronomicamente mais importante. É intermediada por dois grupos de bactérias Gram-negativas, aeróbias, da família *Nitrobacteriaceae*, que oxidam o NH_4^+ a NO_3^- , via NO_2^- (Schmidt & Belser, 1982), embora outros grupos de microrganismos heterotróficos, também tenham sido relatados (Focht & Vershaete, 1977; Shah et al., 1990; Odu & Adeoye, 1970), principalmente em solos ácidos. Como oxidantes do amônio no solo ($2\text{NH}_4^+ + 3\text{O}_2 \xrightarrow{12e^-} 2\text{NO}_2^- + 4\text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$), os gêneros de bactérias autotróficas

¹ Pesquisadores, M.Sc., Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Cx. Postal 1331, CEP 86001-970, Londrina, PR.

² Pesquisador, Ph.D., IAPAR.

identificados são: *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* e *Nitrosobrio*, enquanto na oxidação do nitrito a nitrato ($2\text{NO}_2^- + \text{O}_2 \xrightarrow{4e^-} 2\text{NO}_3^-$) apenas o gênero *Nitrobacter* é conhecido (Belser, 1979). Todos esses microrganismos são capazes de crescer em meio de cultura estritamente inorgânico, e os requerimentos de energia e de carbono podem ser derivados da oxidação de substratos apropriados, NH_4^+ ou NO_2^- , e da assimilação do CO_2 , respectivamente. Neste capítulo serão enfatizados os métodos de avaliação da população dos microrganismos nitrificadores, pela técnica de diluições em série e estimativa pelo NMP (capítulo 3) e o método de avaliação da atividade desses microrganismos, através da medida do potencial nitrificante do solo (Schmidt & Belser, 1982; Saad & Conrad, 1993).

A escolha da técnica da inoculação de suspensões diluídas de solo em meios líquidos específicos, deve-se à impossibilidade da separação dos diversos grupos de microrganismos pela técnica de plaqueamento direto, porque mesmo sendo executado em meios de cultivo estritamente inorgânicos, ainda ocorre o crescimento de contaminantes heterotróficos provenientes do inóculo. Outra técnica que poderia fornecer dados confiáveis - a dos anticorpos fluorescentes -, na qual é possível detectar e contar a bactéria específica diretamente no solo (Schmidt, 1974, Verhagen et al. 1992), apresenta o inconveniente de depender de instrumentos e reagentes muito específicos e nem sempre disponíveis.

17.2. Estimativa da População de Microrganismos Amonificadores

17.2.1. Amostragem do Solo e Preparo das Amostras

Em microbiologia, algumas condições devem ser observadas nas etapas de amostragem e preparo das amostras e descrições detalhadas dessas podem ser encontradas no capítulo 3.

17.2.2. Preparo das Diluições

- a) Preparo da solução tampão de fosfato 1 mM (pH 7,0): em balão volumétrico de 1000 mL, adicionar alíquotas de 4 mL da solução de potássio de fosfato dibásico (K_2HPO_4) e de 1 mL de fosfato de potássio diácido (KH_2PO_4) das soluções estoques (Tabela 17.1) e completar o volume com água destilada ou deionizada (pH 7,1-7,4).
- b) Adicionar 95 mL e 9 mL desta solução tampão 1 mM de fosfato (pH 7,0), em frascos de 250 mL e tubos de 20 mL a 30 mL, respectivamente. Nos frascos com 95 mL, sugere-se colocar algumas "pérolas de vidro," para facilitar a dispersão das células e, também, utilizar tampões de algodão ou outro tipo de tampa esterilizável (nos frascos e tubos) para evitar contaminações posteriores. Esterilizar em autoclave a 121°C e 1,5 atm durante 20 min.
- c) Transferir 10 g de solo úmido para os frascos contendo 95 mL da solução tampão de fosfato estéril e agitar durante 30 min, entre 170 ciclos a 200 ciclos por min. Utilizando-se uma pipeta estéril, transferir 1 mL desta suspensão para um tubo esterilizado contendo 9 mL da solução tampão fosfato 1 mM (diluição 10^{-2}). Se uma população elevada for esperada, continuar o processo de diluição até as diluições 10^{-7} ou 10^{-8} .

TABELA 17.1. Soluções estoques para o preparo do meio de cultivo dos microrganismos nitrificadores. Segundo Schmidt & Belser (1982).

Composto Químico	Concentração da Solução Estoque (g/100 mL)	Meio de cultivo (mL _{sol. est.} / 1000 mL)	
		Oxidantes NH ₄ ⁺	Oxidantes NO ₂ ⁻
(NH ₄)SO ₄	5,00	10,0	-----
KNO ₂	0,85	-----	1,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,34	1,0	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	4,00	1,0	5,0
Azul de bromotimol	0,04	5,0	-----
K ₂ HPO ₄ (0,2 M)	3,48	-----	4,0
KH ₂ PO ₄ (0,2 M)	2,72	7,5	1,0
Ferro quelato	1,0	1,0	
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,246		
EDTA Na ₂	0,331		
Micronutrientes		1,0	1,0
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,010		
MnCl ₂	0,020		
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0002		
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,010		
CuSO ₄ .	0,002		

17.2.3. Preparo do Meio de Cultura e Avaliação

O meio de cultura consiste de sais, uma fonte de nitrogênio orgânico e corante para detectar a presença da amônia, proveniente da atividade dos microrganismos (Sarathchandra, 1978).

Para preparar o meio de Sarathchandra (1978), seguir o seguinte procedimento:

- a) em tubos de 10 mL a 15 mL, adicionar 4 mL do meio de cultura (Sarathchandra, 1978). Tampar os tubos e esterilizar em autoclave a 121°C e 1,5 atm, durante 15 min;
- b) inocular os tubos contendo o meio de cultura, com 1 mL das diluições desejadas da seção 17.2.2, c. Utilizar, no mínimo, três repetições por diluição. Incubar os tubos no escuro, a 28°C, durante cinco dias;
- c) os tubos com produção de amônia, ou seja, mudança na coloração da cor laranja para rosa (Figura 17.1), devido à elevação do pH acima de 7,0, são anotados como positivos (presença) e os sem

alteração na coloração como negativos (ausência) de microrganismos amonificadores. Nas diluições mais baixas (exemplo, 10^{-3}), devido à nitrificação da amônia, o meio pode tornar-se amarelo-claro (ácido). Recomenda-se, portanto, uma avaliação preliminar aos dois ou três dias após a inoculação; d) estimar a população de microrganismos amonificadores utilizando as tabelas de NMP (capítulo 3). Expressar os resultados com base em solo seco em estufa entre 105° a 110° C, conforme descrito no capítulo 3.

Meio de Cultura para Amonificadores (Sarithchandra, 1978)

Ácido casamino (arginina ou caseína hidrolisada)	10,0 g
Extrato de levedura	0,1 g
Fosfato de potássio monoácido (K_2HPO_4)	1,0 g
Sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,1 g
Sulfato ferroso ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,01 g
Sulfato de manganês ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	0,01 g
Fenol vermelho	0,02 g
Água destilada ou deionizada	1.000 mL

Ajustar o pH para 6,5 com uma solução de KOH ou HCl 0,1 N, antes de esterilizar.

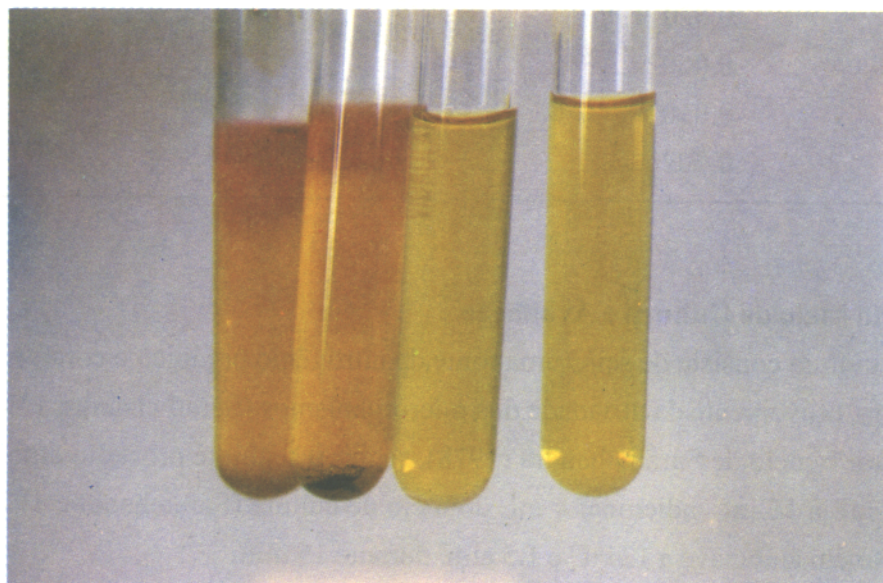


FIGURA 17.1. Teste para a produção de amônia. Na presença de amonificadores ocorre alteração da cor alaranjada para a cor rósea. Foto de Edino Ferreira da Silva (IAPAR).

17.3. Medidas da Amonificação

Para avaliar a atividade dos microrganismos amonificadores, normalmente utilizam-se métodos químicos que determinam o produto da amonificação ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$). As técnicas utilizadas devem apresentar pouca especificidade, para incluir a contribuição de todos os microrganismos (Alef & Kleiner, 1986). Três métodos serão descritos, destacando-se, porém, que as variações metodológicas entre eles são pequenas. A escolha por um deles depende dos objetivos e da infraestrutura disponível no laboratório.

17.3.1. Taxa de Amonificação em Amostras Incubadas de Solo

É calculada a partir de resultados de nitrogênio (NH_4^+ e NO_3^-) obtidos pela análise de amostras incubadas de solo sob condições controladas de temperatura e umidade (Schuster & Schroder, 1990):

- em uma subamostra de 2,0 g, proceder à extração com KCl, 2 M, ou K_2SO_4 0,25 M. O N- NO_3 pode ser determinado através da leitura do extrato em espectrofotômetro a 210 nm e 239 nm e o N- NH_4 pelo método colorimétrico do azul de indofenol (Keeney & Nelson, 1982);
- paralelamente, deve-se determinar a umidade da amostra de solo, nas condições originais, para que se possa expressar os resultados numa base invariável (capítulo 3);
- colocar 10 g a 100 g de amostra de solo, com umidade natural, peneiradas (malha de 2 mm a 4 mm), em frascos de 250 mL a 500 mL. A umidade da amostra de solo é corrigida, com água destilada, para um potencial mátrico de, aproximadamente, 1/3 bar;
- os frascos são fechados e incubados, no escuro, a 25° a 28° C durante três semanas, repetindo-se a extração e a determinação do N- NH_4 e N- NO_3 , como anteriormente;
- a taxa de amonificação [TA, expressa em $\mu\text{g N}/(10 \text{ g solo seco}).\text{dia}$] é calculada pela equação:

$$TA = [(\text{N} - \text{NH}_4 + \text{N} - \text{NO}_3)_{\text{final}} - (\text{N} - \text{NH}_4 + \text{N} - \text{NO}_3)_{\text{inicial}}] / n^\circ \text{ dias} \quad (1)$$

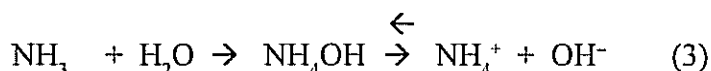
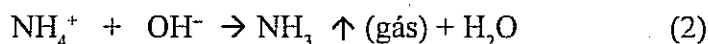
17.3.2. Taxa de Amonificação em Solo com Adição de N Orgânico

- A metodologia é descrita por Alef & Kleiner (1986, 1987), na qual amostras de 10 g a 80 g de solo úmido são colocadas em frascos de 125 mL a 250 mL. Após um período de repouso de 30 min, à temperatura ambiente (não superior a 30° C), são adicionados e homogeneizados 0,5 mL a 4,0 mL de uma solução de NaCl a 0,9% contendo de 1,2 mg a 10 mg de um aminoácido específico (exemplo: arginina, glutamato).
- Incubar durante 6 horas. Após este período, retirar 4 g ou 8 g e proceder à extração da amostra com 4 mL ou 8 mL de KCl, 2 M, agitando durante 10 min em frascos de 50 mL.
- Após a centrifugação durante 2 a 5 min (3000 rpm), retirar 0,1 mL a 2,0 mL do sobrenadante claro para a determinação do amônio (NH_4^+). Se não for possível proceder à extração no período recomendado, deve-se armazenar as amostras, em congelador, a -20° C.

17.3.3. Determinação do $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ pelo Sistema de Análise por Fluxo (Flow Injection Analysis) -FIA

17.3.3.1. Princípio do método de FIA

Um volume selecionado da amostra é introduzido no percurso analítico e transportado com a solução carregadora. A solução é alcalinizada ao confluir com a solução de NaOH. Com a alcalinização do meio, na câmara de difusão de gás (Figura 17.2), a NH_3 difunde-se para compartimento de H_2O através de uma membrana semipermeável (Jardim et al., 1990; Motomizu et al., 1987).



Os íons NH_4^+ e OH^- , formados ao passar na célula condutivimétrica, aumentam a condutividade elétrica da solução. O pico registrado é proporcional à concentração do NH_4^+ da solução. A concentração do NH_4^+ do meio de cultura é estimada por uma curva de calibração de NH_4^+ versus a condutividade elétrica.

O diagrama do fluxo é esquematizado na Figura 17.2. Nesta posição, uma alça de 120 μL é preenchida com a amostra e o excesso é descartado. Com a comutação do injetor(1), a amostra é transportada com a solução carregadora de KCl 0,5 M (vazão de 1 mL/minuto) e encontra-se com a solução de NaOH 1 M (vazão de 2 mL/minuto). A mistura das soluções é homogeneizada durante o percurso na bobina. Ao alcançar a câmara de difusão de gás (2), a NH_3 difunde-se para o compartimento de água destilada e deionizada (fervida a 75° C a 80° C, a vácuo, durante 10 min para eliminar o CO_2) (6), vazão de 1 mL/min, através da membrana semipermeável (5). Ao passar na célula condutivimétrica (3), a condutividade elétrica da solução é medida pelo condutímetro (4) e a altura do pico é proporcional à concentração do NH_4^+ da amostra.

A concentração do NH_4^+ da amostra é estimada pela interpolação da altura do pico na curva padrão ou pela equação da curva padrão.

17.3.3.2. Procedimento

- Uma solução padrão de N- NH_4 , contendo 10.000 $\mu\text{g/g}$, deve ser elaborada, transferindo-se 47,2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para um balão volumétrico de 1000 mL e completando o volume com água destilada (livre de CO_2). A partir dessa solução, preparar os padrões para a curva de calibração: 0 μg ; 50 μg ; 100 μg ; 200 μg ; 300 μg ; e 400 μg e 600 μg /mL de N- NH_4 .
- Preparar o meio de cultura de Sarathchandra (1978).
- Transferir 4 mL desse meio de cultura para tubos, fechando-os a seguir.
- Autoclavar a 121° C e 1,5 atm durante 20 min.
- Adicionar, então, 1 mL de uma solução de NaCl 0,85% contendo 10 mg a 100 mg de solo úmido.
- Incubar durante 48 a 72 horas e determinar o $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ pelo FIA.

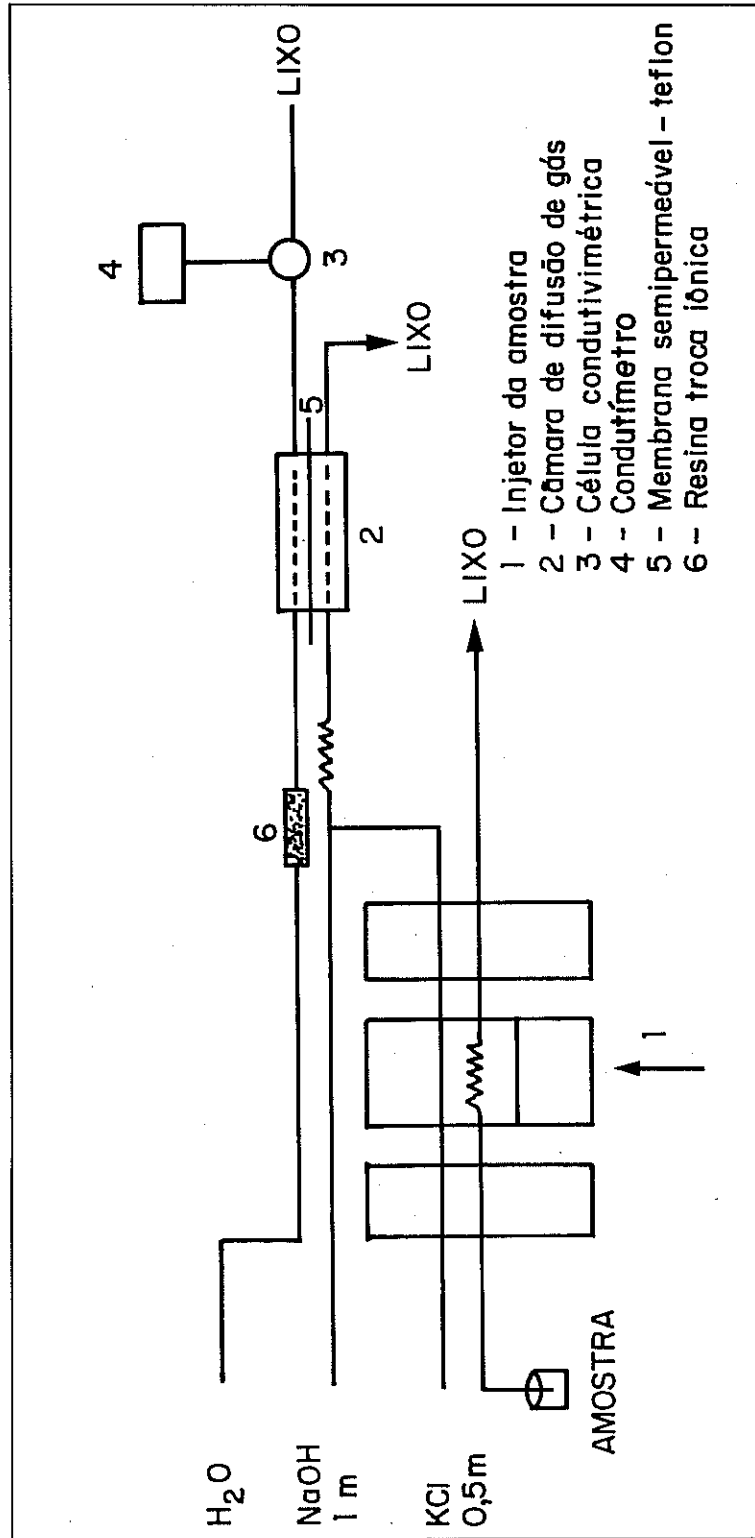


FIGURA 17.2. Diagrama do FIA para determinação de amônia.

17.4. Estimativa das Bactérias Nitrificadoras

17.4.1. Preparo das Diluições da Amostra de Solo

Os procedimentos para realizar a amostragem, solução diluente e as diluições decimais em série são os mesmos descritos para avaliação do microrganismos amonificadores nas seções 17.2.1. e 17.2.2. deste capítulo.

17.4.2. Meios de Cultura

Para o crescimento das bactérias oxidantes utiliza-se meio de cultura inorgânico líquido. Basicamente, os descritos por Soriano & Walker (1968, 1973) são utilizados para os oxidantes do NH_4^+ e o de Belser (1977) para os oxidantes do NO_2^- , ambos modificados por Schmidt & Belser (1982) pela adição de microelementos. Por ser um meio livre de precipitados, pode ser mais conveniente preparar os meios de cultivo a partir de soluções estoques (Tabela 17.1), armazenadas em frascos âmbar em condições de refrigeração. Outra possibilidade para observar a presença dos nitrificadores no solo é a utilização do meio de Saad & Conrad, (1993) (Tabela 17.2).

As soluções devem ser preparadas em água destilada ou deionizada. Para o meio dos oxidantes do amônio (NH_4^+), após adicionar algumas gotas de uma solução de vermelho de fenol ("phenol red") a 0,04%, ajustar o pH para 7,8 utilizando uma solução a 3% de NaCO_3 . No caso do meio de cultivo para os oxidantes do nitrito (NO_2^-), apenas ajustar o pH a 7,6 com HCl 1 N.

TABELA 17.2. Meio de cultura para crescimento microrganismos nitrificadores (Saad & Conrad, 1993).

Composto Químico	Oxidantes do Amônio	Oxidantes do Nitrito
	(mg/1000 mL)	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1000	---
NaNO_2	---	1000
K_2HPO_4	----	100
KH_2PO_4	200	----
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	40	50
CaCO_3	----	10
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	20	----
NaCl	500	500
FeSO_4	6,9	6,9
EDTA-Na	9,3	9,3
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	----	0,05

Adicionar 4 mL do meio de cultura (Schmidt & Belser, 1982 ou Saad & Conrad, 1993), em tubos de 10 mL a 20 mL com tampa. Autoclavar durante 15 min a 121°C e 1,5 atm.

17.4.3. Inoculações

- a) A partir da mais alta diluição (exemplo, 10^{-8}) transferir, com uma pipeta estéril, uma alíquota de 1 mL para cada um dos quatro tubos contendo o meio de cultura; inocular igual número de tubos para as outras próximas quatro diluições mais baixas (exemplo, 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4}).
- b) Incubar a 25° - 30° C, no escuro, durante seis a oito semanas. É importante a ausência de luz durante o período de incubação por ser possível a ocorrência de fotonitrificação no meio de cultura estéril, normalmente usado para o crescimento de microrganismos nitrificadores (Freitas & Cardoso, 1988).

17.4.4. Avaliações

Após o período de incubação, são realizados testes para verificação da presença dos nitrificadores, nos tubos inoculados, utilizando os reagentes de Griess-Ilosvay modificado (Schmidt & Belser, 1982):

- a) “diazotizing reagent”: dissolver 0,5 g de sulfanilamida em 100 mL de HCl 2,4 N. Armazenar em refrigerador;
- b) “coupling reagent”: dissolver 0,3 g de N-(1-naphthyl)-ethylenediamine hydrochloride em 100 mL de HCl 0,12 N. Armazenar em frasco âmbar (escuro) em condições de refrigeração. (Muito cuidado ao manusear o N-(1-naphthyl)-ethylenediamine hydrochloride);
- c) reagente para o teste do nitrato: dissolver 50 mg de difenilamina (diphenylamine) em 25 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Armazenar em frasco de vidro, tipo conta-gotas, protegido da luz. Preparar soluções frescas, pois a validade é de, no máximo, 14 dias.

17.4.5. Teste para Avaliação dos Microrganismos Oxidantes do Amônio (NH_4^+)

Para a detecção das bactérias quimioautotróficas oxidantes do amônio, transferir uma alíquota de 0,1 mL do meio de cultura inoculado para uma placa teste e adicionar uma gota de “diazotizing reagent” e uma gota de “coupling reagent”. O surgimento da coloração rosa indica que o NO_2^- está presente (Figura 17.3). Comparar o resultado com o de um tubo controle sem inoculação. Como os reagentes do NO_2^- são bastante ácidos, o indicador de pH (azul de bromotimol ou fenol vermelho) não interfere neste teste. Se o NO_2^- estiver presente, o tubo é anotado como positivo (presença de bactérias oxidantes do amônio). Entretanto, se o NO_2^- não for encontrado, deve-se proceder ao teste do nitrato (NO_3^-). Para isso, adicionar uma gota do reagente difenilamina e observar se ocorre mudança de coloração para ocre (marrom). Deve ser ressaltado que o teste do NO_3^- não apresenta a sensibilidade do teste do NO_2^- .

17.4.6. Teste para Avaliação dos Microrganismos Oxidantes do Nitrito (NO_2^-)

Após a incubação a 25° - 30° C, no escuro, deve-se proceder aos testes para avaliar se ocorreu a transformação do NO_2^- em NO_3^- , conforme descrito na seção 17.4.5. Se o NO_2^- for ausente (incolor), o tubo é anotado como positivo (presença de bactérias oxidantes do NO_2^-) e, se apresentar coloração rosa, é anotado como negativo (ausência de oxidantes do NO_2^-).

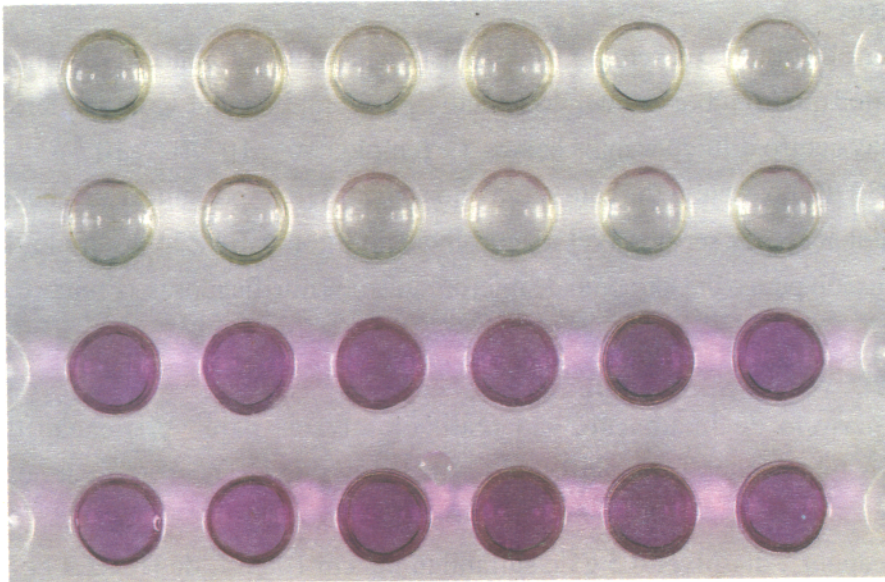


FIGURA 17.3. Teste para avaliação dos oxidantes do amônio. A cor rosa indica que o NO_2^- está presente. Foto de Edino Ferreira da Silva (IAPAR).

17.5. Potencial Nitrificante do Solo

O potencial nitrificante do solo representa a capacidade que os microrganismos presentes, num dado solo, têm de oxidar o N-NH_4 a N-NO_3 . Genericamente, uma amostra de solo é incubada, sob condições favoráveis de temperatura, umidade e um teor suficiente de N-NH_4 , determinando-se, por um método qualquer de análise química, o N-NO_3 formado durante o período de incubação (Berg & Rosswall, 1985; Schmidt & Belser, 1982). A adição, “a priori”, de N-NH_4 , visa a eliminar uma limitação no substrato nitrificável, devido a uma possível baixa taxa de mineralização (amonificação) do nitrogênio orgânico do solo, supondo-se que a população poderá crescer até ser limitada por outro fator ou combinação de fatores. A interpretação dos resultados exige que um “controle” (solo sem adição de N-NH_4) seja incluído no procedimento.

17.5.1. Procedimento

- Numa alíquota da amostra de solo, determinar a umidade (conforme capítulo 3) e o conteúdo inicial de N-NO_3 , pela extração com KCl , 2 M, ou K_2SO_4 , 0,25 M, e leitura em espectrofotômetro na banda UV a 210 nm e 239 nm. O teor é estimado pela curva padrão de KNO_3 .
- Colocar 100 g de solo úmido peneirado em frascos com tampa, adicionar 2 mL de uma solução de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ contendo 125 μg de N/g de solo e adicionar suficiente quantidade de água para, aproximadamente, um potencial mátrico de 1/3 bar. O controle deve ser um frasco sem adição de N-NH_4 e preparado nas mesmas condições. Tampar os frascos e incubar no escuro, a 25° C, durante 3 semanas.

- c) Após a incubação, determinar a concentração final de $N-NO_3$ de cada amostra. Calcular todos os dados em microgramas de $N-NO_3$ por grama de solo seco em estufa e subtrair os valores iniciais dos valores finais.

$$PN = N-NO_{3\text{ final}} - N-NO_{3\text{ inicial}}$$

onde PN refere-se ao potencial nitrificante do solo.

17.6. Taxa de Nitrificação

O nitrogênio nitrificado no solo, em amostras incubadas com $N-NH_4$, pode ser expresso como taxa de nitrificação. O procedimento é o mesmo descrito, anteriormente, para potencial nitrificante. Schuster & Schroder (1990) fazem algumas considerações: a) a quantidade de NH_4^+ deve aumentar, durante o período de incubação, por uma liberação adicional de NH_4^+ através da amonificação; b) uma parte do NO_3^- (e também do NH_4^+) deve ser assimilada pela microflora do solo; e c) uma parte do NH_4^+ deve ser adsorvida, ou mesmo fixada, nas partículas minerais. A soma de todos esses (AN) pode ser calculada como:

$$AN = (N-NH_4 + N-NO_3)_{\text{final}} - (N-NH_4)_{\text{adicionado}} + (N-NO_3 + N-NH_4)_{\text{inicial}}$$

onde AN é a amonificação.

Valores negativos de AN indicam que mais nitrogênio está sendo assimilado do que liberado pela amonificação.

A taxa de nitrificação (TN) é a porcentagem do $N-NH_4$ adicionado, transformado para $N-NO_3$ por 10 g de amostra de solo, durante o tempo (dias) de incubação, pode ser calculada como:

$$TN(\%) = [(N-NO_{3\text{ final}} - N-NO_{3\text{ inicial}}) \cdot 1000 / (N-NH_{4\text{ adicionado}} + AN)] / n^{\circ} \text{ dias de incubação}$$

Os valores de nitrogênio ($N-NH_4^+$ e $N-NO_3^-$) são expressos em μg por grama de solo seco em estufa a 105°C .

17.7. Considerações Finais

Em estudos de fertilidade e ecologia do solo, as avaliações das populações de microrganismos amonificadores e nitrificadores contribuem para a interpretação do efeitos de práticas como adubação

e uso de pesticidas. A atividade dos amonificadores apresenta boa correlação com a da biomassa microbiana do solo, possivelmente por ser um grupo bastante diversificado. Por outro lado, as bactérias nitrificadoras representam um grupo muito sensível ao manejo agrícola sendo de interesse, nos estudos ecológicos, a quantificação de suas populações e atividades. Ainda deve ser ressaltado que os métodos aqui descritos são simples, não exigindo equipamentos sofisticados.

17.8. Referências Bibliográficas

- ALEF, K.; KLEINER, D. Arginine ammonification, a simple method to estimate microbial activity potentials in soils. **Soil Biol. Biochem.**, v.18, n.2, p.233-235, 1986.
- ALEF, K.; KLEINER, D. Applicability of arginine ammonification as indicator of microbial activity in different soils. **Biol.Fertil. Soils**, v.5, n.2, p.148-151, 1987.
- BELSER, L. W. Nitrate reduction to nitrite, a possible source of nitrite for growth of nitrite-oxidizing bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 34, p.403-410, 1977.
- BELSER, L. W. Population ecology of nitrifying bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 33, p.309-333, 1973.
- BERG, P.; ROSSWAL, T. Ammonium oxidizer numbers, potential and actual oxidation rates in two Swedish arable soils. **Biol. Fertil. Soils**, v.1, p.131-140, 1985.
- FOCHT, D. D.; VERSTRAETE, W. Biochemical ecology of nitrification and denitrification. **Adv. Microb. Ecol.**, v. 1, p.135-214, 1977.
- FREITAS, S. S.; CARDOSO, C. O. N. Nitrificação fotoquímica em meio de cultura usado para crescimento de microorganismos nitrificadores. **Rev. bras. Ci. Solo**, v.12, n.2, p.109-111, 1988.
- KEENEY, D. R.; NELSON, D. R. Nitrogen: Inorganic forms. In: PAGE, A. L.; MILLER, R. H.; KEENEY, D., eds. **Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbiological Properties**. 2nd ed. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p.642-698. (Agronomy Monograph, 9).
- JARDIM, W. F.; PASQUINI, C. J. R.; FARIA, L. C. Short-term toxicity test using *Escherichia coli* : monitoring CO₂ production by flow injection analysis. **Wat. Res.**, v.24, p.351-354, 1990.
- MIYAZAWA, M.; BLOCH, M. F. M.; BONFIN, M. A. A.; ANDRADE, D. S. Determinação do NH₃/NH₄⁺ através de FIA-condutivimétrica para avaliação da atividade de microorganismos amonificadores do solo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3, 1994, Londrina. **Resumos**. Londrina: IAPAR, 1994. p.159.

- MOTOMIZU, S.; TÔEI, K.; KUWAKI, T.; OSHIMA, M. Gas-diffusion unit with tubular microporus poly (tetrafluoroethylene) membrane for flow-injection determination of carbon dioxide. **Anal. Chem.**, v.59, p.2930-2932, 1987.
- ODU, C. T. I.; ADEOYE, K. B. Heterotrophic nitrification in soils-a preliminary investigation. **Soil Biol. Biochem.**, v.2, p.41-45, 1970.
- SAAD, O. A. L. O.; RALF, C. Temperature dependence of nitrification, denitrification, and turnover of nitric oxide in different soils. **Biol Fertil. Soils**, v.15, n.1, p.21-27, 1993.
- SARATCHANDRA, S. V. Nitrification activities and the changes in the population of nitrifying bacteria in soil perfused with two different H-ion concentrations. **Pl. Soil**, v.50, p.99-111, 1978.
- SCHMIDT, E. L.; BELSER, L. W. Nitrifying bacteria. In: PAGE, A. L. ed. **Methods of Soil Analysis**; part 2. chemical and microbiological properties. 2nd ed. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p.1.027-1.042. (Agronomy Monograph. 9).
- SCHMIDT, E. L. Quantitative autecological study of microorganisms in soil by immunofluorescence. **Soil Sci.**, v.118, p.141-149, 1974.
- SCHUSTER, E.; SCHRODER, D. Side effects of sequentially-applied pesticides on-target soil microorganisms: field experiments. **Soil Biol. Biochem.**, v.22, p.367-373, 1990.
- SEPERS, A. B. J. Diversity of ammonifying bacteria. **Hydrobiologia**, v.83, p.343-350, 1981.
- SHAH, Z.; ADAMS, W. A.; HAVEN, C. D. Composition and activity of the microbial population in an acidic upland soil and effects of liming. **Soil Biol. Biochem.**, v. 22, p.257-263, 1990.
- SORIANO, S.; WALKER, N. Isolation of ammonia oxidizing autotrophic bacteria. **J. Appl. Bacteriol.**, v.31, p.493-497, 1968.
- SORIANO, S.; WALKER, N. The nitrifying bacteria in soils from Rothamsted classical fields and elsewhere. **J. Appl. Bacteriol.**, v.36, p.523-529, 1973.
- VERHAGEN, F. J. M.; DUYTS, H.; LAANBROEK, H. J. Competition for ammonium between nitrifying and heterotrophic bacteria in continuously percolated soil columns. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.58, n.10, p.3303-3311, 1992.

RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS (RPCPs)

Sueli dos Santos Freitas¹

18.1. Introdução

As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) são organismos cujo estudo vem merecendo destaque nos últimos anos, particularmente as do gênero *Pseudomonas*, possivelmente porque se estabelecem melhor na rizosfera do que outros gêneros de bactérias (Rouatt & Katznelson, 1961), o que lhes confere certa vantagem. Fora do Brasil, muitos trabalhos vêm sendo conduzidos e publicados sobre RPCPs, havendo relatos de benefícios nas mais variadas culturas, como batata, beterraba, nabo, trigo e outras. No Brasil, ainda há poucos trabalhos na área, mas já se observou promoção de crescimento em café, feijão, milho, soja, etc. Todavia, em cada caso o isolado de RPCP parece agir de um modo, seja pela produção de substâncias promotoras de crescimento, seja por controle biológico de fitopatógenos ou seja, ainda, por interferência na nutrição da planta. Há trabalhos evidenciando todos esses modos de ação, às vezes mais de um mecanismo para o mesmo isolado de bactéria. Em nem todos os casos o modo de atuação das RPCPs está bem definido, mas já se mantiveram no mercado, no exterior, por um certo período, inoculantes com essas bactérias (Paau & Mc Intyre, 1987).

É o conhecimento do mecanismo de ação das RPCPs que definirá, em última análise, a melhor utilização dos isolados benéficos, em cada interação planta-bactéria. Dado que o modo de ação e a própria ocorrência do benefício variam com a espécie de planta e/ou bactéria, é vital conhecer-se o mecanismo dessas interações nas condições brasileiras. Aqui, tornam-se particularmente importantes o conhecimento de processos e a aplicação de técnicas que resultem em utilização mais eficiente de insumos. No mundo todo, os rumos tomados pela agricultura exigem a investigação de fenômenos que resultem no emprego de técnicas não agressivas ao ambiente.

18.2. Histórico

Há mais de trinta anos tinha boa divulgação, nos meios científicos ocidentais, o uso que a União Soviética fazia dos chamados "fertilizantes bacterianos". Um pesquisador inglês, da Estação Experimental de Rothamsted, passou seis meses visitando um grande número de laboratórios e estações experimentais em Moscou, Leningrado, Kiev, Tashkent e Alma-Ata e seu relatório sobre essa viagem foi depois publicado na revista "Soils and Fertilizers" (Cooper, 1959). O autor relatou que dez milhões de hectares, na época de sua visita, recebiam fertilizantes bacterianos. Um deles, o

¹ Pesquisadora, Ph.D., Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Cx. Postal 28, CEP 13001-970, Campinas, SP.

“azotobacterin”, constituído por bactérias do gênero *Azotobacter*, tinha efeitos benéficos em 50% a 70% das lavouras em que era aplicado, com 10% de aumento médio de produção. Além desse, também eram usados outros inoculantes: “phosphobacterin”, feito com *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum*, e “nitragin”, de *Rhizobium* spp., principalmente, além dos produzidos com espécies do gênero *Pseudomonas*, particularmente *P. fluorescens*. Brown (1974) cita vários autores russos que teriam obtido aumentos na produção da ordem de 5% a 8% em milho, 24% a 42% em arroz, 10% em soja, 18% a 25% em batata, entre outras culturas, apenas com o uso de fertilizantes bacterianos.

O interesse dos pesquisadores ocidentais, entretanto, era limitado pelo fato de que os primeiros trabalhos sobre esse assunto nem sempre tinham análises estatísticas (Burr & Caesar, 1985) e apresentavam grande variabilidade, já mencionada por Cooper (1959), para o “azotobacterin”, cujos insucessos eram atribuídos à falta de umidade.

Muitos anos atrás, no trabalho de Kloepper & Schroth (1978), cunhava-se a expressão “rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs)”, que designa bactérias que vivem na rizosfera e são benéficas às plantas, sem estabelecerem as mesmas relações simbióticas. No mesmo ano, Burr et al. (1978) apresentaram resultados de incrementos significativos na produção de batatas pela inoculação com *Pseudomonas fluorescens* e *P. putida*.

A partir daí, intensificaram-se os trabalhos com as RPCPs. Diferentemente dos trabalhos iniciais, passaram a ser estudadas as bactérias do gênero *Pseudomonas*, que se estabelecem melhor na rizosfera do que *Azotobacter* spp. e *Bacillus* spp., uma das possíveis razões de insucesso nos experimentos anteriores.

Hoje, há relatos de benefícios em maçã (Caesar & Burr, 1987), trevo subterrâneo (Meyer & Linderman, 1986), alfafa (Olsen & Misaghi, 1981), beterraba (Suslow & Schroth, 1982), café (Freitas, 1989), milho (Brandão, 1989), soja e feijão (Freitas, 1994) e várias plantas ornamentais floríferas (Yuen & Schroth, 1986).

É preciso que se note que a expressão “rizobactérias promotoras do crescimento de plantas”, referida, nos trabalhos de língua inglesa, como “plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)”, designa um grupo muito amplo de bactérias, tendo, na sua estrita interpretação, caráter um tanto vago. Assim, para se delimitar a abordagem deste capítulo, há que se lembrar que, convencionalmente, são chamadas RPCPs algumas bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* e, principalmente, *Pseudomonas*. Os dois primeiros gêneros são considerados no capítulo 16 e, neste capítulo serão abordados os dois últimos. Todavia, nada impede que outros gêneros bacterianos, principalmente os não-fixadores de nitrogênio, sejam incluídos entre as RPCPs.

18.3. Métodos Utilizados no Estudo de RPCPs

Há poucos métodos específicos para o estudo de RPCPs, tanto mais que, sob essa sigla, agrupam-se gêneros bacterianos muito diferentes entre si. Dessa forma, são aplicáveis, ao seu estudo, muitos dos métodos rotineiramente usados em microbiologia do solo, já bem conhecidos.

Serão, pois, comentados a seguir alguns dos métodos aplicados mais especificamente ao estudo dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* como promotoras do crescimento de plantas.

18.3.1. Identificação

Nos estudos com RPCPs, o que se busca é uma bactéria que realmente promova o crescimento de plantas, dando-se importância secundária à sua classificação taxonômica. Todavia, é útil concentrar esforços na obtenção de isolados de gêneros com maior frequência de RPCPs.

O grupo fluorescente de *Pseudomonas* spp. foi muito bem definido por Stanier et al. (1966), num trabalho clássico sobre a taxonomia do gênero *Pseudomonas*: pertencem ao grupo fluorescente as espécies que produzem pigmento fluorescente em meio B de King et al. (1954), observado sob luz com comprimento de onda próximo do ultravioleta. Essas espécies são *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* e *P. putida*. Às duas últimas espécies pertencem, muito frequentemente, as RPCPs.

A produção de pigmentos, por si só, define o grupo, mas não está estabelecido se esse fato está correlacionado com outras características que justifiquem a colocação de *Pseudomonas* spp. fluorescentes em um grupo especial.

Das três espécies do grupo fluorescente, *P. fluorescens* e *P. putida* frequentemente promovem o crescimento de plantas, mas *P. aeruginosa* é patogênica a seres humanos, sendo relatada como causadora de infecções hospitalares. A distinção entre as espécies, também de acordo com Stanier et al. (1966), pode ser feita por uma série de características, a maioria delas avaliada por testes bioquímicos, como a produção de enzimas extracelulares e uma série de propriedades nutricionais ligadas à utilização de diferentes substratos. Pelo menos na fase inicial dos estudos, é importante distinguir *P. aeruginosa* das outras, pela sua patogenicidade.

Um caráter definitivo a separar *P. aeruginosa* das outras espécies é a presença de um único flagelo, enquanto *P. fluorescens* e *P. putida* sempre apresentam mais de um flagelo. A visualização de flagelos bacterianos nem sempre é muito fácil, mas há outras formas de se fazer essa distinção. Dentre as três espécies fluorescentes, *P. aeruginosa* é a única a produzir fenazina, reconhecida como um pigmento azulado em meio A de King et al. (1954).

A realização de alguns outros testes bioquímicos recomendados por Stanier et al. (1966) pode levar à classificação específica dos isolados em estudo, sem maiores dificuldades.

Em fases posteriores de estudo, a distinção entre isolados e a sua identificação pode se tornar necessária. Isso pode ser conseguido pela análise dos lipopolissacarídeos (LPSs), que diferem de isolado para isolado. Faz-se a análise dos LPSs utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, "sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis") (Weger et al., 1987). Mais sofisticado é uso da SDS-PAGE para analisar proteínas intracelulares marcadas por radioisótopos, ligado a programa de computador e resultando em sistema semi-automatizado (Rowe & Finn, 1991).

O gênero *Bacillus* é bem diferente do anterior, sendo incluído entre as bactérias formadoras de endosporos, estruturas altamente resistentes a condições adversas do ambiente. Esse grupo reúne pelo menos 13 gêneros bacterianos, mas sua classificação ainda é problemática. Segundo Berkeley & Ali (1994), a máxima variação que se permite para o conteúdo de guanina + citosina, dentro de indivíduos de uma mesma espécie, é de 5 mols% G+C. Entre as espécies de *Bacillus*, esses valores vão de 32 mols% a 69 mols% G+C. Assim, pertencem ao gênero *Bacillus* as bactérias produtoras de endosporos, com células em bastonete, aeróbias ou aeróbias facultativas, que não esporulam anaerobicamente e usualmente produzem catalase; não crescem a 45°C nem em meio com valor de pH 3,0.

18.3.2. Isolamento

Para o gênero *Pseudomonas*, o meio mais usado é o B de King et al. (1954). Uma vez que se deseja uma bactéria que promova o crescimento de plantas, o melhor é obtê-la a partir da rizosfera. Raízes de plantas vigorosas, sem sintomas de doenças, são levadas do campo para o laboratório e batidas de leve para retirar o solo mais frouxamente a elas aderido. Depois, as raízes são lavadas em água ou solução esterilizada de $MgSO_4$, 0,1 M. Essa suspensão é diluída e espalhada em placas de Petri com o meio B. Depois de 48 a 72 horas, as colônias formadas são observadas, sob luz, com comprimento de onda próximo do ultravioleta. As que produzirem pigmento fluorescente devem ser isoladas e a sua inclusão no grupo fluorescente de *Pseudomonas* spp., confirmada pelos testes mencionados no item anterior. Há relatos (Simon & Ridge, 1974) de que a adição de antibióticos ao meio B inibe o crescimento de espécies não fluorescentes o que, às vezes, pode ser desejável.

A característica exibida pelas espécies de *Bacillus*, a produção de endosporos, facilita enormemente o seu isolamento. A mesma suspensão de raízes e solo rizosférico acima descrita é submetida à temperatura de 80°C por 20 min e, a seguir, distribuída em placas com meio de BDA (batata-dextrose-ágar), que serão incubadas a 28° a 30°C por 48 horas. Apenas endosporos bacterianos resistem àquela condição de temperatura. As colônias que crescerem aerobicamente devem pertencer ao gênero *Bacillus*.

18.3.3. Colonização Radicular

Há muito se sabe que as bactérias do gênero *Pseudomonas* têm seu desenvolvimento favorecido na rizosfera. Rizosfera, conforme definido por Hiltner (1904), é a região do solo sob influência das raízes. As raízes exercem sua influência pela exsudação, para o solo, de um grande número de substâncias orgânicas: açúcares, compostos aminados, ácidos orgânicos, fatores de crescimento, etc. Uma vez que a maioria dos microrganismos depende de matéria orgânica para sua alimentação, os exsudatos radiculares tornam a rizosfera uma região densamente povoada por microrganismos, quando comparada ao solo não-rizosférico. Essa influência da exsudação é, considerando-se os muitos fatores que a podem afetar, de alguns milímetros em torno das raízes (Cardoso & Freitas, 1992), mas é essa a região que

microrganismos devem atravessar para ter contato com a planta, sejam eles benéficos ou patogênicos. O sucesso do microrganismo na rizosfera é um passo importante para o estabelecimento de qualquer relação com a planta.

Assim, é importante saber se a bactéria que se deseja inocular é capaz de se estabelecer na rizosfera, um conhecimento que pode ser crucial para a explicação de um fenômeno. Mas, num ambiente com população tão variada, qualitativa e quantitativamente, como saber se o microrganismo que se inoculou é o mesmo que de lá se isola algum tempo depois? Como determinar a competitividade do isolado na rizosfera?

Uma forma bastante usada para resolver esse problema é o uso de isolados resistentes a antibióticos. Nesse caso, verifica-se a resistência natural dos isolados a diferentes concentrações de um ou, melhor ainda, de vários antibióticos. Os isolados cujo padrão de resistência a antibióticos foi assim determinado são, então, inoculados em plantas e, depois do período desejado, procede-se à diluição e plaqueamento do solo rizosférico em meios de cultura com aqueles determinados antibióticos, em concentrações tais que só os isolados marcados possam crescer.

Já, quando se deseja analisar o comportamento de um determinado isolado, pode-se induzir mutação, com um agente qualquer, numa cultura pura daquele isolado e, depois de obtido o mutante, utilizá-lo da mesma forma descrita. Esse procedimento foi adotado por Brandão (1989), para verificar a capacidade de colonização de rizosfera de milho por *Pseudomonas* spp., com isolados resistentes a estreptomicina, rifampicina e ácido nalidíxico. Davies & Whitbread (1989) consideraram a diluição e plaqueamento uma técnica de execução trabalhosa, mas útil quando usada comparativamente.

Técnicas em microscopia direta são usadas tanto quantitativa quanto qualitativamente medindo, com considerável precisão, o nível de colonização bacteriana em áreas delimitadas do sistema radicular. O maior problema é nos estudos quantitativos, em que o grande número de amostras necessárias pode inviabilizar o emprego da microscopia direta.

De qualquer maneira, é pertinente comentar o método proposto por Misaghi (1990), que é relativamente rápido, simples e é menos trabalhoso, permitindo o teste de um maior número de isolados. A técnica permite avaliar a habilidade de isolados bacterianos em colonizar sistemas radiculares pela observação microscópica direta das raízes. As sementes são colocadas para germinar em placas de Petri com ágar-água. Depois de emitidas as radículas, repicam-se os isolados, em teste próximo à extremidade da coifa. A habilidade bacteriana em colonizar as raízes é avaliada, depois, sob microscópio estereoscópico. Outra vantagem do método é não ser destrutivo, pois permite observações contínuas das interações raízes-bactérias e sua dinâmica.

18.3.4. Testes de Antagonismo

Um dos modos de ação de RPCPs é o controle biológico de fitopatógenos, sejam eles os clássicos causadores de doenças ou subclínicos. Patógenos subclínicos são os que, não vivendo no interior

das plantas, produzem toxinas que afetam o crescimento vegetal, com ou sem a manifestação de sintomas visíveis. A atividade desse patógenos subclínicos, também chamados “patógenos menores”, poderia resultar em diminuição no crescimento da planta. Na ausência de plantas não afetadas, esses patógenos poderiam passar despercebidos. Assim, a eliminação desses patógenos menores, por RPCPs ou outra forma qualquer, pareceria resultar em promoção do crescimento da planta quando, de fato, ela só estaria expressando seu potencial de crescimento mais realisticamente.

Para apressar a seleção de isolados de prováveis RPCPs como agentes de controle biológico de fitopatógenos, freqüentemente são utilizados teste *in vitro*, confrontando patógenos e possíveis agentes. Apenas os isolados bacterianos com atividade antagonica *in vitro* são selecionados para teste *in vivo* na planta.

Nesses testes, conforme discutido por Freitas (1994), os microrganismos são repicados para placas de Petri, com o meio de cultura adequado, o patógeno e o provável agente, próximos um do outro. Depois de um certo período de incubação, variável para cada dupla de organismos, avalia-se a ocorrência de halos de inibição, que evidenciariam o antagonismo.

Contudo, é discutível se há ou não correlação entre o antagonismo observado *in vitro* e a capacidade da bactéria em realmente inibir a manifestação da doença causada por aquele patógeno. Há estudos em que não se observa essa correlação (Freitas & Pizzinatto, 1991) e há outros em que ela é observada (Sivamani & Gnanamanickam, 1988). Ainda que tal correlação fosse sempre verdadeira, é importante notar que os métodos de seleção *in vitro* selecionam apenas os agentes eficientes por produção de antibióticos, metabólitos tóxicos e sideróforos e não consideram os que agem por competição, parasitismo ou resistência induzida.

Uma forma de resolver esse problema é o uso de métodos em que as sementes são germinadas em placas de Petri com ágar-água, onde o patógeno e seu provável agente de controle são inoculados próximo à radícula (evidentemente, essa técnica é válida apenas para patógenos de raiz) (Randhawa & Schaad, 1985; Kloepper, 1991).

18.4. Referências Bibliográficas

- BERKELEY, R. C. W.; ALI, N. Classification and identification of endospore-forming bacteria. **Fundamental and Applied Aspects of Bacterial Spores**. p. 1S-8S. 1994. (Series , 23).
- BRANDÃO, E. M. **Isolamento e seleção de rizobactérias promotoras do crescimento em milho**. Piracicaba: ESALQ , 1989. 133p. (Tese de Mestrado) .
- BROWN, M. E. Seed and root bacterization. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v.12, p.181-197, 1974.
- BURR, J. J.; CAESAR, A. Beneficial plant bacteria. **CRC Crit. Rev. Plant Sci.**, v.2 , n.1, p.1-20, 1985.

- BURR, T. J.; SCHROTH, M. N.; SUSLOW, T. Increased potato yields by treatment of seedpieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. **Phytopatology**, v.68, p.1377-1383, 1978.
- CAESAR, A. J.; BURR, T. J. Growth promotion of apple seedlings and rootstocks by specific strains of bacteria. **Phytopatology**, v.77, n.11, p. 1583-1588, 1987.
- CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, S. S. A rizosfera. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. ed. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.42-57.
- COOPER, R. Bacterial fertilizers in the Soviet Union. **Soils Fertil.**, v.22, n.5, p.327-333, 1959.
- DAVIES, K. G.; WHITIBREAD, R. A comparison of methods for measuring the colonisation of a root system by fluorescent *Pseudomonads*. **Pl. Soil**, v.116, n.2, p. 239-246, 1989.
- FREITAS, S. S. Desenvolvimento de plântulas de café pela inoculação de *Pseudomonas* sp. **R. bras. Ci. Solo**, v.13, p. 31-34, 1989.
- FREITAS, S. S. **Rizobactérias e suas interações com plantas e microrganismos**. Piracicaba: ESALQ, 1994. (Tese de Doutorado).
- FREITAS, S. S.; PIZZINATTO, M. A. Interações de *Pseudomonas* sp. e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* na rizosfera de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). **Sum. Phytopathol.**, v.17, n.2, p. 105-112, 1991.
- HILTNER, L. Uber neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Grundungung und Brache. **Erb. Deut. Landwirtsch. Ges.**, v.98, p.59-78, 1904.
- KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **J. Lab. Clin. Med.**, v.44, n.2, p.301-307, 1954.
- KLOEPPER, J.W. Development of *in vivo* assays for prescreening antagonists of *Rhizoctonia solani* on cotton. **Phytopathology**, v.81, n.9, p.1006-1013, 1991.
- KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 4th, 1978. **Proceedings**, v.2. p. 879-882.
- MEYER, J. R.; LINDERMAN, R. G. Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular micorrhizal fungi and a plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*. **Soil Biol. Biochem.**, v.18, n.2, p. 185-190, 1986.

- MISAGHI, I. J. Screening bacteria for root colonizing ability by a rapid method. **Soil Biol. Biochem.**, v.22, n.8, p.1085-1088, 1990.
- OLSEN, N. W.; MISAGHI, I. J. Plant growth promoting activity of heat-killed cells of *Pseudomonas fluorescens*. **Phytopathology**, v.71, p.1006, 1981.
- PAAU, A. S.; McINTYRE, J. L. Development of PGPR inoculants: Challenges and priorities. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA, 1st, Orillia, 1987. **Proceedings**. p.44-49.
- RANDHAWA, P. S.; SCHAAD, N. W. A seedling bioassay chamber for determining bacterial colonization and antagonism on plant roots. **Phytopathology**, v.75, p.254-259, 1985.
- ROUATT, J. W.; KATZNELSON, H. A study of the bacteria on the root surface and in the rhizosphere of crop plants. **J. Appl. Bact.**, v.24, p.164-171, 1961.
- ROWE, M. T.; FINN, B. A study of *Pseudomonas fluorescens* biovars using the Automated Microbiology Identification System (AMBIS). **Lett. Appl. Microbiol.**, v.13, n.5, p.328-242, 1991.
- SIMON, A.; RIDGE, E. H. The use of ampicilin in a simplified selective medium for the isolation of fluorescent pseudomonads. **J. Appl. Bacteriol.**, v.37, p.459-460, 1974.
- SIVAMANI, E.; GNANAMANICKAM, S. S. Biological control of *Fusarium oxysporim* f. sp. *cubense* in banana by inoculation with *Pseudomonas fluorecens*. **Pl. Soil**, v.107, n.1, p.3-9, 1988.
- STANIER, R. Y.; PALLERONI, N. J.; DOUDOROFF, M. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. **J. Gen. Microbiol.**, v.43, n.2, p.159-271, 1966.
- SUSLOW, T. V.; SCHROTH, M. N. Rhizobacteria of sugar beets: Effects of seed application and root colonization on yield. **Phytopathology**, v.72, p.199-206, 1982.
- WEGER, L. A.; JANN, B.; JANN, K.; LUGTENBERG, B. Lipopolysaccharides of *Pseudomonas* spp. that stimulate plant growth: composition and use for strain identification. **J. Bacteriol.**, v.169, n.4, p.1441-1446, 1987.
- YUEN, G. Y.; SCHROTH, M. N. Interactions of *Pseudomonas fluorescens* strain E6 with ornamental plants and its effect on the composition of root-colonizing microflora. **Phytopathology**, v.76, n.2, p.176-180, 1986.

CAPÍTULO 19

CO-INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS: *RHIZOBIUM* E *BACILLUS*

Fábio F. de Araújo¹

19.1. Introdução

Além das pesquisas conduzidas estritamente com rizóbio, no sentido de se entender e aumentar sua competitividade, alguns estudos avaliam o efeito da interação entre *Rhizobium/Bradyrhizobium* e outros microrganismos. Estes trabalhos, de forma geral, fundamentam-se na obtenção de mutantes de rizóbio eficientes e tolerantes a antibióticos produzidos por outras bactérias, que são co-inoculadas, resultando em uma maior ocupação dos nódulos pelas estirpes de rizóbio introduzidas. Como exemplo desta técnica, Li & Alexander (1988) conseguiram aumentar a colonização da rizosfera da soja e alfafa pelo rizóbio, através da co-inoculação com *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp., respectivamente. Existem outros relatos, na literatura, abordando o uso de outros microrganismos com efeito positivo sobre a nodulação do rizóbio. A maioria dessas espécies pertence ao gênero *Bacillus*.

19.2. Interação do *Bacillus* com *Rhizobium*

O tratamento de sementes de amendoim com *Bacillus subtilis* aumentou a nodulação pelo *Rhizobium* spp., em testes de campo (Turner & Backman, 1991). Em outro teste semelhante, Halverson & Handelsman (1991) observaram aumentos significativos da nodulação, *in vitro* e a campo, quando trataram sementes de soja com uma estirpe de *Bacillus cereus*. Araújo & Hungria (1994) observaram um aumento na ocupação de nódulos da soja, pelas estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* introduzidas no inoculante, quando co-inoculadas com *Bacillus subtilis*, ou seus metabólitos, em campo (Tabela 19.1).

Estudando o efeito associativo de *Azospirillum brasilense* com *Bradyrhizobium japonicum*, Singh & Subba Rao (1979) concluíram que esta associação aumentou a nodulação e a produtividade da soja. Nestes trabalhos, foi observado que a introdução de outros microrganismos, juntamente com o *Rhizobium*, pode ser uma alternativa viável para a resolução de alguns problemas relacionados com a capacidade competitiva das estirpes e eficiência da simbiose.

¹ Engenheiro-agrônomo, curso de pós-graduação na Universidade Estadual de Londrina e EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), Cx. Postal 1061, CEP 86001-970, Londrina, PR.

TABELA 19.1. Efeito da inoculação das estirpes SEMIA 5080+SEMIA 5019, juntamente com a inoculação de *Bacillus* spp. ou seus metabólitos, na ocupação dos nódulos de soja, em solos com população estabelecida, em Londrina e Ponta Grossa, PR. Avaliações realizadas aos 48 dias após o plantio.¹

Tratamento	Ocupação dos Nódulos (%)			
	Sorogrupo 5019		Sorogrupo 5080	
	Londrina	Ponta Grossa	Londrina	Ponta Grossa
Estirpes	11,5 b ²	31,0 a	8,5 ab	8,5 d
Estirpes (M) ³	12,5 b	14,0 cd	8,0 ab	9,0 cd
Estirpes + <i>Bacillus</i>	20,0 ab	34,0 a	7,0 ab	10,0 cd
Estirpes (M)+ <i>Bacillus</i>	25,5 a	25,0 ab	12,0 a	20,0 a
Estirpes + Metabólitos	15,0 ab	31,5 a	6,0 b	10,5 cd
Estirpes (M) + Metabólitos	15,5 ab	32,5 a	10,0 ab	17,0 ab
Controle	15,0 ab	8,0 d	6,0 b	8,5 d
C V (%)	22,37	15,21	19,55	16,03

¹ O procedimento está descrito na seção 19.4.

² Médias de seis parcelas e, quando seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan (5%).

³ Mutantes das estirpes de *B. japonicum* SEMIA 5080 e SEMIA 5019, tolerantes aos metabólitos das estirpes de *Bacillus* AP-3 e A3-5.

Nestes estudos, existem duas linhas de pesquisas: primeiro, aquela relacionada com a contribuição dos microrganismos introduzidos para o estabelecimento das estirpes desejadas, através da exsudação de substâncias inibidoras dos competidores do solo, mas que não afetam a estirpe introduzida; a outra linha de pesquisa destaca a contribuição, através da produção de fitohormônios, pectinases, ou sinais moleculares, que venham a incrementar a nodulação. Nesta linha de pesquisa, já foram conseguidos resultados positivos com a co-inoculação de *Rhizobium* com *Azospirillum* (Plazinski & Rolfe, 1985; Andreeva et al., 1991) ou mesmo com *Agrobacterium* (Caetano-Anollés & Bauer, 1988).

O aumento de competitividade do *Rhizobium* está relacionado, diretamente, aos processos de reconhecimento e infecção da planta hospedeira (Triplett, 1990). No processo de reconhecimento são

envolvidos vários sinais moleculares por parte da planta e da bactéria, responsáveis pelos estímulos mútuos para os passos seguintes da simbiose. Na introdução de uma estirpe de *Rhizobium* no solo, a velocidade no reconhecimento e infecção pode ser fundamental para que esta estirpe ocupe os nódulos na planta hospedeira. A rapidez em estimular a planta na emissão dos pêlos radiculares torna-se importante para o desenvolvimento das infecções pelo *Rhizobium* (Nishi & Hungria, 1993). Neste contexto, a presença de outros microrganismos, liberando diferentes sinais moleculares ou fitormônios, poderá acelerar os passos de reconhecimento e infecção, favorecendo o *Rhizobium* introduzido. Foi observado um maior estímulo para germinação e emissão de pêlos radiculares em soja quando as sementes foram tratadas com metabólitos do *Bacillus subtilis* (Araújo & Hungria, 1994; Tabela 19.2).

19.3. *Bacillus* como Agente de Controle Biológico

Alguns pesquisadores têm procurado relacionar o efeito positivo na co-inoculação pelo *Rhizobium* com a possibilidade de controle biológico de algumas doenças causadas por patógenos do solo, principalmente as que incidem sobre as sementes (Araújo & Hungria, 1994; Li & Alexander, 1988) conseguindo, com isto, um duplo benefício decorrente da inoculação simultânea das sementes com rizóbios e outros microrganismos. Estes estudos necessitam de mais trabalhos, abrangendo o aspecto da competição entre os diferentes microrganismos no solo. As interações entre gêneros de bactérias têm recebido pouca atenção pois, em muitas investigações, só se estuda a competição entre diferentes estirpes de *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium* (Amarger, 1981). Neste contexto, e diante dos resultados, a pesquisa deve buscar isolar e identificar microrganismos e seus metabólitos presentes no solo, os quais poderão influenciar na competitividade e interação *Rhizobium*-leguminosas.

TABELA 12.1. Efeito da inoculação em sementes de soja, cv. BR-37, dos metabólitos e células de *Bacillus subtilis* (AP-3 e A3-5) sobre a germinação e fenótipo das raízes. Londrina, PR, 1994.¹

Tratamento	Germinação (%)	Indução de pêlos radiculares (escala de notas)
Metabólitos (AP-3)	60,4 a ²	2,73 a
Metabólitos (A3-5)	54,2 a	2,15 ab
Células (AP-3)	53,7 a	2,01 b
Células (A3-5)	52,1 a	1,93 b
Controle	50,0 a	1,86 b

¹ O procedimento está descrito na seção 19.4.

² Médias de seis repetições e, quando seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan (5%).

19.4. Procedimento Utilizado nos Estudos sobre Co-inoculação de *Bacillus* com Rizóbio

19.4.1. Efeito na Nodulação e Ocupação dos Nódulos

Em relação aos estudos que, como o exemplificado na Tabela 19.1, investigam o efeito da co-inoculação na simbiose da soja, Araújo & Hungria (1994) utilizaram o seguinte procedimento:

- multiplicar o *Bacillus* spp., por sete dias, em meio BD (batata-dextrose, capítulo 16);
- separar as células dos metabólitos por centrifugação (10.000 rpm/10 min);
- esterilizar os sobrenadantes por filtração (0,22 μ m);
- para a co-inoculação das sementes, crescer o *Bacillus* até uma concentração aproximada de 1.10^6 UFC/mL;
- crescer o rizóbio até uma concentração de 1.10^7 UFC/mL;
- meia hora antes do plantio, incubar as sementes com as bactérias e/ou metabólitos. No caso do experimento mostrado na Tabela 19.1, os metabólitos foram utilizados na proporção de 50 mL do sobrenadante/500 g de sementes misturados;
- determinar a nodulação e a ocupação dos nódulos. Pode-se empregar a identificação sorológica (capítulo 8).

19.4.2. Efeito da Inoculação com *Bacillus* nos Fenótipos Radiculares

Um dos fenótipos radiculares, causado por rizóbio, que está mais associado à competitividade, é o aumento no número de pêlos radiculares (Nishi & Hungria, 1993). Esse fenótipo, também conhecido como Hai (hair increase ou hair induction), é provocado por sinais moleculares produzidos pelo rizóbio, em resposta aos exsudatos da planta. É possível, porém, que outros microrganismos do solo também produzam esses sinais, provocando, nas raízes, os mesmos fenótipos causados pelo rizóbio e aumentando a nodulação (Hungria, 1994).

Em relação aos estudos que estudam os fenótipos radiculares, como o exemplificado na Tabela 19.2, Araújo & Hungria (1994) utilizaram o seguinte procedimento:

- multiplicar as estirpes de *Bacillus subtilis* e extrair os seus metabólitos, conforme descrito na seção 19.4.1;
- desinfestar, inocular e crescer sob condições estéreis (capítulo 3);
- observar a indução de pêlos radiculares, ao microscópio, através da observação das radículas, conferindo notas de 1 a 5 para a menor ou maior presença de pêlos, respectivamente. Detalhes sobre a coloração das raízes, para facilitar a visualização ao microscópio, são dados no capítulo 14.

19.5. Referências Bibliográficas

- ANDREEVA, I. N.; MANDKHAN, K.; REDKINA, T. V.; MISHUSTIN, E. N.; IZMAILOV, S. F. Effect of *Azospirillum brasilense* on formation and nitrogen-fixing activity of bean and soybean nodules. **Sov. Pl. Physiol.**(Transl. from Fiziol. ast.), v.38, p.897-904, 1991.
- AMARGER, N. Selection of *Rhizobium* strains on their competitive ability for nodulation. **Soil Biol. Biochem.**, v.13, p.481-486, 1981.
- ARAÚJO, F.F; HUNGRIA, M. Efeito da co-inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* com as células ou com os sobrenadantes de *Bacillus subtilis* na nodulação da soja. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3, 1994, Londrina. **Resumos**. Londrina: IAPAR, 1994. p.128.
- CAETANO-ANOLLÉS, G.; BAUER, W.D. Enhanced nodule initiation on alfalfa by wild-type *Rhizobium meliloti* co-inoculated with *nod* gene mutants and other bacteria. **Planta**, v.174, p.385-395. 1988.
- HALVERSON, L.J.; HANDELSMAN, J. Enhancement of soybean nodulation by *Bacillus cereus* UW85 in the field and in a growth chamber. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.57, p.2767-2770.
- HUNGRIA, M. Sinais moleculares envolvidos na nodulação de leguminosas por rizóbio. **Rev. bras. Ci. Solo**, 1994. (no prelo).
- LI, D.M.; ALEXANDER, M. Co-inoculation with antibiotic-producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. **Pl. Soil**, v.108, p.211-219, 1988.
- NISHI, C.Y.M.; HUNGRIA, M. **Eficiência da fixação biológica do N₂ e capacidade competitiva das estirpes SEMIA 566, SEMIA 586, SEMIA 5079 e SEMIA 5080 inoculadas em soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1993. p.1-13. (EMBRAPA-CNPSO. Pesquisa em Andamento, 15).
- PLAZINSKI, J.; ROLFE, B.G. *Azospirillum-Rhizobium* interaction leading to a plant growth stimulation without nodule formation. **Can. J. Microbiol.**, v.31, p.1026-1039, 1985.
- SINGH, C.S.; SUBBA RAO, N.S. Associative effect of *Azospirillum brasilense* with *Rhizobium japonicum* on nodulation and yield of soybean (*Glycine max*). **Pl. Soil**, v.53, p.387-392, 1979.
- TURNER, J.T.; BACKMAN, P.A. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. **Pl. Dis.**, v.75, p.347-353, 1991.
- TRIPLETT, E.W. The molecular genetics of nodulation competitiveness in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v.3, n.4, p.199-206, 1990.

PARTE V. MICORRIZAS

CAPÍTULO 20

MICORRIZAS ARBUSCULARES

Arnaldo Colozzi-Filho¹

Élcio L. Balota²

20.1. Introdução

O termo “micorriza” refere-se a associações mutualísticas entre espécies de fungos e raízes de plantas, sendo reconhecidos três grupos principais que, em relação às suas características morfo-anatômicas, dividem-se em: ectomicorrizas, ectendomicorrizas e endomicorrizas. As endomicorrizas podem ser de três tipos: orquidoídes, ericoídes e arbusculares. Neste capítulo serão tratadas especificamente as endomicorrizas arbusculares (MA), formadas por fungos da classe dos Zygomycetes, ordem Glomales, que possuem a capacidade de colonizar as raízes das plantas numa perfeita integração mutualística. Nesta associação, após o processo de infecção das raízes, ocorre o crescimento do micélio na região do córtex, com ramificações das hifas inter e intracelularmente. Estas ramificações intracelular são originárias de repetidas divisões dicotômicas, originando assim, estruturas típicas altamente especializadas denominadas arbúsculos, onde se realizam a maioria das trocas entre os simbiosites. Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) colonizam a maioria das plantas, desde Briófitas e Pteridófitas até Gimnospermas e Angiospermas, e praticamente todas as famílias, com exceção de algumas monocotiledôneas como Commelinaceae, Cyperaceae e Juncaceae e dicotiledôneas como Brassicaceae, Fumariaceae e Urticaceae (Silveira, 1992). Os FMA são de ocorrência generalizada, estando presentes em regiões tropicais, temperadas e árticas, incluindo densas florestas, áreas cultivadas, dunas e desertos (Lopes et al., 1983). Esta ocorrência generalizada sugere o relevante papel desempenhado pelos FMA no desenvolvimento e manutenção das comunidades vegetais.

Os benefícios da simbiose para o hospedeiro resultam de melhorias no estado nutricional da planta, melhor utilização e conservação de nutrientes no sistema, redução de perdas por estresses de natureza biótica (pragas e doenças) ou abiótica (desbalanço nutricional, déficit hídrico, e modificações fisiológicas e bioquímicas como maior taxa fotossintética e produção de raízes. Atribui-se a promoção do aumento no crescimento da planta à grande capacidade de absorção de nutrientes do solo, principalmente aqueles que movimentam-se por difusão, portanto, de baixa mobilidade, como o fósforo, cobre e zinco. As hifas micorrízicas externas às raízes funcionam como extensão do sistema radicular,

¹ Pesquisador, M.Sc., Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), Cx. Postal 1331, CEP 86001-970, Londrina, PR.

² Pesquisador, Ph.D, IAPAR.

aumentando sua capacidade em explorar maior volume de solo (Sanders & Tinker, 1971; Hayman & Mosse, 1972). Estas hifas podem atingir até 8 cm além da superfície da raiz, possibilitando a absorção daqueles nutrientes de baixa mobilidade além da zona de depleção. Esta capacidade de aumento na absorção de nutrientes é de grande interesse, principalmente, em condições tropicais, onde os solos apresentam baixos teores de P disponíveis, devido a sua alta capacidade de fixação. Além disso, plantas micorrizadas podem apresentar K_m (constante de Michaelis-Menten) menor, sugerindo efeitos da micorrização sobre os parâmetros cinéticos de absorção de fósforo, possibilitando que plantas micorrizadas possuam maior afinidade por este elemento (Cress et al., 1979).

O fósforo é o elemento que mais freqüentemente limita a produção nas regiões tropicais e subtropicais, apesar das plantas exigirem quantidades relativamente pequenas. Esta observação justifica o fato das micorrizas arbusculares serem consideradas com maior potencial de utilização na agricultura tropical que nas regiões de clima temperado.

Nas últimas décadas intensificaram-se os estudos com os FMA, na busca de maior conhecimento dos seus efeitos nas plantas e na perspectiva de utilização prática em culturas de interesse econômico. Inúmeros trabalhos de levantamento populacional de FMA, em ecossistemas naturais e em culturas de interesse econômico, têm sido conduzidos. Também têm sido isoladas novas espécies de fungos, testando-se sua eficiência em aumentar o crescimento e melhorar a nutrição das plantas cultivadas.

Os trabalhos de inoculação têm evidenciado que as espécies de FMA diferem em sua capacidade de colonizar as raízes, esporular no solo e também influenciar as plantas. Entretanto, estes testes na maioria das vezes, são feitos sob condições controladas, em substrato esterilizado e muitos dos resultados espetaculares obtidos nestas condições não são repetidos a campo, evidenciando a necessidade e a importância de estudos sob condições naturais.

Os estudos e a utilização prática dos FMA são dificultados pela impossibilidade do seu cultivo em meio axênico, apesar das inúmeras tentativas desenvolvidas. Estes fungos são biotróficos obrigatórios e ainda não se conseguiu formular um meio capaz de sustentar seu crescimento e esporulação sem a presença de raízes vivas. Os estudos em cultura axênica, com componentes orgânicos e/ou inorgânicos adicionados ao meio, têm fornecido informações valiosas sobre o metabolismo e as exigências nutricionais destes fungos. Estudos de biologia molecular, mapeamento genético e modernas técnicas de pesquisa também são utilizadas nos mais avançados laboratórios, mas o seu cultivo *in vitro* ainda permanece um desafio.

Entretanto, algumas metodologias utilizadas nos estudos de MA são básicas e seu domínio é pré-requisito para a maioria dos trabalhos, mesmo aqueles que procuram utilizar técnicas avançadas. Neste capítulo objetivou-se reunir, de forma detalhada e clara, incluindo-se algumas experiências pessoais dos autores, as metodologias básicas descritas na literatura aplicadas aos estudos com MA.

20.2. Critérios para Amostragem, Coleta e Armazenamento de Propágulos

20.2.1. Amostragem

A amostragem de solo para estudos microbiológicos é o primeiro procedimento de grande importância para o sucesso dos trabalhos e apresenta algumas dificuldades. Quando se trabalha com micorrizas, o simples exame visual do local a ser amostrado não nos permite escolher o melhor sítio. Além disso, dentro de um determinado sítio podem ocorrer variações nas características físicas, químicas e biológicas do solo, tais como umidade, pH e desenvolvimento radicular, que alteram a população e a atividade microbiana. Por isso, é fundamental considerar-se o princípio estatístico da repetição. O número de amostras e subamostras deve ser determinado caso a caso, de acordo com os objetivos e observando-se os princípios estatísticos. Quando se objetiva o levantamento populacional, o isolamento e identificação de espécies nativas e as amostragens a campo devem ser feitas considerando-se o ecossistema ou situações particulares de solo ou vegetação, determinando-se, sempre, áreas homogêneas para a amostragem. O sistema radicular e o solo rizosférico de culturas anuais podem ser facilmente amostrados, uma vez que o crescimento das raízes destas plantas, geralmente, é bem distribuído no solo. Entretanto, devem-se considerar as faces de exposição da planta à luz (Norte, Sul, Leste e Oeste) e as diversas profundidades de crescimento da raiz. Em plantas perenes, o sistema radicular é maior e apresenta grande variabilidade espacial, o que dificulta a amostragem. Balota (1989) cita que 85% das raízes de cafeeiro foram encontradas na profundidade de 0 a 10 cm, com densidade de raízes variando em função da distância do tronco e da direção de crescimento (linha de plantio ou entrelinha). O crescimento radicular foi maior numa distância de até 50 cm do tronco, tanto na direção da linha de plantio (9 m raízes/m³ de solo) como na direção da entrelinha (4 m raízes/m³ de solo), comparado a 75 cm-110 cm de distância do tronco, nos dois sentidos, que apresentaram em torno de 1,2 m raízes/m³ de solo. É importante observar, também, a época e a periodicidade das amostragens, considerando-se que, tanto as espécies de plantas quanto as de FMA possuem ciclos fisiológicos diferentes. Portanto, não existe uma regra geral para amostragem, sugerindo-se a observação dos fatores aqui discutidos para que se obtenham consistência e representatividade da amostra.

20.2.2. Coleta

Os FMA produzem seus propágulos (micélio e esporos) no solo, na região da rizosfera. Entretanto, algumas espécies podem, ainda, esporular internamente nas raízes, tornando importante a coleta de solo e raízes. As raízes são utilizadas, também, para a quantificação da colonização radicular. Quando ocorrer pequena quantidade de raízes na amostra, ou sua coleta não for possível, deve-se aumentar o número de subamostras. O material (solo+raízes) contendo propágulos de FMA (esporos e fragmentos de hifas) é coletado no campo com enxadão, trado ou anéis cilíndricos de metal, na profundidade ou horizonte onde se observa o maior crescimento radicular. O volume da subamostra depende do objetivo e das facilidades disponíveis para coleta e transporte. Frequentemente, no laboratório, utilizam-se amostras

de 50 mL de solo para determinar a densidade de esporos e 1 g de raízes para a avaliação da colonização radicular. Entretanto, sugere-se que a amostra composta possua volume mínimo que possibilite, além das avaliações micorrízicas, a análise química do solo e sua utilização como inóculo em vasos de cultivo e multiplicação. Após a coleta, o material pode ser acondicionado em sacos plásticos resistentes e identificados de maneira segura e deve ser transportado à sombra, evitando-se o aquecimento pela exposição ao sol. Temperaturas superiores a 50°C ocorrem facilmente nas amostras expostas ao sol, podendo, assim, inviabilizar os propágulos e secar as raízes.

Para amostragem em vasos de cultivo, coleta-se o substrato em diversos pontos, com espátula ou cilindros de metal, procurando-se danificar ao mínimo o sistema radicular da planta hospedeira. Os orifícios abertos devem ser preenchidos com solo desinfestado, irrigando-se o vaso a seguir. Os equipamentos utilizados para a coleta devem ser limpos, para evitar contaminações. Os demais procedimentos são semelhantes aos descritos para a amostragem a campo.

20.2.3. Armazenamento

As raízes a serem utilizadas na determinação da colonização radicular devem ser separadas do solo por peneiramento (malha 2 mm) ou manualmente, lavadas em água e armazenadas em frascos contendo solução de FAA (13 mL de formol + 5 mL ácido acético + 200 mL de etanol 50 %), ou etanol 50 %, conforme sugerido por Koske & Gemma (1989).

Amostras contendo solo, esporos e fragmentos de hifas podem ser armazenadas em sacos plásticos, sob refrigeração (4° a 6°C) e baixa umidade (5 a 10%), mantendo a viabilidade dos esporos por aproximadamente cinco anos (Fergusson & Woodhead, 1982). Estas condições dificultam o desenvolvimento de fungos e bactérias que parasitam os propágulos dos FMA. Para preparar o material, a secagem pode ser feita naturalmente à sombra, para grandes quantidades, ou em dessecador. Nunca utilize calor, pois altas temperaturas podem inviabilizar os propágulos. Em condições de umidade elevada (acima de 10 %), mesmo sob refrigeração, os propágulos podem perder a viabilidade antes de um ano de armazenamento. Mantenha sempre a temperatura sob controle, pois o congelamento também pode inviabilizar os propágulos.

Sob condições ambientais, o tempo de viabilidade do material é imprevisível, dependendo da espécie de FMA, do tipo de propágulo predominante na amostra (esporos e/ou micélio) e da população microbiana natural (saprófitas e parasitas).

Outros métodos, como a liofilização (Crush & Pattison, 1975), o método "L-drying" (Tommerup & Kidby, 1979) ou o armazenamento de esporos em solução antibiótica (Mertz et al., 1979), podem ser utilizados. Todavia, estes métodos se aplicam mais a conservação de esporos extraídos do solo, além de exigirem maior disponibilidade de pessoal, reagentes e equipamentos, o que os torna mais caros.

20.3. Estabelecimento e Manutenção de Banco de Inóculo Básico de Fungos Micorrízicos Arbusculares

O banco de inóculo básico (BIB) objetiva manter e/ou multiplicar propágulos de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) *in vivo*, fornecendo inóculo básico de boa qualidade e em quantidade suficiente para estudos de identificação e trabalhos de pesquisa sobre fisiologia, eficiência simbiótica e produção de inóculo. Geralmente, são mantidos por universidades, instituições de pesquisa ou empresas que trabalham com biotecnologia e preservam, vivas e multiplicadas, espécies (identificadas ou não) ou populações nativas de FMA coletadas em agroecossistemas de interesse. A inabilidade desses fungos em crescer e esporular em meios artificiais de cultivo, faz da multiplicação *in vivo* e do BIB a melhor estratégia para que se tenham propágulos de FMA disponíveis, viabilizando projetos que envolvam micorrizas.

De maneira geral, a técnica é simples. Inoculam-se esporos extraídos de amostras de solo, previamente separados por tipo ou espécie, nas raízes de plantas hospedeiras. Essas plantas são cultivadas em solo ou substrato desinfestados, sob condições semicontroladas, até que se obtenha abundante esporulação na rizosfera. Entretanto, limitações de ordem prática e fatores que afetam o estabelecimento da simbiose e a esporulação precisam ser observados, para obter sucesso no estabelecimento e manutenção do BIB.

Primeiramente, deve-se considerar as instalações e o espaço disponível. Geralmente, utilizam-se casas de vegetação ou telados, que protegem o material da chuva e da circulação de insetos e animais que podem promover contaminação levando solo de um vaso para outro. Como as plantas inoculadas são cultivadas em vasos e permanecem vegetando por vários meses, dependendo do número de espécies que se quer manter no BIB, a demanda por área pode ser grande. Além disso, para evitar contaminação os vasos devem ser mantidos, aproximadamente, 30 cm distantes entre si, o que também aumenta a demanda por espaço. Como estes espaços são caros e disputados, recomenda-se que o vaso seja o menor possível, suficiente apenas para suportar o crescimento do hospedeiro. Alternativamente, logo após obtida a esporulação, armazena-se o material em refrigerador. A solarização, a disponibilidade de água pura filtrada e a facilidade de acesso ao local são fundamentais.

Para cultivo do hospedeiro utiliza-se solo, substrato (solo + areia ou solo + vermiculita), ou solução nutritiva (hidroponia).

Na hidroponia, as plantas inoculadas são cultivadas em solução nutritiva, na presença ou ausência de substrato sólido, até que se obtenha esporulação dos FMA (Elmes & Mosse, 1984; Mosse & Thompson, 1984). Entretanto, devido ao seu alto custo, a hidroponia tem sido usada para manutenção de BIB e, apenas em casos especiais, para produção de inóculo.

Os efeitos das características do solo, tais como tipo, fertilidade natural e pH, são de grande importância e devem ser considerados no preparo do substrato do vaso de cultivo e multiplicação, pois afetam o desenvolvimento da planta hospedeira e atuam, diretamente, sobre os FMA, podendo inibir,

completamente, a esporulação. Solos com alto teor de argila possuem drenagem e aeração deficientes, dificultando a micorrização. Solos com fertilidade natural alta, especialmente alto teor de P, diminuem a dependência das plantas à micorrização, diminuindo a colonização radicular e, conseqüentemente, a esporulação. As espécies de FMA podem desenvolver-se em diferentes faixas de pH (Siqueira & Franco, 1988), o que pode, portanto, selecionar espécies. FMA do gênero *Glomus* sp. desenvolvem-se e apresentam maior esporulação em solos com pH próximo do neutro, ao contrário das espécies dos gêneros *Acaulospora* sp., *Gigaspora* sp., *Entrophospora* sp. e *Sclerocystis* sp., que preferem pH na faixa ácida. Portanto, sugere-se utilizar solos de fertilidade natural baixa, com 2 ppm a 5 ppm de P disponível, extraídos pelo método Mehlich (Colozzi-Filho, A., dados não publicados), arenosos (Menge, 1984) e com pH ajustado em função da espécie a ser multiplicada. Nestas condições, a micorrização é facilitada, ocorrendo maior produção de micélio externo, colonização radicular e esporulação no solo.

Quando o objetivo é multiplicar populações de fungos nativos, o solo utilizado nos vasos de cultivo pode ser coletado no local de origem da população que se quer multiplicar. Para o cultivo em substratos, freqüentemente, se utiliza a mistura de solo e areia ou solo e vermiculita, determinando-se as proporções em função do teor de argila do solo. Para Latossolo Roxo, com aproximadamente 70 % de argila, tem-se utilizado até 50 % de areia, ou 30 % de vermiculita (Colozzi-Filho, A., dados não publicados). A vermiculita tem-se mostrado como bom condicionador para solos argilosos, entretanto, sua alta capacidade de reter água exige controle rigoroso da umidade na condução do BIB.

A desinfestação do solo ou substrato pode ser feita por aquecimento úmido (vapor d'água) ou seco (estufa), autoclavagem (1 atm, 121°C / 30min), radiação gama (0,8 a 1,0 Mrad) ou pela aplicação de biocidas líquidos (hipoclorito de sódio e soluções antibióticas) ou gasosos (brometo de metila). Tanto a desinfestação por aquecimento quanto a aplicação de biocidas líquidos modificam as propriedades químicas do solo ou substrato. A autoclavagem "queima" a matéria orgânica do solo e pode liberar componentes tóxicos. A aplicação de biocidas líquidos, além de introduzir componentes químicos tóxicos no sistema, apresenta baixa eficiência, pois nem sempre consegue atingir os micro-habitats, onde se desenvolve grande parte da população microbiana. A radiação é um processo eficiente, inócuo, porém caro. O processo mais viável e eficiente tem sido a aplicação de biocidas gasosos (fumigantes). Utiliza-se o brometo de metila na dosagem de 263 cm³/m³ de solo ou substrato seco, colocados diretamente no vaso ou em montes espalhados em local limpo. É importante que a altura dos vasos ou montes não ultrapasse 20 cm, para que o gás circule facilmente. O material é coberto com lona plástica e vedado para impedir o vazamento de gás, pois o produto é extremamente tóxico para homens e animais. Após 48 horas da aplicação do brometo de metila, a lona pode ser retirada, guardando-se intervalo de 72 horas de aeração para utilização do substrato para plantio e inoculação.

A escolha da planta hospedeira é de grande importância na multiplicação de FMA. Estes fungos são simbioses obrigatórios e apresentam baixa especificidade em relação ao hospedeiro. Entretanto,

existem evidências de diferenças intra-específicas relacionadas a variações genéticas da planta (Duc et al., 1989), o que pode explicar a ocorrência de plantas naturalmente mais micorrízicas, como o milho e algumas gramíneas forrageiras (brachiária, grama batatais). Um bom hospedeiro deve apresentar algumas características como: adaptação às condições de clima e ao substrato onde vai ser cultivado; desenvolvimento rápido; preferencialmente perene; resistir ao maior número de doenças e pragas; e possuir sistema radicular abundante, facilitando o contacto planta-FMA. As gramíneas do tipo *Brachiaria* spp. têm sido preferencialmente utilizadas em BIB nas nossas condições, porque são colonizadas pela maioria dos FMA, são adaptadas à grande parte das regiões brasileiras, possuem sistema radicular ramificado e abundante, crescem em solos de baixa fertilidade e resistem a um grande número de pragas e doenças. Entretanto, toda planta, desde que micorrízica, é um hospedeiro em potencial e pode ser utilizada em vasos de cultivo e multiplicação.

Sempre que possível, utilizam-se sementes pré-germinadas ou plântulas obtidas de culturas de tecidos. Elas garantem o contato imediato dos esporos com as raízes, acelerando a micorrização. O uso de sementes deve ser evitado, porque sua demora em germinar pode dificultar a micorrização, diminuindo a eficiência da inoculação. Para a obtenção de sementes pré-germinadas deve-se utilizar substrato desinfestado (areia lavada ou vermiculita), evitando-se que sejam transplantadas trazendo algum FMA indesejado.

A inoculação das plântulas é feita com suspensão de esporos, no momento do transplante. A suspensão é obtida concentrando-se, em água, os esporos extraídos do solo. A densidade (nº. esporos/mL inóculo) depende da espécie de FMA, do hospedeiro que vai ser inoculado e do substrato. Sugere-se, como referencial, 50 esporos/mL solução, lembrando que é possível a cultura monospórica. A suspensão de inóculo é pipetada diretamente sobre a raiz do hospedeiro no orifício de plantio. Para melhor fixar o inóculo à raiz, deve-se fechar o orifício de plantio com solo seco, irrigando a seguir. Outro tipo de inóculo que pode ser utilizado nos vasos de cultivo, é o solo-inóculo. É utilizado para multiplicar fungos já isolados ou populações nativas. Neste caso, o solo inóculo é colocado diretamente no orifício de plantio, envolvendo as raízes da planta hospedeira. Quando se utiliza semente, o solo inóculo deve ser colocado abaixo desta, para que entre em contacto com as primeiras raízes emitidas.

A identificação dos vasos no BIB deve ser bem feita, com etiquetas e canetas resistentes ao sol e à umidade. O longo tempo que o material permanece em exposição ao sol pode destruir as etiquetas, ou apagá-las.

A umidade dos vasos deve ser mantida em aproximadamente 60% do volume total de poros. O excesso de irrigação favorece o aparecimento de hiperparasitas e prejudica o desenvolvimento de micélio e a esporulação dos FMA no solo. A falta de irrigação prejudica o desenvolvimento do hospedeiro e, conseqüentemente, da simbiose. Esporos dos FMA têm sua germinação afetada em condições de baixa umidade do solo.

A condução dos vasos no BIB é feita durante o período necessário para que ocorra esporulação, ou até que o material possa ser colhido para utilização como inóculo básico ou para armazenamento.

Durante este período podem ser feitas podas de limpeza no hospedeiro, no período de inverno e alguma adubação nitrogenada, como estímulo à vegetação. As primeiras extrações para verificação da ocorrência de esporulação podem ser feitas após o primeiro trimestre da inoculação.

20.4. Taxonomia de Fungos MA

Os FMA têm sido classificados como pertencentes a classe dos Zygomycetes, ordem Endogonales e família Endogonaceae. Esta família possui vários gêneros com espécies ectomicorrízicas ou saprófitas e aqueles com espécies formadoras de endomicorrizas arbusculares. Os gêneros formadores de micorrizas arbusculares são: *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Glomus*, *Sclerocystis*, *Gigaspora* e *Scutellospora*, que englobam em torno de 150 espécies (Morton, 1990). Contudo, em recente revisão, Morton & Benny (1990) propuseram a subdivisão da ordem Endogonales, originando uma nova ordem, a Glomales, que incluiria apenas os formadores de micorrizas arbusculares, enquanto que outros fungos permaneceriam na ordem *Endogonales*. Na Figura 20.1, pode ser observado que, dentro da ordem Glomales, foram criadas duas novas subordens (*Gigasporineae* e *Glomineae*) e duas novas famílias (*Gigasporaceae* e *Acaulosporaceae*).

Os gêneros de FMA podem ser diferenciados por características externas do esporo e sua formação (Tabela 20.1):

1. *Acaulospora* e *Entrophospora* apresentam esporos ectocárpicos, produzidos no interior de vesículas formadas por expansão da hifa, a qual se esvazia para formar o esporo. A diferença básica entre *Acaulospora* e *Entrophospora* é que, no primeiro, o esporo é formado lateralmente à hifa, enquanto, no segundo, sua formação ocorre no sentido longitudinal da hifa. Os esporos podem manter fragmentos da vesícula-mãe, porém, muitas vezes, ocorrem sésseis no solo (Figura 20.2).

TABELA 20.1 Principais diferenças entre gêneros de fungos micorrízicos arbusculares. (Extraído de Silveira, 1992).

Característica	<i>Glomus</i>	<i>Sclero-</i> <i>cystis</i>	<i>Acaulos-</i> <i>pora</i>	<i>Entro-</i> <i>phospora</i>	<i>Gigas-</i> <i>pora</i>	<i>Scutellos-</i> <i>pora</i>
Clamidosporos	+	+	–	–	–	–
Azigosporos	–	–	+	+	+	+
Esporoectocárpicos	+	–	+	+	+	+
Esporoemesporocarpos	+	+	–	–	–	–
Hifa de sustentação persistente	+	–	–	–	+	+
Presença de bulbo	–	–	–	–	+	+
Formação através da vesícula mãe	–	–	+	+	–	–
Células auxiliares	–	–	–	–	+	+

+ presente; – ausente .

2. *Glomus* forma clamidosporos isolados ou em esporocarpos, com hifa de sustentação reta ou afunilada, que permanece ligada ao esporo na maturidade. O conteúdo do esporo é separado da hifa por um septo que se invagina na membrana, no sentido esporo-hifa (Figura 20.3).
3. *Sclerocystis* forma clamidosporos dispostos, lado a lado, ao redor de um plexo de hifa terminal, na forma de esporocarpo (Figura 20.3).
4. *Gigaspora* e *Scutellospora* formam azigosporos ectocárpicos laterais ou terminalmente à hifa, apresentando hifas suspensoras em forma de bulbo. A diferenciação ocorre porque *Scutellospora* apresenta o escudo de germinação, por onde emerge o tubo germinativo (Figura 20.4).

A identificação é feita utilizando-se esporos provenientes do campo ou obtidos em vasos de multiplicação. Tem sido sugerido que, para estudos taxonômicos, o ideal seria a produção de esporos em vasos de cultivo, a partir de um único esporo (Walker, 1985). A taxonomia dos FMA tem sido dificultada pela impossibilidade do cultivo destes fungos em meio axênico, o que permitiria a obtenção de isolados, seguramente, puros e em grande quantidade.

A classificação e a identificação dos fungos MA baseiam-se nas características morfológicas e bioquímicas dos esporos. A identificação do gênero pode ser feita através da observação das características morfológicas externas do esporo e de sua formação. Em nível de espécie, além de observar características externas, como forma, diâmetro e cor do esporo, comprimento da hifa de sustentação e ornamentação externa da parede, observam-se, também, características internas, como conteúdo e paredes dos esporos. A caracterização das paredes divide-se em grupos, tipos, números, espessura, elasticidade e reação ao reagente de Melzer. Outras características, como formação de esporos dentro de raízes, frequência de fragmentos de solo aderidos externamente à parede, presença ou ausência de células auxiliares e sua morfologia, características bioquímicas e de germinação dos esporos, também são úteis para a identificação. Maiores detalhes sobre metodologia para identificação de FMA podem ser obtidos em Trappe & Schenck (1982) e Schenck & Perez (1987). Para que seja feita uma identificação segura, sugere-se a observação de 20 a 50 esporos ou mais (Trappe & Schenck, 1982), embora apenas um esporo possa ser suficiente.

Os esporos são observados ao microscópio, em lâminas preparadas com água, lactofenol (fenol, ácido láctico, glicerina e água, 1:1:1:1) ou lactoglicerol. Lâminas permanentes podem ser preparadas com álcool polivinil em lactofenol (PVL) ou álcool polivinil em lactoglicerol (PVLG). Tem sido sugerido a utilização de álcool polivinil na montagem das lâminas, pois o lactofenol pode causar degradação dos esporos, escurecendo-os acentuadamente (Walker, 1987).

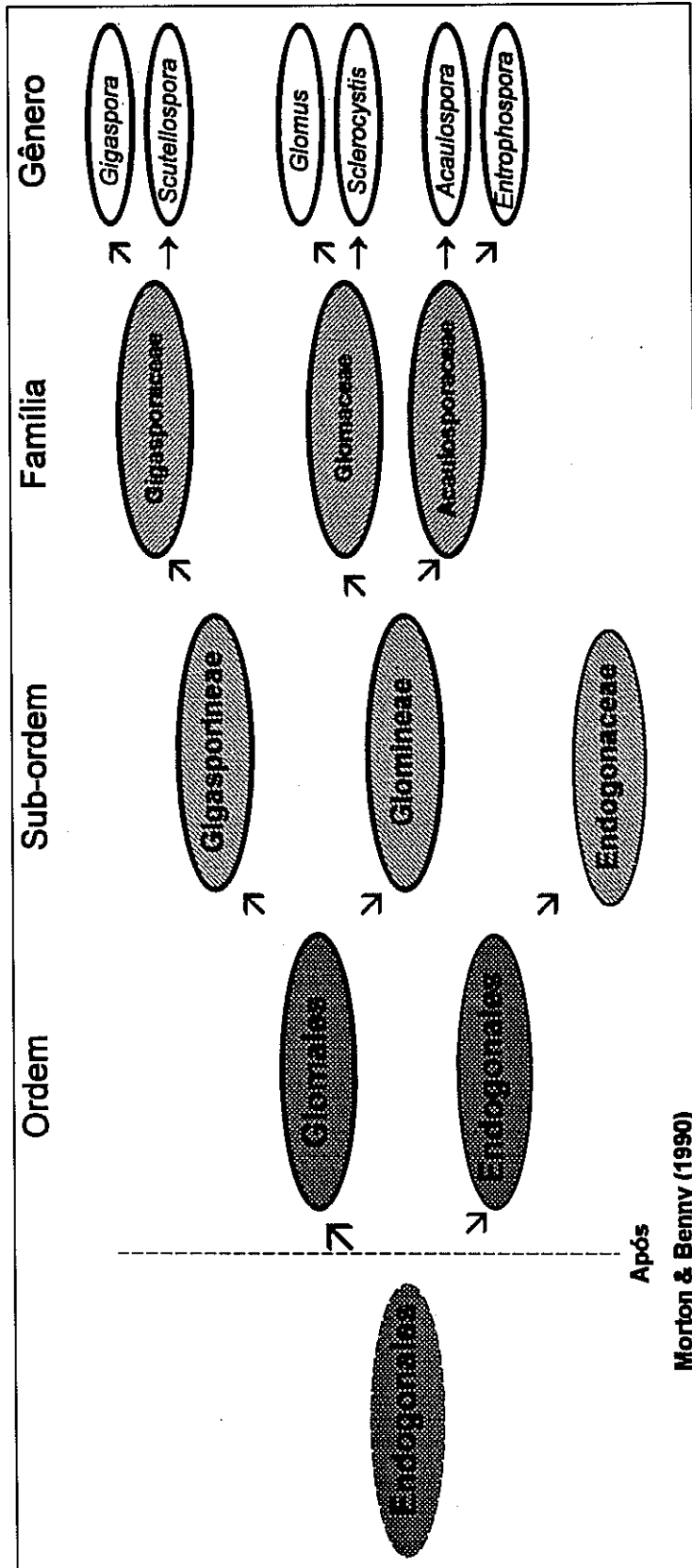
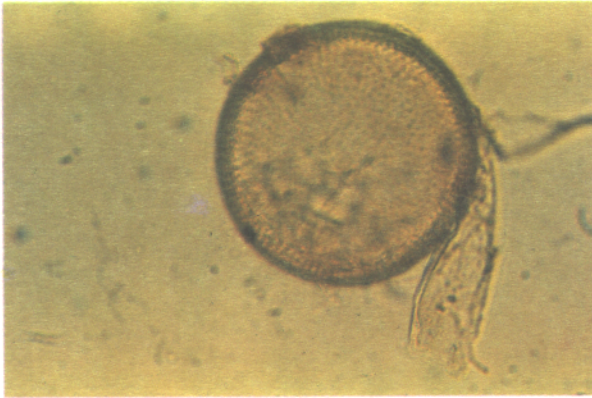
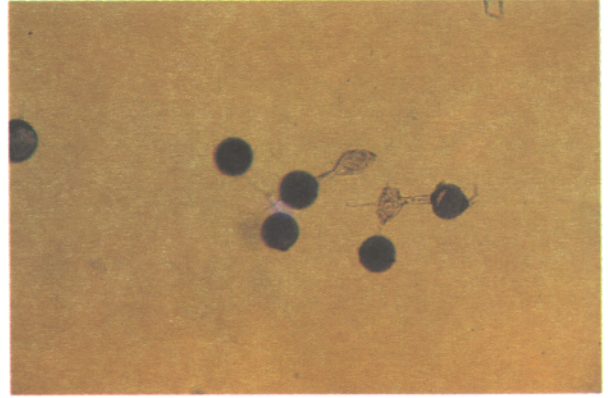


FIGURA 20.1. Classificação dos fungos micorrízicos arbusculares, segundo Morton & Benny (1990).

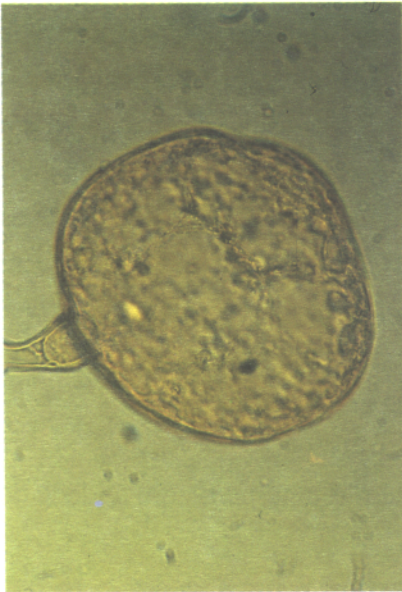


(a)

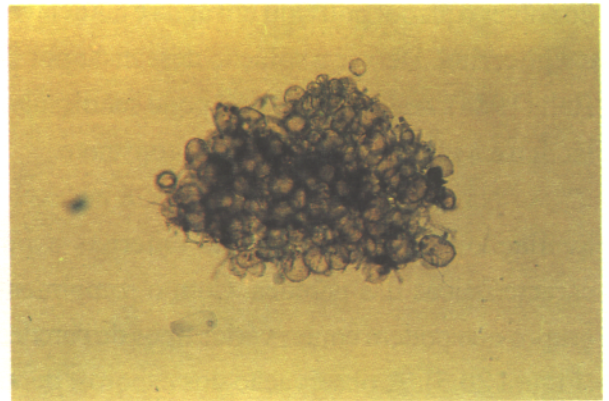


(b)

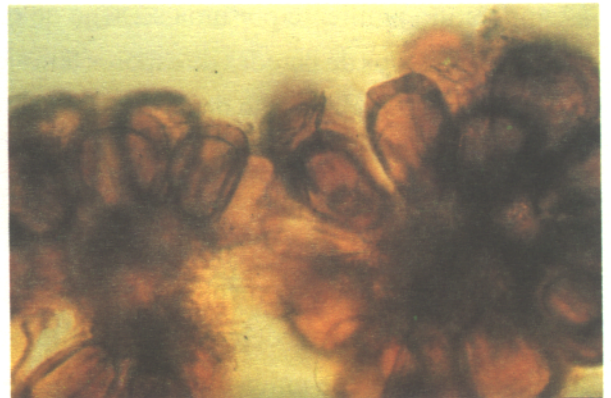
FIGURA 20.2. a) Esporo de *Acaulospora* sp. com presença de hifa de origem aderida lateralmente; b) esporos de *Entrophospora* sp. com hifa e vesícula-mãe aderidas.



(a)



(b)



(c)

FIGURA 20.3. a) Esporos de *Glomus* sp.; b) esporocarpos de *Glomus* sp.; c) esporocarpos de *Sclerocystis* sp. Observar a disposição dos esporos em torno de um plexo central.

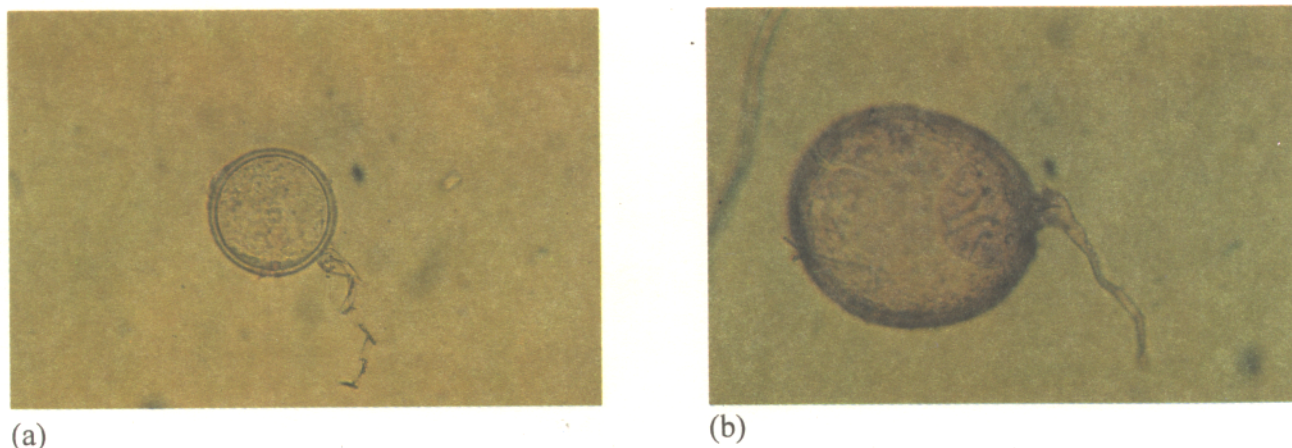


FIGURA 20.4. Esporos de *Gigaspora* sp. (a) e de *Scutellospora* sp. (b).

A solução estoque de PVL é feita dissolvendo-se 15 mL de álcool polivinil em 100 mL de água destilada, a 80°C, sendo estocada, posteriormente, em frasco escuro. A solução de trabalho é feita pela adição de 22 partes de ácido láctico e 22 partes de fenol em 56 partes de solução estoque. A solução de PVLG é feita com 1,67 g de álcool polivinil, 10 mL de ácido láctico, 10 mL de água e 1 mL de glicerina; dissolver o álcool polivinil em água e autoclavar por 15 min, adicionando, posteriormente, o ácido láctico e a glicerina. Deixar a solução descansar por 24 horas antes de ser utilizada (Morton, 1987). Segundo Hall (1984), o álcool polivinil pode ser dissolvido em água, sendo adicionado, posteriormente, o ácido láctico e a glicerina sob agitação constante.

Na observação dos esporos, é necessário que se preparem lâminas com esporos intactos para avaliação das características externas e lâminas com esporos rompidos para observação das características das paredes. Com o rompimento das paredes, várias porções destas dissociam-se em grupos que podem conter vários tipos de paredes, permitindo, assim, a observação dos seus componentes (Figura 20.5). A observação dos esporos, dentro das raízes, pode ser feita através da coloração destas com azul de tripano ou fucsina ácida. As lâminas feitas com PVL ou PVLG são colocadas para secar à temperatura ambiente por uma semana ou em uma chapa quente para acelerar o processo.

Os estudos de paredes de esporos têm sido feitos determinando: tipos, grupos, números e posição das paredes, além da reação desta com reagente de Melzer. Os tipos de paredes são:

- 1 - unitária: parede única, rígida e isolada;
- 2 - laminada: parede simples, composta de várias lâminas que aumentam seu número com a idade do esporo;
- 3 - evanescente: parede única ou multilaminada, efêmera, sendo despreendida com a idade;
- 4 - membranosa: parede delgada, flexível, que frequentemente enrugua e colapsa em solução hipertônica;
- 5 - expansiva: parede única ou laminada que expande quando tratada com meio ácido (ácido láctico ou PVL);
- 6 - coriácia: parede robusta, flexível, apresentando estrutura de “couro” quando em solução hipertônica;
- 7 - amorfa: parede flexível cuja elasticidade é afetada pelo preservante utilizado.

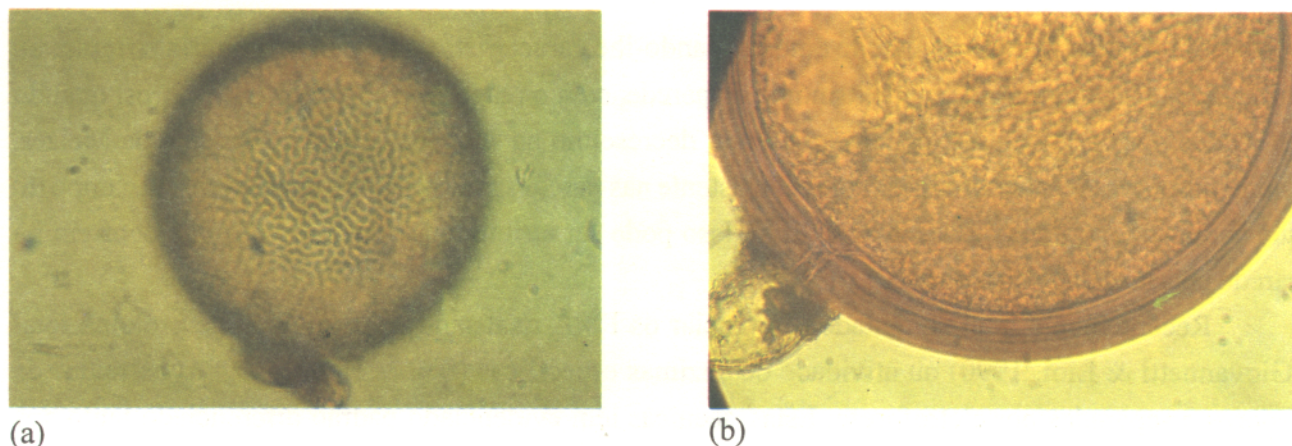


FIGURA 20.5. Algumas características de esporos de fungos micorrízicos arbusculares utilizadas para identificação: a) ornamentação de paredes; b) paredes múltiplas.

Consideram-se grupos de paredes aquelas que mantêm certa proximidade mesmo depois dos esporos rompidos. É importante, também, determinar sua posição, pelo fato de algumas espécies possuírem os mesmos tipos de paredes, porém, em seqüências diferentes. Deve-se salientar que a visualização dos tipos, dos grupos e dos números de paredes não é tarefa fácil, exigindo experiência do observador, principalmente em alguns tipos de esporos.

A utilização do reagente de Melzer produz reação nas paredes de alguns taxa, como reação amilóide (púrpura) e dextrinóide (vermelho), como por exemplo o vermelho-intenso apresentado pelas membranas internas de *Acaulospora* spp. ou presença de cor marron a preto granular em hifas de *Glomus convolutum* (Trappe & Schenck, 1982). Estas reações indicam diferenças químicas na composição das paredes. O reagente de Melzer pode ser feito com: 5 g de iodeto de potássio, 1,5 g de iodo, 100 mL de água e 100 g de cloridrato. O cloridrato pode ser utilizado, opcionalmente, como preservante.

Esporos da mesma espécie, porém de origens diferentes, podem apresentar algumas características distintas, sendo denominados, assim, de ecotipos. Isso pode ocorrer devido à diversidade de condições em que os esporos foram cultivados, à diversidade de respostas destes em função das diferentes pressões seletivas, ou ainda devido aos critérios taxonômicos utilizados atualmente não serem suficientes para diferenciar espécies intermediárias.

Os esporos devem ser preservados, preferencialmente, em solução de formaldeído a 5% ou glutaraldeído a 3,5%, mas não em lactofenol, que pode alterar algumas de suas características (Walker, 1987). Contudo, Morton (1986) salienta que a identificação, a partir de esporos estocados, pode acarretar erros, pois os esporos podem reagir de modo diferente às soluções que auxiliam na fixação. Pode ocorrer maior aderência entre as paredes de *Acaulospora*, que normalmente separam-se facilmente,

seqüência da menor abertura de malha para a maior. Nas peneiras ficam retidos os esporos e algum solo e material orgânico. Os sedimentos recolhidos no fundo do béquer podem ser ressuspensos diversas vezes, para aumentar a chance de obtenção de maior número de esporos.

Esse método é relativamente fácil e rápido, mas a purificação adicional do material retido nas peneiras é necessária, se o número de esporos no solo for baixo. A associação de métodos é importante quando se trabalha com solos que possuem grande quantidade de matéria orgânica e alto teor de argila, que condicionam a obtenção de peneirados com grande quantidade de fragmentos orgânicos e partículas de solo, dificultando a contagem dos esporos. Normalmente, o método da decantação e peneiramento úmido é associado com o método da centrifugação em sacarose (Jenkins, 1964). O material retido nas peneiras é recolhido em béquer e, posteriormente, feita a contagem dos esporos em placa com anéis concêntricos.

Quando se pretende manusear grande quantidade de solo, ou quando é necessária a recuperação de grande quantidade de esporos, é comum o uso de purificador para agilizar o processo de decantação e peneiramento, como sugerido por Byrd et al (1976) e Phipps et al (1976).

Método da centrifugação e flutuação em sacarose (Jenkins, 1974)

Esta metodologia é utilizada como complemento ao peneiramento úmido (Gedermann & Nicolson, 1963), eliminando restos de solo e material orgânico da amostra. O material retido nas peneiras é transferido para tubos de centrífuga com capacidade para 50 mL, adicionando-se água. Os tubos são balanceados e centrifugados por 4 a 5 min a 1750 rpm (± 1000 g). Depois da centrifugação o sobrenadante é cuidadosamente descartado, adicionando-se solução de sacarose a 50%. Para o preparo da solução de sacarose pode-se utilizar açúcar comercial. O material (solo+esporos) sedimentado é ressuspensionado com o auxílio de uma espátula e centrifugado novamente por 1 min. O sobrenadante, contendo os esporos, é vertido em peneiras, lavado abundantemente com água corrente e recolhido em um béquer para avaliação.

A associação destes dois métodos (peneiramento úmido e centrifugação em sacarose) tem sido muito utilizada, pela sua simplicidade e pelos resultados que apresenta. Esporos extraídos por este método podem ser observados na Figura 20.6.

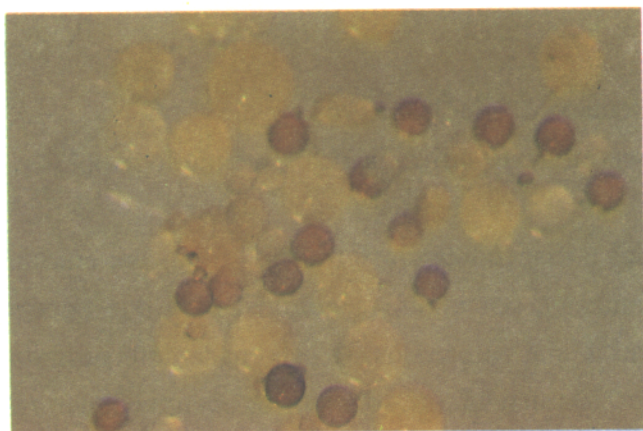


FIGURA 20.6.

Esporos de fungos micorrízicos arbusculares extraídos do solo por peneiramento úmido e centrifugação em sacarose.

Método da centrifugação e flutuação em gradiente de densidade (Ohms, 1957)

Este método baseia-se na propriedade dos esporos de FMA de possuírem densidade intermediária entre as partículas de solo e os fragmentos orgânicos .

O solo é suspenso em água, num béquer e agitado vigorosamente, deixando-se decantar por alguns segundos. Após a decantação, a suspensão é vertida em peneira com abertura de malha suficiente para reter os esporos de FMA. O material retido na peneira é suspenso em água e processado em duas etapas. Na primeira, o material é centrifugado em água por 3 min a 3.100 rpm. Enquanto as partículas de solo e os esporos decantam primeiro, as partículas leves têm decantação mais lenta, o que possibilita sua eliminação pelo descarte do sobrenadante.

Na segunda etapa a suspensão de esporos e resíduos de solo é colocada sobre um gradiente descontínuo de sacarose, em um tubo para centrífuga com capacidade para 50 mL. O gradiente é formado com 15 mL de solução de sacarose a 50% no fundo, 15 mL de solução de sacarose a 25% no meio e 10 mL de água na porção superior. A porção intermediária e a do topo são colocadas com o auxílio de uma seringa hipodérmica, sendo o líquido injetado cuidadosamente, ao longo da parede do tubo. A água na porção superior serve para dispensar o peneirado e, assim, reduzir o número de esporos que, por outro lado, poderiam ser carreados para porções inferiores. Depois de 5 min de centrifugação a 3100 rpm ($\pm 1500 G$), os esporos permanecem na porção intermediária e as partículas de solo sedimentam na porção inferior.

Os esporos da porção intermediária (sacarose 25%) são removidos com uma pipeta e transferidos para um béquer, onde é adicionada água para o decréscimo da gravidade específica da solução e para permitir a decantação dos esporos. Os esporos devem ser lavados com água várias vezes, para evitar plasmólise, e estarão prontos para avaliação com uma quantidade muito pequena de fragmentos orgânicos e de solo.

Método de flutuação e adesão (Sutton & Barron, 1972)

Esse método depende da rápida flutuação dos esporos na água agitada, capacidade hidrofóbica da superfície e adesão à superfície do tubo. Uma amostra de solo (10 g) é colocada em um cilindro graduado de 50 mL, o qual é cheio com água, tampado com uma rolha de borracha e agitado vigorosamente por 15 s. A suspensão é decantada por 2 min, tempo em que os esporos tendem a flutuar e a acumular-se na espuma na margem do menisco. O sobrenadante é colocado em um funil separador de 250 mL. Muitas das partículas suspensas, assim como os esporos que decantaram mais lentamente que as partículas de solo, são transferidos para o funil separador. A agitação e transferência para o funil separador podem ser repetidas várias vezes. Posteriormente, a suspensão no funil separador é decantada por 2 a 3 min, durante os quais os esporos acumulam-se na margem do menisco. A água é drenada numa vazão de 75 a 100 mL/min para outro funil separador de 250 mL e o procedimento é repetido. A espuma, os esporos e outras partículas aderidas à superfície dos funis são lavados e transferidos para um disco de

papel de filtro de 9 cm, sustentado em um funil e esticado numa placa de Petri. Um quadriculado de 1 cm é feito previamente no papel para facilitar a contagem. Os autores observaram que o método é altamente efetivo para quantificar e recuperar esporos em uma grande variedade de solos, com uma eficiência acima de 94%. Não foram observadas diferenças em função do tempo de decantação no cilindro graduado (1, 2 ou 5 min). Cerca de 94 a 98% dos esporos foram recuperados nas três primeiras suspensões, enquanto 96 a 98% dos esporos estavam no primeiro funil.

Método da centrifugação diferencial água/sacarose (Allen et al., 1979)

Esse método é uma combinação modificada do método da centrifugação em gradiente de sacarose (Ohms, 1957) e da flutuação e adesão (Sutton & Barron, 1979). Adicionar água a uma amostra de solo até atingir a saturação, deixando repousar por 15 min (geralmente é adicionada água a 25 g de solo até atingir a marca de 45 mL de solução num tubo de centrífuga para 50 mL). Centrifugar a solução por 10 min a 2000 rpm, descartar o sobrenadante e ressuspender o sedimentado em solução de sacarose 2 M contendo 2% de Calgon (substância dispersante). Centrifugar novamente por 10 min a 2000 rpm e transferir o sobrenadante para um funil separador de 125 mL. Drenar o líquido vagarosamente. Recolher os esporos e material orgânico aderidos à parede do funil. Separar os esporos das partículas orgânicas com auxílio de estilete e fazer as contagens.

Método da sedimentação diferencial em coluna de gelatina (Mosse & Jones, 1968)

Esse método tem como objetivo, basicamente, separar esporos de fragmentos orgânicos usando sedimentação diferencial em coluna de gelatina.

Preparação da coluna: a coluna de gelatina é preparada num tubo plástico de 30 cm de altura, com 37 mm de diâmetro interno, com uma rolha plástica inserida na boca. A gelatina é dissolvida em água destilada até as concentrações de 5, 15 e 20%, que possuem gravidade específica de 1,02, 1,04 e 1,05, respectivamente, a 32°C. A solução de gelatina a 20%, na temperatura de 30 °C, é colocada no tubo até atingir uma altura de 5 cm (aproximadamente 54 mL) e colocada a 4°C para solidificar. Isso é repetido para as concentrações de 15 e 5%. Por último, é colocada uma porção de água com 10 cm de altura no topo da coluna de soluções de gelatina. A coluna é imediatamente estocada a 4°C para que não ocorra perda do nível de solidificação e para prevenir a ação de microrganismos.

Separação dos esporos: a coluna de gelatina é colocada, verticalmente, em recipiente com água a 32°C para liquefazer. Paralelamente, 50 g de solo são usados para fazer o peneiramento úmido (Gerdemann & Nicolson, 1963). O material retido nas peneiras de interesse é colocado no topo da coluna para ocorrer a dispersão diferencial. Depois de 30 min de sedimentação, quando a maioria das partículas está depositada no fundo, a coluna é removida para ambiente com 4°C para solidificação. Posteriormente, a coluna de água é descartada e a coluna de gelatina é deixada alguns segundos embaixo da torneira de água quente, para que seja possível sua retirada do tubo de plástico e feitos cortes das respectivas concentrações

diferenciais, sendo desprezado 1 cm nas interfaces para evitar interferência dos limites diferenciais, e 2 cm do fundo do tubo. As respectivas seções são colocadas em béquer com água aquecida, para que a gelatina seja dissolvida. A suspensão resultante é filtrada sob torneira com baixa pressão e posteriormente são feitas as contagens dos esporos.

Na avaliação do método, os autores observaram que 75% dos esporos estavam concentrados na porção de gelatina a 15% e acima de 21% dos esporos estavam na porção de 20%. Os esporos possuem diferentes níveis de sedimentação e por isso podem ser separados por esse método. Entretanto, deve ser salientado que a concentração de gelatina e o tempo de sedimentação devem ser ajustados de acordo com o tipo de solo e o tamanho dos esporos.

Método da separação seca (Tommerup & Carter, 1982)

Este método baseia-se no princípio da decantação seca, usada para determinar micropartículas. Num fluxo de ar de mínima turbulência, as partículas de solo são separadas dos esporos de acordo com a velocidade de sedimentação, e coletadas em um papel de filtro na seqüência de equivalência do diâmetro.

Comentários gerais

Alguns estudos têm avaliado, comparativamente, os métodos de extração dos esporos de FMA. Estes estudos têm evidenciado que muitos destes métodos dependem da flutuação dos esporos no meio líquido. Métodos como o peneiramento úmido e flutuação e adesão poderiam perder esporos que afundariam sozinhos ou seriam arrastados por partículas de solo. Contudo, Iason & Allen (1986) observaram que os esporos raramente são perdidos com o descarte da água usada na centrifugação diferencial água/sacarose, mas a hidratação prévia à centrifugação é essencial. A hidratação dos esporos é especialmente importante em solos secos, para garantir a gravidade específica existente.

Em alguns tipos de solo a recuperação de esporos torna-se bastante difícil, principalmente naqueles que possuem estruturas que não se fragmentam ou se dissolvem facilmente na água, assim como aqueles solos com alto teor de fragmentos orgânicos, que são suficientes para esconder muitos esporos, mesmo naqueles métodos que sofrem alguma purificação. Tem sido evidenciado ainda que o método da placa apresenta um número consistentemente maior de esporos que outros métodos, ficando claro, porém, que essa técnica é de grande utilidade apenas para a avaliação do potencial de inóculo do solo.

A escolha do método apropriado pode depender das características do solo, do tipo de esporos a serem observados, do objetivo do trabalho e de outros fatores. Muitas vezes utiliza-se a associação de vários métodos, objetivando aumentar a eficiência e/ou diminuir a quantidade de material orgânico que possa dificultar a observação e contagem dos esporos.

20.6. Avaliação da Colonização Micorrízica

A avaliação da colonização micorrízica é baseada na observação da presença de estruturas fúngicas dentro das raízes. Para isso é necessária a preparação das raízes, o que consiste basicamente no clareamento e coloração.

20.6.1. Clareamento e Coloração das Raízes

O método, seguramente, mais utilizado pelos pesquisadores de todo o mundo, para a preparação das raízes para avaliação da colonização micorrízica, é aquele descrito por Phillips & Hayman (1970), no qual, basicamente, faz-se o clareamento das raízes pelo aquecimento em solução de KOH a 10%, a acidificação com HCl diluído e a coloração com azul de tripano a 0,05%. Pode também ser utilizado em raízes pigmentadas, usando-se H_2O_2 alcalina antes da acidificação com HCl. O clareamento das raízes com KOH tem como objetivo remover o citoplasma e o núcleo das células hospedeiras, deixando-as claras e transparentes, com o cilindro central visível. A água oxigenada ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2) alcalina pode ser preparada juntando-se 3 mL de NH_4OH , 30 mL de H_2O_2 a 10% e 567 mL de água, no momento de ser utilizada.

Anteriormente à metodologia de Phillips & Hayman (1970), as raízes eram coradas diretamente sem clarificação, utilizando-se fucsina ácida a 0,1% em cloridrato saturado (Gerdemann, 1955), azul de metileno com gelatina de glicerol na relação 1:4 (Peuss, 1958, citado por Mosse, 1981) ou azul de algodão (Mosse & Phillips, 1971). Após a metodologia idealizada por Phillips & Hayman (1970) têm sido criadas muitas variações da metodologia, nas quais se utilizam o clareamento e a coloração como mostra a Tabela 20.2.

Recentemente, tem sido muito utilizado o corante em glicerol ou lactoglicerol (Kormanik et al., 1980), em substituição ao lactofenol ou ao cloridrato, que são extremamente perigosos porque liberam gases tóxicos. O corante (0,05 g de azul de tripano) é colocado em 100 mL de uma mistura de ácido láctico, glicerina e água (1:1:1). O corante em lactofenol, glicerol ou lactoglicerol pode ser reutilizado, porém, sua eficiência diminui, acentuadamente, após a segunda utilização. Carbono ativado (10 g/L) pode ser utilizado para remover o corante do ácido láctico, permitindo, assim, sua reciclagem após filtragem em papel de filtro.

Para a melhor visualização das estruturas fúngicas sugerem-se testes do tempo ideal para clareamento e coloração de raízes para cada espécie de planta, pois elas possuem diferentes padrões bioquímicos, que podem variar, inclusive, em função do estágio fisiológico.

20.6.2. Determinação da Colonização Micorrízica

A determinação da colonização micorrízica é feita basicamente pela observação da presença de estruturas fúngicas dentro das raízes na região do córtex, onde ocorre o desenvolvimento inter e intracelular de hifas, podendo estender-se pela rizosfera; de arbusculos, originários de ramificações dicotômicas de hifas internamente às células; e de vesículas, glóbulos mais ou menos esféricos que ocorrem intra e extracelularmente.

TABELA 20.2. Métodos e reagentes utilizados para clarear e corar raízes para avaliação da colonização micorrízica.

Clareamento das raízes: reagentes, tempo e temperatura	Lava com água	Acidificação: reagente	Lava com água	Coloração: corante, tempo e temperatura	Retirada de excesso de corante	Referência
Raízes pigmentadas: KOH 10%, 2 h a 90° C em banho-maria; lavar com KOH novo e deixar em H ₂ O ₂ alcalina (10 vol.) por 10 min a 1 h a 20° C	Sim	HCl diluído	Não	Azul de tripano 0,05% e lactofenol por 5 a 10 min em banho-maria.	Lactofenol	Phillips & Hayman (1970)
Raízes não pigmentadas: KOH 10 % por 1 h a 90° C em banho-maria.	Sim	HCl diluído	Não	Azul de tripano 0,05% e lactofenol por 5 min a 100° C em banho-maria.	Lactofenol	Phillips & Hayman (1970)
HCl 1 N por 10 min à temperatura ambiente.		Cloridrato saturado por 10 min 100°C banho-maria.		Fucsina ácida 0,1% por 10 min em solução quente.	2 vezes em lactofenol	Possingham & Obrink (1971)
Idem Phillips & Hayman (1970).				Fucsina ácida 0,1% em lactofenol por 10 min a 100° C em banho-maria.		Schenck & Hinson (1971)
KOH 10% por 1 noite à temperatura ambiente.	Sim	HCl 1%	Não	Azul de tripano em lactofenol de um a vários dias à temperatura ambiente.	Vários dias em ácido láctico	Kruckelmann (1975)
KOH 10% por 10 min em autoclave 121° C; lavar em KOH novo; deixar em H ₂ alcalina 3% por 10 min à temperatura ambiente.	Sim	HCl diluído		Cloridrato de fucsina ácida (900 ml água, 100 ml cloridrato e 0,5 g fucsina ácida) por 30 min em autoclave a 121° C.	Lactofenol	Bird et al. (1974)
KOH 10% por 30 min a 90° C em banho-maria.	Sim			Azul de tripano em lactofenol 0,05% + Sudan IV saturado em lactofenol.	Lactofenol	Cox & Sanders (1974)
KOH 10% por 30 min a 90° C em banho-maria.			Não	Azul de tripano 0,05% em água.	Ácido láctico	Crush (1974)
KOH 10% por 30 min a 90° C em banho-maria.				Fucsina ácida 0,01% em lactofenol por 10 min em autoclave a 110° C.		Schenck & Schroeder (1974)

(continua...)

Tabela 20.2. Continuação.

Clareamento das raízes: reagentes, tempo e temperatura.	Lava com água	Acidificação: reagente	Lava com água	Coloração: corante, tempo e temperatura	Retirada de excesso de corante	Referência
Em lactofenol.				Azul de anilina		Vozzo & HacsKayl (1974)
KOH 10% 1 a vários dias à temperatura ambiente, se necessário aquecer por 10 min a 100° C em banho-maria; lavar com hipoclorito sódico.	Sim	HCl 10%	Não	Azul de metileno 0,1%		Read et al. (1976)
KOH 10% or 1 a 2 h a 70° C ou 1 a 3 dias à temperatura ambiente; podendo ser branqueada com H ₂ O ₂ .	Sim	Azul de tripano 0,01% e ácido acético 50%.		Azul de tripano 0,1% em lactofenol por 2 horas		Ambler & Young (1977)
KOH 10% por 15min a 90° C em banho-maria.				Fucsina ácida 0,01% em cloridrato saturado por 30 min em autoclave a 121° C		Backman & Clark (1977)
KOH 10% por 1 h a 90° C em banho-maria.	Sim	HCl diluído	Não	Sudan IV saturado em lactofenol.	Lactofenol	Cooper & Lösel (1978)
KOH 10% por 10 min. em autoclave.	Sim	HCl diluído		Azul de tripano 0,05% em lactofenol por 5 min em vapor quente.	1 noite em lactofenol	Luedders et al. (1979)
KOH 10% por 1 h a 90° C em banho-maria.	Sim	HCl diluído	Não	Azul de tripano 0,05% em lactofenol por 1 noite em temperatura ambiente.		Miller et al. (1979)
KOH 10% por 2-3 dias à temperatura ambiente.	Sim	HCl 1 N		Azul de tripano 0,05% em lactofenol por 1 dia à temp. ambiente.		Smith & Bowen (1979)
Deixar em água por 1 noite.				1 hora em azul de lagodão 0,5% em lactofenol.	Lactofenol	Allen & Allen (1980)
KOH 20% por 1 h a 75° C em banho-maria.		20ml KO 2-3 ml H ₂ O ₂ , 110ml água e 20ml de álcool 95% a 75° C em banho-maria		Azul de tripano 0,05% em lactofenol por 5 min em autoclave a 115° C.		Bartschi & Garree (1980)

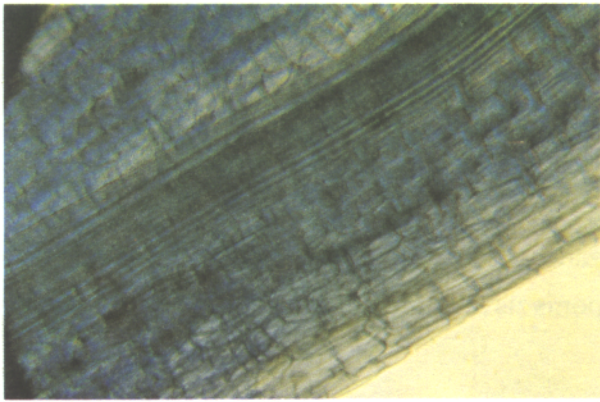
(continua...)

Tabela 20.2. Continuação.

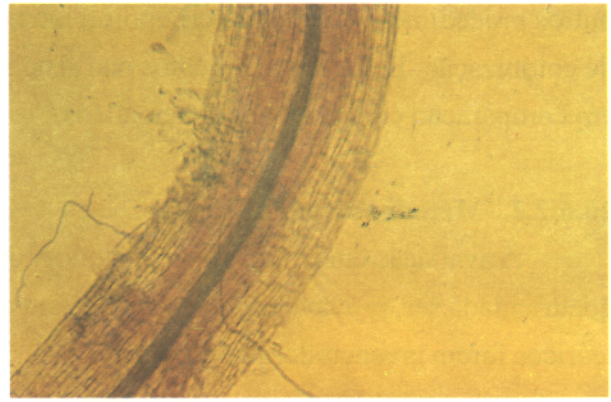
Clareamento das raízes: reagentes, tempo e temperatura	Lava com água	Acidificação: reagente	Lava com água	Coloração: corante, tempo e temperatura	Retirada de excesso de corante	Referência
KOH 10% por 1 h a 90° C em banho-maria	Sim	HCl diluído	Não	Azul de tripano 0,05% em lactofenol sem aquecer.	Lactofenol ou glicerol	Chamber et al. (1980)
KOH 10%, 10 min em autoclave ou 1 h a 90° C em banho-maria; lavar 3 vezes em água e branquear com H ₂ O ₂	Sim	HCl 1% por 3 min.		Fucsina ácida 0,01% em lactofenol, 10 min em autoclave ou 10 a 60 min a 90° C em banho-maria.	Lactofenol	Kormani et al. (1980)
Idem anterior	Sim	HCl 1% por 3 min.	Não	Fucsina ácida 0,01% em lactoglicerol (875 ml ácido láctico+63 ml glicerol + 62 ml de água) por 10 min em autoclave ou 10/60 min a 90° C em banho-maria.	Ácido láctico ou glicerol	Kormani et al. (1980)
KOH 10% por 10 min em autoclave, lavar em KOH 10%, deixar por 45 min em H ₂ O ₂	Sim	HCl diluído	Não	Fucsina ácida 0,01% em lactofenol em autoclave	Lactofenol	Maronek et al. (1980)
KOH 2,5% por 40 min a 90° C ou a 10% 10/15 min 100° C, podendo branquear com H ₂ O ₂	Sim	HCl 1% por 1 a 24 hora.	Não	Azul de tripano 0,05% em solução (500 ml glicerol + 450 ml de água e 50 ml HCl 1%) por 3 min em autoclave a 121° C ou 15/60 min a 90° C	Glicerol	Koske & Gemma (1989)

As vesículas são estruturas morfológicas facilmente distinguidas. Os arbúsculos são estruturas delicadas que apresentam ramificações dicotômicas visíveis apenas em aumentos maiores, e naqueles menores apresentam estruturas com limite externo não claramente definido. Estes arbúsculos possuem vida curta, sendo prontamente disponíveis à absorção.

Para observação da colonização micorrízica podem ser preparadas lâminas temporárias com lactofenol ou lactoglicerol, ou permanentes com PVA (resina de álcool polivinil) em lactofenol ou lactoglicerol. As raízes coradas podem ser preservadas em solução de lactoglicerol. Aspectos gerais da coloração de raízes podem ser observados nas Figuras 20.7, 20.8 e 20.9.



(a)



(b)

FIGURA 20.9. Raízes micorrizadas coradas com: a) azul de tripano e b) fucsina ácida.

20.6.2.1. Métodos não sistemáticos

A avaliação da colonização micorrízica radicular usando procedimentos não sistemáticos pode ser feita por diferentes caminhos, dependendo do objetivo do estudo. O objetivo primário de muitos estudos é determinar a porcentagem de raízes colonizadas e a intensidade da colonização dentro das raízes.

Método Visual: As raízes coradas são espalhadas uniformemente numa placa de Petri e avaliadas por microscopia através de movimentos cuidadosos com a placa. A avaliação é feita pela atribuição de notas. A escala de notas recomendada pelo Institute for the Mycorrhizal Research and Development, USDA Forest Service, Athens, Georgia, é como se segue: 1 = 0 a 5%; 2 = 6 a 25%; 3 = 26 a 50%; 4 = 51 a 75% e 5 = 76 a 100% de colonização. Normalmente, 3 min de observação são suficientes para classificar a amostra em uma classe apropriada. Quando a classificação da amostra situa-se entre duas classes, podem ser selecionados cinco ou seis campos ao acaso e reavaliados, cuidadosamente, para colocá-la em uma classe mais apropriada. Este método é rápido, apesar de ser encarado com restrições por muitos pesquisadores, pela sua subjetividade.

Com relação à intensidade da colonização, Kormanik et al. (1980) determinam três categorias para avaliar esta intensidade: 1) apresentam raízes com pequenos pontos de colonização esparsamente distribuídas ao longo das raízes; 2) apresentam grandes pontos de colonização distribuídos, uniformemente, através das raízes, mas raramente coalescentes; e 3) quando as raízes estão, praticamente, tomadas pela colonização micorrízica.

Estes procedimentos, não sistemáticos, podem ser feitos em muitos estudos, mas não devem ser feitos em estudos que têm como objetivo obter dados morfológicos quantitativos (vesículas, micélio, arbúsculos) da infecção micorrízica em si, mas podem ser adotados como uma avaliação adicional aos

outros procedimentos sistemáticos, pois a intensidade da colonização é independente da porcentagem de colonização. Estes procedimentos não sistemáticos podem e, ocasionalmente, devem ser checados em comparação com métodos sistemáticos.

20.6.2.2. Métodos sistemáticos

A avaliação em lâminas é um método muito utilizado, apesar de o método da interseção em placa quadriculada ser, provavelmente, o mais exato dos disponíveis atualmente, se todos os requerimentos teóricos forem preenchidos naturalmente.

Método da Lâmina: Neste método, segmentos de raízes de aproximadamente 1 cm de uma amostra corada são selecionados ao acaso e montados paralelamente em uma lâmina de microscópio em grupos de 10. Os autores sugerem que 30 a 100 segmentos de raízes são suficientes para avaliação por este método. A extensão da colonização radicular é avaliada (aumento: 100 a 250) medindo o comprimento em mm para cada segmento e expressado como porcentagem do comprimento de raízes colonizadas.

O método pode ser simplificado avaliando-se apenas a presença e ausência de colonização em cada segmento, através de movimentos perpendiculares, e o resultado é expresso em porcentagem de raízes colonizadas. Contudo, os autores salientam que este procedimento modificado pode resultar em dados que apresentem grandes erros-padrão quando comparados àqueles obtidos por outros métodos.

Método da Placa Quadriculada (Giovanetti & Mosse, 1980)

Este método pode ser utilizado para estimar tanto a proporção do comprimento de raízes colonizadas, como o total do comprimento de raízes da amostra.

As raízes são espalhadas na placa de Petri, que possui, no fundo, linhas quadriculadas de 1,27 cm, fazendo-se a observação da presença e ausência de colonização nas linhas verticais e horizontais, exatamente no ponto onde as raízes cruzam as linhas. A avaliação de todo o campo da placa é necessária quando se deseja estimar o comprimento total de raízes da amostra, não o sendo, porém, quando se deseja estimar apenas a porcentagem do comprimento de raízes colonizadas. Os autores do método salientam que bons resultados são obtidos se observados no mínimo 100 pontos de interseção. Estas linhas quadriculadas podem ser feitas em um pedaço de acetato que é colocado dentro de uma placa de Petri, sendo outra placa com a amostra colocada dentro desta.

O método é baseado na fórmula de Newman (1966), na qual o comprimento total de raízes espalhadas numa dada área é igual ao número de vezes que elas interceptam uma linha reta traçada ao acaso nessa área:

$$R = \frac{\pi A \times n}{2 H}$$

onde: R = total do comprimento de raízes;
 A = área na qual as raízes estão distribuídas;
 n = número de interseções entre raízes e linhas retas; e
 H = comprimento total das linhas retas.

Quando a distância entre as interseções é 14/11 (1,27 cm), $A = 2H$. Nestas condições, o comprimento das raízes, em centímetros, é igual ao número de interseções raízes-linhas, ou $R = n$.

Têm sido utilizados, ainda, outros métodos como a avaliação da quitina total, componente da parede de hifas fúngicas, depois de sua conversão para glucosamina, com leitura em espectrofotômetro (Hepper, 1977) e o método colorimétrico de Daft & Nicolson (1972), pois raízes de algumas plantas com endomicorrizas produzem um pigmento amarelo que espalham na água quando cortadas. Avaliando a intensidade deste pigmento em luz de mercúrio ultravioleta, observou-se boa correlação com a intensidade de colonização micorrízica avaliado por métodos sistemáticos. Tem sido sugerido que este método dá bons resultados quando a colonização micorrízica é alta, apesar de sua subjetividade. Existe também o fato de este pigmento ocorrer em condições de vaso, mas nem sempre em plantas do campo, além de ocorrer também somente em algumas plantas hospedeiras.

20.7. Alguns Procedimentos para Estudos *in Vitro*

O cultivo dos FMA sob condições controladas, em que os componentes do meio são conhecidos, tem sido um grande desafio aos pesquisadores do mundo todo. Insistentemente, os requerimentos nutricionais destes fungos permanecem desconhecidos e, até hoje, somente partes de seu metabolismo têm sido compreendidas. Muitas vezes não se dispõe de metodologias sensíveis, capazes de detectar pequenas diferenças, levando ao empirismo e a interpretações errôneas. Por isso, os estudos *in vitro* com cultura axênica ou monoxênica são tão importantes. O teste de novos produtos ou combinações destes, ou mesmo o desenvolvimento de novas metodologias pode ser a chave para esclarecer as vias metabólicas dos FMA e permitir seu cultivo e reprodução em laboratório. Os desafios são muitos e exigem conhecimento e criatividade. Entretanto, algumas metodologias são básicas e seu domínio pode facilitar os trabalhos.

Desinfestação superficial de esporos: embora não sejam o único tipo de propágulo dos FMA, os esporos tem sido os mais utilizados nos experimentos *in vitro*, porque não apresentam auto-inibição e podem germinar em água, solo ou meios de cultivo, mesmo na ausência de raízes vivas (Siqueira, 1987). Entretanto, os esporos estão, freqüentemente, associados e/ou contaminados por outros microrganismos (fungos e bactérias), que os parasitam (Ross & Ruttencuter, 1977; Sylvia & Schenck, 1983) e contaminam os meios, dificultando a avaliação e a interpretação dos resultados. A desinfestação é feita, basicamente, através da lavagem e/ou imersão dos esporos em soluções contendo antibióticos e agentes desinfestantes.

Entretanto, a grande variação nas espécies de contaminantes e na natureza da contaminação (exógena ou endógena) diminui a probabilidade de que um único método seja 100% eficiente. O primeiro método para desinfestação de esporos foi descrito por Mosse (1959), surgindo, a partir daí, diversas variações de uso com relação à concentração, tempo de exposição, ou mesmo dos antibióticos ou desinfestantes utilizados (Mertz et al., 1979; Silvia & Schenck, 1983). Recentemente, Colozzi-Filho (1988) estudou alguns dos produtos mais utilizados, testando-os em diferentes FMA, e sugere o seguinte procedimento para desinfestação:

1. lavar os esporos com jatos fortes de água, selecionando-os quanto ao aspecto morfológico. Descartar esporos velhos, com fragmentos de solo ou material orgânico aderidos ou com sinais de hiperparasitismo;
2. recolher os esporos selecionados em seringas de vidro com capacidade para 20mL, transferindo-os para unidades de filtração (papel de filtro comum colocado em suporte tipo "Swinnex" da Millipore);
3. acoplar a unidade de filtração em outra seringa contendo 20mL de hipoclorito de sódio a 1%, aplicando-o vagarosamente durante 20 min;
4. lavar rapidamente os esporos (três vezes), com água destilada autoclavada (20mL/vez);
5. aplicar vagarosamente, em lavagem sobre os esporos, 20mL de estreptomicina a 100 ppm, ou gentamicina 50 ppm, durante 30 min;
6. lavar com água destilada autoclavada, conforme descrito no item 4; e
7. em condições assépticas, retirar o papel de filtro contendo os esporos, transferindo-os para placas de Petri contendo água estéril, onde permanecerão em suspensão, prontos para serem utilizados. Alternativamente ao uso dos antibióticos em lavagem dos esporos pode-se incorporar 100 ppm de estreptomicina ao meio de germinação. Neste caso, o antibiótico é misturado ao meio após sua autoclavagem, quando este ainda se encontra liquefeito, antes de sua distribuição nas placas.

Todo o material e reagentes utilizados devem ser estéreis e o procedimento executado em condições de assepsia.

Para aumentar a eficiência da desinfestação, tem-se utilizado a aplicação de ultra-som nos esporos por 3 min, antes da aplicação do hipoclorito de sódio e ao final da aplicação do antibiótico (Colozzi-Filho, dados não publicados).

Avaliação da germinação de esporos: os esporos de FMA germinam através da emissão de um ou mais tubos germinativos, que rompem a parede e crescem perpendicularmente aos esporos, dando origem às hifas (Figura 20.10). Consideram-se germinados aqueles esporos que emitiram, pelo menos, um tubo germinativo. As contagens para determinação do número ou porcentagem de esporos germinados são feitas observando-se os esporos ao microscópio estereoscópico, sob aumentos que variam da 80 a 400. Quando se trabalha com meios à base de ágar, nem sempre é possível visualizar o tubo germinativo, pois algumas vezes ele pode crescer no ágar, do lado oposto ao lado visível do esporo. Portanto, é preciso atenção no momento da avaliação, procurando sempre virar os esporos com estilete em caso de dúvida sobre a germinação. Em meio líquido, esta avaliação é facilitada, pois com leve agitação pode se visualizar todo o esporo.

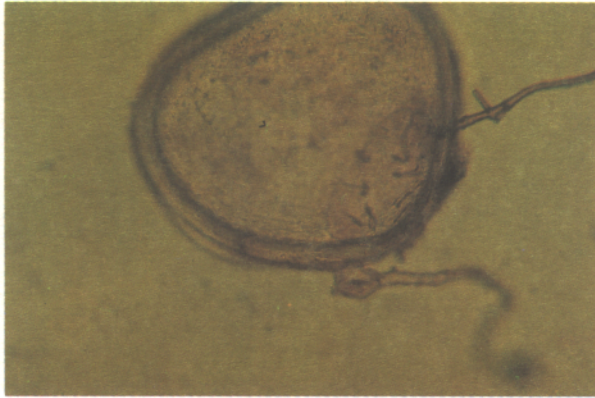


FIGURA 20.10. Esporo germinado de *Scutellospora* sp.

Avaliação do crescimento micelial: o crescimento micelial de FMA *in vitro* é geralmente avaliado ao microscópio estereoscópico, com aumentos que variam de 80 a 400 . Consideram-se micélios, tubos germinativos maiores que 1/3 do diâmetro médio do espora. O crescimento micelial pode ser avaliado medindo-se o comprimento das hifas com auxílio de uma escala graduada (divisões de 0,1 mm), conforme utilizado por Siqueira et al. (1982), Hepper & Jakobsen (1983), Tsai & Phillips (1991) e Elias & Safir (1987), atribuindo-se categorias de crescimento de acordo com a medida do volume ou do diâmetro do micélio total produzido ao redor do espora (Azcón, 1987; Mostasso et al., 1994). A contagem de células auxiliares ou esporos vegetativos produzidos *in vitro* também é um parâmetro que auxilia na avaliação do desenvolvimento micelial, uma vez que a produção dessas estruturas relaciona-se ao vigor do micélio. Paula (1988) utilizou, além da determinação de classes de crescimento, a contagem do número de ramificações do micélio e de pontas de hifas. A determinação de mais de um parâmetro pode auxiliar nas avaliações, uma vez que algumas determinações são pouco sensíveis para detectar pequenas diferenças. Na prática, medidas do comprimento de hifas ou determinações do número de ramificações e pontas de hifas, em situações de grande crescimento micelial, são extremamente trabalhosas. O micélio dos FMA cresce no meio sem orientação definida, criando emaranhados de hifas (Figura 20.11) que podem confundir facilmente até o avaliador mais experiente. Nesta situação, a determinação de categorias de crescimento parece ser a alternativa mais indicada. Silva (1990) utilizou a fragmentação do micélio pela agitação em meio líquido com pérolas de vidro, contando os fragmentos de hifas recolhidos em filtro milipore quadriculado. Esta metodologia pode acrescentar precisão à avaliação, mas é extremamente difícil de ser executada.

Portanto, a avaliação do crescimento micelial *in vitro* não é tarefa fácil. A fragilidade do micélio dificulta seu manuseio ou o uso de equipamentos de maior precisão. Novas metodologias precisam ser desenvolvidas.

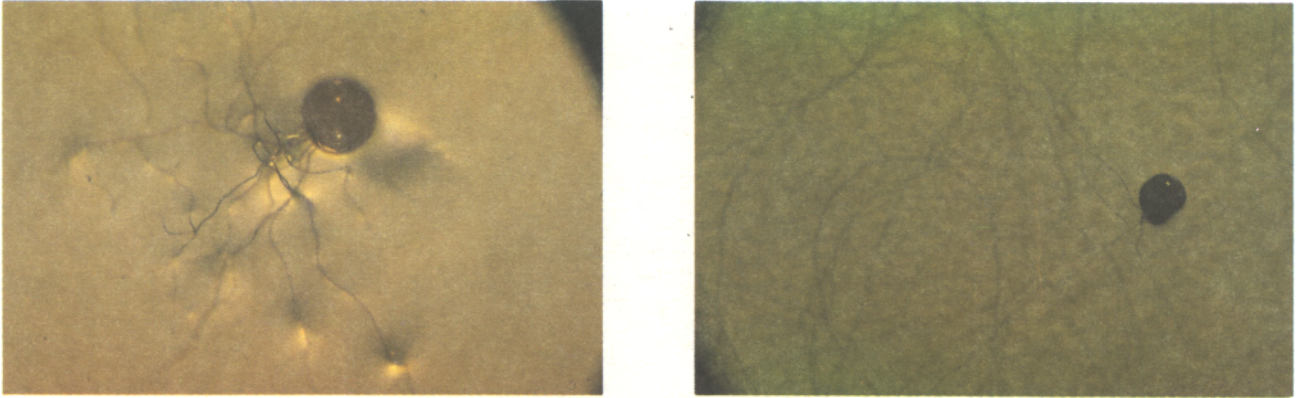


FIGURA 20.11. Crescimento micelial de esporos de fungos micorrízicos arbusculares *in vitro*.

20.8. Referências Bibliográficas

- ALEXANDER, M. Most probable number method for microbial populations. In: BLACK, C.A., ed. **Methods of soil analysis, Part 2, Chemical and microbiological properties**. Madison: Am. Soc. Agron., 1965, p.1467-1472.
- ALLEN, E.B.; ALLEN, M.F. Natural re-establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizae following stripmine reclamation in Wyoming. **J. Appl. Ecol.**, v.17, p.139-147, 1980.
- ALLEN, E.B.; MOORE JR, T.S.; CHRISTENSEN, M. Growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal and non-mycorrhizal *Bouteloua gracilis* in a defined medium. **Mycologia**, New York, v.71, p.666-669, 1979.
- AMBLER, J.R.; YOUNG, J.L. Techniques for determining root length infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.41, p.551-554, 1977.
- BACKMAN, P.A.; CLARK, E.M. Effect of carbofuran and other pesticides on vesicular-arbuscular mycorrhizal in peanuts. **Nematropica**, v.7, p.13-17, 1977.
- BALOTA, E.L. **Flutuação sazonal de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares no cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, 1980. 145p. (Tese de Mestrado).
- BIRD, G.W.; RICH, J.R.; GLOVER, S.U. Increase in endomycorrhizae of cotton roots in soil treated with nematicides. **Phytopathology**, v.64, p.48-51, 1974.
- BYRD, D.W.; BARKER, K.R.; FERRIS, H.; GRIFFIN, E.E.; SMALL, R.H.; STONE, C.A. Two semi-automatic elutriators for extracting nematodes and certain fungi from soil. **J. Nematol.**, v.8, p.206-212, 1976.
- BOWEN, G.D. Mycorrhizal roles in tropical plants and ecosystems. In: MIKOLA, P., ed. **Tropical Mycorrhiza Research**. Oxford: Oxford University Press, 1980. p.165-190.

- CHAMBERS, C.A.; SMITH, S.E.; SMITH, F.A. Effects of ammonium and nitrate ions on mycorrhizal infection, nodulation and growth of *Trifolium subterraneum*. **New Phytol.**, v.85, p.47-62, 1980.
- COLOZZI-FILHO, A. **Desinfestação superficial de esporos de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares**. Lavras: ESAL, 1988. (Tese de Mestrado).
- COOPER, K.M.; LÖSEL, D.M. Lipid physiology of vesicular-arbuscular mycorrhiza. I. Composition of lipids in roots of onion, clover and ryegrass infected with *Glomus mosseae*. **New Phytol.**, v.80, p.143-151, 1978.
- COX, G.; SANDERS, F.E. Ultrastructure of the host-fungus interface in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. **New Phytol.**, v.73, p.901-912, 1974.
- CRESS, W.A.; THRONEBERRY, G.O.; LINDSEY, D.L. Kinetics of phosphorus absorption by mycorrhizal and nonmycorrhizal tomato roots. **Pl. Physiol.**, v.64, p.484-487, 1979.
- CRUSH, J.R. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. VII-Growth and nodulation of some herbage legumes. **New Phytol.**, v.73, p.743-749, 1974.
- CRUSH, J.R.; PATTINSON, A.C. Preliminary results on the production of vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculum by freeze drying. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B. TINKER, P.B. ed. **Endomycorrizas**. London: Academic Press, 1975. p.485.
- DAFT, M.J.; NICOLSON, T.H. Effect of Endogone mycorrhiza on plant growth. IV-Quantitative between the growth of the host and the development of endophyte in tomato and maize. **New Phytol.**, v.71, p.287-295, 1972.
- DANIELS, B.A.; SKIPPER, H.D. Methods for the recovery and quantitative estimations of propagules from soil. In: SCHENCK, N.C, ed. **Methods and Principles of Mycorrhizal Research**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1982. p.29-45
- DODD, J.; KRIKUN, J.; HASS, J. Relative effectiveness of indigenous populations of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi from four sites in Negev. **Israel J. Bot.**, v.32, p.10-21, 1983.
- DUC, G.; TROVELOT, A.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. First report of non-mycorrhizal plant mutant (myc-) obtained in pea (*Pisum sativum L.*) and fababean (*Vicia faba L.*). **Pl. Sci.**, v.60, p.215-222, 1989.
- ELIAS, K.S.; SAFIR, G.R. Hyphal elongation of *Glomus fasciculatus* in response to root exudates. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.53, p.1928-1933, 1987.
- ELMES, R.P.; MOSSE, B. Vesicular-arbuscular endomycorrhizal inoculum production. II. Experiments with maize (*Zea mays*) and other hosts in nutrient flow culture. **Can. J. Bot.**, v.62, p.1531-1536, 1984.

- FERGUSON, J.J.; WOODHEAD, S.H. Production of endomycorrhizal inoculum. A. Increase and maintenance of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. In: SCHENCK, N.C. ed. **Methods and Principles of Mycorrhizal Research**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1982. p.47.
- FISHER, R.A.; YATES, F. **Statistical tables for biological, agricultural and medical research**. Edingburg: Oliver and Boyd, 1963. p.146.
- GERDEMANN, J.W. Relation of a large soil-borne spore to phycomycetous mycorrhizal infections. **Mycologia**, v.47, p.619-632, 1955.
- GERDEMANN, J.W. Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v.6, p.397-418, 1968.
- GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Trans. Br. mycol. Soc.**, v.46, p.235-244, 1963.
- GERDEMANN, J.W.; TRAPPE, J.M. The Endogonaceae in the Pacific Northwest. **Mycologia Memoir**, n.5, 1974. 76p.
- GIOVANNETTI, M.; LIOI, L. Variation of electrophoretic patterns in proteins of VAM fungi chlamydospores. In: INTERNATIONAL MYCOLOGICAL CONGRESS, 4th, Regensburg, 1990. **Abstracts**. Regensburg: RFA, 1990. p.323.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytol.**, v.84, p.489-500, 1980.
- HAYMAN, D.S.; MOSSE, B. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. III. Increased uptake of labile phosphorus from soil. **New Phytol.**, v. 71, p.41-47, 1972.
- HALL, I.R. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi. In: POWELL, D.L.I.; BAGYARAJ, D.I., ed. **VA Mycorrhiza**. Boca Raton: CRC Press, 1984. p.57-94.
- HEPPER, C.M. A colorimetric method for estimating vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **Soil Biol. Biochem.**, v.9, p.15-18, 1977.
- HEPPER, C.M.; JAKOBSEN, I. Hyphal growth from spores of the mycorrhizal fungus *Glomus caledonium*: effect of amino acids. **Soil Biol. Biochem.**, v.15, n.1, p.55-58, 1983.
- HETRICK, B.A.D. Ecology of VA mycorrhizal fungi. In: POWELL, C. L. I.; BAGYRAJ, D.J. ed. **VA Mycorrhiza**. Boca Raton: CRC Press, 1985. p.35-55.
- IANSON, D.C.; ALLEN, M.F. The effects of soil texture on extraction of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores from arid sites. **Mycologia**, v.78, p.164-168, 1986.
- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Pl. Dis. Rep.**, v.48, p.692, 1964.

- KOSKE, R.E.; GEMMA, J.N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycol. Res.**, v.92, p.486-488, 1989.
- KORMANIK, P.P.; BRYAN, W.C.; SCHULTZ, R.C. Procedures and equipment for staining large number of plant roots endomycorrhizal assay. **Can. J. Microbiol.**, v.26, p.536-538, 1980.
- KRUCKELMANN, H.W. Effects of fertilizers, soils, soil tillage and plant species on frequency of *Endogone* chlamydospores and mycorrhizal infection in arable soils. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B.; TINKER, P.B. ed. **Endomycorrhizas**. London: Academic Press, 1975. p.511-525.
- LOPES, E.S.; SIQUEIRA, J.O.; ZAMBOLIM, L. Revisão de literatura: Caracterização das micorrizas vesículo-arbusculares (MVA) e seus efeitos no crescimento das plantas. **R. bras. Ci. Solo**, v.7, p.1-19, 1983.
- LUEDDERS, V.D.; CARLING, D.E.; BROWN, M.F. Effect of soybean plant growth on spore production by *Glomus mosseae*. **Pl. Soil**, v.53, p.393-397, 1979.
- MARONEK, D.M.; HENDRIX, W.; KIERNAN, J. Differential growth response to the mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatus* of southern Magnolia and Bar Harbor juniper grown in containers in composted hardwood bark-shale. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v.105, p.206-208, 1980.
- MENGE, J.A. Inoculum production. In: POWELL, C.L. ; BAGYARAJ, D.J., ed., **VA Mycorrhiza**. Boca Raton: CRC Press, 1984. p.187-203.
- MERTZ, S.M.; HETTHAUS, J.J.; BUSH, R.L. Mass production of axenic spores of the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. **Trans. Br. mycol. Soc.**, v.72, p.167-169, 1979.
- MILLER, R.H.; CARDOSO, E.J.B.N.; CARDOSO, C.N. Some observations on mycorrhizal infection of tropical forage legumes and grasses in Brazil. **Sum. Phytopathol.**, v.5, p.168-172, 1979.
- MORTON, J.B. Effects of mountants and fixatives on wall structure and Melzer's reaction in spores of two *Acaulospora* species (*Endogonaceae*). **Mycologia**, v.78, n.5, p.787-794, 1986.
- MORTON, J.B. Wall structure of spore of MVA fungi, assessing mycorrhizal colonization in roots and making a permanent slide for MVA fungal species determination. In: **Curso de Taxonomia de Fungos MVA**. II REBRAM, São Paulo, 1987. 22p.(Apostila).
- MORTON, J.B.; BENNY, G.L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. **Mycotaxon**, v.37, p.471-491, 1990.

- MOSTASSO, F.L.; COLOZZI-FILHO, A.; HUNGRIA, M. Efeitos de exsudatos de feijão, soja, milho e trigo sobre a germinação e crescimento micelial de *Gigaspora gigantea in-vitro*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3, 1994, Londrina. **Resumos**. Londrina: IAPAR, 1994. p.106.
- MOSSE, B. The regular germination of resting spore and some observation on the growth requirements of an *Endogone sp.* causing vesicular-arbuscular mycorrhiza. **Trans.Br. mycol. Soc.**, v.42, p.273-286, 1959.
- MOSSE, B. **Vesicular-arbuscular mycorrhizal research for tropical agriculture**. Hawaii Institute for Tropical Agriculture and Human Resources, 1981. 81p. (Research Bulletin, 194).
- MOSSE, B.; JONES, G.W. Separation of *Endogone* spores from organic soil debris by differential sedimentation on gelatin columns. **Trans. Br. mycol. Soc.**, v.51, p.604-608, 1968.
- MOSSE, B.; PHILLIPS, J.M. The influence of phosphate and other nutrients on the development of vesicular-arbuscular mycorrhiza in culture. **J. Gen. Microbiol.**, v.69, p.157-166, 1971.
- MOSSE, B.; THOMPSON, J.P. Vesicular-arbuscular endomycorrhizal inoculum production.I. Exploratory experiments with beans (*Phaseolus vulgaris*) in nutrients flow culture. **Can. J. Bot.**, v.62, p.1523-1530, 1984.
- NEWMAN, E.I. A method of estimating the total length of root in a sample. **J. Appl. Ecol.**, v.3, p.139-141, 1966.
- OHMS, R.E. A flotation method for collecting spores of a phycomycetous mycorrhizal parasite from soil. **Phytopathology**, v.47, p.751-752, 1957.
- OLIVEIRA, E. Taxonomia de *Endogonaceae*. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 1. **Anais**. Lavras: ESAL, 1985. p.100-119.
- OMAR, M.B.; BOLLAND, L.; HEATHER, W.A. A permanent mounting medium for fungi. **Bull. Br. mycol. Soc.**, v.13, p.31, 1979.
- PAULA, M.A. **Germinação e crescimento micelial de esporos de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares na presença de calos e suspensão de células**. Lavras: ESAL, 1988. (Tese de Mestrado).
- PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Trans. Br. mycol. Soc.**, v.55, p.158-161, 1970.
- PHIPPS, P.M.; BEUTE, M.K.; BARKER, K.R. An elutriation method for quantitative isolation of *Cylindrocladium crotalariae* microsclerotia from peanut field soil. **Phytopathology**, v.66, p.1255-1259, 1976.

- PORTER, W.M. The "most probable number" method for enumerating infective propagules of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in soil. **Aust. J. Soil Res.**, v.17, p.515-519, 1979.
- POSSINGHAM, J.V.; OBRINK, J.G. Endotrophic mycorrhiza and the nutrition of grape vines. **Vitis**, v.10, p.120-130, 1971.
- READ, D.J.; KOUCKEKI, H.K.; HODGSON, J. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in natural vegetation systems. I. The occurrence of infection. **New Phytol.**, v.77, p.641-654, 1976.
- RHODES, L.H.; GERDEMANN, J.W. Phosphate uptake zones of mycorrhizal and non-mycorrhizal onions. **New Phytol.**, v.75, p.555-561, 1975.
- ROSS, J.P.; RUTTENCUTTER, R. Population dynamics of two vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi and the role of hyperparasitic fungi. **Phytopathology**, v.67, n.4, p.490-496, 1977.
- SANDERS, F.E.; TINKER, P.B. Mechanism of absorption of phosphate from soil by *Endogone* mycorrhizas. **Nature**, v.233, p.278-279, 1971.
- SCHENCK, N.C.; HINSON, K. Endotrophic vesicular-arbuscular mycorrhizae on soybean in Florida. **Mycologia**, v.63, p.672-675, 1971.
- SCHENCK, N.C.; SCHROEDER, V.N. Temperature response of *Endogone* mycorrhiza on soybean roots. **Mycologia**, v.66, p.600-605, 1974.
- SEN, R.; HEPPER, C.M. Characterization of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* spp.) by selective enzyme staining following polyacrylamide gel electrophoresis. **Soil Biol. Biochem.**, v.18, p.29-34, 1986.
- SMITH, S.E.; BOWEN, G.D. Soil temperature mycorrhizal infection and nodulation of *Medicago truncatula* and *Trifolium subterraneum*. **Soil Biol. Biochem.**, v.11, p.469-473, 1979.
- SILVA, L.R.C. **Efeitos de compostos orgânicos sobre o crescimento micelial de *Gigaspora gigantea* "in vitro"**. Lavras: ESAL, 1990. (Tese de Mestrado).
- SILVEIRA, A.P.D. Micorrizas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P., ed., **Microbiologia do Solo**. Campinas: SBCS, 1992. p.258-282.
- SIQUEIRA, J.O. Cultura axênica e monoxênica de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 2, São Paulo, 1987. **Programa e Resumos**. São Paulo: SEMA/SEAG/USP, 1987. p.44-70.
- SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. **Biotechnology do Solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC/ABEAS/ESAL, 1988. 235p.

- SIQUEIRA, J.O.; HUBBELL, D.H.; SCHENCK, N.C. Spore germination and germ tube growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *in vitro*. **Mycologia**, v.74, p.952-959, 1982.
- SMITH, G.W.; SKIPPER, H.D. Comparison of methods to extract spores of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.43, p.722-725, 1979.
- SUTTON, J.C.; BARRON, G.L. Population dynamics of *Endogone* spores in soil. **Can. J. Bot.**, v.50, p.1909-1914, 1972.
- SYLVIA, D.M.; SCHENCK, N.C. Germination of chlamydospores of three *Glomus* species as affected by soil matric potential and fungal contamination. **Mycologia**, v.75, n.1, p.30-35, 1983.
- TOMMERUP, I.C.; CARTER, D.J. Dry separation of microorganisms from soil. **Soil Biol. Biochem.**, v.14, p.69-71, 1982.
- TOMMERUP, I.C.; KIDBY, D.K. Preservation of spores of vesicular-arbuscular endophytes by L-drying. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.37, p.831-834, 1979.
- TRAPPE, J.M.; SCHENCK, N.C. Taxonomy of the fungi forming endomycorrhizae. In: SCHENCK, N.C. ed. **Methods and principles of mycorrhizal research**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1982. p.91-101.
- TSAI, S.M.; PHILLIPS, D.A. Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores *in vitro*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.57, n.5, p.1485-1488, 1991.
- VOZZO, J.A.; HACSKAYLO, E. Endo and ectomycorrhizal associations in five *Populus* species. **Bull. Torrey Botanical Club**, v.101, p.182-186, 1974.
- WALKER, C. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: spore wall characteristics in species descriptions. **Mycotaxon**, v.18, p.443-455, 1983.
- WALKER, C. Identifying the endomycorrhizal Endogonaceae. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 2, São Paulo, 1987. **Programas e Resumos**. São Paulo: SEMA/SEAG/USP, 1987. p.83-97.
- WILSON, J.M.; TRINICK, M.J.; PARKER, C.A. The identification of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi using immunofluorescence. **Soil Biol. Biochem.**, v.15, p. 439-445, 1983.
- WRIGHT, S.F.; MORTON, J.B.; SWOROBUK, J.E. Identification of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by using monoclonal antibodies in an enzyme-linked immunoassay. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.52, p.2222-2225, 1987.

PARTE VI. BIOMASSA MICROBIANA

CAPÍTULO 21

METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA MICROBIANA DO SOLO

David A. Wardle¹

21.1. Introdução

Os trabalhos envolvendo análise da biomassa microbiana do solo podem fornecer informações extremamente úteis sobre a dinâmica de um reservatório lábil da matéria orgânica do solo. Isso pode ter conseqüências importantes no funcionamento do ecossistema e na "qualidade" do solo, refletindo, a longo prazo, na produtividade. Entretanto, qualquer pesquisador que inicie trabalhos envolvendo análises da biomassa microbiana encontrará um número considerável de métodos (e variações, em menor ou maior grau, desses métodos), entre os quais terá que selecionar. O problema é acentuado pelo número substancial de trabalhos sobre metodologia publicados nos últimos 15 anos. Além disso, há controvérsia, entre os pesquisadores, sobre a escolha dos métodos mais apropriados. Neste capítulo, dá-se ênfase à posição do autor, que é a de que nenhum método tem aplicabilidade universal e que métodos diferentes podem ser apropriados sob diferentes circunstâncias e para responder diferentes questões. Apresenta-se, portanto, algum embasamento sobre os principais métodos disponíveis para avaliar a biomassa microbiana do solo, incluindo suas vantagens e desvantagens e as aplicações mais apropriadas. Como os métodos necessitam adaptações para circunstâncias específicas de cada estudo, evitar-se-á dar "receitas" sempre que possível. Finalmente, deve-se salientar que cada pesquisador é responsável pela determinação, através de experimentação preliminar e análise dos resultados, da quantidade de solo, temperatura de incubação e outros fatores mais apropriadas para o seu estudo e para as condições do laboratório. Os detalhes, bem como a escolha dos métodos, dependem das questões que necessitam de esclarecimento, da disponibilidade de tempo, da natureza química e física do solo e do acesso a equipamentos e recursos.

21.2. Preparo das Amostras

Ao amostrar um solo para a determinação da biomassa microbiana, é necessário coletar uma amostra representativa e aleatória de cada unidade da área ou parcela que está sendo estudada. De um modo geral, isso envolve a coleta de diversos (10 a 100) cilindros de solo, seguida pela sua homogeneização. Amostras de diferentes parcelas, do mesmo tratamento, nunca deverão ser misturadas

¹ Pesquisador, Ph.D., AgResearch Ruakura Agricultural Center, Private Bag 3123, Hamilton, New Zealand.

ou divididas em subamostras, uma vez que isso resulta em perda da independência estatística entre as repetições (Hurlbert, 1984). De modo geral, a amostra de solo deve incluir a profundidade da camada na qual se encontra a maior parte das raízes e, dependendo da cobertura vegetal, as profundidades de amostragem de 0 cm-5 cm e 0 cm-15 cm são as mais comumente empregadas. Cilindros de solo com diâmetro de 25 mm ou 50 mm são, geralmente, os mais apropriados para a retirada das amostras de solo.

O solo deve ser colocado em sacos plásticos, que devem ficar protegidos do calor e da insolação direta até o retorno ao laboratório. No laboratório, o nível de umidade deve ser mantido e as amostras devem ser armazenadas a 4° C. Nessas condições de armazenamento, provavelmente não ocorrerão alterações substanciais na biomassa microbiana, desde que estas sejam analisadas na mesma semana (por exemplo, Tate & Jenkinson, 1982; Visser et al., 1984).

A homogeneização da amostra para a análise deve ser feita por peneiramento, utilizando-se peneira relativamente grossa, pois o peneiramento fino poderá resultar na morte de tecido microbiano (Lynch & Panting, 1980; Jenkinson, 1988). A experiência do autor é de que, em solos com os quais trabalhou, peneiras relativamente grossas (4 mm) são as desejáveis, mas os testes preliminares para cada solo devem ser feitos por cada pesquisador. As raízes das plantas interferem significativamente com a maioria das determinações microbianas (Sparling et al., 1986) e, como é impossível remover todas as raízes de uma amostra de solo, deve-se, pelo menos, retirar a maior parte delas.

Os solos, freqüentemente, precisam ter seu teor de umidade ajustado, uma vez que todos os métodos fisiológicos de análise da biomassa microbiana exigem que a umidade do solo esteja em um nível pré-determinado. De modo geral, um teor de umidade de -1/3 bar ou -33 kPa é apropriado (Wardle & Parkinson, 1990a). O teor de umidade gravitacional correspondente a esse potencial deve ser determinado para cada tipo de solo sob investigação e, para isso, existem alguns métodos, como o da placa gravimétrica. O ajuste do nível de umidade do solo pode ser obtido através do reumedecimento com "spray" ou pela secagem gradual, ao ar, antes da análise.

21.3. Microscopia Direta e Técnicas de Observação

A microscopia direta é o método mais antigo utilizado na avaliação da biomassa microbiana e, embora tenha sido substituído nos últimos 18 anos, em grau significativo, por outros métodos, ainda pode fornecer informações úteis sobre a natureza e a composição da biomassa microbiana do solo. Como exemplo, têm-se os estudos sobre a contribuição relativa das bactérias ou fungos à biomassa total (Bååth et al., 1979) e sobre a distribuição das bactérias por tamanho e classe (Jenkinson et al., 1976). As principais desvantagens deste método são o tempo maior necessário para a análise, em relação aos outros métodos disponíveis e a necessidade de grande aptidão no estágio de separação visual dos componentes microbianos de outros materiais (ex.: partículas de resíduos orgânicos); além disso, o método requer o uso de diversos fatores de conversão que sempre vêm associados a um erro (Martens, 1987;

Wardle & Parkinson, 1991). Na microscopia direta, a biomassa de bactérias e fungos deve ser analisada separadamente.

21.3.1. Bactérias

O plaqueamento de diluições de solo (por exemplo, sobre ágar-nutriente) pode ser usado para a enumeração de bactérias, mas é de valor restrito nas estimativas da biomassa, uma vez que somente uma pequena proporção (talvez 0,1%) do total de bactérias é estimada (por exemplo, Jensen, 1968; Parkinson & Coleman, 1991). Esta técnica é, usualmente, mais apropriada para a avaliação da constituição dos componentes da biomassa bacteriana ou de grupos específicos.

A biomassa total de bactérias pode ser estimada pela utilização de microscopia direta dos filtrados de solo, de acordo com metodologia descrita por Babuik & Paul (1970). Nesse método, diluições decimais de solo são preparadas e subamostras de 1 mL são coradas com isotiocianato de fluoresceína (FITC, fluorescein isothiocyanate) e filtradas a 0,2 mm (filtros tipo Nucleopore). O número total de bactérias fluorescentes, em diversos campos, é então determinado por microscopia fluorescente com objetiva de óleo de imersão (100X). Alternativamente, as bactérias podem ser estudadas pela técnica do "filme de ágar" (Jones & Mollison, 1948) com o corante anilina fenólica azul, embora, com esta técnica, nem sempre seja possível distinguir as bactérias vivas das bactérias mortas (Parkinson & Coleman, 1991).

Para converter o número de bactérias em biomassa é necessário:

- 1 - determinar o diâmetro médio de diversas bactérias (por exemplo, de 40 bactérias);
- 2 - calcular seu volume médio, assumindo que as mesmas têm forma esférica;
- 3 - multiplicar o volume pelo número total de bactérias calculando, assim, o biovolume;
- 4 - multiplicar o biovolume por uma estimativa da densidade média das bactérias (por exemplo, 0,33);
- 5 - converter o valor encontrado no item 4 em biomassa de C, assumindo que a biomassa contém, em média, 47% de carbono.

Como alternativa para o cálculo da média do diâmetro das bactérias, pode-se utilizar a divisão das bactérias em classes de tamanho (Clarholm & Rosswal, 1980).

21.3.2. Fungos

Embora o plaqueamento de diluições de solo seja, ocasionalmente, usado como uma medida relativa de biomassa fúngica, o uso deste método não é apropriado, pois reflete apenas o número de fragmentos fúngicos ou "unidades de propágulos", que incluem esporos individuais e fragmentos de micélio. Desse modo, é melhor restringir esse método à estimativa do número total de propágulos fúngicos no solo (Wardle et al., 1993a).

Para estimativas diretas da biomassa fúngica, é necessário que se faça, inicialmente, uma estimativa do comprimento total de hifas. A técnica do "filme de ágar" (Jones & Mollison, 1948;

Thomas et al., 1965) envolve a dispersão do solo sobre um meio osmoticamente ajustado e a preparação de um filme de ágar contendo uma subamostra desse meio. Este filme é, então, corado com analina fenólica azul (para distinguir hifas mortas das hifas vivas) e observado ao microscópio para determinação do comprimento de hifas, podendo-se utilizar o método de "linha de interseção" (Newman, 1966). Este método permite não apenas a determinação do comprimento de hifas, como a análise de diferentes subconjuntos da malha de hifas, ou seja, hialinas, pigmentadas ou possuindo grampos de conexão. O uso desse método em solos orgânicos, porém, é problemático, pois as hifas podem ser mascaradas (Parkinson & Coleman, 1991) e porque o método tende a desconsiderar partículas de solo mais pesadas (Warcup, 1967). Uma técnica alternativa para a estimativa de comprimento de hifas é a filtração em membrana (Hansen et al., 1974), similar à técnica de filtração para bactérias mas que, provavelmente, subestima a biomassa fúngica (Bååth & Söderström 1980). Na análise de hifas vivas, pela filtração em membrana, Söderström (1977) propôs o uso de FDA ("fluorescein diacetate", diacetato de fluoresceína) como corante. Para a conversão de comprimento de hifas em biomassa é necessário calcular o diâmetro médio da hifa, para converter o biovolume em biomassa fúngica, conforme anteriormente descrito para bactérias.

21.4. Fumigação-Incubação

A hipótese do método de fumigação-incubação é a de que, se um solo for esterilizado e depois inoculado com uma pequena quantidade de microrganismos, segue-se um grande fluxo de respiração. Isto se deve à decomposição daqueles microrganismos que estavam originalmente presentes no solo e que foram mortos pela fumigação. Assume-se que esse fluxo é diretamente proporcional à quantidade de microrganismos no solo antes da esterilização e, sendo assim, a biomassa microbiana pode ser calculada diretamente, seguindo-se uma calibração apropriada. Este método, desenvolvido por Jenkinson & Powlson (1976), é provavelmente o método mais amplamente empregado para a quantificação de biomassa.

A primeira etapa, neste método, envolve a esterilização de uma subamostra da amostra de solo. Uma pressuposição fundamental é a de que a esterilização é total e não tem qualquer outro efeito, a não ser o de matar a microflora do solo. O clorofórmio é o fumigante mais amplamente usado e, geralmente, mata quase toda a população microbiana (Santruckova, 1992; Wardle & Parkinson; 1990c). As críticas levantadas por Ingham et al. (1991) contra a fumigação são aplicáveis somente a solos com teor orgânico elevado e não são relevantes na maioria das situações. O uso de microondas (em lugar do clorofórmio) é também promissor (Hendricks & Pascoe, 1988), mas necessita ser ainda mais estudado. Em geral, a fumigação com clorofórmio é conduzida em um dessecador forrado com papel toalha molhado, para manter a umidade. As amostras, colocadas em recipientes abertos, são dispostas no dessecador contendo um béquer aberto, com clorofórmio. Cria-se, então, vácuo no dessecador. De modo geral, apenas uma pequena quantidade de vácuo é necessária para a vaporização do clorofórmio.

As amostras são deixadas no dessecador, por 24 horas, para que o clorofórmio elimine a biomassa do solo. O tamanho das amostras a serem fumigadas depende do estudo a ser realizado. Em nosso laboratório, encontrou-se que 10 g a 15 g (matéria seca) são suficientes, mas amostras maiores podem ser necessárias para solos tropicais, onde os níveis de biomassa microbiana são inferiores aos encontrados nas regiões temperadas.

Após a fumigação e a retirada do clorofórmio, o solo fumigado é, normalmente, reinoculado com uma pequena subamostra de solo. Essa etapa visa assegurar que uma gama diversificada de microrganismos esteja presente para decompor os outros microrganismos mortos pela fumigação e, assim, produza o fluxo de fumigação. Uma relação de peso de 1:9 (inóculo:solo fumigado) é, freqüentemente, necessária (Chapman et al., 1987; Wardle & Parkinson, 1990b), mas muitos estudos adotam uma relação menor. Simultaneamente ao preparo da subamostra fumigada reinoculada, uma subamostra da mesma amostra do solo, mas não-fumigada, deve ser preparada (Jenkinson & Powlson, 1976). Essa testemunha corrige a respiração que ocorreria, no solo, independentemente do fluxo de fumigação. As amostras fumigadas e não fumigadas são, então, incubadas em recipientes separados, fechados, juntamente com um frasco contendo uma base (as mais empregadas são os hidróxidos de sódio e potássio, NaOH ou KOH a 1 M), para capturar o CO₂. Jenkinson & Powlson (1976) propuseram um período de incubação de 10 dias, embora um período de inoculação de sete dias seja, normalmente, suficiente. A temperatura de incubação depende da preferência individual, embora 20° C, 22° C e 25° C sejam as mais comuns.

O C do CO₂, capturado pela base, é determinado, ao final do período de incubação, por titulação a dois pontos (pH=8,3 e pH=3,7) com HCl, 0,05 M (Jenkinson & Powlson, 1976). Em seguida, o carbono da biomassa microbiana é calculado de acordo com a seguinte relação:

$$B = \frac{F - NF}{k_c}$$

onde:

- F e NF representam o C total do CO₂ que foi liberado das subamostras fumigadas e não fumigadas, respectivamente;
- k_c é uma constante, representando a proporção do carbono da biomassa microbiana morta que é convertido em CO₂ durante o período de incubação.

Três valores de k_c são muito citados na literatura, 0,50 (Jenkinson & Powlson, 1976), 0,45 (Oades & Jenkinson, 1979) e 0,41 (Anderson & Domsch, 1978a).

O método de fumigação-incubação assume que os valores de k_c não variam, embora existam evidências de que esses valores variam com o pH (Jenkinson, 1988) com a umidade do solo e com o esgotamento do substrato (Wardle & Parkinson, 1990a). Entretanto, essas variações não são, provavelmente, expressivas. O fator k_c também varia entre tipos de solo (Wardle & Parkinson, 1991) e pode ser

desejável determinar os valores de k_c se o método de fumigação for utilizado em solos que são muito diferentes daqueles utilizados na determinação dos valores de k_c tradicionalmente usados. A determinação dos valores de k_c envolve o desenvolvimento de culturas puras de microrganismos, em meio líquido contendo glicose marcada com ^{14}C , e a determinação do ^{14}C liberado, como CO_2 , por esses microrganismos, durante a incubação em fumigado com clorofórmio. Isto é descrito, em detalhes, por Anderson & Domsch (1978a) e por Wardle & Parkinson (1990a). Problemas com os fatores k_c podem ser evitados usando-se este método como uma estimativa “relativa” da biomassa microbiana, e expressando-se apenas os valores para F-NF [em $\mu\text{gC-CO}_2/\text{g}$ de solo/7 ou 10 dias].

O método para determinação de biomassa microbiana, já descrito, não funciona em solos com teores elevados de matéria orgânica e/ou com baixo pH. Diversos controles têm, portanto, sido usados. Ross (1990) propôs o uso da quantidade de $\text{CO}_2\text{-C}$ liberada do solo fumigado, no período de 10 a 20 dias de incubação, como testemunha. Outros pesquisadores (Voroney & Paul, 1984; Wardle et al., 1993b; Wardle & Ghani 1994) não subtraíram os valores das testemunhas. Em nosso laboratório, não subtraíram-se os valores encontrados nos controles, pois acredita-se que o $\text{CO}_2\text{-C}$ liberado do solo fumigado pode, freqüentemente, fornecer uma medida relativa útil da biomassa microbiana. Entretanto, quando grande proporção da massa microbiana do solo foi morta antes da amostragem (ex.: pela seca), uma testemunha não fumigada, de zero a 10 dias, é essencial, uma vez que ocorrerá um fluxo de CO_2 , neste período, devido à decomposição dos microrganismos mortos.

A técnica da fumigação-incubação pode, também, ser usada para estimar o nitrogênio da biomassa, do mesmo modo que é usada para determinar o carbono. Nesta avaliação, o nitrogênio mineral das amostras dos solos, fumigados e não fumigados, é determinado após a incubação (Jenkinson & Powlson, 1976; Jenkinson, 1988) e o nitrogênio de biomassa é estimado da seguinte maneira:

$$N \text{ da biomassa} = \frac{N_F - N_{NF}}{k_N}$$

onde:

- N_F e N_{NF} são as quantidades totais de nitrogênio mineral liberado dos solos fumigado e não fumigado durante o período de incubação;
- k_N é uma constante, análoga a k_c , representando a proporção do nitrogênio da massa microbiana que é mineralizada durante o período de incubação;
- o valor mais usado para k_N é 0,57 (Jenkinson, 1988);
- o principal problema, com este método, é a estimativa de k_N , que pode variar de acordo com a relação C/N microbiana (Nicolardot et al., 1986) e, possivelmente, com as condições do solo. A mineralização seguida pela imobilização, nos tratamentos fumigados, pode, também, ser problemática.

O método de fumigação-incubação pode ser usado para acompanhar a absorção de compostos marcados ou nutrientes pela biomassa microbiana (Soulas et al., 1984; Ladd et al., 1985). Em tais

estudos, os compostos marcados são adicionados ao solo e a mineralização dos isótopos marcados é avaliada, após a fumigação, conforme descrito anteriormente para o carbono e o nitrogênio da biomassa.

21.5. Fumigação-Extração

A técnica de fumigação-extração (Vance et al., 1987b) envolve a eliminação da microflora do solo pelo clorofórmio, como no método de fumigação-incubação. Entretanto, diferentemente da incubação, o carbono liberado pela morte dos microrganismos é determinado por extração química ou digestão. Subamostras fumigadas e não fumigadas são submetidas à extração com K_2SO_4 (0,5 M) por 2 horas, em agitador contínuo, sendo então centrifugadas e filtradas. Uma subamostra da solução extraída é, em seguida, misturada com $K_2Cr_2O_7$ (0,15 M) para oxidar o carbono. Isto é facilitado pelo uso de H_2SO_4 concentrado. O excesso de dicromato é, então, retrotitulado contra $Fe(NH_4)(SO_4)$, revelando a quantidade de dicromato utilizado na oxidação e, assim, a quantidade de carbono extraída. Este procedimento é descrito em detalhes por Vance et al. (1987b).

A biomassa microbiana é, então, determinada por:

$$B = \frac{C_F - C_{NF}}{k_{EC}}$$

onde:

C_F e C_{NF} representam o carbono extraído dos solos fumigado e não fumigado;

k_{EC} representa a proporção do total do carbono microbiano extraído após fumigação.

Este método assume que o fator k_{EC} é constante em todas as amostras e tratamentos. Vance et al. (1987b) calibraram este método, comparando-o com o método de fumigação-incubação e determinaram o fator k_{EC} de 0,379. Sparling & West (1988a,b) também calibraram este método, comparando-o com o método de respiração-induzida pelo substrato. Estas calibrações, entretanto, podem ser de pouco valor, uma vez que as correções são feitas por artefatos estatísticos (Wardle & Parkinson, 1991). Além disso, os valores de k_{EC} podem variar substancialmente (de 0,13 a 0,34) para diferentes espécies microbianas (Tate et al., 1988). Sparling & West (1988b) determinaram, usando biomassa com ^{14}C marcado, que o k_{EC} pode variar de 0,23 a 0,38, em diferentes tipos de solo. O problema com a variabilidade de k_{EC} é a sua tendência a ser inferior ao fator k_c , do método de fumigação-incubação, o que torna o método de fumigação-extração menos desejável em muitos estudos.

Há, entretanto, situações em que o método de fumigação-incubação não pode ser aplicado. Nestas circunstâncias, a fumigação-extração, freqüentemente, funciona relativamente bem e é particularmente útil em solos ácidos e orgânicos de florestas (Vance et al., 1987a,b) e em solos secos reidratados (Zagel, 1993). Além disso, a fumigação-extração é menos laboriosa do que a fumigação-incubação e não requer 10 dias de armazenamento, em recipiente de incubação.

O nitrogênio da biomassa microbiana pode, também, ser determinado por fumigação-extração (Brookes et al., 1985a,b). Neste método, o nitrogênio extraído por K_2SO_4 (0,5 M) de amostras fumigadas e amostras não fumigadas correspondentes, é determinado. O nitrogênio da biomassa é, então, avaliado como o carbono da biomassa, mas usando o fator k_{EN} . Este método foi calibrado com o método de fumigação-incubação e, por isso, apresenta problemas similares com a calibração, como aqueles para a determinação do carbono da biomassa. Dois valores de k_{EN} são amplamente utilizados, 0,45 e 0,54 (Jenkinson, 1988). O carbono e o nitrogênio da biomassa também podem ser determinados usando o mesmo extrator K_2SO_4 (Sparling & West, 1988a). O método de fumigação-extração apresenta uma vantagem sobre o método de fumigação-incubação, na determinação do nitrogênio da biomassa, que é o de que a remobilização do nitrogênio, que segue à fumigação, pode não ocorrer.

21.6. Respiração Induzida pelo Substrato

O método da respiração induzida pelo substrato, originalmente proposto por Anderson & Domsch (1978b), envolve a adição de glicose a uma subamostra de solo e a avaliação da respiração, antes que o crescimento microbiano ocorra. Esse nível de glicose é determinado, através de experimentação preliminar, para cada tipo de solo sob investigação. Isso é feito pela incubação de subamostras de solo com várias concentrações de glicose e pela determinação da quantidade mínima de glicose necessária à produção de uma resposta respiratória máxima. A resposta respiratória é avaliada ou uma hora depois da adição da glicose ou (em solos onde a respiração decresce e, depois, aumenta novamente após a adição de glicose) quando a respiração atinge uma taxa mínima (Anderson & Domsch, 1978b). Para converter suas unidades de respiração em biomassa, Anderson e Domsch (1978b) calibraram seu método em relação ao método de fumigação-incubação e propuseram a seguinte equação para prever a biomassa microbiana:

$$B = 40,04 X + 0,37$$

onde:

B = biomassa microbiana (mg C/100 g de solo)

X = taxa de respiração (mL C-CO₂/h/ 100 g de solo)

Embora esta equação seja freqüentemente empregada, estatisticamente ela não tem validade, pois incluiu, em sua calibração, dois solos com teores orgânicos elevados. Os teores de biomassa microbiana, nesses solos, eram substancialmente maiores do que os de outros solos (pertencendo, portanto, a uma "população" diferente) e o emprego de fatores de correção para esse problema faz com que a relação obtida seja muito mais fraca (Wardle & Parkinson, 1991). Muitas outras tentativas para avaliar a relação entre a respiração induzida pelo substrato e a medida da biomassa, através de outros métodos, têm sido feitas e, enquanto alguns encontram relações relativamente fortes (ex. Martens, 1987; Cheng & Virginia, 1993), outros não encontram relações (Sparling et al., 1986; Wardle & Parkinson, 1990b). A razão pela qual os métodos baseados na fumigação e na respiração induzida pelo

substrato não concordam é, provavelmente, pelo fato de esses métodos não avaliarem o mesmo reservatório de microrganismos. É razoável esperar que apenas microrganismos ativos, por ocasião da avaliação, respondam à adição de glicose e que, portanto, o método de respiração induzida pelo substrato deveria ser aplicado apenas aos componentes ativos da microflora (Van de Werf & Verstrate, 1987; Ross, 1991). Entretanto, é justamente o componente ativo da biomassa, o de maior interesse para os microbiologistas do solo, pois é essa a parcela da microflora que está reciclando, ativamente, os nutrientes e é responsável pela decomposição dos restos culturais. Desse modo, o método da respiração induzida pelo substrato pode ser extremamente útil como medida relativa da biomassa microbiana (veja Van de Werf & Verstrate, 1987).

Anderson & Domsch (1978b) adotaram um sistema descontínuo de fluxo durante a avaliação. Martens (1987) propôs o uso de um sistema contínuo de fluxo, no qual o ar, livre de CO_2 , passa continuamente pela amostra e é conduzido para um instrumento capaz de medir o CO_2 . Isto soluciona o problema da redissolução do CO_2 na umidade do solo, o que pode ocorrer em solos com pH inferiores a 6,5 (Sparling & West, 1990). Por outro lado, o sistema de fluxo contínuo pode interferir na taxa de respiração do solo devido a efeitos de perturbações provocadas pela passagem do ar, continuamente, através da amostra. Uma tentativa alternativa envolve a adição de glicose ao solo, colocando-o em recipientes vedados, e a avaliação da evolução do C- CO_2 , no espaço superior, através de injeção (Sparling & West, 1985; Wardle, 1993).

O principal requisito para o emprego do método da respiração induzida pelo substrato é a disponibilidade de equipamento que possa avaliar, acuradamente, o CO_2 . Isso pode ser feito com o analisador de gás infravermelho ou o cromatógrafo a gás. Equipamentos automatizados que avaliam, simultaneamente, a evolução do CO_2 de várias amostras, já são disponíveis (ex., Heinemeyer et al., 1989; Nordgren, 1992) mas estão muito além da disponibilidade econômica de muitos laboratórios. A injeção manual de amostras do gás retirado do espaço superior dos recipientes vedados, para a análise em um analisador infra-vermelho, em uma hora e quatro horas, após a adição de glicose, tem fornecido resultados consistentes e confiáveis em nosso laboratório. A respiração induzida pelo substrato é estimada pela subtração entre a leitura após quatro horas e a leitura após uma hora (Wardle et al., 1993a).

O método da respiração induzida pelo substrato pode ser, também, modificado para avaliar a contribuição de bactérias ou fungos à massa microbiana do solo. Isto envolve a adição de "inibidores seletivos", tais como sulfato de estreptomicina (que inibe a respiração de bactérias) e actidione (= cicloheximida) (que inibe a respiração fúngica) (Anderson & Domsch, 1973). Quatro subamostras de solo são preparadas e submetidas aos seguintes tratamentos:

- 1) apenas glicose;
- 2) sulfato de estreptomicina + glicose;
- 3) actidione + glicose;
- 4) sulfato de estreptomicina + actidione + glicose.

A contribuição relativa das bactérias e fungos são determinadas como mostrado na Figura 21.1; a relação bactéria:fungo é dada por A:B. O tratamento 4 é incluído para verificar se os inibidores seletivos estão suprimindo, completamente, os diferentes componentes da microflora do solo. Se isto estiver ocorrendo, então $A + B$ deve ser igual a C. Alguma respiração ocorre mesmo quando ambos os inibidores estão presentes. Isto acontece porque os inibidores são supressores de síntese de proteínas e é impossível que suprimam microrganismos que sejam moderadamente inativos (e que não sintetizam proteínas rapidamente) por ocasião da adição à amostra (Wardle & Parkinson, 1990c). Os inibidores são adicionados numa concentração mínima requerida para provocar inibição máxima e isto é determinado através de experimentação preliminar, para cada tipo de solo. Este método pode ser executado medindo-se o C-CO₂, como no método da respiração induzida pelo substrato (West, 1986). Embora este método não funcione para todos os tipos de solo (West, 1986; Roser et al., 1993), fornece uma alternativa atraente à microscopia direta para a determinação das relações bactérias:fungos. O método da respiração induzida pelo substrato pode ser aplicado facilmente em restos culturais, pela aspersão de solução de glicose na superfície dos restos culturais (Wardle, 1993; Ross & Sparling, 1993). Isto torna o método apropriado para avaliações da dinâmica da biomassa microbiana durante a decomposição de restos culturais (Wardle et al., 1993b), permitindo a análise confiável de quantidades de restos de cultura tão pequenas quanto 0,05 g.

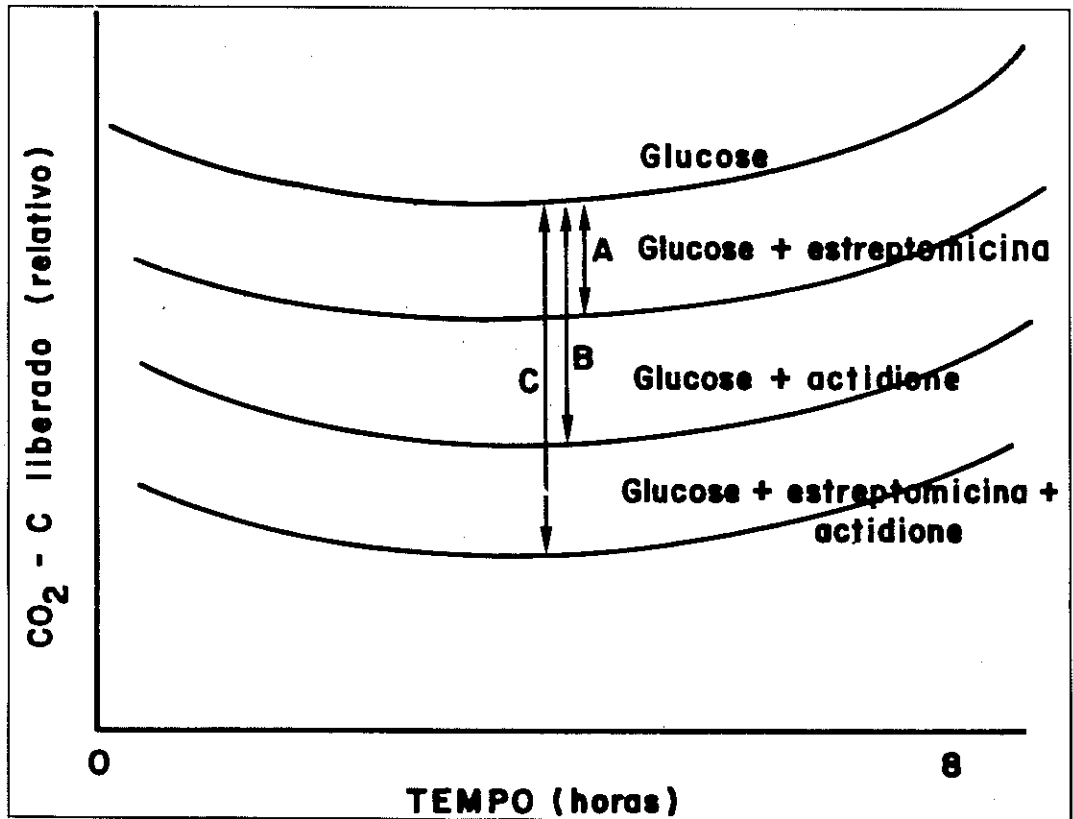


FIGURA 21.1. C-CO₂ liberado de um solo que recebeu glicose e inibidores seletivos.

21.7. Componentes Celulares

Embora avaliações da biomassa microbiana baseadas em componentes celulares específicos não sejam, freqüentemente, adotadas nos estudos do solo, assim mesmo têm valor para o entendimento dos componentes lábeis do sistema do solo. Em bactérias, estes componentes incluem o ácido murâmico (Miller & Casida, 1970) e o ácido diaminoepilêmico (Steubing et al., 1970). As avaliações baseadas nesses componentes, entretanto, podem ser problemáticas, pela superestimação da biomassa bacteriana (Parkinson & Coleman, 1991). Em fungos, a determinação de quitina pode ser apropriada, em circunstâncias específicas (ex., Frankland et al., 1978) e o teor de ergosterol pode fornecer estimativas altamente confiáveis da biomassa fúngica e da produtividade em restos de culturas (Newell, 1992). A avaliação do teor de ATP do solo pode fornecer estimativas relativas confiáveis da biomassa microbiana total em solos não estressados (Oades & Jenkinson, 1979; Jenkinson, 1988) e o nitrogênio reativo com a ninidrina mostra-se promissor para muitos tipos de solo (Amato & Ladd, 1988).

21.8. Parâmetros Derivados das Estimativas da Biomassa do Solo

Avaliações da biomassa microbiana feitas isoladamente podem, freqüentemente, fornecer apenas informações relativamente limitadas sobre resposta do sistema do solo ao estresse ou perturbação. Isto ocorre porque a biomassa microbiana, normalmente, apresenta uma forte correlação com a matéria orgânica do solo e, assim, com freqüência, simplesmente reflete mudanças na concentração de matéria orgânica. Outras avaliações, portanto, podem ser conduzidas concomitantemente à determinação da biomassa microbiana. Em nosso laboratório, particularmente, identificaram-se três avaliações que poderiam ser úteis: 1) a relação biomassa microbiana e carbono orgânico; 2) o quociente metabólico microbiano; e 3) o atraso na resposta respiratória à adição de glicose.

A relação carbono microbiano e carbono orgânico fornece uma medida da qualidade da matéria orgânica. Um sistema, no qual a biomassa é estressada, é incapaz de utilizar totalmente o carbono, como poderia ocorrer se o estresse não ocorresse. Nesse caso, a relação C microbiano: C orgânico diminui. Ao contrário, com a adição de matéria orgânica de boa qualidade, a biomassa microbiana pode aumentar rapidamente, mesmo se os níveis do carbono orgânico permanecerem inalterados (ex., Powlson et al., 1987). Durante o desenvolvimento do solo esta proporção, inicialmente, é submetida a mudanças rápidas e, com o passar do tempo, converge para um valor de "equilíbrio". Se este valor de equilíbrio for conhecido, então, esta razão pode fornecer uma indicação sobre quanto um solo está distante de seu "estado de equilíbrio" (Insam & Domsch, 1988).

O quociente metabólico microbiano é calculado como a razão da respiração microbiana em relação à biomassa. A avaliação do quociente metabólico é particularmente fácil, quando o método utilizado for o da respiração induzida pelo substrato. Isso ocorre porque as medidas da respiração basal são idênticas àquelas da respiração induzida pelo substrato, exceto pela falta de adição de glicose. Esta razão é baseada na teoria de Odum, da "Sucessão de Ecossistemas" (Odum, 1969) e prediz que, à medida que uma determinada biomassa microbiana se torna mais eficiente, menos carbono é perdido como CO₂ pela respiração e uma maior proporção de carbono é incorporada ao tecido microbiano

(Anderson & Domsch, 1985). Sendo assim, uma biomassa microbiana "eficiente" tem menor taxa de respiração em relação a uma biomassa microbiana "ineficiente". Desse modo, tanto fatores de "estresse" (aqueles envolvendo "estado de equilíbrio" ou condições desfavoráveis como, por exemplo, metais pesados, limitações de nutrientes, baixo pH), como fatores de perturbação (aqueles envolvendo fluxo rápido de condições ambientais, ou seja, cultivo, queimada) induzem à ineficiência microbiana (Wardle, 1993). De modo geral, um solo com quociente metabólico mais baixo está mais próximo ao estado de equilíbrio. Frequentemente, solos com um alto quociente metabólico são dominados por organismos "colonizadores" de crescimento rápido (Sakamoto & Obo, 1994).

Informações úteis podem ser obtidas pelo de curvas de respiração obtidas após a adição de glicose. Visser et al. (1984) e Visser & Parkinson (1989) demonstraram que solos estressados responderam à glicose mais lentamente do que solos não estressados e que o atraso na resposta à glicose foi mais longo nos solos estressados. Wardle (1993) observou que:

1) solos "perturbados" responderam, prontamente, à glicose (presumivelmente porque estavam dominados por microrganismos ativos e de rápido crescimento); 2) solos estressados responderam muito lentamente; e 3) solos que não foram nem estressados nem perturbados apresentavam resposta intermediária (Figura 21.2). Este método é útil e apropriado para separar os efeitos do estresse dos efeitos do distúrbio na biomassa microbiana no solo.

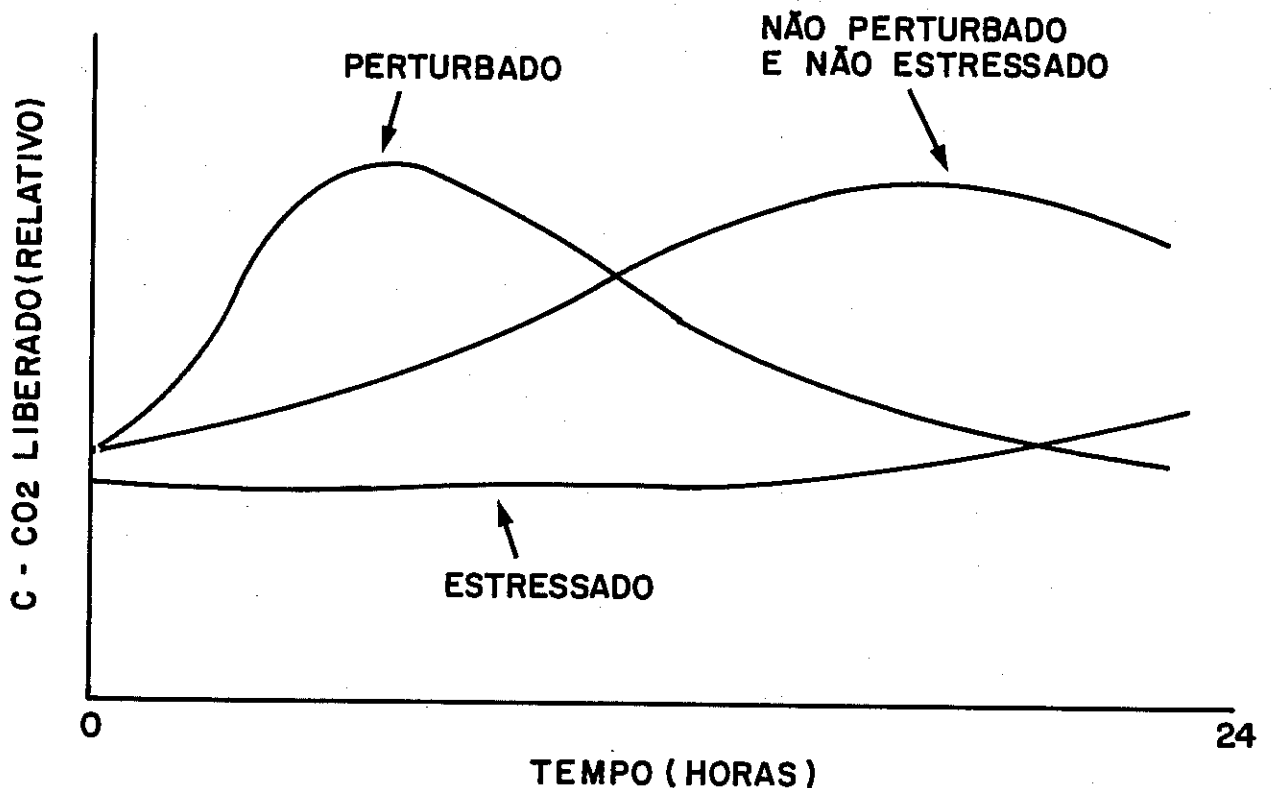


FIGURA 21.2. Resposta respiratória da biomassa microbiana após a adição de glicose, em solos perturbados (isto é, solos que passaram por alterações ambientais rápidas), solos estressados (isto é, em equilíbrio, mas sob condições desfavoráveis) e solos não perturbados. A parte ascendente de cada curva está relacionada com o crescimento microbiano, tendo glicose como substrato.

21.9. Referências Bibliográficas

- AMATO, M.; LADD, J. M. Assay for microbial biomass based on ninhidrin-reactive nitrogen in extracts of fumigated soils. **Soil Biol. Biochem.**, v.20, p.107-110, 1988.
- ANDERSON, J. P. E.; DOMSCH, K. H. Quantification of bacterial and fungal contributions to soil respiration. **Archiv. Mikrobiol.**, v.93, p.113-127, 1973.
- ANDERSON, J. P. E.; DOMSCH, K.H. Mineralisation of bacteria and fungi in chloroform-fumigated soils. **Soil Biol. Biochem.**, v.10, p.207-213, 1978a.
- ANDERSON, J. P. E.; DOMSCH, K. H. A physiologically active method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. **Soil Biol. Biochem.**, v.10, p.215-221, 1978b.
- ANDERSON, T. H.; DOMSCH, K. H. Determination of eco-physiological maintenance requirements of microorganisms in a dormant state. **Biol. Fertil. Soils**, v.1, p.81-89, 1985.
- BÅÅTH, E.; LUNDGREN, B.; SÖDERSTRÖM, B. Effects of artificial acid rain on microbial biomass and activity. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.23, p.737-740, 1979.
- BÅÅTH, E.; SÖDERSTRÖM, B. Comparison of the agar-film and membrane-filter methods for the estimation of hyphal lengths in soil, with particular reference to the effects of magnification. **Soil Biol. Biochem.**, v.12, p.385-387, 1980.
- BABUIK, L.A.; PAUL, E. A. The use of fluorescein isothiocyanate in the determination of the bacterial biomass of grassland soils. **Can. J. Microbiol.**, v.16, p.57-62, 1970.
- BROOKES, P.C.; KRAGT, J.F.; POWLSON, D.S.; JENKINSON, D.S. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen. **Soil Biol. Biochem.**, v.17, p.831-835, 1985a.
- BROOKES, P. C.; LANDMAN, A.; PRUDEN, G.; JENKINSON, D. S. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. **Soil Biol. Biochem.**, v.17, p.837-847, 1985b.
- CHAPMAN, S. J. Inoculation and the fumigation method for soil biomass determination. **Soil Biol. Biochem.**, v.19, p.83-87, 1987.
- CHENG, W.; VIRGINIA, R. A. Measurement of microbial biomass in arctic tundra soils using fumigation-extraction and substrate-induced respiration procedures. **Soil Biol. Biochem.**, v.25, p.135-141, 1993.
- CLARHOLM, M.; ROSSWALL, T. Biomass and turnover of bacteria in a forest soil and a peat. **Soil Biol. Biochem.**, v.12, p. 49-57, 1980.

- FRANKLAND, J. C.; LINDSEY, D. K.; SWIFT, M. J. A comparison of two methods for the estimation of mycelial biomass in leaf litter. **Soil Biol. Biochem.**, v.10, p.323-333, 1978.
- HANSEN, J. F.; THINGSTAD, T. F.; GOKSOY, J. Evaluation of hyphal lengths and fungal biomass in soil by a membrane filter technique. **Oikos**, v.25, p.102-107, 1974.
- HEINEMEYER, O.; INSAM, H.; KAISER, E. A.; WALENZIK, G. Soil microbial biomass and respiration measurements: an automated technique based on infra-red gas analysis. **Pl. Soil**, v.116, p.191-195, 1989.
- HENDRICKS, C. W. ; PASCOE, N. Soil microbial biomass estimates using 2450 Mhw, irradiation. **Pl. Soil**, v.110, p.39-47, 1988.
- HURLBERT, S. M. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. **Ecol. Monogr.**, v.54, p. 187-211, 1984.
- INGHAM, E. R.; CROMACK, K.; ENTRY, J. A. Comparison of direct vs. fumigation incubation microbial biomass from mycorrhizal mat and non-mat soils. **Soil. Biol. Biochem.**, v. 23, p. 465-471, 1991.
- INGHAM, H.; DOMSCH, K.H. Relationship between soil organic C and microbial biomass on chromossequences of reclamation sites. **Microb. Ecol.**, v.15, p.177-188, 1988.
- JENKINSON, D. S. Determination of microbial biomass carbon and nitrogen in soils. In: WILSON, J.R. ed. **Advances in Nitrogen Cycling Agricultural Systems**. Wallingford: CAB International, 1988. p.368-386.
- JENKINSON, D. S.; POWLSON, D. S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. **Soil Biol. Biochem.**, v.8, p.204-213, 1976.
- JENKINSON, D. S.; POWLSON, D. S.; WEDDERBUM, R.W.M. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. III. The relationship between soil biovolume, measured by optical microscopy, and the flush of decomposition caused by fumigation. **Soil Biol. Biochem.**, v.8, p.189-202, 1976.
- JENSEN, V. The plate count technique. In: GRAY, T.R.G.; PARKINSON, D. ed. **The Ecology of Soil Bacteria**. Liverpool: Liverpool University Press, 1968. p.158-170.
- JONES, P. T. C.; MOLLISON, J. E. A technique for the quantitative estimation of soil microorganisms. **J. Gen. Microbiol.**, v.2, p. 54-69, 1948.
- LADD, J. N. ; AMATO, M. ; OADES, J. M. Decomposition of plant material in Australian soils. III. Residual organic and microbial biomass C and N from isotope-labelled legume material and soil organic matter decomposing under field conditions. **Aust. J. Soil. Res.**, v.23, p.603-611, 1985.

- LYNCH, J. M. ; PANTING, L. M. Cultivation and the soil biomass. **Soil Biol. Biochem.**, v.12, p.29-33, 1980.
- MARTENS, R. Estimation of microbial biomass in soil by the respiration method: importance of soils pH and flushing methods for the measurement of respired CO₂. **Soil Biol. Biochem.**, v.19, p.77-81, 1987.
- MILLER, W. N.; CASIDA, L E. Evidence for muramic acid in soil. **Can. J. Microbiol.**, v.16, p.299-304, 1970.
- NEWELL, S. Y. Estimating fungal biomass and productivity in decomposing litter. In: CARROL, G.C.; WICKLOW, D.T., ed. **The fungal community: its organization and role in the ecosystem**. 2nd edition. New York: Marcel Dekker, 1992. p.521-561.
- NEWMAN, E. I. A method for estimating total root length in a sample. **J. Appl. Ecol.**, v.3, p.139-145, 1966.
- NICOLARDCT, B.; GUIRAUD, G.; CHAUSSOD, R.; CATROUX, G. Mineralisation dans le sol de matériaux microbiens marqués au carbone et a l'azote de la biomasse microbienne. **Soil Biol. Biochem.**, v.18, p.263-273, 1986.
- NORDGREN, A. A method for determining microbially available N and P in an organic soil. **Biol. Fertil. Soils**, v.13, p.195-199, 1992.
- OADES, J. M. ; JENKINSON, D. S. Adenosine-triphosphate content of the soil microbial biomass. **Soil Biol. Biochem.**, v.11, p.201-204, 1979.
- ODUM, E. P. The strategy of ecosystem development. **Science**, v.164, p.262-270, 1969.
- PARKINSON, D.; COLEMAN, D.C. Microbial Communitus, activity and biomass. In: CROSSLEY, D.A. ed. **Modern Techniques in Soil Ecology**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p.3-33.
- POWLSON, D. S.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. **Soil Biol. Biochem.**, v.19, p.159-164, 1987.
- ROSER, D. J.; SEPPELT, R.D.; ASHBOLT, N. Microbiology of ornithogenetic soils from the Windmill Islands, Budd Coast, continental Antarctica: some observations on methods for measuring soil biomass in ornithogenetic soils. **Soil Biol. Biochem.**, v.25, p.177-183, 1993.
- ROSS, D. J. Measurement of microbial biomass C and N in grassland soils of fumigation-incubation procedures: influence of inoculum size and the control. **Soil Biol. Biochem.**, v.22, p.289-294, 1990.

- ROSS, D. J. Microbial biomass in soil: a comparison of different estimation procedures. **Soil Biol. Biochem.**, v.23, p.1005-1007, 1991.
- ROSS, D.J.; SPARLING, G.P. Comparison of methods to estimate microbial C and N in litter and soil under *Pinus radiata* on a coastal sand. **Soil Biol Biochem.**, v.25, p.1591-1599, 1993.
- SAKAMOTO, K.; OBO Y. Effects of fungal to bacterial ratio on the relationship between CO₂ - evolution and total soil microbial biomass. **Biol. Fertil. Soils.**, v.17, p.39-44, 1994.
- SANTRUCKOVA, H. Zdroje chyb pri stanoveni mikrobini biomasy fumigacni metodou. **Rost. Vyr.**, v.38, p.893-898, 1992.
- SÖDERSTRÖM, B. Vital staining of fungi in pure cultures in soil with fluorescein diacetate. **Soil Biol. Biochem.**, v.9, p.59-63, 1977.
- SOULAS, G.; CHAUSSOD, R.; VERGUET, A. Chloroform fumigation as a means for determining the size of specialised soil microbial populations: applications to pesticide degrading organisms. **Soil Biol. Biochem.**, v.16, p.497-501, 1984.
- SPARLING, G.P.; SPEIR, T.W.; WHALE, K.N. Changes in microbial biomass C, ATP content, soil phospho-monoesterase and phospho-diesterase activity following air drying of soils. **Soil Biol. Biochem.**, v.18, p.363-370, 1986.
- SPARLING, G.P.; WEST, A.W. Modifications to the fumigation-incubation technique to permit simultaneous extraction and estimation of soil microbial C and N. **Commun. Soil Sci. Plant. Anal.**, v.19, p.327-344, 1988a.
- SPARLING, G. P. ; WEST, A. W. A direct extratction method to estimate soil microbial C: calibration in situ using microbial respiration and ¹⁴C-labelled cells. **Soil Biol. Biochem.**, v.20, p.337-343, 1988b.
- SPARLING, G. P. ; WEST, A. W. A comparison of gas chromatography and differential respirometer methods to measure soil respiration and to estimate the soil microbial biomass. **Pedobiol.**, v.34, p.103-112, 1990.
- SPARLING, G. P. ; WEST, A. W. .Influence of plant roots on the estimation of soil microbial ATP, C, N, and P. **Soil Biol. Biochem.**, v.17, p.275-278, 1985.
- STEUBING, L. Soil flora: studies on the number and activity of microorganisms in woodland soils. In: REICHLER, D.G.ed. **Analysis of Temperate Forest Ecosystems**. New York:Springer, 1970. p.131-146.

- TATE, K. R.; JENKINSON, D.S. Adenosine triphosphate measurements in soil: an improved method. **Soil Biol. Biochem.**, v.14, p.331-335, 1982.
- THOMAS, A.; NICHOLAS, D. P. ; PARKINSON, D. Modifications of the agar film technique for assaying lengths of mycelium in soil. **Nature**, v.205, p. 105, 1965.
- VANCE, E. D.; BROOKES, P. C. ; JENKINSON, D. S. Microbial biomass measurements in forest soils: the use of the chloroform fumigation-incubation method in strongly acid soils. **Soil Biol. Biochem.**, v.19, p.697-702, 1987a.
- VANCE, E. D; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biol. Biochem.**, v.19, p.703-707, 1987b.
- VAN DE WERF, H.; VERSTRATE, W. Estimation of active soil microbial biomass by mathematical analysis of respiration curves: relation to conventional estimation of total biomass. **Soil Biol. Biochem.**, v.19, p.267-271, 1987.
- VISSER, S.; FUJIKAWA, J.; GRIFFITHS, C.L.; PARKINSON, D. Effect of topsoil storage on microbial activity, primary productivity and decomposition potential. **Pl. Soil**, v.82, p.41-50, 1984.
- VISSER, S.; PARKINSON, D. Microbial respiration and biomass in a soil of a lodgepole pine stand acidified with elemental sulphur. **Can.J. For. Res.**, v.19, p.855-869, 1989.
- VORONEY, R. P. ; PAUL, E. A. Determination of K_c and K_n in situ for calibration of the fumigation incubation method. **Soil Biol. Biochem.**, v.16, p.9-14, 1984.
- WARCUP, J. H. Fungi in soil. In: BURGESS, A.; RAW, F., eds. **Soil Biology**. London: Academic Press, 1967. p.51-110.
- WARDLE, D. A. Changes in the microbial biomass and metabolic quotient during leaf litter succession in some New Zealand forest and scrubland ecosystems. **Funct. Ecol.**, v.7, p.346-355, 1993.
- WARDLE, D. A.; GHANI, A. Why is the strength of relationships between pairs of methods for estimating microbial biomass often so variable, 1994. (submitted).
- WARDLE, D. A.; PARKINSON, D. Determination of bacterial and fungal fumigation K_c -factors across a soil moisture gradient. **Soil Biol. Biochem.**, v.22, p.811-816, 1990a.
- WARDLE, D. A.; PARKINSON, D. Comparison of physiological techniques for estimating the response of the soil microbial biomass to soil moisture. **Soil Biol. Biochem.**, v.22, p.817-824, 1990b.
- WARDLE, D. A.; PARKINSON, D. Response of the soil microbial biomass to glucose, and selective inhibitors, across a soil moisture gradient. **Soil Biol. Biochem.**, v.22, p.825-834, 1990c.

- WARDLE, D. A.; PARKINSON, D. A statistical evaluation of equations for predicting total microbial biomass carbon using physiological and biochemical methods. In: CROSSLEY, D.A., ed. **Modern techniques in soil ecology**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p.75-86.
- WARDLE, D. A.; PARKINSON, D. ; WALLER, J. E. Interspecific competitive interactions between pairs of fungal species in natural substrates. **Oecologia**, v. 94, p.165-172, 1993a.
- WARDLE, D. A. ; YEATES, G. W. ; WATSON, R. N. ; NICHOLSON, K. S. Response of the soil microbial biomass and plant litter decomposition to weed management strategies in maize and asparagus cropping systems. **Soil Biol. Biochem.**, v.25, p.857-868, 1993b.
- WEST, A. W. Improvements to the selective respiratory inhibition technique to measure eukaryote ratios in soils . **J. Microbiol. Methods**, v.5, p.125-138, 1986.
- WEST, A. W. Modifications to the substrate-induced respiration method to permit measurement of microbial biomass in soils of differing water content. **J. Microbiol. Methods**, v.5, p.177-189, 1986.
- ZAGEL, E. Measurement of microbial biomass in rewetted air-dried soil by fumigation-incubation and fumigation-extraction techniques. **Soil Biol. Biochem.**, v.25, p.553-559, 1993.

PARTE VII. TÉCNICAS AUXILIARES NOS ESTUDOS DE MICROBIOLOGIA DO SOLO

CAPÍTULO 22

O MÉTODO DA REDUÇÃO DO ACETILENO

Frank R. Minchin¹

22.1. Introdução

O teste da redução do acetileno oferece uma alternativa rápida e simples para se determinar a atividade da nitrogenase, mudando-se o substrato de nitrogênio atmosférico (N_2) para acetileno (C_2H_2) (que satura a atividade da nitrogenase a uma concentração em torno de 10%) e obtendo-se como produto final, em lugar da amônia (NH_3), o etileno (C_2H_4), um gás facilmente detectado em um cromatógrafo a gás. Este teste teve uma profunda influência nos estudos sobre os nódulos das leguminosas, sendo empregado com freqüência cada vez maior desde o seu desenvolvimento em 1966 (Turner & Gibson, 1980). Uma hipótese fundamental para este teste é que a taxa de atividade da enzima não é afetada pelas condições do ensaio. Entretanto, experimentos empregando sistemas abertos com fluxo contínuo de gás demonstraram que há um decréscimo, rápido e significativo, na atividade da nitrogenase, associado à respiração nodular, a partir da exposição do sistema radicular da planta ao acetileno, por períodos de 3 a 10 min, atingindo-se um novo platô no período de 30 a 60 min (Minchin et al., 1983b).

A taxa real de atividade da nitrogenase é representada pela taxa máxima (pré-decrécimo) de redução de acetileno. Desta forma, se ocorrer um decréscimo induzido pelo acetileno, os cálculos da atividade da nitrogenase, com base na produção cumulativa de etileno em frascos fechados, acaba subestimando a taxa real de fixação. Esse erro pode ser da ordem de 50%, quando se faz a incubação por um período de 30 min ou mais. O decréscimo persiste mesmo quando se emprega acetileno purificado (mas não é induzido pelo etileno ou por alterações na concentração de CO_2). Um decréscimo semelhante ocorre, na produção de H_2 e CO_2 , quando se substitui o N_2 por argônio, o que também provoca a paralisação na produção de amônia (Minchin et al., 1983b). O decréscimo na atividade da nitrogenase, induzido pelo acetileno, parece ser causado por um aumento na resistência dos nódulos à difusão de O_2 e pode ser parcialmente revertido por exposição do sistema a uma pO_2 externa mais elevada (Witty et al., 1984). O decréscimo pode, ainda, ser totalmente revertido pela remoção da fase gasosa que contém o acetileno, sem causar danos aparentes à nitrogenase (Minchin et al., 1983a).

¹ Pesquisador, Ph.D., Institute of Grassland and Environmental Research, Plas Gogerddan, Aberystwyth, Dyfed, SY23 3EB, UK.

Minchin et al. (1983b) realizaram suas observações em plantas intactas. Entretanto, o ensaio tradicional de redução do acetileno (Hardy et al., 1968) é realizado em frascos fechados, contendo sistemas radiculares nodulados, que podem ser removidos por lavagem ou agitação e decapitados, livres do substrato em que as plantas foram crescidas. Sabe-se que a lavagem reduz a atividade da nitrogenase (Mague & Burris, 1972), assim como o faz o destacamento dos nódulos antes da incubação (Hardy et al., 1973). Apesar desses problemas, esses tratamentos são comumente empregados na preparação de amostras para ensaios comparativos. Mesmo conhecendo-se as possibilidades de efeitos negativos da remoção da parte aérea e agitação das raízes, sobre a atividade da nitrogenase, elas não mereceram muita consideração durante o desenvolvimento da metodologia (Hardy et al., 1973). Talvez isto se deva à existência de relatos contraditórios a respeito das atividades comparadas de plantas intactas e raízes destacadas (Mague & Burris, 1972; Trinick et al., 1976; Wych & Rains, 1978; Saito et al., 1980), refletindo diferentes graus de erros causados pelo decréscimo na atividade induzido pelo acetileno.

Experimentos com um sistema de fluxo contínuo demonstraram que os distúrbios causados pela preparação das amostras para o “ensaio-padrão” causam um decréscimo substancial na atividade da nitrogenase (Minchin et al., 1986). Esse decréscimo, assim como aquele induzido pelo acetileno, está associado a um aumento na resistência dos nódulos à difusão de O_2 . Como os decréscimos induzidos pelo acetileno e pela perturbação do sistema radicular atuam pelo mesmo mecanismo fisiológico, eles são interativos. Por isso, o efeito do acetileno diminui, à medida que o efeito da perturbação aumenta e vice-versa. Para complicar um pouco mais, alguns tratamentos aplicados às plantas também podem acarretar aumentos na resistência dos nódulos à difusão de O_2 (Witty et al., 1986; Hunt & Layzell, 1993), fazendo com que essas plantas sofram menos os efeitos do acetileno ou da remoção da parte aérea/destacamento das raízes. Em conseqüência, as plantas-controle de tais experimentos podem ser severamente afetadas pelos procedimentos para o teste de redução do acetileno, enquanto que as plantas de outros tratamentos podem não ser afetadas. Como demonstrado por Minchin et al. (1986), podem-se observar situações nas quais as plantas-controle têm atividade da nitrogenase superior à das plantas tratadas.

Os estudos de Minchin et al. (1986) levaram à conclusão que o ensaio-padrão, baseado na técnica da redução do acetileno, é inválido mesmo quando utilizado com fins comparativos. Essa condenação do ensaio provocou um longo debate (Hunt & Layzell, 1993; Minchin et al., 1994; Vessey, 1994) e, hoje, muitos cientistas, revisores e editores de revistas científicas aceitam que este é um ensaio pouco confiável. A dúvida restante é, então, sobre como o ensaio ainda pode ser adotado e quais procedimentos são necessários. Tentar-se-á esclarecer essas dúvidas considerando as aplicações práticas do ensaio em relação a situações reais de pesquisa, o que requer que se façam considerações separadas sobre plantas cultivadas em vasos e aquelas cultivadas no campo.

22.2. Aplicação do Ensaio Tradicional em Plantas Cultivadas em Vasos

A vantagem das plantas cultivadas em vasos é que o sistema radicular inteiro pode ser facilmente recuperado, além de ser possível regular a extensão dos estresses relacionados ao ambiente (devidos a água, temperatura, nutrientes, etc.). Tanto o decréscimo induzido pelo acetileno quanto aquele causado pela perturbação do sistema podem ser reduzidos ou estar ausentes em nódulos estressados. Entretanto, os estresses relacionados ao ambiente, no caso de plantas cultivadas em vasos, costumam ser impostos, deliberadamente, como parte de estudos agrônômicos ou fisiológicos. Nesses casos há, normalmente, a comparação com plantas-controle que não foram submetidas ao estresse e que podem apresentar um decréscimo significativo na atividade da nitrogenase em decorrência da perturbação ou da presença do acetileno. Essa diferença na intensidade do decréscimo entre plantas-controle e aquelas submetidas ao estresse é uma das razões que tornam o ensaio tradicional pouco confiável no caso desses experimentos (Minchin et al., 1986).

As principais fontes de erro nas estimativas da fixação de nitrogênio, através do ensaio tradicional, por plantas cultivadas em vasos, são os decréscimos induzidos pela presença do acetileno ou pelos distúrbios físicos. Como já foi dito, esses efeitos são interativos (Minchin et al., 1986). Sendo assim, o decréscimo induzido pelo acetileno será mais importante se os sistemas radiculares intactos forem analisados dentro dos vasos, enquanto o decréscimo causado pelo distúrbio será mais importante se as raízes forem removidas dos vasos.

Apesar dos erros provocados pelos decréscimos na atividade da nitrogenase, os ensaios em sistemas fechados podem ser empregados para plantas cultivadas em vasos com a finalidade de detectar a presença ou ausência de atividade da nitrogenase e permite análises qualitativas, como a determinação do ponto inicial de fixação de nitrogênio, ou a triagem de estirpes de rizóbios para detectar aquelas ineficientes. Há, também, sugestões de que os ensaios de redução do acetileno em sistemas nodulares destacados podem ser incorporados a medidas da alocação relativa de elétrons para a produção de hidrogênio e dos custos de carbono para a atividade da nitrogenase (Minchin & Witty, 1989). No caso de outras medidas comparativas, se a redução do acetileno sofrer severas modificações em um determinado tratamento experimental (ex.: 70% a 90%), é provável que as diferenças entre tratamentos sejam genuínas e os resultados (ainda que aproximados) se tornam mais aceitáveis.

Outros pesquisadores (ex.: Vessey, 1994) tentaram demonstrar que o ensaio tradicional com sistemas destacados, pode ser empregado para propósitos comparativos. A base do argumento de Vessey foi uma relação linear entre dados de atividade da nitrogenase, obtidos pelo ensaio tradicional, utilizando plantas crescidas em vasos e da evolução de hidrogênio em Ar:O_2 , avaliada em um sistema de fluxo contínuo. Entretanto, essa comparação representa apenas uma calibração do efeito do distúrbio do sistema, com o ensaio tradicional, contra a avaliação precisa da atividade da nitrogenase em plantas intactas. Embora tais calibrações sejam perfeitamente válidas, existe uma limitação prática muito séria, pois a extensão do distúrbio pode variar com o tratamento (ex.: plantas do tratamento controle

vs. plantas estressadas). Esses efeitos inconsistentes são fontes imprevisíveis de erros e, por isso, o ensaio em sistema fechado deve ser calibrado para cada tratamento (ex.: troca de cultivar, estirpe de *Rhizobium*, condições de crescimento das plantas e realização do ensaio). Dessa forma, a calibração mostrada por Vessey (1994) é aplicável apenas às plantas daquele experimento em particular, e não representa calibração universal para todos os experimentos realizados utilizando o ensaio tradicional.

A realização de calibrações requer que se façam comparações com plantas intactas antes que ocorra um decréscimo induzido pelo acetileno (ou argônio), e a maneira mais óbvia para que isso seja feito, é através da utilização de um sistema de fluxo contínuo. Entretanto, uma vez que há a necessidade de se construir um sistema aberto de fluxo contínuo para que essas calibrações sejam feitas e comparadas com o ensaio fechado, então não é mais fácil utilizá-lo logo para a obtenção das medidas? Na minha do autor, nos casos de estudos fisiológicos detalhados, deve-se sempre empregar um sistema de fluxo contínuo. A realização de calibrações pode ser útil para estudos agronômicos ou programas de melhoramento, que envolvem um grande número de amostras, mas mesmo nestes casos sua utilidade é limitada pela necessidade de se fazer uma calibração para cada sistema simbiótico e cada condição de ensaio.

Há quem argumente que os sistemas de fluxo contínuo têm necessidades específicas de equipamentos e instalações que não são disponíveis a todos. Entretanto, isto só se aplica ao caso de sistemas sofisticados, projetados para medir outras coisas além da redução do acetileno (ex.: Layzell et al., 1989). Já foi demonstrado que o sistema de fluxo contínuo não precisa ser muito complexo ou caro (Minchin & Witty, 1989; Silvester et al., 1989) e que o misturador simples de gases desenvolvido por Parsons et al. (1992) pode ser construído em qualquer laboratório que seja equipado para conduzir o ensaio tradicional de redução do acetileno. Os elementos funcionais de um sistema de fluxo contínuo são:

- um sistema preciso para a mistura de gases, que seja capaz de ser usado, rapidamente, com diferentes fontes de gases;
- um método para regular a entrada de gás a um fluxo constante e conhecido;
- recipientes que aceitem a passagem de um fluxo de gases, que sejam facilmente vedados, que tenham termostato e que apresentem um mínimo de espaço vazio e uma baixa “memória” de gases;
- um método para realizar amostragens e análises rápidas e precisas dos gases.

Os requisitos básicos desses sistemas foram descritos anteriormente (Mederski & Streeter, 1977; Minchin et al., 1983b) e existem muitas opções para a montagem de sistemas simples descritas por Silvester et al. (1989) e Parsons et al. (1992). Deve-se lembrar, porém, que em todos os sistemas de fluxo contínuo, as misturas de gases contendo mais que 4% de acetileno dissolvido no ar são explosivas, devendo ser manuseadas com as devidas precauções, que incluem:

- certificar-se de que o sistema não apresenta vazamentos;
- utilizar ventilação forçada para dirigir os gases da exaustão para longe de fontes de combustão;

- certificar-se de que a mistura de gases não seja submetida a pressões acima de 0,7 bar e que o sistema possua uma linha para alívio do excesso de pressão;
- evitar o uso de materiais que possam gerar eletricidade estática (ex.: mangueiras de náilon);
- manter o volume da mistura de gases no nível mínimo, evitando recipientes muito grandes para preparar a mistura de gases ou para a realização dos ensaios;
- isolar as seções consecutivas do sistema por meio de válvulas anti-retorno e coletores de água;
- certificar-se de que as partes de vidro estejam cobertas com fita adesiva e que as partes metálicas estejam fixas;
- evitar a utilização de canos de cobre e colunas de perclorato de magnésio.

Em decorrência desses problemas, alguns cientistas têm recomendado a medição da produção de H_2 na presença de argônio, em vez de avaliar a redução do acetileno (Hunt & Layzell, 1993). Entretanto, a medição da produção de H_2 na presença de argônio, também está sujeita aos problemas de redução da atividade da nitrogenase (o decréscimo induzido pelo argônio) e só pode ser empregada em sistemas simbióticos Hup^- (hidrogenase negativo). A utilização de um analisador de H_2 com sistema de fluxo contínuo (Layzell et al., 1984) também sofre complicações, decorrentes de alterações na sensibilidade, concomitantes com alterações na velocidade do fluxo de gases, na pressão, na concentração de vapor d'água, no gás de arraste (N_2 ou Ar) e na concentração de O_2 , de forma que a calibração é difícil e demorada (Layzell et al., 1989; Hunt & Layzell, 1983). Contudo, o método tem as vantagens de ser mais seguro e proporcionar uma medição contínua da atividade da nitrogenase, além de eliminar o trabalho de se retirarem amostras com seringas, a intervalos de 1 min ou menos, associado ao ensaio tradicional.

Uma alternativa para avaliar a velocidade máxima da nitrogenase num sistema de fluxo contínuo seria trabalhar sob concentrações não saturantes de acetileno (ex.: 0,1%) que não viessem a induzir o decréscimo (Denison et al., 1983). Entretanto, dados da produção de etileno obtido nessas condições devem ser extrapolados para a situação que ocorreria sob concentrações saturantes de acetileno. A calibração cinética necessária requer que se aumente a concentração de acetileno para 1% ou mais, um nível que pode induzir o decréscimo em soja e trevo, aumentando a probabilidade de erros no processo de calibração. Pode-se, ainda, evitar o decréscimo induzido pelo acetileno quando as plantas estão crescendo em solução nutritiva aerada ou sob condições aeropônicas pois, aparentemente, a barreira à difusão de oxigênio, produzida em nódulos obtidos nessas condições, pode ser insensível ao acetileno (Minchin & Witty, 1989). Entretanto, a fisiologia das plantas e dos nódulos, nessas condições, pode não estar relacionada àquela de plantas cultivadas em substratos convencionais, ou mesmo no campo.

Um outro problema associado ao teste de redução do acetileno (ou à medição da produção de H_2 sob argônio) está no fato que esse teste mede apenas o fluxo de elétrons para a nitrogenase no material da amostra e nas condições predominantes durante a realização do ensaio. Essa medição não

se relaciona diretamente à fixação de nitrogênio. Quando se pretende obter dados sobre a fixação de nitrogênio a partir de dados da redução de acetileno, torna-se necessária a utilização de um fator de conversão. Em estudos preliminares, esse fator era de 3:1 (Hardy et al., 1973), baseado na relação entre o número de elétrons necessários para reduzir N_2 (6) e o número necessário para reduzir acetileno (2). Posteriormente, tornou-se aparente que, para cada N_2 reduzido, havia a redução de pelo menos dois prótons a H_2 levando, então, a adotar-se um fator de conversão de 4:1. Entretanto, na realidade, a proporção de elétrons alocados para a produção de H_2 é variável, tornando necessária a determinação do fator de conversão para cada caso, com base na redução de acetileno e produção de hidrogênio. Este cálculo é impossível no caso de sistemas simbióticos Hup^+ , e mesmo nos Hup^- a relação de conversão é aplicável apenas às condições do ensaio. Em casos como este, é importante que as medições da redução do acetileno e da produção de H_2 sejam efetuadas utilizando-se materiais comparáveis e sujeitos aos mesmos erros. Não se pode relacionar a produção de H_2 por nódulos destacados com a redução de acetileno por sistemas radiculares intactos.

22.3. Aplicação do Ensaio Tradicional em Plantas Cultivadas no Campo

Apesar das tentativas de adaptação do sistema de fluxo contínuo para a utilização no campo (McNeill et al., 1989), é necessário que o tamanho dos recipientes *in situ* e a velocidade do fluxo de gás sejam adequados para se obter boa resolução experimental na determinação da taxa máxima de redução do acetileno. Caso contrário, esses sistemas necessitam de tratamentos matemáticos complexos (Sheehy, 1991; Sheehy et al., 1991). As técnicas de fluxo contínuo para experimentos de campo utilizam câmaras de ensaio abertas em uma das extremidades e colocadas no solo, no princípio da estação de crescimento. Entretanto, a limitação imposta pelas câmaras ao crescimento das plantas pode provocar alterações na morfologia das plantas que nelas são cultivadas continuamente (Denison, 1983). A alternativa de inserir as câmaras no solo, ao redor de plantas já estabelecidas, pode causar danos às raízes laterais e compactação do solo (Hardy et al., 1977). Em ambos os casos, a profundidade em que se encontra a câmara de ensaio pode não ser adequada para incluir toda a população de nódulos (Denison et al., 1983) podendo, ainda, causar modificações na distribuição dos nódulos em função da inoculação e do ambiente (ver a seguir).

Os danos advindos dos estresses induzidos pelo ambiente sobre plantas cultivadas no campo podem ser mais sérios e, conseqüentemente, a extensão dos decréscimos na atividade de redução do acetileno, induzidos pelo acetileno ou pelos distúrbios, pode ser menor. Os resultados de duas séries de experimentos de campo envolvendo sistemas abertos de fluxo contínuo levaram McNeill et al. (1989) e Sheehy et al. (1991) a concluir que as plantas não sofreram decréscimos induzidos pelo acetileno. Na primeira série, a simbiose com *Onobrychis viciaefolia*, no campo, não sofreu decréscimo induzido pelo acetileno, em comparação com plantas cultivadas em vasos e testadas sob condições controladas, mas na segunda série, com plantas de alfafa (*Medicago sativa*), essa comparação não foi

realizada. Nossas observações pessoais sobre a alfafa sugerem que essa espécie, freqüentemente, exibe um decréscimo induzido pelo acetileno de ordem pequena (10% a 20% após um período de 60 minutos) sob condições controladas em câmaras de crescimento. Assim, a aparente ausência de decréscimo nos experimentos de Sheehy et al. (1991) não é tão surpreendente, mas os resultados não podem ser extrapolados e sugerir que as espécies menos sensíveis aos decréscimos induzidos pelo acetileno em câmaras de crescimento (ex.: soja e trevo) também o serão quando testadas no campo.

Mesmo que os resultados de pesquisas demonstrem que, em certas espécies ou situações, não há erros decorrentes da presença do acetileno ou do distúrbio, ainda resta uma poderosa fonte de erros associada à recuperação incompleta da população de nódulos quando se coletam plantas do campo (Witty & Minchin, 1988). É muito difícil coletar todos os nódulos de leguminosas com sistemas radiculares superficiais cultivadas em solos friáveis, e praticamente impossível recuperar todos os nódulos de leguminosas com sistemas radiculares profundos ou de plantas cultivadas em solos secos ou com má estrutura. No exemplo de Witty & Minchin (1988), a resposta do tremoço à inoculação foi avaliada por meios de medições semanais (através do ensaio tradicional) da taxa da atividade de redução do acetileno de plantas inoculadas e não inoculadas. As plantas inoculadas reduziram acetileno três a quatro vezes mais rápido que as plantas não inoculadas. Entretanto, esse “benefício” da inoculação não se refletiu na acumulação máxima ou final de nitrogênio nas plantas. Quando se procedeu a uma escavação cuidadosa do sistema radicular, observou-se que a maioria dos nódulos das plantas inoculadas se concentrava na raiz principal e nas raízes secundárias, próximas à superfície do solo. Já nas plantas não inoculadas foram encontrados os mesmos números de nódulos, mas esses estavam distribuídos ao acaso ao longo de todo o sistema radicular. Esse fenômeno se estendeu a uma profundidade de 40 cm e a maioria dos nódulos (cerca de 75%) havia sido perdida quando as raízes foram coletadas, por meio de escavação, a 20 cm de profundidade. Se fosse adotado um processo extensivo de escavação “arqueológica” para a amostragem, provavelmente teria sido possível recuperar mais nódulos das plantas não inoculadas. Mas existem dúvidas se, ao final da escavação, os nódulos ainda estariam viáveis ou inalterados pelos efeitos dos distúrbios.

Podem-se esperar erros como esses quando se fazem comparações entre tratamentos que modifiquem a estrutura do solo (ex.: irrigação, adição de matéria orgânica) ou a distribuição dos nódulos no sistema radicular (ex.: inoculação, adubação, espaçamento), ou quando se comparam locais ou genótipos de hospedeiros. Por essa razão, conclui-se que a utilidade do teste de redução do acetileno, para estudos realizados no campo, é muito limitada.

22.4. Considerações Finais

Vessey (1994) defendeu o ensaio tradicional do teste de redução do acetileno, concluindo que: “A aceitação da invalidade do teste de redução do acetileno realizado em sistemas fechados seria um grande retrocesso para a pesquisa sobre fixação de nitrogênio, especialmente em países em desenvolvimento que, muitas vezes, não dispõem de tecnologias alternativas para medir a atividade da

nitrogenase". A aparente promoção feita por Vessey, da continuação da medição da atividade da nitrogenase através do sistema fechado, nos trabalhos de pesquisa realizados por países em desenvolvimento, é perigosa. Grande parte desses trabalhos de pesquisa é realizada no campo e de uma natureza em que dados irreais podem implicar em sérios efeitos adversos na produção de alimentos.

Não é verdade que a técnica da redução do acetileno é a única forma de se avaliar a atividade da nitrogenase que se encontra disponível aos pesquisadores dos países em desenvolvimento, onde os solos são normalmente pobres em nitrogênio. Como concluído por Mytton (1988), observa-se, normalmente, uma boa correlação entre N_2 fixado e o acúmulo de matéria seca, o que faz com que parâmetros simples como peso seco, produtividade e N total sejam bons indicadores da atividade da nitrogenase, ao mesmo tempo que fornecem dados agronômicos úteis. É lógico que existem áreas e objetivos para os quais as diferenças em produtividade sejam inapropriadas ou não sejam suficientemente sensíveis (ex.: em solos ricos em N), mas esses problemas são melhor estudados com a utilização de ^{15}N , sendo possível até obter ajuda financeira da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) em Viena, Áustria.

Considerando-se o exposto, não é tão surpreendente que as condenações mais sérias ao uso do ensaio tradicional tenham partido de cientistas com estreitas ligações a laboratórios nos países em desenvolvimento (ex.: Sprent & Sprent, 1990; Giller & Wilson, 1991). Ao contrário do que foi afirmado por Vessey (1994), um grande atraso à pesquisa em fixação biológica do nitrogênio seria a aceitação de resultados obtidos pelo ensaio tradicional sem questioná-los, ou incentivar o emprego dessa técnica em laboratórios de países em desenvolvimento simplesmente por eles terem acesso a um cromatógrafo.

Como relatado anteriormente, existem algumas situações práticas em que a medição da atividade da nitrogenase pelo ensaio tradicional é válida e pode ser estendida para a realização de calibrações cuidadosas em comparação com o sistema de fluxo contínuo. Entretanto, restam dúvidas se a realização de tais calibrações apresenta vantagens práticas sobre a utilização do sistema de fluxo contínuo para se obterem as medidas de interesse. Na ausência de calibração os resultados obtidos com comparações baseadas no ensaio tradicional são duvidosos. Os cientistas, revisores e editores de periódicos deveriam perguntar-se o seguinte: "se o ensaio tradicional em sistema fechado oferece as únicas evidências de diferenças (ex.: entre sistemas simbióticos ou entre tratamentos), isto o torna conclusivo? Se existem outras evidências das diferenças (ex.: crescimento das plantas, N total), há necessidade de dados sobre a redução de acetileno?" Na maioria dos casos, a resposta a ambas as perguntas seria: "não".

Não se pode recomendar nenhuma forma não calibrada do teste de redução do acetileno para estudos de campo, sugerindo-se que os cientistas considerem os méritos de medidas simples e alternativas, como acúmulo de matéria seca, produtividade e nitrogênio total. Estas medições podem não trazer o apelo de sofisticação de tantas outras, mas na maioria dos casos elas representam uma maneira direta e relativamente precisa de avaliar parâmetros importantes na pesquisa.

22.5. Referências Bibliográficas

- DENISON, R. F.; WISZ, P. R.; SINCLAIR, T. R. Analysis of acetylene reduction rates of soybean nodules at low acetylene concentrations. **Plant Physiol.**, v.73, p.648-651, 1983.
- GILLER, K. E.; WILSON, K. J. **Nitrogen Fixation in Tropical Cropping Systems**. Wallington: CAB International, 1993. 313 p.
- HARDY, R. W. F.; CRISWELL, J. G.; HAVELKA, U. D. Investigations of possible limitations of nitrogen fixation by legumes: (1) methodology, (2) identification and (3) assessment of significance. In: NEWTON, W. E.; POSTGATE, J. R.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C., eds. **Recent developments in nitrogen fixation**. London: Academic Press, 1991. p.451-467.
- HARDY, R. W. F.; HOLSTEM, R. D.; JACKSON, E. K.; BURNS, R. C. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. **Plant Physiol.**, v.43, p.1185-1207, 1968.
- HARDY, R. W. F.; BURNS, R. C.; HOLSTEN, R. D. Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. **Soill Biol. and Biochem.**, v.5, p.47-81, 1973.
- HUNT, S.; LAYZELL, D. B. Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.44, p.483-511, 1993.
- LAYZELL, D. B.; WEAGLE, G.E.; CANVIN, D. T. A highly sensitive flow through H₂ gas analyzer for use in nitrogen fixation studies. **Plant Physiol.**, v.75, p.582-585, 1984.
- LAYZELL, D. B.; HUNT, S.; KING, B. J.; WALSH, K. B.; WEAGLE, G. E. A multichannel system for steady-state and continuous measurements of gas exchanges from legume roots and nodules. In: TORREY, J.G.; WINSHIP, L.J., ed. **Applications of continuous and steady-state methods in root biology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1989. p.1-28.
- MAGUE, T. H.; BURRIS, R. H. Reduction of acetylene and nitrogen by field-grown soybeans. **New Phytol.**, v.71, p.275-286, 1972.
- McNEILL, A. M.; SHEEHY, J. E.; DRENNAN, D. S. H. The development and use of a flow-through apparatus for measuring nitrogenase activity and photosynthesis inf field crops. **J.Exp. Bot.**, v.40, p.187-194, 1989.
- MEDERSKI, H. J.; STREETER, J. G. Continuous, automated acetylene reduction assays using intact plants. **Plant Physiol.**, v.59, p.1075-1081, 1977.
- MINCHIN, F. R.; SHEEHY, J. E.; WITTY, J. F. Factors limiting N₂ fixation by the legume-*Rhizobium* symbiosis. In: EVANS, H. J.; BOTTOMLEY, P. J.; NEWTON, W. E., ed. **Nitrogen fixation research progress**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1985. p.285-291.

- MINCHIN, F.R.; SHEEHY, J.E.; WITTY, J.F. Further errors in the acetylene reduction assay: effects of plant disturbance. **J. Exp. Bot.**, v.37, p.1581-1591, 1986.
- MINCHIN, F. R.; WITTY, J. F. Limitations and errors in gas exchange measurements with legume nodules. In: TORREY, J. G.; WINSHIP, L. J. ed. **Applications of continuous and steady-state methods to root biology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1989. p.79-95.
- MINCHIN, F. R.; WITTY, J. F.; MYTTON, L. R. Reply to 'Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: in defense of the acetylene reduction assay' by VESSEY, J.K. **Pl. Soil**, v. 158, p.163-167, 1994.
- MINCHIN, F. R.; WITTY, J. F.; SHEEHY, J. E. A new technique for the measurement of the respiratory costs of symbiotic nitrogen fixation. In: JONES, D.G.; DAVIES, D. R., eds. **Temperature legumes: physiology, genetics and nodulation**. London: Pitman, 1983a. p.201-217.
- MINCHIN, F. R.; WITTY, J.F.; SHEEHY, J. E.; MULLER, M. A Major error in the acetylene reduction assay: decreases in nodular nitrogenase activity under assay conditions. **J. Exp. Bot.**, v.34, p.641-649, 1983.
- MYTTON, L. R. Workshop synthesis and recommendations developed from group discussion. In: BECK, D. P.; MATERON, L.A., eds. **Legumes in Mediterranean agriculture**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1988. p.373-379.
- PARSONS, R.; RAVEN, J. A.; SPRENT, J. I. A simple open flow system used to measure acetylene reduction activity of *Sesbania rostrata* stem and root nodules. **J. Exp. Bot.**, v.43, p.595-604, 1992.
- SAITO, S. M. T.; MATSUI, E.; SALATI, E. $^{15}\text{N}_2$ fixation, H_2 evolution and C_2H_2 reduction relationships in *Phaseolus vulgaris*. **Physiol Plant**, v.49, p.37-42, 1980.
- SILVESTER, W. B.; PARSONS, R.; MINCHIN, F. R.; WITTY, J. F. Simple apparatus for growth of nodulated plants and for continuous nitrogenase assay under defined gas phase. In: TORREY, J.G.; WINSHIP, L.J., eds. **Applications of continuous and steady-state methods to root biology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1985. p.55-66.
- SHEEHY, J. E. Theory of a crop enclosure system for measuring nitrogen fixation, photosynthesis, respiration and biological processes in the soil. **Ann. Bot.**, v.67, p.123-130, 1991.
- SHEEHY, J. E.; WOODWARD, F. I.; GOSSE, G. Measurement of N_2 fixation (C_2H_2), photosynthesis and respiration using an open system in the natural environment. **Ann. Bot.**, v.67, p.131-136, 1991.

- SPRENT, J.I.; SPRENT, P. **Nitrogen-fixing organisms**. London: Chapman and Hall, 1990. 256p.
- TRINICK, M. J.; SILWORTH, M. J.; GROUNDS, M. Factors affecting the reduction of acetylene by root nodules of *Lupinus* species. **New Phytol.**, v.77, p.359-370, 1976.
- TURNER, G. L.; GIBSON, A. H. measurement of nitrogen fixation by indirect means. In: BERGERSEN, F. J. ed. **Methods for evaluating biological nitrogen fixation**. Chichester: John Wiley, 1980. p.111-138.
- VESSEY, J. K. Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: In defense of the acetylene reduction assay. **Pl. Soil**, v.158, p.151-162, 1994.
- WITTY, J. F.; MINCHIN, F. R. Measurement of nitrogen fixation by the acetylene reduction assay; myths and mysteries. In: BECK, D. P.; MATERON, L. A. ed. **Nitrogen fixation by legumes in Mediterranean agriculture**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1988. p.331-334.
- WITTY, J. F.; MINCHIN, F. R.; SHEEHY, J. E.; MINGUEZ, M. I. Acetylene-induced changes in the oxygen diffusion resistance and nitrogenase activity of legume root nodules. **Ann. Bot.**, v.53, p.13-20, 1984.
- WITTY, J. F.; MINCHIN, F. R.; SKØT, L.; SHEEHY, J.E. Nitrogen fixation and oxygen in legume root nodules. In: MIFLIN, B.J. ed. **Oxford surveys of plant molecular and cell biology**. Oxford: Oxford University Press, 1986. p.275-314.
- WYCH, R. D.; RAINS, D. W. Simultaneous measurements of nitrogen fixation estimated by the acetylene-ethylene assay and nitrate absorption by soybeans. **Plant Physiol.**, v.62, p.443-448, 1978.

CAPÍTULO 23

MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DO NITROGÊNIO EM SOLO E PLANTA

Bruno J. R. Alves¹

Júlio César F. dos Santos²

Segundo Urquiaga³

Robert M. Boddey³

23.1. Introdução

Na agricultura, o nitrogênio é o nutriente que mais influi no crescimento e na produção das culturas, especialmente no caso das não-leguminosas. Pode-se dizer que este elemento é um dos mais estudados e, atualmente, os estudos de seu ciclo no sistema solo-água-planta-atmosfera têm sido intensificados, visando um maior controle da poluição ambiental e da sustentabilidade de sistemas agrícolas e pastoris. Nesses estudos, o êxito dos resultados vai depender dos métodos de análise utilizados, em que a exatidão e a precisão deverão prevalecer à praticidade.

A seguir apresenta-se, de forma resumida, uma análise crítica das principais metodologias para determinação das formas de nitrogênio mais importantes no sistema solo planta.

23.2. Nitrogênio Total do Solo

Durante os anos 60, Bremner e colaboradores investigaram exaustivamente as técnicas de análise de nitrogênio total no solo (Bremner, 1965a). Até hoje, estas técnicas continuam a ser recomendadas, e utilizadas em quase todos os laboratórios no mundo (Bremner & Mulvaney, 1982). Existem duas técnicas básicas, que são baseadas nas metodologias da combustão a alta temperatura (Dumas) e da digestão úmida (Kjeldahl).

23.2.1. Técnica da Combustão em Alta Temperatura (Dumas)

Nesta técnica, a amostra é aquecida a 600°C, ou mais, num tubo de porcelana, em corrente de CO₂ puro. Os gases liberados (principalmente H₂O, CO₂, SO₂ e os óxidos de nitrogênio: NO_x) são passados por uma coluna com limadura de cobre a 600°C para reduzir os óxidos de nitrogênio a N₂ e, depois a água é absorvida em cloreto de cálcio ou perclorato de magnésio ("anhydron"). Finalmente, todo o CO₂ (e SO₂) é absorvido por hidróxido de sódio (ou potássio) e o volume de N₂ é estimado. A

¹ Engenheiro-agrônomo, M.Sc., curso de pós-graduação na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (CNPAB), km 47 da antiga Rio-São Paulo, CEP 23851-970, Itaguaí, RJ.

² Engenheiro-agrônomo, M.Sc., curso de pós-graduação no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) e Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), Cx. Postal 1331, CEP 86001-970, Londrina, PR.

³ Pesquisadores, Ph.D., EMBRAPA-CNPAB.

técnica é lenta, trabalhosa e exige muito cuidado na estimativa do volume de N_2 (devendo-se fazer a correção para temperatura e pressão). A temperatura de combustão é, freqüentemente, insuficiente para a oxidação completa das amostras e, segundo Bremner & Shaw (1958), isto pode resultar na evolução de metano ou outros hidrocarbonetos, em vez de CO_2 , causando uma superestimativa do N na amostra.

Atualmente, esta técnica é pouco utilizada nesta forma, mas através de instrumentos, conhecidos como analisadores automáticos (como o LECO CHN 600 ou FP-428, ou CARLO ERBA CHN 1500), devido a sua praticidade. Estes instrumentos, utilizam um forno de combustão a mais de 1000° C, onde a amostra é queimada em um copinho de estanho, que funciona como um catalisador, evitando assim o problema de combustão incompleta. Nestes instrumentos, a quantificação do N_2 é feita em fluxo contínuo, após a absorção de água e CO_2 , com um detector de condutividade térmica e, em alguns modelos, os gases são separados utilizando uma coluna de cromatografia gasosa (peneira molecular de 5 Å ou similar) antes da detecção.

Existem dois problemas principais na utilização destes instrumentos: 1- o oxigênio utilizado para a combustão e o hélio, que serve como gás de arraste, devem ser puros (livres de N_2). Este gases, porém, são extremamente caros, especialmente no Brasil; 2- as amostras requeridas são muito pequenas (tipicamente 10 mg a 50 mg) e, para se ter uma amostra representativa, o solo precisa ser moído a pelo menos 100 mesh (< 0,150 mm).

Além disso, freqüentemente, não são obtidos bons resultados quando o teor de N total do solo é baixo (< 0,2 % N), como é comum em solos tropicais cultivados, devido à pequena quantidade de N_2 liberada em comparação com a variação dos brancos.

23.2.2. Técnica de Digestão Úmida

A técnica mais utilizada é a versão desenvolvida por Bremner (1965a), chamada semimicro Kjeldahl, seguida por destilação a vapor e titulação para a quantificação de NH_3 .

23.2.2.1. Técnica de Kjeldahl

Preparação de amostras

A técnica utiliza amostras contendo, aproximadamente, 1 mg a 2 mg de N. Em solos agrícolas (com a exceção de solos orgânicos), uma amostra de 1,0 g de solo é normalmente apropriada. É recomendado que a amostra seja moída inteiramente para passar numa peneira de 100 mesh (< 0,150 mm).

Reagentes

- a. ácido sulfúrico concentrado (p.a., para análise);
- b. mistura catalisadora: 100 g de K_2SO_4 , 10 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ e 1 g de selênio, moídos em almofariz até formar um pó homogêneo;

- c. hidróxido de sódio (p.a.), 10 M;
- d. solução de ácido bórico/indicador: dissolver completamente 80 g de H_3BO_3 (p.a.) em, aproximadamente, 3,8 litros de água destilada. Adicionar 80 mL de solução indicadora (0,100 g de verde de bromocresol + 0,066 g de vermelho de metila em 100 mL de etanol p.a.). Caso seja necessário, adicionar NaOH (0,1 M), gota por gota, até o pH da solução chegar a 5,0 (cor violeta). Completar a 4,0 litros com água;
- e. ácido sulfúrico padrão para a titulação: Preparar uma solução de ácido sulfúrico de concentração entre 0,005 a 0,001 M e padronizar contra um álcali de molaridade conhecida. Pode ser utilizado, para esta padronização, NaOH 0,1 ou 1,0 M, ou uma solução da base THAM (Tris-hidroximetil-amino-metano) (Bremner & Mulvaney, 1982).

Procedimento

Hoje em dia, as digestões de Kjeldahl são, normalmente, conduzidas em bloco digestor de alumínio com capacidade para vários tubos e aquecido eletricamente. Para melhor exatidão, utilizam-se dois tubos para o branco (reagentes sem amostra) e dois com uma amostra padrão com teor de N conhecido (referência).

Colocar a amostra num tubo de digestão (300 mm X 25 mm) e adicionar 2 mL de água destilada, agitar e deixar por 30 min. Adicionar 1,1 g da mistura catalisadora e 3 mL de ácido sulfúrico. Colocar os tubos no bloco digestor e aumentar a temperatura gradualmente (para evitar um excesso de espuma) até, aproximadamente, 300°C. A temperatura ideal é atingida quando for observado o refluxo do ácido a, aproximadamente, 10 cm de altura no tubo. Assim que a solução no tubo ficar clara (verde) continuar a digestão por mais 5 horas.

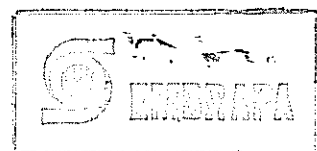
Após esfriamento dos tubos, transferir o conteúdo para o frasco de destilação (Figura 23.1), lavando o tubo 3 vezes com, aproximadamente, 8 mL de água destilada por vez. Colocar 5 mL da solução ácido bórico/indicadora em erlenmeyer, deixando-o abaixo da saída do condensador do aparelho de destilação (Figura 23.1), de tal maneira que a saída do condensador fique 4 cm acima da superfície da solução. Colocar 20 mL da solução de NaOH (10 M) no copo de álcali e lentamente introduzir esta solução para o frasco de destilação. Lavar o copo com, aproximadamente, 15 mL de água destilada. Abrir a válvula e deixar o vapor passar até que o volume da solução no erlenmeyer, contendo a solução ácido bórico/indicadora, chegue a 35 ou 40 mL, num intervalo de tempo de cerca de 4 min. Retirar o erlenmeyer e titular contra o ácido sulfúrico padrão.

Cálculo

$$\% N \text{ na amostra} = \left[(\text{título da amostra (mL)} - \text{título do branco (mL)}) \times 14 \times N_A \right] / \text{peso da amostra (mg)} \times 100$$

* 14 = mg N/meq N.

** N_A = normalidade do ácido sulfúrico padrão.



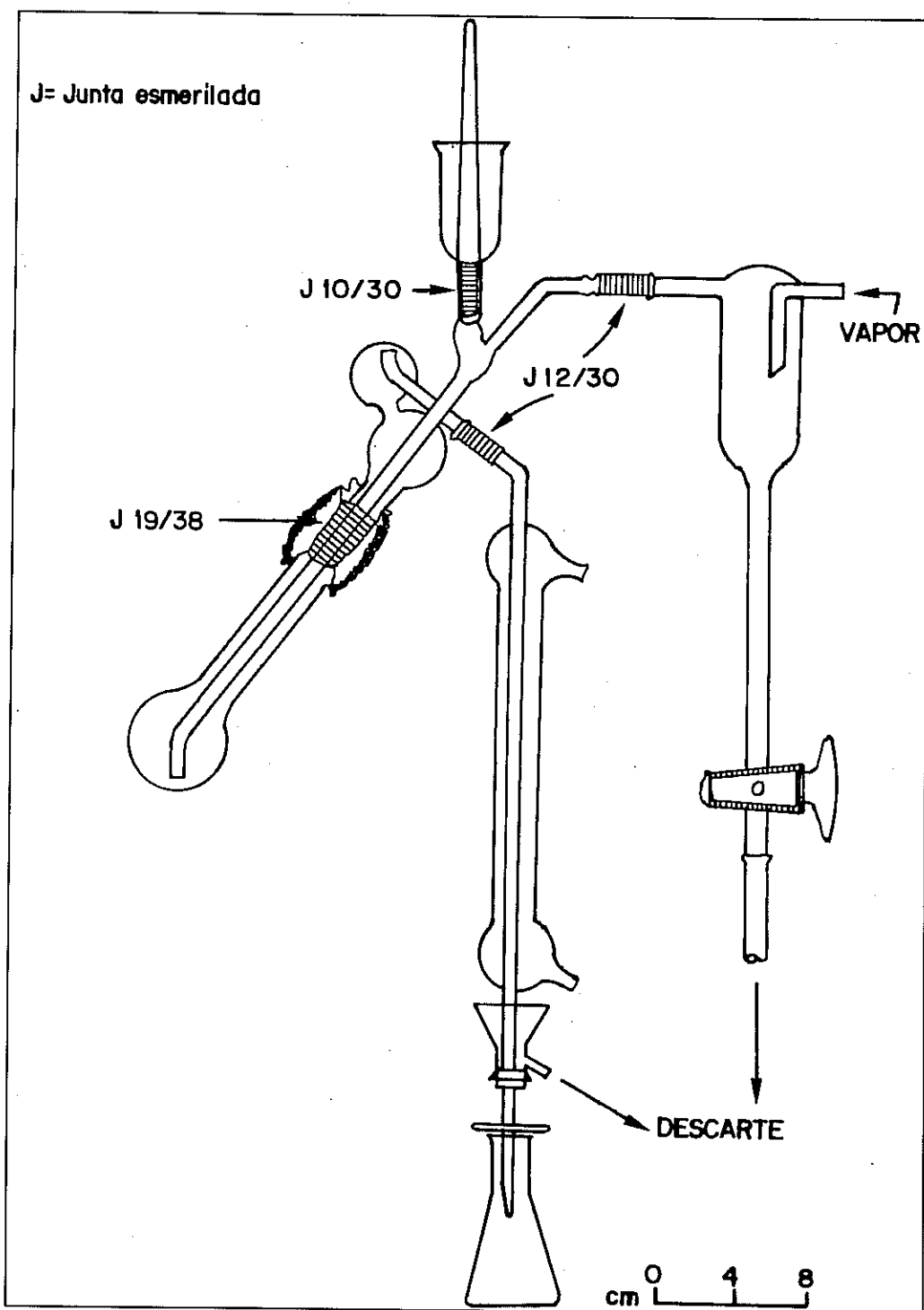


FIGURA 23.1. Esquema de montagem do sistema de destilação a vapor para análise de nitrogênio.

Comentários

- a. a utilização de tituladores automáticos com leitura digital é conveniente nestas titulações, pois diminui os erros de operação. Os destiladores/tituladores automáticos [como os da Tecator (Kjeltec 1030)-Suécia, ou Gerhardt (Vapodest 5 ou 6)-Alemanha], também são muito úteis, podendo-se destilar de 25 a 30 amostras por hora.
- b. além da técnica de destilação a vapor para a quantificação da amônia no material digerido, existem outras alternativas, como as que usam um eletrodo específico para a amônia (Bremner & Tabatabai, 1972) e as técnicas colorimétricas. Em ambos os casos, o material digerido é diluído até exatamente 50 ou 100 mL e a concentração de NH_3 na solução é determinada sem a necessidade da destilação. No caso das técnicas colorimétricas, pode-se utilizar um analisador automático (por exemplo, Technicon Instruments Corp., USA) conforme descrito por Henzell et al. (1968) ou Schuman et al. (1973) ou, ainda, pela técnica de fluxo contínuo ("Flow Injection Analysis" - FIA), conforme descrito por Alves et al. (1993) com algumas modificações (B.J.R. Alves & E. Ferreira, em preparação). Esta última técnica é rápida (até 60 amostras por hora) e utiliza equipamento disponível no mercado nacional.

23.2.2.2. Inclusão de nitrato e nitrito

Caso as amostras do solo contenham nitrato ou nitrito, a digestão descrita acima incluirá somente uma fração (variável, dependendo do solo) deste nitrogênio. Normalmente, a fração do N total na forma de NO_3^- ou NO_2^- é muito pequena e, por isso, a não inclusão destas formas de N não resulta em erros significativos. Caso haja a necessidade de se incluir 100 % destas formas de N (exemplo, no caso de um solo recentemente adubado com fertilizante nitrogenado ou adubo verde), existem várias técnicas para incluir todo o nitrato e nitrito: 1- adição, antes da digestão, de ácido salicílico dissolvido em ácido sulfúrico e os nitrocomplexos formados pela reação de NO_3^- com o salicilato são reduzidos a complexos aminos por tiosulfato, para a subsequente redução a amônia, pela digestão com ácido sulfúrico (Bremner, 1965a; Bremner & Mulvaney, 1982); 2- a oxidação de NO_2^- para NO_3^- por permanganato de potássio, seguida pela redução de nitrato por ferro reduzido (Goh, 1972; Bremner & Mulvaney, 1982); ou 3- a redução de NO_2^- e NO_3^- por liga de Devarda (50% Cu; 45 % Al; 5% Zn) (Liao, 1981), ou por zinco na presença de cobre (Goyal & Hafez, 1990). Alguns testes da técnica (1), de ácido salicílico, indicaram menos de 100 % da recuperação de NO_2^- e NO_3^- , especialmente em amostras de material vegetal (Goh, 1972; Boddey et al., 1987; Goyal & Hafez, 1990). A técnica (2), de permanganato/redução com ferro, às vezes produz um resíduo sólido nos tubos de digestão que é difícil de se retirar para transferência aos frascos de destilação. A técnica (3), que utiliza zinco/cobre, é mais complicada do que a técnica de liga de Devarda (Liao, 1981), e esta última já foi testada, com êxito, para amostras de solo (Loureiro, 1985) e de material vegetal (Boddey et al., 1987) e, por isso, é recomendada aqui.

Reagentes

- a. liga de Devarda;
- b. ácido sulfúrico, 3 M;
- c. para completar o procedimento de análise de N total, são necessários os reagentes listados na seção 23.2.2.

Procedimento

A preparação das amostras é feita conforme o procedimento da seção 23.2.2.

Colocar a amostra de solo no tubo de digestão com 0,2 g de liga de Devarda e adicionar 6 mL de ácido sulfúrico 3 M. Quando os tubos estiverem no bloco digestor, elevar a temperatura a 100° a 150°C, até a solução iniciar a fervura. Após 30 minutos, retirar os tubos, deixar esfriar e adicionar 1,1 g da mistura catalisadora e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Continuar com o procedimento descrito na seção 23.2.2.

23.3. N Total em Material Vegetal

As técnicas disponíveis para a quantificação de N total em material vegetal são as mesmas descritas para a análise do solo.

23.3.1. Técnica da Combustão em Alta Temperatura (Dumas)

A utilização de instrumentos automáticos, para análise de N total pelo método de Dumas, facilitam estas análises, pois a concentração de N em tecidos vegetais é, normalmente, bem maior do que em solos. O único problema é o tamanho da amostra utilizada, que em geral restringe-se a 5 mg a 25 mg, menor do que a utilizada para a análise de solo, pois a densidade do material vegetal é menor. Para ter uma amostra representativa é essencial moê-la até, pelo menos, 60 mesh e, preferencialmente, a menos de 100 mesh.

23.3.2. Técnica de Digestão Úmida (Kjeldahl)

Os reagentes, equipamento e procedimento para análise de N total em material vegetal são os mesmos daqueles utilizados na análise de solo. As únicas diferenças são o tamanho das amostras utilizadas e a duração da digestão. Para material com menos de 1 % de N total, recomenda-se a utilização de 200 mg de amostra, e para materiais mais ricos em N, 100 mg ou menos. A digestão prossegue a, aproximadamente, 300° C, conforme o procedimento para solo, até que a solução no tubo fique verde-clara e, depois, continuar por mais uma hora.

Comentários

Recentemente, Simonne et al. (1994) sugeriram que a técnica de Kjeldahl não consegue digerir ácidos nucleicos. A mistura catalisadora utilizada por estes autores foi diferente daquela recomendada

anteriormente (Bremner, 1965a; Bremner & Mulvaney, 1982) e, estes últimos autores, mostraram 100 % de recuperação do N em compostos semelhantes com uma estrutura cíclica como triptofano. Resultados de experimentos feitos no Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (CNPAB), também mostraram a recuperação total de N-triptofano (Boddey et al., 1987) e, por isso, acredita-se na eficácia da técnica recomendada. Neste mesmo trabalho, mostra-se a recuperação total de N na forma de NO_2^- ou NO_3^- utilizando a técnica de Liao (1981), com a pré-redução destas formas de N, utilizando liga de Devarda conforme o procedimento descrito na seção 23.2.2.1.

23.4. Nitrogênio Mineral

No caso de plantas, a forma mineral do nitrogênio que estas podem armazenar, em quantidades significativas, é a nítrica. As demais formas, amônio e nitrito, são tóxicas e, por isso, não se acumulam nos tecidos. O nitrato, segundo Peoples et al. (1989), pode ser quantitativamente extraído com água em ebulição, recomendando o método colorimétrico de Cataldo et al. (1975) para a sua determinação.

A quantificação das formas minerais de N no solo tem sido feita a partir da extração em solução de KCl 2 M. A metodologia de quantificação se dá por um processo de destilação a vapor e posterior titulometria, que foi considerada padrão para a análise de solos pela Sociedade Internacional de Ciência do Solo, por sofrer interferências mínimas de substâncias orgânicas e por ser aplicável a qualquer tipo de solo (Keeney & Nelson, 1982). Segundo esta metodologia, a destilação do extrato do solo em KCl 2 M na presença de MgO, faz com que somente o NH_4^+ trocável seja extraído em ambiente alcalino junto ao vapor d'água (na forma de NH_3) que, uma vez condensado, é coletado em solução de H_3BO_3 /indicador. A análise do NO_3^- é feita em seguida, com adição de liga de Devarda (que reduz NO_3^- a NH_4^+), na mesma amostra. Através da titulação do coletado com H_2SO_4 padronizado, tem-se as quantidades das formas minerais. Para solos pobres em N ($< 1 \mu\text{g N/g}$), é necessário que maior quantidade de solo seja utilizada, o que exige mais tempo em cada determinação. O problema no aumento do tempo de destilação ($> 5 \text{ min}$) está na interferência das substâncias orgânicas, que se podem hidrolisar e liberar NH_4^+ , superestimando os resultados (Keeney & Nelson, 1982).

Os métodos colorimétricos para a determinação das formas minerais de nitrogênio têm sido bastante usados em estudos com águas naturais, águas residuais e em extratos de planta e solo. A vantagem do uso dos métodos colorimétricos está na necessidade de pequenos volumes de extrato e, conseqüentemente, de amostra.

As metodologias colorimétricas, baseadas na reação de Berthollet, são as normalmente usadas na determinação de NH_4^+ em extratos de solo, devido à sua alta resolução e reprodutibilidade. A mais comum consiste, basicamente, na reação de uma amostra contendo NH_4^+ com um reagente à base de fenol e nitroprussiato de sódio, na presença de íons Cl^- , em solução com alto pH, o que resulta no desenvolvimento de cor azul. Este método, conhecido como método do indofenol, pode ser aplicado diretamente em determinações de NH_4^+ em extratos de solo com KCl (Dorich & Nelson, 1983). A

metodologia de Kempers & Zweers (1986), onde o fenol é substituído por salicilato de sódio, mostrou bons resultados na determinação de NH_4^+ em extratos de solo. O uso do salicilato reduz bastante o trabalho com compostos tóxicos e, ainda, parece ser superior ao método do indofenol (Alves et al., 1991).

A análise colorimétrica do NO_3^- , em grande parte dos métodos, é feita dosando-se o NO_2^- formado por ação de um redutor, através da reação de Griess/Ilosvay (Keeney & Nelson, 1982). Bremner (1965b) descreveu, em detalhe, um procedimento analítico, para análise de extratos de solo com KCl 2 M, em que a redução do NO_3^- é feita em uma coluna de cádmio cuperizado. Segundo este autor, este procedimento apresenta poucas interferências em comparação a outros que utilizam redutores como o sulfato de hidrazina e ácido fenoldissulfônico. Contudo, o procedimento manual é extremamente tedioso e demorado, sendo muito pouco utilizado. Um outro processo para a determinação do NO_3^- é o proposto por Cataldo et al. (1975), e recomendado para o "Tropical Soil Biology Program" (Anderson & Ingram, 1989). A determinação do NO_3^- é baseada na cor formada pela complexação com o ácido salicílico. Por ser uma metodologia bastante prática e pouco sujeita a interferências, é utilizada em análises de planta. Para análise de solo, embora recomendada por Anderson & Ingram (1989), pouco se pode afirmar quanto a sua eficiência.

Com o objetivo de aumentar a velocidade nas determinações de diversos elementos, Ruzicka & Hansen (1975), desenvolveram um sistema de análise em fluxo contínuo (FIA) que possibilita a adaptação dos métodos colorimétricos, o que resulta, além de maior velocidade, maiores eficiência e repetibilidade nas análises. Em análises de NO_3^- em extratos de solo com KCl 2 M, Giné et al. (1980) adaptaram o método descrito por Bremner (1965b), para FIA. Esta adaptação propiciou uma capacidade de análise de 80 a 100 amostras por hora com excelente repetibilidade e exatidão. Para a análise de NH_4^+ , Alves et al. (1993) adaptaram a metodologia descrita em Kempers & Zweers (1986), conseguindo resultados semelhantes ao da adaptação para o NO_3^- . Outras metodologias para determinação da fração mineral do nitrogênio, como o método condutimétrico (Coelho et al., 1992) com baixo consumo de reagentes, são propostas na literatura.

23.4.1. Determinação por Destilação a Vapor

O esquema de montagem do equipamento utilizado está demonstrado na Figura 23.1. É composto por uma manta aquecedora com balão de fundo redondo, um condensador, um balão para amostra com capacidade para 500 mL, todos conectados a um corpo de vidro central, conforme mostra o esquema.

Material

- a. erlenmeyers de 250 mL;
- b. medida de aproximadamente 200 mg para MgO e outra de 300 mg para a liga de Devarda.

Reagentes

- solução de cloreto de potássio 2 M - pesar 149 g de KCl em frasco com volume de 1 litro e completar o volume com água destilada;
- óxido de magnésio calcinado - aquecer uma quantidade de MgO suficiente para a análise em mufla a 600° C por 6 horas;
- liga de Devarda (ref. 14903 Riedel-deHaën);
- solução de ácido bórico a 2 % (conforme descrito na seção 23.2.2.);
- ácido sulfúrico 0,005N, padronizado - pipetar 5 mL de uma solução de H₂SO₄ 1 N (29 mL de ácido concentrado em 1 litro de solução) em balão volumétrico de 1 litro. Padronizar titulando-se contra 2mL de THAM em 10 mL da solução de ácido bórico.

Procedimento

Colocar 30 g de solo com umidade conhecida, peneirado a 2mm, em um erlenmeyer de 250 mL. Adicionar 150 mL da solução de KCl 2 M e levar à agitação (210 rpm) por 1 hora. Filtrar ou centrifugar a 10.000 rpm. Excepcionalmente, pode-se deixar decantar por uma noite, embora ainda seja necessária melhor avaliação dos efeitos deste procedimento sobre os resultados.

Para a análise, retirar uma alíquota de 100 mL do extrato e colocá-la no balão de amostra. Adicionar, através da medida, 200 mg de MgO calcinado para a extração da fração amoniacal. Coletar o condensado em outro erlenmeyer de 250 mL, contendo 10 mL da solução de ácido bórico. Após a coleta de, aproximadamente, 75 mL do condensado (aproximadamente, 5 min de destilação), retirar o balão da amostra e adicionar 300 mg da Liga de Devarda trocando, também, o erlenmeyer que coleta o condensado. A Liga de Devarda reduz o NO₃⁻ a NH₄⁺, que será coletado no outro erlenmeyer contendo ácido bórico. Para quantificação das frações minerais, titula-se o coletado em ácido bórico contra ácido sulfúrico 0,005 N padronizado.

Cálculos

Volume (V) de ácido gasto na titulação (mL) x Normalidade do ácido (N_A) = meq (miliequivalente) de ácido gasto na titulação.

Como as substâncias reagem equivalente a equivalente, meq de ácido gasto = meq da forma de N mineral titulada, logo:

$$\text{mg de N-(NH}_4^+ \text{ ou NO}_3^-) = \text{equivalente-miligrama do N (14,007) x meq de ácido gasto, ou} \\ \text{N-NH}_4^+ \text{ ou N-NO}_3^- \text{ (mg) = 14,007 x N}_A \text{ x V} \quad (1)$$

Para se obter a concentração de N-mineral no extrato, basta dividir o resultado obtido em (1) pelo volume da alíquota (V_A), ou:

$$\text{N-NH}_4^+ \text{ ou N-NO}_3^- \text{ (mg/mL) = (14,007 x N}_A \text{ x V) / V}_A \quad (2)$$

Contudo, o objetivo principal na análise do solo é saber o teor de N no solo. Para isto, basta multiplicar a equação (2) pelo volume total de extrator utilizado na extração (V_T) e dividir o resultado pelo peso do solo seco (P) em kg (obtendo-se mg N/kg de solo), ou:

$$N\text{-NH}_4^+ \text{ ou } N\text{-NO}_3^- = (14,007 \times N_A \times V) \times V_T / (V_A \times P) \quad (3)$$

23.4.2. Determinação Colorimétrica

Os métodos colorimétricos existentes são muito úteis em análises de amostras com quantidades mínimas de N. Na análise de NO_3^- em plantas, a metodologia de Cataldo et al. (1975) é a mais utilizada, e será descrita mais adiante. Para a análise de solos, a determinação de NH_4^+ pela metodologia que usa salicilato na reação de Bertholet e a determinação de NO_3^- , usando cádmio como redutor, são as mais indicadas. A adaptação ao FIA permite aumentar a velocidade de análise (35 amostras por hora), com sensibilidade e precisão.

Um sistema FIA pode ser construído com equipamentos comumente encontrados em laboratórios que analisam solo rotineiramente, sendo somente necessária a aquisição de um injetor-comutador de amostra (até o presente momento, a única fornecedora no Brasil é a Micronal S.A., São Paulo) para completar o sistema.

23.4.2.1. Nitrato em plantas

23.4.2.1.1. Extração alcoólica em material fresco (Fernandes, 1983)

Material

- a. triturador (liquidificador)
- b. gaze
- c. funil de separação.

Reagentes

- a. clorofórmio
- b. etanol 80 %.

Procedimento

Juntar 1 g de tecido de planta a 20 mL de etanol a 80 %. Colocar a amostra com etanol no triturador por 3 minutos. Filtrar o material em quatro camadas de gaze e recolher o filtrado. Ressuspender o resíduo da gaze em 20 mL de etanol. Filtrar novamente. Juntar os extratos obtidos e passar por papel de filtro (após evaporação do etanol, secar o resíduo em estufa a 60° C por 48 horas). Transferir o extrato para funil de separação e adicionar 40 mL de clorofórmio. Agitar suavemente e deixar em repouso por 40 min, até a separação completa das fases polar e apolar. Descartar a fase apolar (é a fase

colorida que fica na parte inferior) e completar a fase polar com etanol 80 % até um volume de 50 mL. Guardar em geladeira até que se faça a determinação de nitrato.

23.4.2.1.2. Extração de material seco (Peoples et al., 1989)

Procedimento

Pesar 500 mg de amostra seca em estufa a 70° C e moída a 60 mesh (peneira de 1,0 mm) e colocá-la em erlenmeyer de 125mL. Adicionar 25mL de água destilada e ferver por 1 a 2 min. Filtrar enquanto quente (Whatmann nº. 40) para um balão volumétrico de 50 mL. Deixar esfriar e completar o volume com água destilada.

23.4.2.1.3. Determinação de nitrato

Reagentes

- hidróxido de sódio, 2 M - dissolver 40 g para 1 litro de solução;
- ácido salicílico a 5% em ácido sulfúrico - dissolver 5 g de ácido salicílico em 95 mL de ácido sulfúrico concentrado (solução estável por 7 dias);
- padrões: secar a 105° C cerca de 10 g de nitrato de potássio por duas horas. Esfriar em dessecador. Dissolver 7,223 g do KNO_3 seco em água e completar o volume a 1 litro em balão volumétrico. Esta é uma solução-estoque 1000 ppm de N-NO_3^- . Pipetar 25 mL desta solução em balão volumétrico de 500 mL e completar o volume com água destilada. Esta é uma solução 50 ppm N-NO_3^- . Pipetar 0, 2, 4, 6, 8 e 10 mL da solução de 50 ppm em balões volumétricos de 50 mL e completar com água destilada. Têm-se os padrões de trabalho de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 ppm de N-NO_3^- .

Procedimento

Pipetar 0,3 mL do extrato e colocá-lo em um frasco contendo 0,8 mL da solução de ácido salicílico a 5% em ácido sulfúrico. Agitar bem com as mãos e deixar por 30 min em descanso. Adicionar 19,0 mL da solução de hidróxido de sódio para deixar o pH em torno de 12 e misturar bem. Deixar 1 hora em descanso para o desenvolvimento da cor. A cor é estável por 12 horas. Ler os padrões e amostras em absorvância de 410 nm.

Cálculos

Fazer uma regressão dos valores de absorvância obtidos em cada padrão com suas respectivas concentrações. Com a função obtida calcular, a partir das absorvâncias obtidas, a concentração das amostras. A concentração obtida está relacionada ao volume de 1 mL. Deve-se multiplicar a concentração pelo volume total do extrator da amostra e dividir pelo peso da amostra. Dessa forma, tem-se a concentração de N-NO_3^- por unidade de massa da amostra seca.

23.4.2.2. Determinação colorimétrica do amônio através do FIA (Alves et al., 1993)

O esquema de montagem do sistema para amônio está na Figura 23.2.

Material

- a. comutador-injetor de amostra (Micronal S.A., São Paulo);
- b. bomba peristáltica de seis canais;
- c. espectrofotômetro para região do visível;
- d. banho-maria (de preferência, com sensibilidade, de pelo menos, 1°C);
- e. registrador (opcional);
- f. tygons para bomba peristáltica (vazões de 2,75; 3,23; 2,01; 0,58 e 1,06 mL/min);
- g. capilares de polietileno com 0,7 mm de diâmetro.

Reagentes

- a. tampão - pesar 90 g de citrato de sódio e 40 g de hidróxido de sódio em um volume final de 1 litro com água destilada;
- b. salicilato/nitroprussiato - pesar 200 g de salicilato de sódio e 800 mg de nitroprussiato de sódio em um volume final de 1 litro com água destilada;
- c. hipoclorito de sódio a 5% ou água sanitária comercial;
- d. carreador KCl, 2 M - pesar 149 g de KCl em 500 mL de água destilada. Dissolver e completar o volume para 1 litro;
- e. padrões em KCl, 2 M - dissolver 4,714 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em água e completar o volume a 1 litro em balão volumétrico. Esta é uma solução estoque 1000 ppm de N-NH_4^+ . Pipetar 10 mL desta solução em balão volumétrico de 1 litro e completar o volume com KCl, 2 M. Esta é uma solução 10 ppm N-NH_4^+ . Pipetar 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 20 mL da solução de 10 ppm em balões volumétricos de 100 mL e completar com KCl, 2 M. Têm-se os padrões de trabalho de 0, 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 1,0 e 2,0 ppm de N-NH_4^+ .

Procedimento

A extração da fração mineral do N é feita conforme descrito na seção 23.4.1. A conexão da bomba com o comutador e espectrofotômetro é feita com os capilares, por onde fluem os reagentes e a amostra. Os frascos, contendo os reagentes, são posicionados de forma que os capilares ligados aos tygons possam ficar imersos nestes. No reagente tampão (citrato de sódio), deve estar imerso o capilar do tygon de vazão 0,58 mL/min. No reagente salicilato/nitroprussiato, o do tygon de vazão 2,01 mL/min. Na solução de hipoclorito a 5%, o do tygon de vazão 1,06 mL/min. No carreador KCl 2 M, o do tygon de vazão 3,23 mL/min e, na amostra, o tygon de vazão 2,75 mL/min. No trajeto (ver Figura 23.2) entre o comutador-injetor de amostras e o espectrofotômetro, encontra-se um banho-maria contendo duas bobinas, de 1 m cada, por onde o fluxo passa para permitir o desenvolvimento satisfatório da cor, lida a 647 nm no espectrofotômetro.

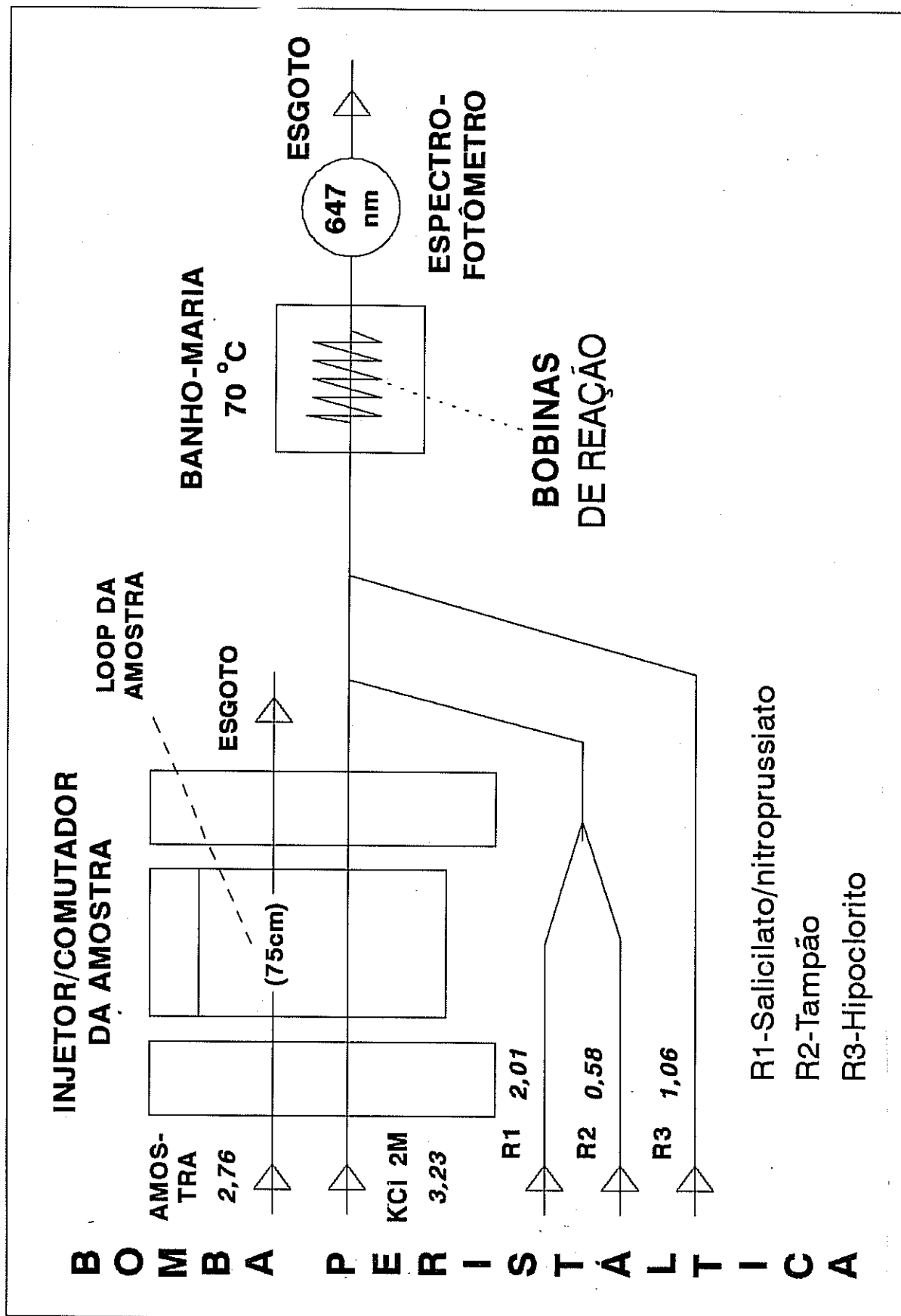


FIGURA 23.2. Esquema de montagem do sistema de fluxo contínuo (FIA) para análise de amônio em extratos de solo com KCl 2 M, de acordo com Alves et al. (1993).

Ligada a bomba peristáltica, os reagentes são colocados em fluxo juntamente a um carreador, que faz papel do branco nas análises (ver Figura 23.2). Uma vez zerada a absorvância no espectrofotômetro, inicia-se a análise. Inicialmente, a amostra não entra em fluxo com os reagentes. Primeiro esta passa em um “loop”, que nada mais é do que um capilar com comprimento de 75 cm, e que define sempre um mesmo volume para a amostra. Uma vez observado que o “loop” está completo com a amostra, posiciona-se a alavanca do injetor-comutador de forma a colocar o “loop” no fluxo do carreador. Após cerca de 15 s, pode-se fazer a leitura da absorvância.

O cálculo é o mesmo mostrado na seção 23.4.2.1.3.

23.4.2.3. Determinação colorimétrica do nitrato através do FIA

O esquema de montagem do sistema está na Figura 23.3.

Material

- a. o mesmo usado no FIA amônio, exceto o banho-maria, que é dispensado neste procedimento.
- b. os tygons necessários devem produzir vazões de 1,08; 0,58; 5,06; e 2,76 mL/min.

Reagentes

- a. cloreto de amônio - dissolver 100 g de NH_4Cl , 20 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ e 1 g EDTA-Na em água destilada para um volume final de 1 litro;
- b. sulfanilamida/N-naftil - dissolver 20 g de sulfanilamida, 1 g de N-naftil-etileno-diamônio-dicloreto e 100 mL de H_3PO_4 a 85 % em água destilada para um volume final de 1 litro;
- c. coluna de cádmio - tubo de vidro com 2 mm de diâmetro e 5 cm de comprimento preenchido com Cd a 60 mesh. Em cada extremidade coloca-se lã de vidro para reter o Cd;
- d. ácido clorídrico, 0,1 M;
- e. solução de sulfato de cobre, 0,1 M;
- f. padrões em KCl, 2 M: secar a 105° C cerca de 10 g de nitrato de potássio por 2 horas. Esfriar em dessecador. Dissolver 7,223 g de KNO_3 seco em água e completar o volume a 1 litro em balão volumétrico. Esta é uma solução estoque 1000 ppm de N-NO_3^- . Pipetar 10 mL desta solução em balão volumétrico de 1 litro e completar o volume com KCl 2M. Esta é uma solução 10 ppm N-NO_3^- . Pipetar 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 20 mL da solução de 10 ppm em balões volumétricos de 100 mL e completar com KCl 2 M. Têm-se os padrões de trabalho de 0, 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 1,0 e 2,0 ppm de N-NO_3^- .

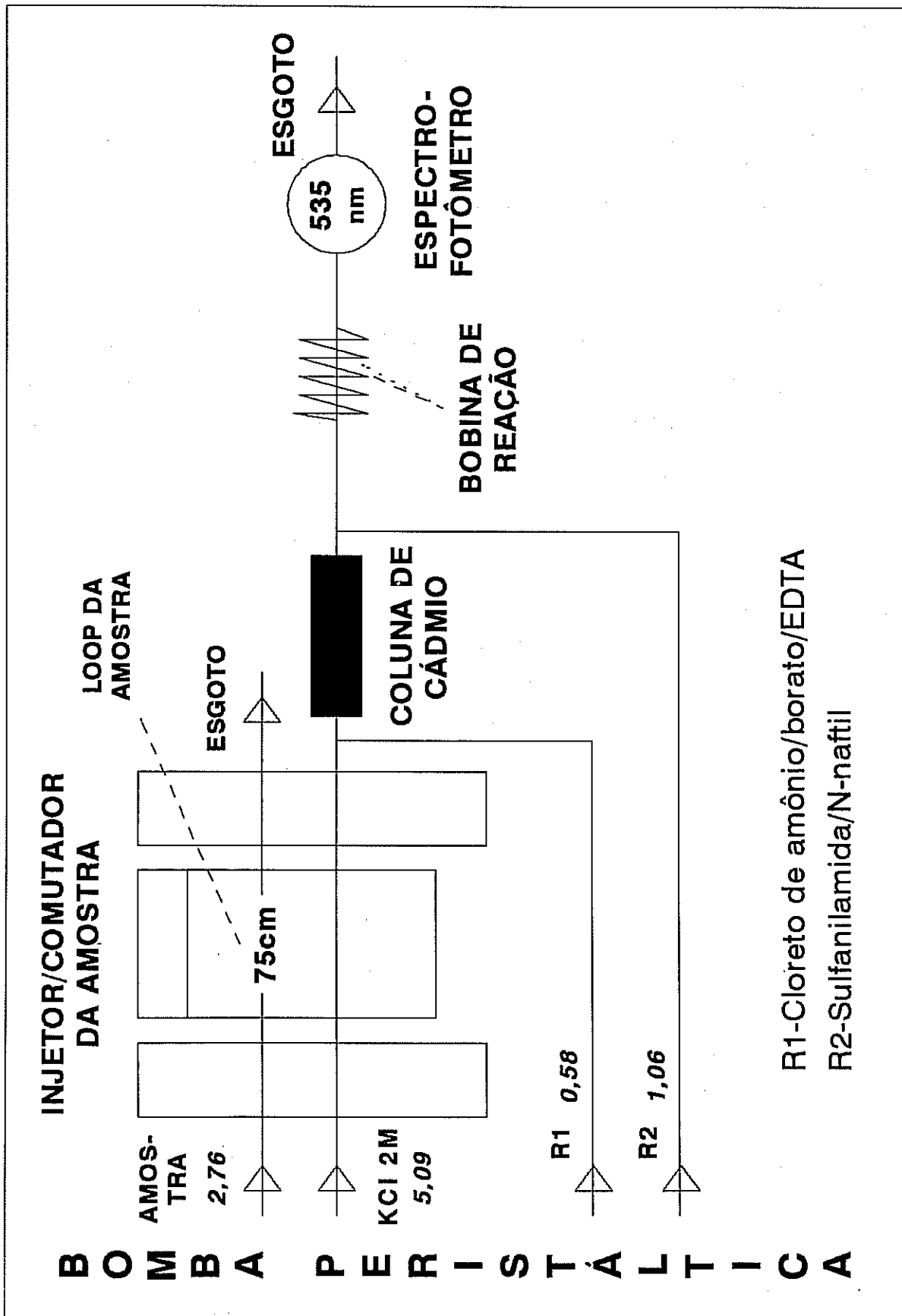


FIGURA. 23.3. Esquema de montagem do

Procedimento

A extração da fração mineral do N é feita conforme descrito na seção 23.4.1. A coluna de Cd deve ser cuperizada. Para isso, usando um dos canais da bomba peristáltica, faz-se fluir, pela coluna, água destilada por 1 min para umedecimento. Depois flui-se o ácido clorídrico, 0,1 M, por 2 min, em seguida, água destilada por 2 min, sulfato de cobre, 0,1 M, por 3 min e, finalmente, água destilada por 3 min para retirar todo o resíduo deste processo. A conexão da bomba com o comutador e espectrofotômetro é feita com os capilares, por onde fluem os reagentes e a amostra. Os frascos contendo os reagentes são posicionados de forma que os capilares ligados aos tygons possam ficar imersos nestes. No reagente cloreto de amônio deve estar imerso o capilar do tygon de vazão 0,58 mL/min. No reagente sulfanilamida/N-naftil, o do tygon de vazão 1,08 mL/min. No carreador KCl, 2 M, o do tygon de vazão 5,06 mL/min, e, na amostra, o tygon de vazão 2,76 mL/min. No trajeto (ver Figura 23.3), antes do fluxo receber o reagente N-naftil/sulfanilamida, encontra-se a coluna de Cd cuperizada. Antes do espectrofotômetro, o fluxo passa por uma bobina de 1 m, para permitir o desenvolvimento satisfatório da cor, lida a 535 nm. Ligada a bomba peristáltica, os reagentes são colocados em fluxo juntamente a um carreador, que faz papel do branco nas análises (ver Figura 23.3). Uma vez zerada a absorbância no espectrofotômetro, começa-se a análise. Inicialmente, a amostra não entra em fluxo com os reagentes. Primeiro, esta passa em um "loop", ou seja, um capilar com comprimento de 75 cm, que define sempre um mesmo volume para a amostra. Uma vez observado que o "loop" está completo com a amostra, posiciona-se a alavanca do injetor-comutador de forma a colocar o "loop" no fluxo do carreador. Após cerca de 15 s, pode-se fazer a leitura da absorbância.

O cálculo é o mesmo mostrado na seção 23.4.2.1.3.

Comentários

Em ambos os procedimentos para FIA, a faixa de padrões pode ser alterada no caso de amostras mais concentradas. O sistema deve ser modificado também. No caso da análise de N-amônio, deve-se, inicialmente, reduzir a temperatura do banho-maria e, se não for suficiente, pode-se diminuir o comprimento do "loop" da amostra. Esta redução do "loop" deve ser feita para a análise do FIA-nitrato, se necessário. Os tygons devem ter diâmetros compatíveis com a velocidade da bomba peristáltica em uso, de forma a produzir as vazões mencionadas.

23.5. N Potencialmente Mineralizável

Na área de fertilidade do solo, o N é um dos macronutrientes mais estudados, sendo, certamente, um dos elementos cuja disponibilidade para as plantas é, na maioria dos casos, imprevisível através da análise rotineira.

Adotou-se, então, o conceito de N potencialmente mineralizável, que é a fração do compartimento do total de N orgânico que, em condições de temperatura e umidade otimizadas, pode ser

mineralizada pelos microrganismos do solo (Stanford & Smith, 1972). Este compartimento pode ser determinado através da incubação do solo, nas condições ótimas para a máxima atividade microbiológica, por um determinado intervalo de tempo.

Inúmeras metodologias, de base biológica, foram propostas nas últimas décadas (Stanford, 1982) e resultados positivos e negativos puderam ser observados. A referência para a metodologia era a produção de uma certa cultura que crescia no solo em estudo e na qual os resultados negativos poderiam ser oriundos de fatores de ordem climática que afetaram o crescimento da planta. Binkley & Hart (1989) defendem este ponto de vista e sugerem que metodologias de avaliação *in situ* (Raison et al., 1987, por exemplo) deveriam servir de controle para os métodos de laboratório nestes estudos. Assim, pelo menos o efeito do ambiente sobre a planta seria eliminado.

A obtenção de um método químico que forneça um índice de disponibilidade de N é bastante desejável, pois as análises químicas são, normalmente, mais rápidas e mais precisas do que os procedimentos utilizados nos métodos biológicos. Procedimentos químicos, para avaliar o N orgânico do solo, variam desde aqueles envolvendo uma extração relativamente moderada, como fervura em água (Keeney & Bremner, 1966) ou fervura em CaCl_2 0,01 M (Stanford, 1968), até os que utilizam oxidantes fortes, como a extração ácida com permanganato de potássio (Stanford & Smith, 1978), ou a extração com dicromato de potássio a 100° C (Nomnik, 1976). Entre estes extremos, inúmeros métodos propõem variações em temperatura, extratores e tempo de extração. Entre os diversos métodos químicos, alguns têm mostrado certa consistência nas suas estimativas quando comparados com resultados de métodos biológicos (Stanford, 1982). Contudo, o problema relacionado aos métodos biológicos está intrínseco.

O uso de modelos matemáticos para simular efeitos climáticos *in situ*, aliado aos resultados dos métodos de determinação do N potencialmente mineralizável, podem ser uma solução para a previsão da disponibilidade de N para as plantas.

A seguir, são descritos um método biológico (Waring & Bremner, 1964), modificado por Keeney (1967) e recomendado por Stanford (1982), e um método químico (Gianello & Bremner, 1988), que se correlacionam muito bem com o método anterior.

23.5.1. Método Biológico (incubação anaeróbica)

Material

Destilador (Figura 23.1, descrito na seção 23.2.2).

Reagentes

- a. óxido de magnésio calcinado (seção 23.4.1);
- b. cloreto de potássio, 4 M - dissolver 298 g de KCl em um volume final de 1 litro de solução.

Procedimento

Pesar 10 g de solo seco ao ar e peneirado a 2 mm e colocá-lo em um frasco de forma que adicionando-se uma quantidade de água conhecida, obtenha-se uma lâmina d'água de 2 cm. Tampar com filme plástico para reduzir a perda de água. Incubar por uma semana a 40° C. Após o período de incubação, adicionar um volume de solução de KCl, 4 M, igual ao volume usado de água para fazer a lâmina d'água. Agitar por uma hora. Fazer a determinação do N-NH₄⁺ formado, conforme seção 23.4.

Comentários

Neste processo, assume-se que o solo seco ao ar possui quantidades mínimas de amônio, sendo desnecessária a determinação do tempo zero. Como se trata de uma incubação anaeróbia, só existirá amônio no extrato, o que dispensa a determinação do nitrato. Contudo, se julgar-se necessária a determinação de tempo zero de amônio e nitrato, como no caso de solos ácidos que tenham recebido recentemente resíduos vegetais, prossiga conforme a seção 23.4.

23.5.2. Método Químico

Material

Destilador (Figura 23.1, descrito na seção 23.2.2)

Reagentes

- tampão fosfato borato - Pesar 200 g de Na₃PO₄.12H₂O e 50 g de Na₂B₄O₇.10H₂O. Dissolvê-los em, aproximadamente, 1800 mL de água destilada em um balão volumétrico de 2 L. Ajustar o pH da solução para 11,2 com adição de H₃PO₄. Complete o volume para 2 L e guarde em frasco fechado.
- solução ácido bórico/indicadora - preparar conforme seção 23.2.2.
- solução padrão de ácido sulfúrico 0,005N - preparar conforme seção 23.4.1.

Procedimento

Colocar 4 g de amostra de solo em um balão de destilação de 200 mL e adicionar 40 mL da solução tampão fosfato borato. Iniciar a destilação coletando o condensado e, em seguida, determinar o N destilado por titulometria, conforme descrito na seção 23.4. Determinar a quantidade de N-NH₄⁺, inicialmente presente numa amostra de 4 g, conforme descrito na seção 23.4. A diferença corresponde ao N mineralizável.

Comentários

Os resultados obtidos com este método, em 33 solos brasileiros, mostraram alta correlação com os obtidos na incubação anaeróbia descrita anteriormente, para avaliar o N potencialmente mineralizável do solo.

23.6. Considerações Finais

O nitrogênio é, possivelmente, o elemento da biosfera que mais tem sido estudado. Para analisar seu teor em diferentes meios, vários métodos têm sido desenvolvidos. Os métodos mais difundidos estão baseados na digestão úmida, ou mais propriamente, no método Kjeldahl, proposto há mais de 100 anos, com algumas variações.

Neste trabalho, após análise crítica dos métodos atualmente em uso na análise de solo, planta e água ou extratos de solo, propõem-se aqueles que têm apresentado melhores resultados (precisão e exatidão), e que são de fácil adaptação nos laboratórios de análise de solos e plantas no Brasil.

Especial atenção é dada aos métodos de determinação colorimétrica de nitrato e amônio de extratos de solo, que pode também ser estendida a determinação de amônio de extratos provenientes da digestão de amostras de solo e planta, através da análise por fluxo contínuo. Este método de determinação, em relação ao método manual, além de ser mais sensível e preciso, economiza reagentes e aumenta a velocidade das determinações.

23.7. Referências Bibliográficas

- ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. A rapid and sensitive flow injection technique for the analysis of ammonium in soil extracts. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.**, v.24, p.277-284, 1993.
- ALVES, B.J.R.; SOUTO, C.M., FERREIRA, E.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Avaliação da sensibilidade de três métodos de determinação de $N-NH_4^+$ em extratos de KCl do solo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 23, 1991, Porto Alegre. **Resumos**. Porto Alegre: SBCS, 1991. p.190.
- ANDERSON, J.M.; INGRAM, J.S.I. **Tropical soil biology and fertility: a handbook of methods**. Wellingford: CAB International, 1989. 171p.
- BINKLEY, D.; HART, S.C. The components of nitrogen availability assessments in forest soils. **Adv. Soil Sci.**, v.10, p.57-112, 1989.
- BODDEY, R.M.; PEREIRA, J.A.R.; HUNGRIA, M.; THOMAS, R.J.; NEVES, M.C.P. Methods for the study of nitrogen assimilation and transport in grain legumes. **MIRCEN J.**, v.3, p.3-22, 1987.
- BREMNER, J.M. Inorganic forms of nitrogen. In: BLACK, C.A., ed. **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, 1965b. p.1179-1237.
- BREMNER, J.M. Total nitrogen. In: BLACK, C.A., ed. **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, 1965a. p.1149-1178.

- BREMNER, J.M.; MULVANEY, C.S. Nitrogen-total. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R., eds. **Methods of soil analysis: part 2, chemical and microbiological properties**. Madison: American Society of Agronomy-Soil Science Society of America, 1982. p.595-624.
- BREMNER, J.M.; SHAW, K. Denitrification in soil. I.Methods of investigation. **J. Agri. Sci.**, v.51, p.22-39, 1958.
- BREMNER, J.M.; TABATABAI, M.A. Use of ammonia electrode for determination of ammonium in Kjeldahl analysis of soils. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.**, v.3, p.159-165, 1972.
- CATALDO, D.A.; HAROON, M.; SCHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.**, v.6, p.71-80, 1975.
- COELHO, N.M.M.; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H. Determinação de amônio e nitrato em solos por injeção em fluxo, pelo método de difusão-condutividade. **R. bras. Ci. Solo**, v.16, p.325-329, 1992.
- DORICH, R.A.; NELSON, D.W. Direct colorimetric measurement of ammonium in potassium chloride extracts of soils. **Soil Sci. Soc. Amer. J.**, v.47, p.833-836, 1983.
- FERNANDES, M.S. N carriers, light and temperature influences on the free amino acid pool composition of rice plants. **Turrialba**, v.33, p.297-301, 1983.
- GIANELLO, C.; BREMNER, J.M. A rapid steam distillation method of assessing potentially available organic nitrogen in soil. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.**,v.19, p.1551-1568, 1988.
- GINÉ, M.F.; BERGAMIN Fo, F.H.; ZAGATTO, E.A.G.; REIS, B.F. Simultaneous determination of nitrate and nitrite by flow injection analysis. **Anal. Chem. Acta.**, v.114, p.191-197, 1980.
- GOH, K.M. Comparison and evaluation of methods for including nitrate in total nitrogen determination of soils. **J. Sci. Food. Agri.**, v.23, p.275-284, 1972.
- GOYAL, S.S.; HAFEZ, A.A. Quantitative reduction and inclusion of plant tissue nitrates in kjeldahl digestion. **Agron. J.**, v.82, p.571-576, 1990.
- HENZELL, E.F.; VALLIS,I.; LINDQUIST, J.E. Automatic colorimetric methods for the determination of nitrogen in digests and extracts of soils. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF SOIL SCIENCE, 9, 1968, Adelaide. **Proceedings**, v.3. Adelaide: ISSS, 1968. p.513-520.
- KEENEY, D.R.; BREMNER, J.M. Determination and isotope-ratio analysis of different forms of nitrogen in soils: 4. Exchangeable ammonium, nitrate, and nitrite by direct-distillation methods. **Soil Sci. Soc. Amer. Proc.**, v.30, p.583-587, 1966.

- KEENEY, D.R.; NELSON, D.W. Nitrogen - Inorganic forms. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. eds. **Methods of soil analysis, part 2: chemical and microbiological properties**. Madison: American Society of Agronomy-Soil Science Society of America, 1982. p.643-698.
- KEMPERS, A.J.; ZWEERS, A. Ammonium determination in soil extracts by the salicylate method. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.**, v.17, p.715-723, 1986.
- LIAO, C.F.H. Devarda's alloy method for total nitrogen determination. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.45, p.852-855, 1981.
- LOUREIRO, M.F. **Balanco de nitrogênio em gramíneas do gênero *Brachiaria***. Itaguaí: UFRRJ, 1985. (Tese de Mestrado).
- NOMMIK, H. Predicting the nitrogen-supplying power of acid forest soils from data on the release of CO₂ and NH₃ on partial oxidation. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.**, v.7, p.569-584, 1976.
- PEOPLES, M.B.; FAIZAH, A.W.; RERKASEM, B.; HERRIDGE, D.F. **Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field**. Canberra: ACIAR, 1989. 76p. (Monograph, 11).
- RAISON, R.J.; CONNELL, M.J.; KHANNA, P.K. Methodology for studying fluxes of soil mineral-N *In situ*. **Soil Biol. Biochem.**, v.19, p.521-530, 1987.
- RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. Flow injection Analysis. **Anal. Chem. Acta.**, v.78, p. 145-180, 1975.
- SCHUMAN, G.E.; STANLEY, M.A.; KNUDSEN, D. Automated total nitrogen analysis for soils and plant samples. **Soil Sci. Soc. Am. Proc.**, v.37, p.480-481, 1973.
- SIMONNE, E.H.; MILLS, H.A.; BENTON JONES JR., J.; SMITTLE, D.A.; HUSSEY, C.G. A comparison of analytical methods for nitrogen analysis in plant tissues. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.**, v.25, p.943-954, 1994.
- STANFORD, G. Assesment of soil nitrogen availabillity. In: STEVENSON, F.J., ed. **Nitrogen in agricultural soils**. Madison: ASA, 1982. p.651-687.
- STANFORD, G. Extractable organic nitrogen and nitrogen mineralization in soils. **Soil Sci.**, v.106, p.345-351, 1968.
- STANFORD, G.; SMITH, J. Estimating potentially mineralizable soi nitrogen from a chemical index of soil nitrogen availability. **Soil Sci.**, v.122, p.71-76, 1976.
- STANFORD, G.; SMITH, S.J. Oxidative release of potentially mineralizable soil nitrogen by acid permanganate extraction. **Soil Sci.**, v.126, p.210-218, 1978.
- WARING, S.A.; BREMNER, J.M. Ammonium production in soil under waterlogged conditions as an index of nitrogen availability. **Nature**, v.201, p.951-952, 1964.

QUANTIFICAÇÃO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO ASSOCIADA
A PLANTAS UTILIZANDO O ISÓTOPO ^{15}N

*Robert M. Boddey*¹

*Bruno J. R. Alves*²

*Segundo Urquiaga*¹

24.1. Introdução

Existem várias técnicas para avaliar a contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN) às plantas. A técnica da redução de acetileno baseia-se na atividade da enzima nitrogenase, responsável pela redução de N_2 a amônia e que também reduz acetileno a etileno. A técnica é rápida e simples de se aplicar e não utiliza equipamentos muito sofisticados. Contudo, apresenta alguns problemas, especialmente aqueles relacionados à perturbação física da planta na hora da avaliação, e é uma medida instantânea dessa atividade, pois não considera a incorporação de N fixado nos tecidos vegetais (Hardy et al., 1968; Witty & Minchin, 1988).

A técnica de análise da seiva (Herridge et al., 1988) também é rápida e simples de se aplicar e não utiliza equipamentos sofisticados. A técnica também é de avaliação instantânea, mas somente pode ser utilizada com um grupo restrito de leguminosas, principalmente aquelas que produzem ureídeos (alantoina e ácido alantóico) como produtos da FBN exportados dos nódulos (Peoples et al., 1989).

Em contraste com as técnicas de redução de acetileno e de análise da seiva, as técnicas baseadas na quantificação de N total das plantas (balanço de N total e a diferença de N total) apresentam estimativas integradas da contribuição da FBN à nutrição das plantas. No balanço de N total, o aumento do N total no sistema solo/planta é avaliado durante o crescimento da planta por análises de N do solo e do material vegetal (App et al., 1984; Boddey, 1987). Como o N total do solo normalmente é bem maior do que o da planta, o N derivado da FBN somente representa uma pequena fração do N total do sistema que, na maioria dos casos, fica abaixo da sensibilidade do método. Na técnica de diferença de N total, compara-se o N total acumulado pela planta “fixadora de N_2 ” com o N total acumulado por uma planta controle não fixadora (testemunha) e a diferença é considerada como o N derivado da FBN. Esta última técnica é simples de aplicar, mas como diferentes espécies ou cultivares de plantas podem absorver quantidades bastante diferentes de N do solo, os resultados podem ser poucos confiáveis.

¹ Pesquisadores, Ph.D., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (CNPAB), km 47 da antiga Rio-São Paulo, CEP 23851-970, Itaguaí, RJ.

² Engenheiro-agrônomo, M.Sc., curso de pós-graduação na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e EMBRAPA-CNPAB.

O nitrogênio possui somente dois isótopos estáveis de ocorrência natural, um de peso atômico 14 e outro de 15. No nitrogênio do ar, 99,6337 e 0,3663% dos átomos são de ^{14}N e ^{15}N , respectivamente (Junk & Svec, 1958). Uma planta fixadora de N_2 tem duas fontes principais de N, o N do solo e N o derivado do ar via FBN. Se uma destas fontes for enriquecida com o isótopo ^{15}N é possível quantificar a proporção de N na planta derivado da FBN através da análise do enriquecimento isotópico do ^{15}N da planta. O enriquecimento isotópico de ^{15}N , de uma amostra de N, pode ser estimado mediante o uso de um espectrômetro de massa de relação isotópica ou com um espectrômetro de emissão. A utilização destes instrumentos e os problemas envolvidos foram amplamente discutidos por vários autores (Bremner, 1965; Fieldler & Proksch, 1972; Martin et al., 1981; Hauck, 1982) e, por isso, não são considerados aqui. Recentemente, espectrômetros de massa foram acoplados a analisadores automáticos, facilitando as análises de nitrogênio através da utilização de um computador (Barrie et al., 1993).

Como o isótopo ^{15}N é estável (não radioativo) e de ocorrência natural, a utilização de materiais enriquecidos artificialmente com ^{15}N não apresenta nenhum risco para a saúde ou o meio ambiente. Por isso, estas técnicas podem ser aplicadas em casa de vegetação ou no campo aberto, sem a necessidade de grandes cuidados no manuseio e com os resíduos do material marcado. Este material, artificialmente enriquecido com ^{15}N , como o gás N_2 , os sais como sulfato de amônio ou nitrato de potássio e uréia, etc., pode ser comprado de vários fornecedores.

Nesta revisão, três técnicas de ^{15}N são descritas: 1) a técnica de $^{15}\text{N}_2$, em que o N_2 da atmosfera de um ambiente fechado onde cresce a planta é enriquecido com ^{15}N (seção 24.2); 2) a técnica de diluição isotópica de ^{15}N , em que o N do solo é enriquecido com ^{15}N (seção 24.3); e 3) a técnica de abundância natural de ^{15}N , que explora o fato de que a abundância natural do isótopo de ^{15}N no solo pode ser um pouco diferente daquela do ar (tipicamente até 0,004 átomos % ^{15}N) (seção 24.4).

24.2. A Técnica de $^{15}\text{N}_2$

O princípio da técnica é simples, basta crescer uma planta numa atmosfera fechada contendo N_2 enriquecido com ^{15}N . É necessário que o $^{15}\text{N}_2$ utilizado seja livre de outros compostos enriquecidos com ^{15}N , como amônia, e o enriquecimento do $^{15}\text{N}_2$ utilizado seja suficiente para promover um enriquecimento significativo de ^{15}N do N da planta, acima das variações de abundância natural mencionadas acima e discutidas na seção 24.4. O $^{15}\text{N}_2$ obtido do comércio é caro, difícil de transportar e, às vezes, se encontra contaminado com amônia (ou outros compostos) enriquecida com ^{15}N (Hurek et al., 1988). Entretanto, não é difícil produzir este gás no laboratório através da redução de amônia com cobre a 600°C (Bergersen, 1980), ou mais facilmente através da reação de uma solução de sulfato (ou cloreto) de amônio com hipobromito de sódio (Witty & Day, 1978; Ohyama & Kumazawa, 1981). A purificação do $^{15}\text{N}_2$ pode ser feita passando-se o gás produzido por um tubo imerso em nitrogênio líquido (-200°C) (De Polli et al., 1977) ou contendo soluções de KMnO_3 -KOH e ácido sulfúrico (Burriss, 1974; Ohyama & Kumazawa, 1981).

O maior problema com a utilização da técnica do gás marcado é a dificuldade de vedação da câmara de crescimento da planta, de tal forma que o $^{15}\text{N}_2$ não seja perdido e o N_2 do ar externo não entre e dilua o enriquecimento do $^{15}\text{N}_2$ interno. Outro problema é que, para que a planta cresça numa atmosfera similar às condições normais é necessário controlar as concentrações de CO_2 e O_2 na atmosfera, além da temperatura, umidade relativa e a intensidade e qualidade da luz. O problema mais sério é o controle de pCO_2 , pois a fotossíntese da planta é capaz de reduzir o nível de CO_2 na atmosfera a níveis próximos a zero, em somente alguns minutos, impedindo o crescimento da planta até o final da incubação.

Eskew et al. (1981) construíram uma câmara de crescimento para esta aplicação para quantificar a contribuição da FBN em arroz inundado, equipada com sofisticados sistemas de controle de CO_2 , O_2 , luz e temperatura. Ainda assim, houve algum vazamento de gases e, em consequência, o enriquecimento do $^{15}\text{N}_2$ da atmosfera da câmara diminuiu de 49 a 45 atom % ^{15}N em excesso durante quatro dias de incubação. Outros autores utilizaram câmaras mais simples e menores períodos de incubação, mas as condições, durante a incubação, certamente não representaram aquelas reinantes no campo (Ruschel et al., 1975; Yoshida & Yoneyama, 1980; Ito et al., 1980; Morris et al., 1985).

Portanto, é evidente que a aplicação desta técnica, no campo, ou ainda para mais de duas ou três plantas, é bastante difícil. Devido às dificuldades de manter o crescimento saudável das plantas nestas câmaras de incubação, nos experimentos relatados até agora, os períodos de exposição de plantas ao N_2 enriquecido foram somente de poucos dias. Dessa forma, a contribuição da FBN estimada por esta técnica, para todo um ciclo de crescimento, ainda é uma incógnita. A técnica tem grande utilidade na comprovação da existência de uma contribuição da FBN às plantas, quando existem dúvidas, como no caso das gramíneas. Ainda, a técnica é muito útil para investigar a distribuição do N fixado em plantas beneficiando-se de microrganismos fixadores de N_2 .

Pelo mencionado acima, a técnica do gás marcado é quase inútil para avaliar interações entre diferentes membros das simbioses (ex.: rizóbio, leguminosa hospedeira), ou efeitos do manejo ou fatores edafoclimáticos nas contribuições de FBN às leguminosas, especialmente em condições do campo. Nestas últimas aplicações destaca-se a técnica de diluição isotópica de ^{15}N que, se aplicada com cuidado, pode fornecer estimativas confiáveis das contribuições de FBN às plantas durante todo o ciclo de crescimento em condições do campo. Por isso, neste trabalho, maior atenção é dedicada a esta última técnica.

24.3. A Técnica de Diluição Isotópica de ^{15}N

24.3.1. Princípio Básico

Para aplicar a técnica de diluição isotópica de ^{15}N é necessário cultivar a planta “fixadora de N_2 ” num solo onde o N mineral disponível seja marcado com ^{15}N . Se o enriquecimento de ^{15}N , do N que a planta absorve do solo, é conhecido, seja através da análise do enriquecimento de ^{15}N do N mineral ou

mediante o uso de plantas-controle não fixadoras de N_2 , a quantidade de N não marcado derivado do ar, via FBN, será proporcional à diluição do enriquecimento de ^{15}N do N marcado extraído do solo. Normalmente, a planta “fixadora” e a planta-controle não fixadora são cultivadas no mesmo solo marcado sob idênticas condições de manejo, no qual o enriquecimento de ^{15}N da planta-controle é considerado como o enriquecimento de ^{15}N do nitrogênio que a planta “fixadora” absorveu do solo. Neste caso, o cálculo da proporção (%) do N, na planta-teste, derivado da FBN (%Ndfa), é feito pela seguinte equação:

$$\%Ndfa = 100 \times \left\{ 1 - \frac{(\text{atom } \%^{15}\text{N na planta "fixadora de } \text{N}_2" - A)}{(\text{atom } \%^{15}\text{N na planta controle} - A)} \right\} \quad \text{Equação 1}$$

onde A = atom % ^{15}N do N do ar (0,3663 atom % ^{15}N).

Normalmente, o enriquecimento de ^{15}N do ar é subtraído do enriquecimento da amostra e expressado como ‘atom % ^{15}N em excesso’. Neste caso, a equação para o cálculo de %Ndfa torna-se:

$$\%Ndfa = 100 \times \left\{ 1 - \frac{(\text{atom } \%^{15}\text{N excesso planta "fixadora de } \text{N}_2")}{(\text{atom } \%^{15}\text{N excesso planta controle})} \right\} \quad \text{Equação 2}$$

Realmente, se o enriquecimento do N disponível do solo com ^{15}N é determinado por outra técnica, tal como análise direta do enriquecimento do N mineral do solo (Chalk, et al., 1983; Hamilton et al., 1992; Smith et al., 1992), o uso de uma planta-controle pode ser dispensado.

24.3.2. Premissa Básica

No caso da utilização de uma planta-controle, a premissa básica da técnica é a seguinte: o N que a leguminosa e a planta controle absorvem do solo apresentam o mesmo enriquecimento de ^{15}N . Alternativamente, essa premissa pode ser descrita como: a relação entre o N-fertilizante marcado e o N do solo, não marcado, que é absorvido pela leguminosa e a planta-controle (não fixadora de N_2), é a mesma.

24.3.3. A Marcação do N do Solo com ^{15}N

A técnica mais comumente utilizada é uma única aplicação de fertilizante nitrogenado solúvel marcado com ^{15}N (ex. sulfato de amônio ou uréia) na superfície do solo logo antes, na hora, ou logo após, a semeadura das culturas. Resultados apresentados na literatura mostram, claramente, que esta técnica leva, com o tempo, a uma rápida queda no enriquecimento de ^{15}N do N mineral do solo (Witty, 1983; Fried et al., 1983; Smith et al., 1992). Sob estas condições, se a planta-controle e a leguminosa

possuem diferentes curvas (não homólogas) de absorção de N do solo, elas inevitavelmente apresentarão diferentes enriquecimentos para o N proveniente do solo marcado. A partir da premissa básica da técnica, obviamente, isto significa que elas, inevitavelmente, apresentariam diferenças para N proveniente do solo e a técnica de diluição isotópica de ^{15}N não poderia ser aplicada, ou se fosse aplicada, estaria introduzindo um erro na estimativa da contribuição do N derivado da FBN.

Para evitar esses problemas, alguns autores utilizaram solo marcado com ^{15}N , por mais de um ano antes da semeadura. Assim, o N mineral do solo se encontra quase estável com o tempo, e no momento da marcação maiores quantidades de material enriquecido com ^{15}N têm que ser adicionadas, para que se atinjam níveis convenientes de enriquecimento de ^{15}N no solo durante o crescimento das plantas. Neste caso, se não se têm variações muito significativas de marcação, tanto em extensão ou profundidade do solo, todas as plantas, “fixadoras de N_2 ” ou não, devem obter N do solo com o mesmo enriquecimento ^{15}N , satisfazendo a premissa básica da técnica. Esta estratégia foi utilizada por Broadbent et al. (1982), Patterson & LaRue (1983) e Talbot et al. (1982, 1985) no campo, onde ainda poderia ter havido problemas com variações no enriquecimento de ^{15}N no N mineral do solo com a profundidade e em cilindros ou tanques preenchidos com solo, onde o N enriquecido foi misturado com todo o volume do solo, por Legg & Sloger (1975), Boddey & Victoria (1986), Miranda & Boddey (1987) e Urquiaga et al. (1992). Nestes últimos três trabalhos, o objetivo foi o de quantificar as contribuições da FBN às gramíneas forrageiras e à cana-de-açúcar, e esta estratégia comprovou, pela primeira vez, que tais gramíneas foram capazes de obter contribuições significativas de N da FBN. Apesar do fato de que este método de enriquecimento de ^{15}N do solo é ideal para quantificar FBN, com a técnica de diluição isotópica, o custo referente a tempo e material enriquecido é elevado e, aliando-se à pouca praticidade, faz com que esta técnica não seja estendida para estudos de rotina no campo.

24.3.4. Erros Associados ao Uso da Aplicação Simples de Fertilizante Marcado

Os problemas associados com a utilização da técnica de diluição isotópica de ^{15}N , quando o enriquecimento não permanece estável durante o crescimento das plantas, têm sido discutidos por muitos autores (Witty, 1983; Chalk, 1983; Vose & Victoria, 1986; Rennie, 1986; Danso, 1988; Boddey, 1987; Witty et al., 1988; Witty & Giller, 1991). Estes autores entendem muito bem que o uso de uma simples adição de N enriquecido na semeadura resulta, com o tempo, em grandes mudanças, com o tempo, no enriquecimento de ^{15}N do solo. Por isso, como dito anteriormente, plantas com curvas não homólogas de acumulação de N podem obter o N derivado do solo com diferentes enriquecimentos de ^{15}N e, mesmo assim, vários destes autores continuam utilizando esta técnica de marcação. A explicação para isto está na falta de estimativas da grandeza dos possíveis erros envolvidos. Para estimar os possíveis erros é necessário avaliar o enriquecimento de ^{15}N no N derivado do solo por plantas diferentes, crescidas no solo marcado com uma simples adição de ^{15}N -fertilizante. Isto somente pode ser feito

com plantas que não obtenham N da fixação de N_2 , sendo necessários experimentos em que se utiliza mais de uma planta-controle. Das centenas de experimentos feitos, empregando a técnica de diluição isotópica para a quantificação da FBN, somente poucos utilizaram mais de uma planta-controle. Entretanto, nestes estudos, todos os resultados mostraram que as diferentes plantas-controle obtiveram enriquecimentos de ^{15}N do solo significativamente diferentes quando o ^{15}N foi aplicado numa única dose de fertilizante solúvel (ex.: uréia ou sulfato de amônio) na semeadura (Rennie, 1982; Witty, 1983; Wagner & Zapata, 1982; Duque et al., 1985). Tal efeito pode ser observado na Figura 24.1, em que duas plantas não fixadoras (soja não nodulante e sorgo) foram crescidas em um solo marcado com uma simples adição de sulfato de amônio marcado com ^{15}N . Através de amostragens em vários estádios de desenvolvimento das plantas, foi possível constatar que a planta de sorgo extraiu muito mais N do solo, em comparação à soja, num período mais tardio, em que o N do solo estaria mais empobrecido em ^{15}N , o que refletiu em diferentes enriquecimentos em ambas as plantas.

Mesmo nos casos em que foram realizadas tentativas para diminuir as mudanças temporais do enriquecimento com ^{15}N do N mineral do solo, por meio de gesso peletizado ou matéria orgânica marcada, ainda foram constatadas diferenças significativas do enriquecimento de ^{15}N do N em diferentes plantas-controle (Wagner & Zapata, 1982; Witty, 1983 e Boddey et al., 1990). Ocasionalmente, diferenças na curva de absorção de N entre plantas “fixadoras de N_2 ” e controle são tão grandes que a aplicação da técnica de diluição isotópica conduz a erros grosseiros, dando, às vezes, estimativas negativas da contribuição da FBN (Patterson & LaRue, 1983; Witty & Ritz, 1984; Ledgard et al., 1985; Sanginga et al., 1990).

A partir desta evidência observa-se que podem existir grandes diferenças entre o enriquecimento com ^{15}N obtido entre diferentes plantas (“fixadora de N_2 ” e controle) cultivadas em solos onde foram aplicados fertilizantes nitrogenados solúveis marcados, pelo que é aconselhável tentar usar técnicas de marcação do N do solo que produzam variações temporais mais lentas no enriquecimento com ^{15}N do N mineral do solo (Figura 24.2).

24.3.5. Estratégias para o Uso da Técnica de Diluição Isotópica de ^{15}N para Obter Estimativas Confiáveis da Contribuição da FBN às Plantas

24.3.5.1. Marcação do solo de maneira que as variações temporais do enriquecimento do N mineral do solo com ^{15}N sejam as menores possíveis

As metodologias disponíveis para diminuir as mudanças temporais do enriquecimento de ^{15}N no solo foram discutidas por Chalk (1985) e Boddey (1987). A seguir são apresentadas algumas vantagens e desvantagens das várias técnicas.

- a) A peletização do sulfato de amônio marcado (^{15}N) com gesso foi utilizada por Witty (1983) e, mais tarde, por outros autores (Giller & Witty, 1987; Boddey et al., 1990) que mostraram que esta técnica não é tão efetiva em reduzir a queda do enriquecimento de ^{15}N no tempo, uma vez que os péletes não reduzem sensivelmente a velocidade da liberação de ^{15}N .

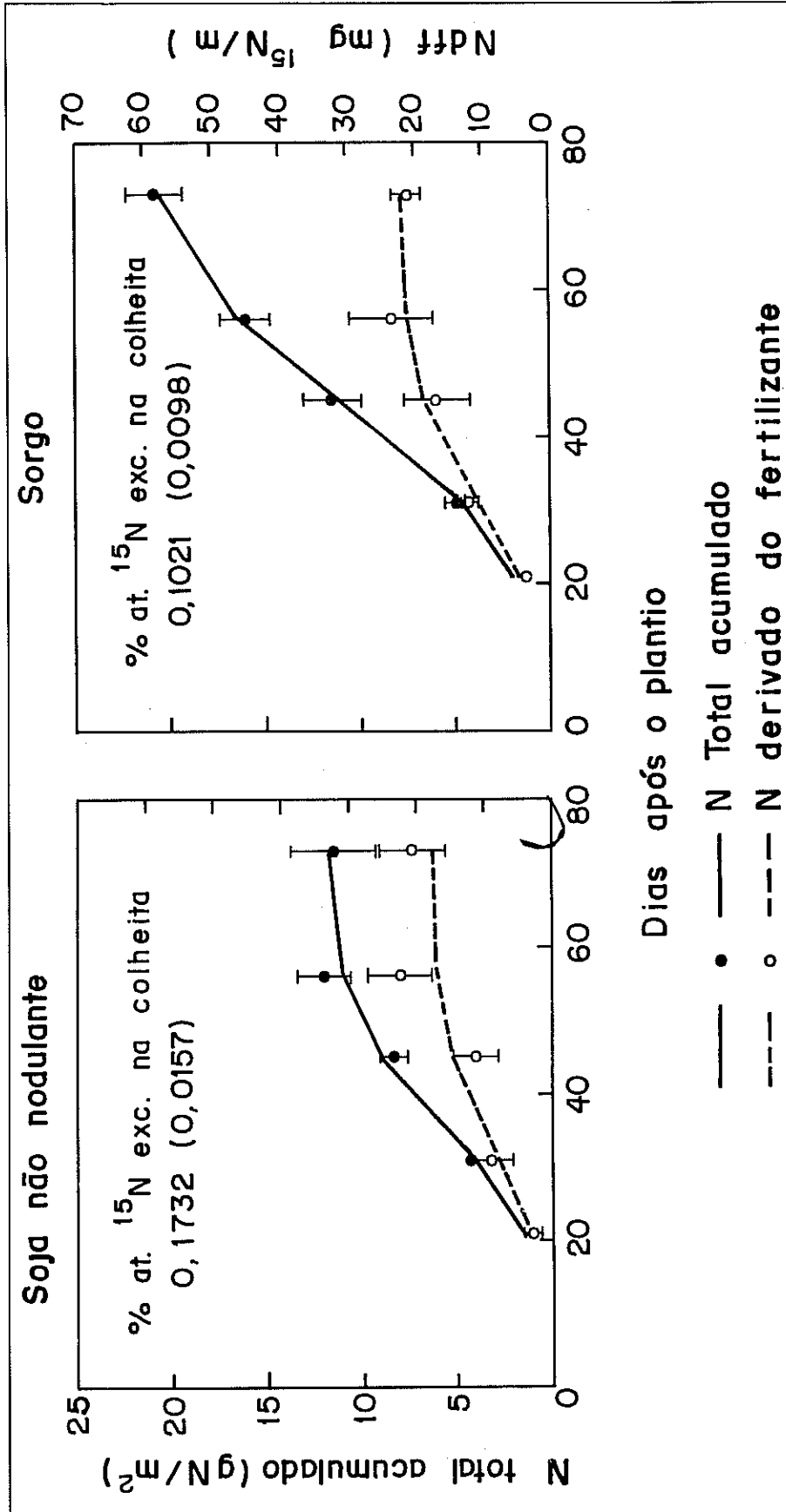
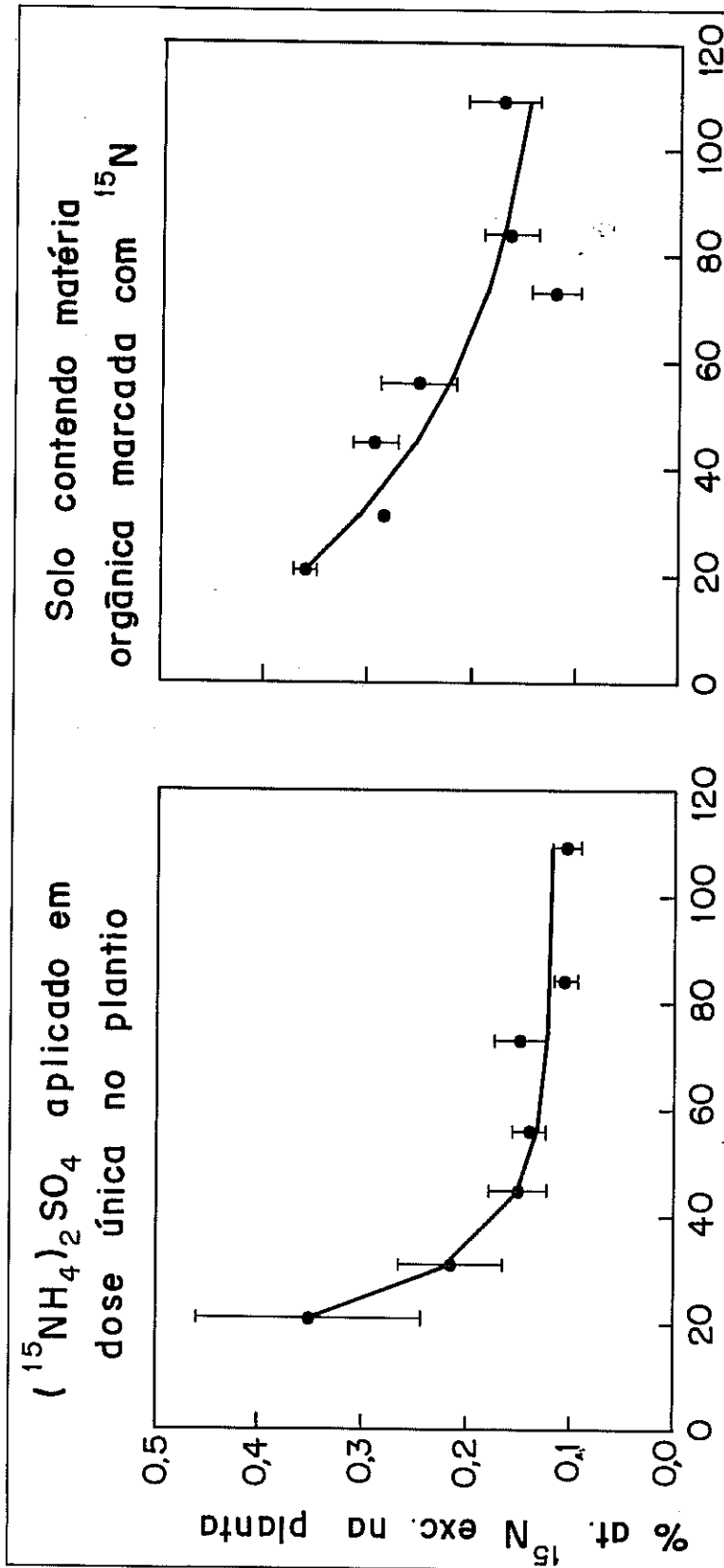


FIGURA 24.1. Acumulação de N derivado do solo e do ^{15}N fertilizante (Ndff) por duas plantas-controlé num solo marcado com uma dose única de sulfato de amônio marcado com ^{15}N aplicada no plantio. Dados de experimento de campo (Boddey, Oliveira, Alves, Urquiaga & Neves, em preparação).



Dias após o plantio

FIGURA 24.2. Mudança do enriquecimento de ^{15}N em arroz (controle não fixador de N_2) com o tempo em solo, no campo, marcado com aplicação única de sulfato de amônio marcado com ^{15}N ou matéria orgânica marcada com ^{15}N .

Dados de Boddey, Oliveira, Alves, Urquiaga & Neves (em preparação).

- b) Imobilização do N mineral dos fertilizantes pela adição de açúcar, celulose, serragem ou palha (veja oito referências citadas por Boddey, 1987). Este procedimento parece ser mais efetivo que a peletização com gesso, mas mudanças no enriquecimento do N mineral do solo com ^{15}N , provavelmente, ainda sejam razoavelmente rápidas, como é evidente a partir do fato de que diferenças significativas no enriquecimento com ^{15}N têm sido relatadas para diferentes plantas-controle crescendo no mesmo meio (Wagner & Zapata, 1982; Witty, 1983; Boddey et al., 1990). Outra desvantagem é que este procedimento, provavelmente, reduzirá a disponibilidade de N do solo (imobilização) para as plantas, afetando (provavelmente de maneira positiva) o total de N derivado da FBN pela planta "fixadora de N_2 ". Uma possível variação desta técnica é imobilizar o fertilizante, por algum tempo (30 a 50 dias), antes do semeadura (Cadisch et al., 1993), mas até agora não foi feito nenhum estudo exaustivo sobre a possível utilidade deste procedimento. Uma possível desvantagem seria a elevada quantidade de ^{15}N que deve ser adicionada ao solo para se ter um razoável enriquecimento de ^{15}N nas plantas para a detecção pelo espectrômetro de massa ou de emissão.
- c) Adição de composto ou material vegetal marcado com ^{15}N . Esta metodologia tem sido utilizada com certa frequência (Henzell et al., 1968; Boddey et al., 1983, 1984, 1990; Urquiaga et al., 1992). No entanto, este procedimento também leva a um declínio do enriquecimento inicial com ^{15}N , embora mais lento que o verificado para a adição de um fertilizante solúvel marcado. Este procedimento também imobiliza o N do solo, mas, conforme já mencionado, nas condições tropicais de intensa atividade microbiana no solo, após 18 meses, o enriquecimento tornou-se virtualmente estável (Figura 24.2).
- d) Múltiplas aplicações de pequenas doses de fertilizantes solúveis marcados. Trata-se de uma técnica razoavelmente popular (veja oito referências citadas por Boddey, 1987), que foi criticada por Rennie (1985) com o argumento de que se a planta em teste e a planta-controle absorvem diferentes quantidades de N mineral, o N fertilizante residual do solo, após a primeira aplicação, será diferente para as duas plantas, situação que se agravava com a adição posterior de ^{15}N fertilizante, no segundo período de crescimento. Entretanto, se a quantidade de N marcado que foi adicionada é pequena em relação ao que a planta absorve, é improvável que quantidades significativas de N mineral residual estejam disponíveis até a colheita, invalidando esta crítica, conforme foi admitido por Rennie. A evidência sugere que esta técnica é significativamente superior no que se refere a menores variações temporais no enriquecimento com ^{15}N do N mineral do solo se o fracionamento é adequadamente realizado. Em relação à técnica de uma única adição de N fertilizante, esta apresenta a vantagem de que o enriquecimento de ^{15}N permanece alto até o final do ciclo da cultura, quando as contribuições de N da FBN normalmente são grandes. Se pequenas quantidades de ^{15}N fertilizante são utilizadas, a disponibilidade de N mineral do solo não é significativamente alterada, ao contrário das técnicas b) e c). Portanto, trata-se de uma boa técnica se o objetivo do estudo for estimar a FBN em condições reais de cultivo. A desvantagem surge do trabalho envolvido nas freqüentes adições de ^{15}N fertilizante e na

certeza de que as adições não sejam suficientes para afetar o crescimento das plantas e que quantidades não significativas de sais contendo ^{15}N sejam absorvidas pelas folhas das plantas adultas ou em desenvolvimento. Este último problema pode ser atenuado pelo uso de partículas de areia como portador do material marcado, as quais podem ser menos retidas nas folhas e, posteriormente, liberar o ^{15}N fertilizante no solo por meio de uma aspersão de água (Bergersen & Turner, 1983; Cadish et al., 1989; Viera-Vargas et al., 1994).

24.3.5.2. Uso de diversas plantas-controle

Recentemente, Boddey et al. (1990) sugeriram que uma boa estratégia para a aplicação da técnica de diluição isotópica é o uso de diversas plantas-controle juntamente com outra técnica que reduza as variações temporais do enriquecimento de ^{15}N do N mineral do solo. Este procedimento baseia-se no fato de que, se realmente existem consideráveis mudanças temporais no enriquecimento de ^{15}N no N mineral do solo, então, cada planta-controle poderá fornecer uma estimativa independente da contribuição da FBN para a planta “fixadora de N_2 ”. Se as diferenças entre estas estimativas são pequenas, então, é provável que a estimativa média seja razoavelmente precisa. Os resultados apresentados por Boddey et al. (1990) ilustram o uso desta metodologia. Naturalmente este procedimento envolve um acréscimo de trabalho e do número de amostras para análise, mas, por outro lado, pode-se ter mais confiança nos resultados.

24.3.5.3. Uso de dois métodos de aplicação de ^{15}N

Para esta estratégia, recomenda-se que a aplicação de ^{15}N no solo seja feita pela utilização de técnicas contrastantes, ou seja, aquelas que forneçam diferentes tipos de mudanças no enriquecimento de ^{15}N do N disponível do solo com o tempo. Provavelmente, isto significa que tanto a adição de um fertilizante solúvel marcado, ou de uma forma de liberação lenta (opções b ou c da seção 24.3.5.1), poderá ser utilizada junto com a técnica de adições múltiplas. A primeira técnica promove um decréscimo, com o tempo, do enriquecimento com ^{15}N do N mineral do solo e a segunda promove um incremento no enriquecimento deste N com o tempo, se as adições forem freqüentes (Viera-Vargas et al., 1994). É preferível usar, também, diversas plantas-controle juntamente com esta técnica, embora duas possam ser suficientes, como descrito acima (seção 24.3.5.2). Se a planta “fixadora de N_2 ” e uma das plantas-controle possuem modelos idênticos de absorção do N mineral do solo, então, nos dois tratamentos marcados com ^{15}N a estimativa do N decorrente da FBN pela planta “fixadora de N_2 ” também será idêntica. Isto leva ao fato de que a planta-controle que possibilita um estreito ajuste na estimativa da FBN, nos dois tratamentos marcados com ^{15}N , é aquela que está fornecendo a estimativa para a verdadeira contribuição da FBN (Viera-Vargas et al., 1994). Esta técnica, provavelmente, exige mais trabalho, mais unidades experimentais, mais ^{15}N e um maior número de análises que o método de múltiplos controles (seção 24.3.5.2), mas pode valer a pena.

24.3.5.4. Avaliações do enriquecimento de ^{15}N da planta ao longo do tempo

Esta técnica pode ser aplicada com apenas uma planta-controle e a adição de uma única dose no semeadura de N fertilizante solúvel marcado na semeadura, mas, certamente, melhores resultados serão obtidos se o fertilizante nitrogenado for de liberação lenta e mais de uma planta-controle for utilizada. Neste procedimento várias colheitas (provavelmente até cinco) de cada planta (planta “fixadora” e controle) são realizadas durante o ciclo de crescimento. Isto significa que mais repetições (maior área no campo) são necessárias. As colheitas deverão ser espaçadas além do tempo necessário para que ocorra o período de máxima fixação de N_2 pela planta teste, caso seja possível prevêê-lo. A cada cultivo completo, o material é analisado quanto ao N total e enriquecimento com ^{15}N e a partir destes resultados a curva de recuperação do fertilizante marcado (ou excesso de ^{15}N) pode ser obtida para cada planta. Se a curva de recuperação do fertilizante marcado é muito semelhante ou homóloga à da planta-controle (ou de uma das plantas-controle), então, a estimativa da FBN na leguminosa, a partir desta planta controle, deve ser mas aceitável. A equação da curva de crescimento, obtida por Hamilton et al. (1992), pode ser utilizada para ajustar os dados de acumulação do N-fertilizante marcado pelas diferentes plantas:

$$T^{15}\text{N} = c \cdot (N_u \cdot t) \quad \text{Equação 3}$$

onde: $T^{15}\text{N}$ = acumulação de ^{15}N pela planta; N_u = constante de absorção de ^{15}N ; c = quantidade inicial de ^{15}N na planta; e t = tempo de cultivo em dias.

Se as constantes 'c' e N_u são iguais, as curvas podem ser consideradas de mesmo formato, embora, visualmente, isto torne-se evidente pelo gráfico. Este tipo de procedimento foi utilizado por Boller & Nosberger (1988) e também por Pareek et al. (1990) e Watanabe et al. (1990). Se as duas curvas não são semelhantes, pode-se obter uma avaliação da magnitude do erro da estimativa da contribuição da FBN para a leguminosa. Novamente, mais vasos/parcelas são necessários, assim como um considerável número de análises extras para N e para o enriquecimento com ^{15}N .

24.3.6. Estimativa por Modelagem sem a Necessidade de Planta-Controle

Se nenhuma planta-controle é utilizada, então, o enriquecimento de ^{15}N do N mineral do solo é estimado por meio da extração periódica do N mineral do solo com KCl (ou similar). Isto foi primeiramente tentado por Chalk et al. (1983).

Estimando-se o declínio do enriquecimento de ^{15}N do N mineral do solo onde foi aplicada uma dose única de N fertilizante marcado, usando-se KCl como extrator, avaliando-se o total de N e o ^{15}N acumulados pela planta “fixadora de N_2 ” e ajustando curvas para estas características é, teoricamente, possível estimar a quantidade de N e seu enriquecimento com ^{15}N absorvido pela planta a cada dia

durante seu ciclo de crescimento. A partir destas informações, é possível estimar o total do enriquecimento com ^{15}N acumulado pela planta ao longo de seu ciclo, se realmente o N mineral extraído com o KCl representa aquele que é utilizado pela planta, ou seja, o volume do solo explorado pelas raízes da planta.

Em dois estudos publicados recentemente pelo grupo de Melbourne (Hamilton et al., 1992; Smith et al., 1992), os autores alegam que a adoção deste procedimento resultou em sucesso, tanto para estudos com soja em vasos como para tremeços em condições de campo. No primeiro estudo, com soja, o aspecto preocupante foi que o enriquecimento de ^{15}N do N mineral do solo apresentou um declínio mais rápido sob a soja do que sob as duas plantas-controle (soja não nodulante e azevém). Isto sugeriria a possível existência de uma interação entre o tipo de planta e a taxa de declínio do enriquecimento do N mineral do solo, o qual, caso fosse verdade, invalidaria o conceito geral da técnica de diluição isotópica. Isto não foi discutido pelos autores, mas poderia ter ocorrido devido à exsudação de parte do N fixado (não marcado) no solo pela soja, tornando-se um artefato para os pequenos vasos utilizados. No estudo de campo o ajuste da curva de acumulação do N fertilizante marcado pelo tremeço não foi muito bom ($R^2 = 0,60$), o que pode ter causado algum erro na estimativa da FBN.

Nos dois estudos, as duas plantas-controle foram incorporadas ao desenho experimental para fins de comparação da estimativa derivada dos cálculos baseados no enriquecimento de ^{15}N dos extratos (de KCl) de N mineral do solo, com as estimativas derivadas do uso do enriquecimento de ^{15}N destas plantas-controle. Neste caso, o método de modelagem foi razoavelmente bom. Em nenhum caso os autores tentaram prever o enriquecimento de ^{15}N no N acumulado pelas plantas controle e comparar esta estimativa com o resultado obtido pela análise do material vegetal. Trata-se de uma oportunidade perdida que teria avaliado a técnica com um procedimento de verificação muito bom.

A técnica requer um número considerável de amostras de solo de cada vaso ao longo do ciclo (há relatos de até seis amostragens ao longo do ciclo da planta) e, em cada uma, deve-se fazer a extração com KCl e estimar o enriquecimento com ^{15}N do N mineral de cada amostra por espectrometria de emissão ou de massa. Nos solos utilizados nestes trabalhos, os níveis de N mineral foram, aparentemente, altos ao longo do período de crescimento das plantas, tornando as avaliações de enriquecimento de ^{15}N possíveis. Entretanto, a experiência obtida no (CNPAB) mostra que estas análises, em solos com baixo nível de N mineral, como normalmente se observa em solos tropicais, são extremamente difíceis de serem analisadas com o espectrômetro de massa, em que mais de 500 $\mu\text{g N/amostra}$ são, usualmente, necessários. Neste caso, a extração deve ser feita com grandes quantidades de solo. Este procedimento envolve grandes quantidades de reagentes, os quais podem apresentar traços de N mineral não marcado, provocando mais erros na estimativa do enriquecimento com ^{15}N do N mineral do solo.

Estes problemas também têm sido discutidos pelo próprio grupo de Melbourne (Chen et al., 1991). O problema seria muito menos agudo se, nas análises de ^{15}N , fosse utilizado um espectrômetro de emissão, que requer somente pequenas amostras (entre 10 μg e 50 μg N).

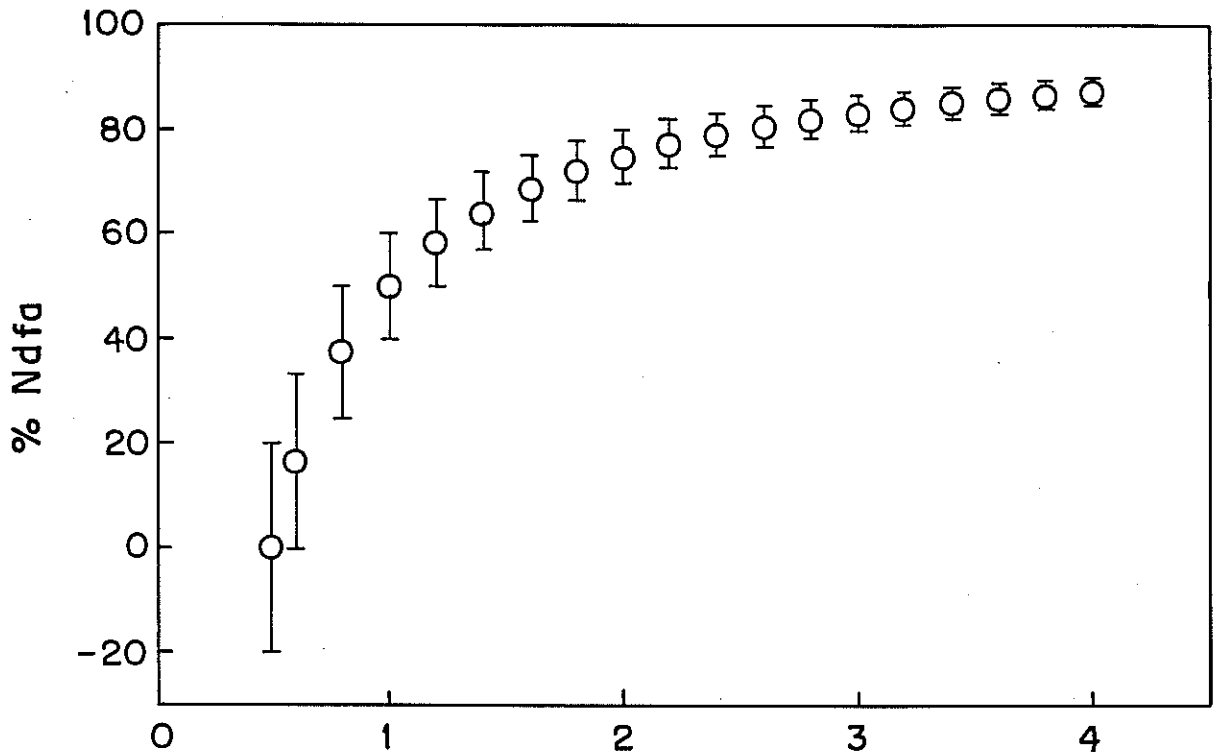
Em resumo, a técnica é razoavelmente trabalhosa e, às vezes, muito difícil de ser aplicada em solos tropicais onde são encontrados baixos níveis de N mineral. Ela ainda necessita de estudos, mas poderá se tornar uma técnica muito útil para estudos onde os níveis de N mineral sejam grandes e que não seja desejável baixá-los durante o estudo. Como mencionado anteriormente (seção 24.3.5.1), algumas técnicas utilizadas para produzir uma queda mais lenta no enriquecimento de ^{15}N no solo podem imobilizar o N mineral e, portanto, causar mudanças na atividade de fixação de N_2 da planta “fixadora de N_2 ”. Se é desejável que uma única aplicação de N fertilizante marcado seja utilizada, como por exemplo num estudo do efeito do fertilizante nitrogenado sobre a FBN pela leguminosa, então, a técnica de modelagem poderá ser mais satisfatória do que qualquer outra.

24.3.7. Uma Palavra sobre Grandes Contribuições da FBN

A partir dos cálculos utilizados com a técnica de diluição isotópica observa-se que, se a contribuição proporcional da FBN (%Ndfa) para a planta “fixadora de N_2 ” é alta, então, a estimativa da %Ndfa é relativamente insensível às diferenças nas curvas de absorção de N entre as plantas-controle e a leguminosa (Figura 24.3) (Boddey, 1987; Hardarson et al., 1991; Watanabe, 1991). Nestes casos, o uso de formas nitrogenadas marcadas de lenta liberação e a escolha da planta-controle são menos críticas. Entretanto, se os níveis de N do solo são realmente baixos e a leguminosa é capaz de fixar grandes proporções do N_2 , o uso da técnica de diluição isotópica pode ser até descartado, empregando-se o método da diferença de N total, preferencialmente com a utilização de diversas plantas-controle.

24.3.8. Nitrogênio da Semente

Se a quantidade de nitrogênio da semente é, proporcionalmente, significativa em relação ao N total acumulado pela leguminosa, ou pela planta-controle, este fato deve ser levado em consideração. Isto deve ser aplicado particularmente nos estudos de FBN durante o ciclo de crescimento da cultura no qual, em colheitas iniciais, o N da semente constitui uma grande proporção do total de N da planta. Normalmente, este N da semente não é marcado e muito dele é incorporado no tecido da planta. Se a planta-controle possui menos N na semente do que a planta “fixadora de N_2 ” (ou vice-versa), como no caso de gramíneas ou cereais utilizados como controle de soja (ou pior, em *Canavalia* spp., em que as sementes podem conter mais de 120 mg de N/semente), então, uma considerável superestimação da FBN pode ser realizada. Isto é aparente no trabalho de Kucey (1989) e tem sido amplamente discutido por Jensen et al. (1985), Hamilton et al. (1992) e Smith et al. (1992).



átomos % ^{15}N em excesso da planta controle

FIGURA. 24.3. Influência de uma variabilidade de 10% do enriquecimento de ^{15}N nas estimativas da porcentagem de N derivado da FBN (%Ndfa). Obs.: o enriquecimento de ^{15}N da planta não fixadora de $\text{N}_2 = 0,50 + 0,05$ átomo % ^{15}N em excesso. Segundo Hardarson et al. (1988).

Não existem saídas rápidas ou curtas para quantificar a FBN associada a plantas. A técnica de diluição isotópica com ^{15}N , através da adição única de um fertilizante marcado e solúvel na sementeira, e usando somente uma planta-controle, é fácil de ser aplicada. O método utiliza pouco material enriquecido com ^{15}N , fornece poucas amostras para análise, mas os resultados são muitas vezes de valor limitado e, às vezes, sem uso. Entretanto, pode ser melhorada, em muito, se mais plantas-controle forem utilizadas. Todas as outras técnicas que requerem mais de uma planta-controle, mais de uma técnica de adição de ^{15}N , ou a técnica de colheitas múltiplas, envolvem maior trabalho e custos. Entretanto, estas técnicas podem produzir estimativas confiáveis da contribuição da FBN para plantas “fixadoras de N_2 ”, em experimentos com vasos, ou em condições de campo.

Entre as técnicas discutidas nas seções 24.3.5 e 24.3.6, a menos trabalhosa é a do uso da aplicação de forma de liberação lenta de ^{15}N com mais de uma planta-controle, conforme recomendado por Boddey et al. (1990). A maior desvantagem desta estratégia é a possibilidade da forma de liberação lenta de ^{15}N diminuir a disponibilidade de N mineral do solo, afetando assim a quantidade de N derivado da

FBN pela planta “fixadora de N_2 ” em estudo. Se isso pode prejudicar os objetivos do experimento, recomenda-se a utilização da mesma técnica mas com o uso de várias pequenas adições de ^{15}N -fertilizante solúvel durante o ciclo das culturas.

24.4. A Técnica de Abundância Natural de ^{15}N

Muitos dados, na literatura, indicam que existem diferenças significativas entre a abundância natural de ^{15}N do N no solo e aquela do ar (Cheng et al., 1964; Black & Waring, 1977; Shearer et al., 1978; Steele et al., 1981). Estas diferenças se devem a vários processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem no solo (Delwiche & Steyn, 1970; Domenach & Chalamet, 1977; Mariotti et al., 1981; Turner et al., 1983). Estes enriquecimentos ou depleções tão pequenas são, tradicionalmente, quantificados mediante o uso de um espectrômetro de massa equipado com dois ou mais detectores e um sistema de dupla introdução de amostra, que compara, simultaneamente, as abundâncias isotópicas da amostra e de um padrão (normalmente N_2 do ar). A diferença no enriquecimento de ^{15}N entre as duas amostras é normalmente expressa em unidades de $\delta^{15}\text{N}$, onde:

$$\delta^{15}\text{N} = \frac{(\text{atom } \% \text{ } ^{15}\text{N} \text{ na amostra} - \text{atom } \% \text{ } ^{15}\text{N} \text{ no padrão})}{(\text{atom } \% \text{ } ^{15}\text{N} \text{ no padrão})} \times 1.000 \quad \text{Equação 4}$$

Se o padrão utilizado é N_2 do ar (0,3663 atom % ^{15}N), então, uma unidade de $\delta^{15}\text{N}$ (expressado em ‰ 0,0003663 atom % ^{15}N).

Para a análise de amostras deste tipo, de muito baixo enriquecimento, grandes precauções devem ser tomadas na preparação das amostras para evitar discriminação isotópica e contaminação durante os processos de digestão das amostras, destilação a vapor e secagem do destilado. Estas precauções têm sido amplamente discutidas por vários autores (Bremner, 1965; Shearer et al., 1974; Hauck, 1982; Reeder, 1984; Mulvaney, 1986).

O princípio da técnica de abundância natural é o mesmo que a técnica de diluição isotópica: a quantidade do N derivado do ar é proporcional à diferença de enriquecimento de ^{15}N entre o N derivado do solo (estimado como o enriquecimento da planta-controle) e o enriquecimento do N da planta “fixadora de N_2 ”. Entretanto, o N derivado do ar pode sofrer alguma discriminação isotópica durante sua assimilação, normalmente menor de 1 ou 2 ‰ (Amarger et al., 1977; Kohl & Shearer, 1980; Mariotti et al., 1980; Bergersen & Turner, 1983; Shearer et al., 1983) e a equação para o cálculo de % Ndfa, utilizado com a técnica de diluição isotópica (Equação 1), é modificada:

$$\% \text{Ndfa} = 100 \times \left\{ \frac{(\text{atom } \% \text{ } ^{15}\text{N} \text{ controle} - \text{atom } \% \text{ } ^{15}\text{N} \text{ planta "fixadora"})}{(\text{atom } \% \text{ } ^{15}\text{N} \text{ planta-controle} - B)} \right\} \quad \text{Equação 5}$$

onde B = Atom % ^{15}N da planta “fixadora de N_2 ” crescida, tendo a FBN como a única fonte de nitrogênio (ex.: em areia ou vermiculita livre de N irrigada com uma solução nutritiva sem N). Esta equação pode ser modificada para o uso de unidades de $\delta^{15}\text{N}$, assim:

$$\% \text{Ndfa} = 100 \times \left\{ \frac{(\delta^{15}\text{N} \text{ controle} - \delta^{15}\text{N} \text{ planta “fixadora”})}{(\delta^{15}\text{N} \text{ planta-controle} - B)} \right\} \quad \text{Equação 6}$$

O uso destas equações é dependente da premissa básica da técnica de diluição isotópica (seção 24.3.2) que tanto a planta(ou plantas)-controle como a planta “fixadora de N_2 ” acumulam N do solo com o mesmo enriquecimento de ^{15}N . Além disso, é suposto que qualquer discriminação isotópica no N derivado do solo é igual em todas as plantas (controle e planta “fixadora de N_2 ”). Investigações feitas por Mariotti et al. (1980) indicaram que estas discriminações são, normalmente, desprezíveis se os teores de N do solo não são muito altos.

Além destas fontes potenciais de erro, se os valores de $\delta^{15}\text{N}$ do N mineral do solo não são uniformes em espaço e profundidade, ou variam com o tempo, existirão também problemas associados com diferenças entre curvas de absorção de N entre a planta “fixadora de N_2 ” e o controle discutido anteriormente (seção 24.3.3). Inicialmente, este problema foi considerado menor porque algumas evidências indicaram que variações na abundância natural de ^{15}N no solo eram pequenas (Rennie & Rennie, 1983). Entretanto, outros autores mostraram que a abundância natural de ^{15}N no solo pode variar, consideravelmente, com as formas de N no solo, com a profundidade e no tempo, e que diferentes plantas-controle podem acumular N do solo com valores diferentes de abundância de ^{15}N (Feigin et al., 1974, Delwiche et al., 1979; Bergersen et al., 1985; Ledgard et al., 1984; Selles et al., 1986; Turner et al., 1987). Por isso, também é recomendado que mais de uma planta-controle seja utilizada na aplicação desta técnica, conforme recomendado para a utilização da técnica de diluição isotópica (Boddey et al., 1990).

A grande vantagem desta técnica consiste na não-necessidade de adição de materiais enriquecidos com ^{15}N , nem a perturbação do solo ou vegetação. Por isso, esta técnica tem muito valor nos estudos das contribuições de N da FBN em ecossistemas naturais, em pastagens já estabelecidas, ou com plantas grandes (árvores, cana-de-açúcar), nas quais grandes aplicações de ^{15}N ficam extremamente caras, além das dificuldades da aplicação de ^{15}N -fertilizante em grandes áreas de terra. Os problemas associados com a aplicação desta técnica foram discutidos, detalhadamente, por Shearer & Kohl (1986) e Bergersen et al. (1990).

24.5. Referências Bibliográficas

- AMARGER, N.; MARIOTTI, A.; MARIOTTI, F. Essai d'estimation du taux d'azote fixe symbiotiquement chez le Lupin par le tracage isotopique naturel (^{15}N). **C. R. Acad. Sci.**, v.284, p.2179-2182, 1977.
- APP, A.; SANTIAGO, T.; DAEZ, C.; MENGUITO, C.; VENTURA, W.; TIROL, A.; PO, J.; WATANABE, I.; DATTA S.K. DE; ROGER, P. Estimation of the nitrogen balance for irrigated rice and the contribution of phototrophic nitrogen fixation. **Field Crops Res.**, v.9, p.17-27, 1984.
- BARRIE, A. New methodologies in stable isotope analysis. In: **STABLE Isotopes in Plant Nutrition, Soil Fertility and Environmental Studies**. Vienna: International Atomic Energy Agency, 1991. p.3-25.
- BERGERSEN, F.J. Measurement of nitrogen fixation by direct means. In: BERGERSEN, J., ed. **Methods for evaluating biological nitrogen fixation**. Chichester: John Wiley, 1980. p 65-110.
- BERGERSEN, F.J.; TURNER, G.L. An evaluation of ^{15}N methods for estimating nitrogen fixation in a subterranean clover-perennial ryegrass sward. **Aust. J. Agric. Res.**, v.34, p.391-401, 1983.
- BERGERSEN, F.J.; TURNER G.L.; GAULT, R.R.; CHASE, D.L.; BROCKWELL, J. The natural abundance of ^{15}N in an irrigated soybean crop and its use for the calculation of nitrogen fixation. **Aust. J. Agric. Res.**, v.36, p.411-423, 1985.
- BLACK, A.S.; WARING, S.A. The natural abundance of ^{15}N in the soil water system of a small catchment area. **Aust. J. Soil Res.**, v.15, p.51-57, 1977.
- BODDEY, R.M. Methods for the quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. **CRC Crit. Rev. Plant Sci.**, v.6, p.209-266, 1987.
- BODDEY, R.M.; VICTORIA, R.L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using ^{15}N -labelled organic matter and fertilizer. **Pl Soil.**, v.90, p.265-292, 1986.
- BODDEY, R.M.; CHALK, P.M.; VICTORIA, R.L.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J. The use of the ^{15}N dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of *Paspalum notatum* cv. *batatais*. **Can. J. Microbiol.**, v.29, p.1036-1045, 1983.
- BODDEY, R.M.; CHALK, P.M.; VICTORIA, R.L.; MATSUI, E. Nitrogen fixation by nodulated soybean under tropical field conditions estimated by the ^{15}N isotope dilution technique. **Soil Biol. Biochem.**, v.16, p.583-588, 1984.

- BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; NEVES, M.C.P.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. Quantification of the contribution of N_2 fixation to field-grown grain legumes - A strategy for the practical application of the ^{15}N isotope dilution technique. **Soil Biol. Biochem.**, v.22, p.649-655, 1990.
- BOLLER, B.C.; NOSBERGER, J. Influence of dissimilarities in temporal and spatial N-uptake patterns on ^{15}N -based estimates of fixation and transfer of N in ryegrass-clover mixtures. **Pl. Soil.**, v.112, p.167-175, 1988.
- BREMNER, J.M. Isotope-ratio analysis of nitrogen in nitrogen-15 tracer investigations. In: BLACK, C.A., ed. **Methods of Soil Analysis**. Madison: American Society of Agronomy, 1965. p.1256-1286.
- BROADBENT, F.E.; NAKASHIMA, T.; CHANG, C.Y. Estimation of nitrogen fixation by isotope dilution in field and Greenhouse experiments. **Agron. J.**, v.74, p.625-628, 1982.
- BURRIS, R.H. Methodology. In: QUISPÉL, A. ed. **The Biology of Nitrogen Fixation**. Amsterdam: North Holland, 1974. p 9-33.
- CADISCH, G.; SYLVESTER-BRADLEY, R.; NOSBERGER, J. ^{15}N -based estimates of N_2 fixation of eight tropical forage legumes at two levels of P:K supply. **Field Crops Res.**, v.22, p.181-194, 1989.
- CADISCH, G.; FERREIRA, E.; URQUIAGA, S.; GILLER, K.E.; BODDEY, R.M. Nitrogen turnover in a red Latosol: Effect of added carbon on the incorporation of ^{15}N into soil organic matter. In: MULONGOY, K.; MERCKX, R., eds. **Soil organic matter dynamics and sustainability of tropical agriculture**. Exeter: Sayce Publishing, 1993. p.209-213.
- CHALK, P.M. Estimation of N_2 fixation by isotope dilution: an appraisal of techniques involving ^{15}N enrichment and their application. **Soil Biol. Biochem.**, v. 17, p.389-410, 1985.
- CHALK, P.M.; DOUGLAS, L.A.; BUCHANAN, S.A. Use of ^{15}N enrichment of soil mineralizable N as a reference for isotope measurements of biologically fixed nitrogen. **Can. J. Microbiol.**, v.29, p.1046-1052, 1983.
- CHEN, D.; CHALK, P.M.; FRENEY, J.R. External-source contamination during extraction-distillation in isotope-ratio analysis of soil inorganic nitrogen. **Anal. Chim. Acta**, v.245, p.49-55, 1991.
- CHENG, H.H.; BREMNER, J.M.; EDWARDS, A.P. Variations of nitrogen-15 abundance in soils. **Science**, v.146, p.1574-1575, 1964.
- DANSO, S.K.A. The use of ^{15}N enriched fertilizers for estimating nitrogen fixation in grain and pasture legumes. In: BECK, D.P.; MATERON, L.A., eds. **Nitrogen fixation by legumes in Mediterranean agriculture**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1988. p.345-348.

- DE POLLI, H.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J.; SALATI, E. Confirmation of nitrogen fixation in two tropical grasses by $^{15}\text{N}_2$ incorporation. **Soil Biol. Biochem.**, v.9, p.119-123, 1977.
- DEL WICHE, C.C.; STEYN, P.L. Nitrogen isotope fractionation in soils and microbial reactions. **Environ. Sci. Technol.**, v.4, p.929-935, 1970.
- DEL WICHE, C.C.; ZINKE, P.J.; JOHNSON, C.M.; VIRGINIA, R.A. Nitrogen isotope distribution as a presumptive indication of nitrogen fixation. **Bot. Gaz.**, v.140, p.65-69, 1979.
- DOMENACH, A.M.; CHALAMET, A. Rapports isotopiques naturels de l'azote. I. Premiers resultats: sols de Dombes. **Rev. Ecol. Biol. Soil**, v.14, p.279-287, 1977.
- DUQUE, F.F.; NEVES, N.C.P.; FRANCO, A.A.; VICTORIA, R.L.; BODDEY R.M. The response of field grown *Phaseolus vulgaris* to *Rhizobium* inoculation and the quantification of N_2 fixation using ^{15}N . **Pl. Soil**, v.83, p.333-343, 1985.
- ESKEW, D.L.; EAGLESHAM, A.R.J.; APP, A.A. Heterotrophic $^{15}\text{N}_2$ fixation and distribution of newly fixed nitrogen in a rice-flooded soil system. **Pl. Physiol.**, v.68, p.48-52, 1981.
- FEIGIN, A.; KOHL, D.H.; SHEARER, G.; COMMONER, B. Variation in the natural nitrogen-15 abundance in nitrate mineralized during incubation of several Illinois soils. **Soil Sci. Soc. Am. Proc.**, v.38, p.90-95, 1974.
- FIEDLER, R.; PROKSCH, G. Emission spectrometry for routine analysis of nitrogen-15 in agriculture. **Pl. Soil**, v.36, p.371-378, 1972.
- FRIED, M.; DANSO, S.K.; ZAPATA, F. The methodology of measurement of N_2 fixation by non-legumes as inferred from field experiments with legumes. **Can. J. Microbiol.**, v.29, p.1053-1062, 1983.
- GILLER, K.E.; WITTY, J.F. Immobilized ^{15}N fertilizer sources improve accuracy of field estimates of N_2 -fixation by isotope dilution. **Soil Biol. Biochem.**, v.19, p.459-463, 1987.
- HAMILTON, S.D.; SMITH, C.J.; CHALK, P.M.; HOPMANS, P. A model based on measurement of soil and plant ^{15}N enrichment to estimate N_2 fixation by soybean (*Glycine max* L. Merrill) grown in pots. **Soil Biol. Biochem.**, v.24, p.71-78, 1992.
- HARDARSON, G.; DANSO, S.K.A.; ZAPATA, F.; REICHARDT, K. Measurements of nitrogen fixation in fababean at different N fertilizer rates using the ^{15}N isotope dilution and 'A'-value methods. **Pl. Soil**, v.131, p.161-168, 1991.

- HARDARSON, G.; DANSO, S.K.A.; ZAPATA, F. Dinitrogen fixation measurements in alfalfa-ryegrass swards using nitrogen-15 and the influence of the reference crop. **Crop Sci.**, v.28, p.101-105, 1988.
- HARDY, R.W.F.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E.K.; BURNS, R.C. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluations. **Plant Physiol.**, v.43, p.1185-1207, 1968.
- HAUCK, R.D. Nitrogen-isotope-ratio analysis. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R., eds. **Methods of soil analysis: part II, chemical and microbiological properties**. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p.735-779.
- HENZELL, E.F.; MARTIN, A.E.; ROSS, P.J.; HAYDOCK, K.P. Isotopic studies on the uptake of nitrogen by pasture plants. IV. Uptake of nitrogen from labelled plant material by Rhodes grass and siratro. **Aust. J. Agric. Res.**, v.19, p.65-77, 1968.
- HERRIDGE, D.F.; O'CONNELL, P.; DONNELLY, K. The xylem ureide assay of nitrogen fixation: Sampling procedures and sources of error. **J. Exp. Bot.**, v.39, p.12-22, 1988.
- HUREK, T.; REINHOLD, B.; GRIMM, B.; FENDRIK, I.; NIEMANN, E.G. Occurrence of effective nitrogen-scavenging bacteria in the rhizosphere of kallar grass. **Pl. Soil**, v.110, p.339-348, 1988.
- ITO, O.; CABRERA, D.; WATANABE, I. Fixation of dinitrogen-15 associated with rice plants. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.39, p.554-558, 1980.
- JENSEN, E.S.; ANDERSEN, A.J.; THOMSEN, J.D. The influence of seed-borne N in ¹⁵N dilution studies with legumes. **Acta Agric. Scand.**, v.35, p.438-443, 1985.
- JUNK, G.; SVEC, H.J. The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gas from various sources. **Geochim. Cosmochim. Acta**, v.14, p.234-243, 1958.
- KOHL, D.H.; SHEARER, G. Isotopic fractionation associated with symbiotic N₂ fixation and uptake of NO₃- by plants. **Plant Physiol.**, v.66, p.51-56, 1980.
- KUCEY, R.M.N. Contribution of N₂ fixation to field bean and pea uptake over the growing season under field conditions in southern Alberta. **Can. J. Soil Sci.**, v.69, p.695-699, 1989.
- LEDGARD, S.F.; FRENEY, J.R.; SIMPSON, J.R. Variations in natural enrichment of ¹⁵N in the profiles of some Australian pasture soils. **Aust. J. Agric. Res.**, v.22, p.155-164, 1984.
- LEDGARD, S.F.; SIMPSON, J.R.; FRENEY, J.R.; BERGERSEN, F.J. Field evaluation of ¹⁵N techniques for estimating nitrogen fixation in legume-grass associations. **Aust. J. Agric. Res.**, v.36, p.247-258, 1985.

- LEGG, J.O.; SLOGER, C. A tracer method for determining symbiotic nitrogen fixation in field studies. In: KLEIN, E.R.; KLEIN, P.D., ed. **Proceedings of the Second International Conference on Stable Isotopes**. Oak Brook: s.e., 1975. p. 661-666.
- MARIOTTI, A.; GERMON, J.C.; HUBERT, P.; KAISER, P.; LETOLLE, R.; TARDIEUX, A.; TARDIEUX, P. Experimental determination of nitrogen kinetic isotope fractionation: Some principles; illustration for the denitrification and nitrification processes. **Pl. Soil**, v.62, p.413-430, 1981.
- MARIOTTI, A.; MARIOTTI, F.; AMARGER, N.; PIZELLE, G.; NGAMBI, J.M.; CHAMPIGNY, M.L.; MOYSE, A. Fractionnements isotopique de l'azote lors des processus d'absorption des nitrates et de fixation de l'azote atmosphérique par les plants **Physiol. Veg.**, v.18, p.163-181, 1980.
- MARTIN, F.; MAUDINAS, B.; CHEMARDIN, M.; GADAL, P. Preparation of submicrogram nitrogen samples for isotope analysis by the GS1 emission spectrometer. **Int. J. Appl. Rad. Isot.**, v.32, p.215-217, 1981.
- MIRANDA, C.H.B.; BODDEY, R.M. Estimation of biological nitrogen fixation associated with 11 ecotypes of *Panicum maximum* grown in nitrogen- 15 -labeled soil. **Agron. J.**, v.79, p.558-563, 1987.
- MORRIS, D.R.; ZUBERER, D.A.; WEAVER, R.W. Nitrogen fixation by intact grass- soil cores using $^{15}\text{N}_2$ and acetylene reduction. **Soil Biol. Biochem.**, v.17, p.87-91, 1985.
- MULVANEY, R.L. Comparison of procedures for reducing cross-contamination during steam distillations in nitrogen- 15 tracer research. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.50, p.92-96, 1986.
- OHYAMA, T.; KUMAZAWA, K. A simple method for the preparation, purification and storage of $^{15}\text{N}_2$ gas for biological nitrogen fixation studies. **Soil Sci. Pl. Nutr.**, v.27, p.263-265, 1981.
- PAREEK, R.P.; LADHA, J.K.; WATANABE I. Estimating N_2 fixation by *Sesbania rostrata* and *S. cannabina* (syn. *S. aculeata*) in lowland rice soil by the ^{15}N dilution method. **Biol. Fertil. Soils**, v.10, p.77-88, 1990.
- PATTERSON, T.G.; LARUE, T.A. Nitrogen fixation by soybeans: seasonal and cultivar effects, and comparison of estimates. **Crop Sci**, v.23, p.488-492, 1983.
- PEOPLES, M.B.; FAIZAH, A.W.; RERKASEM, B.; HERRIDGE, D.F. **Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field**. Canberra, Australia: ACIAR, 1989. 76p. Monograph 11.

- REEDER, J.D. Errors in concentrating ammonium samples prior to isotope-ratio analysis. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.48, p.695-698, 1984.
- RENNIE, R.J. Quantifying dinitrogen (N_2) fixation in soybeans by ^{15}N isotope dilution: the question of the nonfixing control plant. **Can. J. Bot.**, v.60, p.856-861, 1982.
- RENNIE, R.J. Theoretical errors in sequential N-15 labelling of soil to estimate N_2 fixation by isotope dilution. **Crop Sci.**, v.25, p.891, 1985.
- RENNIE, R.J. Advantages and disadvantages of nitrogen-15 isotope dilution to quantify dinitrogen fixation in field-grown legumes - a critique. In Field Measurement of Dinitrogen Fixation and Denitrification. **Soil Sci. Soc. Am. Spec. Publ.**, v.18, p. 43-58, 1986.
- RENNIE, R.J.; RENNIE, D.A. Techniques for quantifying N_2 fixation in association with nonlegumes under field and greenhouse conditions. **Can. J. Microbiol.**, v.29, p.1022-1035, 1983.
- RUSCHEL, A.P.; HENIS, Y.; SALATI, E. Nitrogen-15 tracing of N-fixation with soil-grown sugar cane seedlings. **Soil Biol. Biochem.**, v.7, p.181-182, 1975.
- SANGINGA, N.; DANSO, S.K.A.; ZAPATA, F.; BOWEN, G.D. Influence of reference trees on N_2 -fixation estimates in *Leucaena leucocephala* and *Acacia albida* using ^{15}N -labelling techniques. **Biol. Fertil. Soils**, v.9, p.341-346, 1990.
- SELLES, F.; FRENEY, J.R.; SIMPSON, J.R. The spatial variability of nitrogen-15 and its relation to the variability of other soil properties. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.50, p.105-110, 1986.
- SHEARER, G.; KOHL, D.H. N_2 -fixation in field settings: estimations based on natural ^{15}N abundance. **Aust. J. Plant Physiol.**, v.13, p.699-756, 1986.
- SHEARER, G.; KOHL, D.H.; CHIEN, S.H. The nitrogen-15 abundance in a wide variety of soils. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.42, p.899-902, 1978.
- SHEARER, G.B.; KOHL, D.H.; COMMONER, B. The precision of determination of the natural abundance of nitrogen-15 in soils, fertilizers, and shelf chemicals. **Soil Sci.**, v.118, p.308-316, 1974.
- SHEARER, G.; KOHL, D.H.; VIRGINIA, R.A.; BRYAN, B.A.; SKEETERS, J.L.; NILSEN, E.T.; SHARIFI, M.R.; RUNDEL, P.W. Estimates of N_2 fixation from variation in the natural abundance of N-15 in Sonoran desert ecosystems. **Oecologia**, v.56, p.365-373, 1983.
- SMITH, C.J.; CHALK, P.M.; HAMILTON, S.D.; HOPMANS, P. Estimating N_2 fixation by field-grown lupins (*Lupinus angustifolius* L.) using soil and plant ^{15}N enrichment. **Biol. Fertil. Soils**, v.13, p.235-241, 1992.

- STEELE, K.W.; WILSON, A.T.; SAUNDERS, W.M.H. Nitrogen isotope ratios in surface and subsurface horizons of New Zealand improved grassland soils. **N.Z. J. Agric. Res.**, v.24, p.167-170, 1981.
- TALBOTT, H.J.; KENWORTHY, W.J.; LEGG, J.C. Field comparison of the nitrogen-15 and difference methods of measuring nitrogen fixation. **Agron. J.**, v.74, p.799-804, 1982.
- TALBOTT, H.J.; KENWORTHY, W.J.; LEGG, J.O.; DOUGLASS, L.W. Soil nitrogen accumulation in nodulated and non-nodulated soybeans: a verification of the difference method by a ^{15}N technique. **Field Crops Res.**, v.11, p.55-67, 1985.
- TURNER, G.L.; BERGERSEN, F.J.; TANTALA, H. Natural enrichment of ^{15}N during decomposition of plant material in soil. **Soil Biol. Biochem.**, v.15, p.495-497, 1983.
- TURNER, G.L.; GAULT, R.R.; MORTHORPE, L.; CHASE, D.L.; BERGERSEN, F.J. Differences in the natural abundance of ^{15}N in the extractable mineral nitrogen of cropped and fallowed surface soils. **Aust. J. Agric. Res.**, v.38, p.15-25, 1987.
- URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.; BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.22, p.105-114, 1992.
- VIERA-VARGAS, M.S.; OLIVEIRA, O.C.; DE SOUTO, C.M.; CADISCH, G.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Use of different ^{15}N techniques quantify the contribution of biological nitrogen fixation to legumes. **Soil Biol. Biochem.** (submetido), 1994.
- VOSE, P.; VICTORIA, R.L. Re-examination of the limitations of nitrogen-15 isotope dilution technique for the field measurement of dinitrogen fixation. In *Field Measurement of Dinitrogen Fixation and Denitrification*. **Soil Sci. Soc. Am. Spec. Publ.**, v.18, p.23-41, 1986.
- WAGNER, G.H.; ZAPATA, F. Field evaluation of reference crops in the study of nitrogen fixation by legumes using isotope techniques. **Agron. J.**, v.74, p.607-612, 1982.
- WATANABE, I. Errors related to the ^{15}N dilution method for estimating nitrogen fixation. In: **STABLE isotopes in plant nutrition, soil fertility, and environmental studies**. Vienna: International Atomic Energy Agency, 1991. p 83-88.
- WATANABE, I.; CHUI, C.Y.; YOSHIDA, T. Estimation of N_2 fixation in soybean and cowpea by using residual ^{15}N . **Soil Sci. Pl. Nutr.**, v.36, p.375-381, 1990.
- WITTY, J.F. Estimating N_2 fixation in the field using ^{15}N -labelled fertilizer: some problems and solutions. **Soil Biol. Biochem.**, v.15, p.631-639, 1983.
- WITTY, J.F.; DAY, J.M. Use of $^{15}\text{N}_2$ in evaluating asymbiotic N_2 fixation. In: **ISOTOPES in biological dinitrogen fixation**. Vienna: International Atomic Energy Agency, 1978. p.135-150.

- WITTY, J.F.; GILLER, K.E. Evaluation of errors in the measurement of biological nitrogen fixation using ^{15}N fertilizer. In: **STABLE isotopes in plant nutrition, soil fertility and environmental studies**. Vienna: International Atomic Energy Agency, 1991. p.59-72.
- WITTY, J.F.; MINCHIN, F.R. Measurement of nitrogen fixation by the acetylene reduction assay; myths and mysteries. In: BECK, D.P.; MATERON, L.A., eds. **Nitrogen fixation by legumes in Mediterranean agriculture**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1988. p.331-344, 1988.
- WITTY, J.F.; RITZ, K. Slow release ^{15}N fertilizer formulations to measure N_2 -fixation by isotope dilution. **Soil Biol. Biochem.**, v.16, p.657-661, 1984.
- WITTY, J.F.; RENNIE, R.J.; ATKINS, C.A. ^{15}N addition methods for assessing N_2 fixation under field conditions. In: SUMMERFIELD, R.J. ed. **World crops: cool season food legumes**. Dordrecht: Kluwer, 1988. p.715-730.
- YOSHIDA, T.; YONEYAMA, T. Atmospheric dinitrogen fixation in the flooded rice rhizosphere as determined by the N-15 isotope technique. **Soil Sci. Pl. Nutr.**, v.26, p.551-559, 1980.

MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO NO SOLO E NOS TECIDOS*Júlio César F. dos Santos¹**Bruno J. R. Alves²***25.1. Introdução**

O fósforo ocorre na natureza nas formas inorgânica e orgânica. Dentre as formas inorgânicas, os fosfatos (PO_4^{2-}) são muito utilizados no crescimento microbiano. Como acontece com outros nutrientes, o P está sujeito à imobilização e à mineralização no solo, dependendo da relação C:P do resíduo em decomposição. A mineralização do P no solo ocorre simultaneamente com a do C e acompanha a mineralização do N. A principal fração de P mineralizável no solo é a biomassa microbiana, que contém até 20 % do P orgânico do solo (Wardle & Hungria, 1994). Algumas associações microbianas, como a das leguminosas com rizóbio, são, muitas vezes, limitadas pelo P, particularmente em solos tropicais (Catellan & Hungria, 1994), diminuindo o potencial de fornecimento de nitrogênio para as plantas. Certamente, por isso, há inúmeros estudos sobre microrganismos que aumentam a disponibilidade de P para as plantas, como é o caso das micorrizas vesículo-arbusculares (Siqueira, 1994). A interpretação de muitos desses estudos, porém, é limitada por problemas metodológicos na determinação dos níveis de P no solo e na planta.

A diagnose da fertilidade do solo, com relação ao fósforo (P), é um dos mais interessantes e desafiadores campos de aplicação da ciência do solo. A pesquisa tem dirigido seus esforços para conseguir um procedimento de rotina capaz de separar as formas de P disponíveis para as plantas. A principal dificuldade tem sido definir um método para determinar o P que seja capaz de predizer a resposta das plantas em solos sob ampla variação de condições pedoclimáticas, químicas e físicas.

Alguns extratores utilizados na avaliação da disponibilidade de fósforo exercem uma ação destrutiva sobre a matriz do solo, dissolvendo formas de P que não são prontamente disponíveis para as plantas e produzindo, deste modo, resultados inconsistentes. Por outro lado, a extração com resinas de troca aniônica tem-se mostrado como uma alternativa capaz de reproduzir, em laboratório, o processo de absorção de fósforo pelas plantas, por retirar apenas a fração lábil (Amer et al., 1955; Bowman et al., 1978).

¹ Engenheiro-agrônomo, M.Sc., curso de pós-graduação no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) e Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), Cx. Postal 1331, CEP 86001-970, Londrina, PR.

² Engenheiro-agrônomo, M.Sc., curso de pós-graduação na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (CNPAB), km 47 da antiga Rio-São Paulo, CEP 23851-970, Itaguaí, RJ.

Embora muitos trabalhos indiquem a superioridade do método da resina em correlacionar a resposta da planta com os níveis de P determinados (Grande et al., 1986; Rajj et al., 1986), ele é pouco utilizado como procedimento de rotina, devido à preferência por métodos mais simples. No Brasil, dois terços dos laboratórios utilizam a solução Mehlich-1 para determinar P, enquanto o outro um terço extrai o elemento do solo com resinas de troca de íons (Rajj et al., 1994).

No que se refere à pesquisa, além dos métodos já citados, o extrator Bray-1 (P solúvel em fluoreto ácido diluído) está entre os mais utilizados. Ele utiliza flúor para aumentar a extração de fosfatos de Fe e Al disponíveis para as plantas (Bray & Kurtz, 1945). Outros métodos, como o de Olsen (P solúvel em bicarbonato de sódio) e a determinação de P no extrato de CaCl_2 , têm sido utilizados com menor frequência.

Neste capítulo, serão expostos os principais métodos, para extração e determinação das formas de P no solo e material vegetal, que atualmente estão em uso no Brasil, sem no entanto constituir uma revisão exaustiva sobre o assunto.

25.2. Métodos de Extração

25.2.1. Fósforo Total no Solo

Na maioria dos solos brasileiros, a fração argila é constituída por diferentes proporções dos minerais caulinita, gibbsita, hematita e goethita (Resende, 1976). Esses minerais são caracterizados pela alta capacidade de adsorver fósforo (Lopes, 1983; Resende et al., 1988), principalmente os óxidos de Fe e Al (Juo & Fox, 1977). Assim, mesmo em muitos casos em que a quantidade total de P for elevada, a maior parte deste ocorre em formas de baixa solubilidade, principalmente P-Fe e P-Al ocluídos, não assimiláveis pelas plantas.

Portanto, a análise do teor de P total do solo requer a conversão de materiais insolúveis a formas solúveis, que são as formas adequadas para os procedimentos de determinação colorimétrica. Os dois métodos mais usados para a extração de P total do solo são a digestão com HClO_4 (ácido perclórico) e a fusão com Na_2CO_3 . Os resultados obtidos por ambos os métodos são bastante controversos, apresentando valores relativos de extração de P, maiores ou menores, de acordo com o solo avaliado (Olsen & Sommers, 1986). Neste caso, optou-se pela apresentação do método de digestão com HClO_4 , por ser mais simples e adaptável, como um procedimento de rotina.

25.2.1.1. Método de digestão

Reagentes

- a. ácido perclórico (HClO_4), 60 %;
- b. solução padrão de fosfato: dissolva 0,4393 g de KH_2PO_4 em água destilada e dilua a solução para um litro. Esta solução contém 100 μg de P/mL. Prepare soluções contendo 10 μg e 1 μg de P/mL pela diluição de alíquotas em água destilada.

Procedimento

Misture, em frasco volumétrico ou erlenmeyer de 250 mL, 2,0 g de solo finamente moído (0,5 mm) com 30 mL HClO₄ 60 %. Faça a digestão da mistura, em temperatura equivalente a poucos graus abaixo do ponto de ebulição, sobre uma placa quente, até que a cor escura, devido à matéria orgânica, desapareça. Continue aquecendo, na temperatura de ebulição, por mais 20 min. Neste estágio, será desprendida grande quantidade de fumaça branca, que é proveniente da evaporação do HClO₄. O material insolúvel torna-se claro. Se necessário, adicione 1 ou 2 mL de HClO₄ para soltar qualquer partícula escura que tenha aderido aos lados do frasco. Se a amostra apresentar teor elevado de matéria orgânica, adicione 20 mL de HNO₃ e aqueça, o que provocará oxidação da amostra. Adicione, então, o HClO₄. A digestão total com HClO₄ normalmente requer 40 min. Esfrie a mistura. Adicione água destilada para obter o volume de 250 mL e misture. Espere até que o material sólido sedimente e retire, então, uma alíquota para a análise.

Pipete, em um frasco volumétrico de 50 mL, uma alíquota que contenha 0,05 a 1,0 mg de P da solução. Utilize um dos métodos indicados para a determinação de P.

25.2.2. Fósforo Orgânico do Solo

O P orgânico (PO) representa um importante reservatório de P para o solo, variando de 20% a 80% do P total (Dallal, 1977), o que evidencia sua importância no ciclo do P e nutrição de plantas (Dallal, 1977; Anderson, 1980; Machado et al., 1993). Procedimentos indiretos são usados para estimar o P orgânico total em solos. Os métodos atualmente mais usados podem ser divididos em duas categorias:

- 1- extração (Mehta et al., 1954; Anderson, 1960; Bowman, 1989);
- 2- ignição (Saunders & Williams, 1955; Walker & Adams, 1958).

Os métodos de extração envolvem o tratamento do solo com ácidos, bases, ou ambos, seguido pela determinação de ortofosfato (OP) no extrato antes e após a oxidação da matéria orgânica, ou seja:

$$PO = OP \text{ total no extrato} - OP \text{ inorgânico no extrato}$$

Os métodos de ignição utilizam baixa ou alta temperatura para oxidar a matéria orgânica antes da extração do OP total. Uma amostra não incinerada é, concomitantemente, submetida à extração com ácido para determinar o P inorgânico, ou seja:

$$PO = OP \text{ extraído da amostra com ignição} - OP \text{ da amostra sem ignição.}$$

Condrón et al. (1990) fizeram uma avaliação crítica dos métodos para determinação do P-orgânico total em solos tropicais. Foram avaliados o método de ignição Saunders-Williams (Saunders & Williams, 1955; Walker & Adams, 1958), o método de extração Anderson-Mehta (Anderson, 1960) e o método de extração Bowman (Bowman, 1989). Os resultados indicaram que o método Saunders-Williams superestima o conteúdo de P orgânico, apesar de ser um procedimento muito mais simples. Em geral, houve pequena diferença entre as quantidades de P orgânico obtidas pelos métodos Anderson-Mehta e Bowman.

No entanto, ambos os métodos, extração e ignição, apresentam fontes de erros (Olsen & Sommers, 1986). Os métodos de extração apresentam duas fontes principais de erro: a extração incompleta do P orgânico e a hidrólise do P orgânico durante a extração. Por outro lado, o método de ignição está sujeito a um número maior de erros do que os procedimentos de extração: 1) tempo de contato e concentração de H_2SO_4 para extrair P de amostras incineradas e não incineradas; 2) mudança no teor P inorgânico extraível em meio ácido, induzidas pela alta temperatura; 3) hidrólise ácida durante o tratamento das amostras não incineradas; 4) volatilização de P em temperaturas superiores a $400^\circ C$; e 5) extração de P inorgânico retido pela matéria orgânica. Associado a isto, em ambos os métodos, soma-se o erro inerente de um método analítico em que o resultado final é obtido por diferença.

Diante disso, pode-se dizer que não existe um método padrão para determinar P orgânico em solos. O método de ignição, porém, parece ser mais adequado para análises de rotina e, também, quando o objetivo do trabalho é o de comparar mudanças nos teores de P orgânico entre tratamentos de solo e um controle (Olsen & Sommers, 1986).

25.2.3. Fósforo Disponível

Antes do surgimento do método de fracionamento das formas inorgânicas de fósforo (Chang & Jackson, 1957), vários extratores utilizados para avaliar a fertilidade do solo foram desenvolvidos empiricamente (Thomas & Peaslee, 1973). Porém, foi somente com os resultados de Chang & Jackson (1957) que o modo de ação dos extratores passou a ser conhecido (Fixen & Grove, 1990). A metodologia descrita por Chang & Jackson (1957) separa as formas de P solúveis em água das formas ligadas a Ca, Fe e Al, o que auxilia no entendimento da interação química entre o extrator e o solo quando e/ou a fonte de P e as características do solo variam.

Os extratores podem liberar P do solo através da combinação, ou não, de quatro mecanismos: dissolução ácida, troca aniônica, complexação catiônica e hidrólise catiônica (Kamprath & Watson, 1980). Deste modo, o P disponível às plantas, avaliado por diferentes extratores, inclui diferentes proporções de P- H_2O , P-Ca, P-Al e P-Fe. As formas ligadas a Fe e Al são as principais fontes de P em alguns solos brasileiros (Barbosa Filho et al., 1987).

Em relação ao solo, os fatores relacionados à capacidade tampão (Gonçalves et al., 1985, 1989; Lins & Cox, 1989; Silva & Braga, 1992; Villani et al., 1993) são os que apresentam melhor correlação com o teor de P disponível e com a redução desse após a aplicação de fertilizantes (Couto et al., 1987; Gonçalves et al., 1989).

Em relação às características dos extratores, o duplo ácido, Mehlich-1, apesar de ser o mais utilizado, não é recomendado para solos calcários, nem para solos ácidos contendo fosfato de rocha recentemente aplicado. Nestas condições, ele extrai teores mais elevados de P do que os realmente disponíveis para as plantas (Sanzonevicz et al., 1987). Isso ocorre pela extração preferencial de P-Ca que, no entanto, têm seus teores reduzidos com o tempo após a aplicação do fertilizante (Couto et al.,

1987; Gonçalves et al., 1989). Apesar disso, o método é adequado para solos sem adubação e para solos que receberam adubos fosfatados solúveis (Gonçalves et al., 1989; Smyth & Cravo, 1990).

Isto já não ocorre com os extratores Bray-1 e Olsen (Barbosa Filho et al., 1987; Sanzonowicz et al., 1987), possivelmente devido à extração preferencial de P-Al e P-Fe (Novelino et al., 1985; Barbosa Filho et al., 1987). Estas formas têm seus teores bastante elevados, à medida que aumenta a solubilização do fósforo natural, causando, conseqüentemente, diminuição nos teores de P-Ca (Couto et al., 1987; Novelino et al., 1985) e redução nos teores de P pelo Mehlich-1.

O P extraído pela resina parece ser menos influenciado, em relação aos outros métodos, pelo poder tampão do solo e pelo tempo decorrido após a incubação do solo com fertilizantes (Silva & Braga, 1992). Isto ocorre porque o P-resina representa a fração lábil do solo (Amer et al., 1955), enquanto o P extraído por outros extratores representa a fração lábil e uma parte da fração não lábil do solo (Novelino et al., 1985).

Bons resultados têm sido obtidos pelo método de extração em solução de CaCl_2 (0,01 M), havendo boa correlação com a disponibilidade de P para as plantas (Gonçalves et al., 1989). Em alguns casos, porém, o método é limitado pelas pequenas quantidades de fósforo recuperado. Recentemente, porém, o método de determinação com verde-malaquita, mais sensível do que os métodos comumente utilizados, surge como opção para superar este problema metodológico. Resta, contudo, validar o método em nossas condições.

25.2.3.1. Fósforo extraível em resina aniônica (Raij & Quaggio, 1983)

Princípio

- 1-transferência de fósforo da amostra de solo para uma resina trocadora de ânions, em meio aquoso;
- 2-separação da resina e extração do elemento da resina com solução ácida de cloreto de sódio.

Aparelhagem

Os aparelhos aqui indicados são utilizados para análise de muitas amostras, mas podem ser substituídos por alternativas mais simples.

- a. dispensador para 25 mL;
- b. aparelho separador de resina, para separar a resina do solo em operação realizada em série;
- c. painel de recuperação de resina;
- d. agitador horizontal com movimento circular, com capacidade de velocidade mínima de 220 rpm.

Reagentes e soluções

- a. água destilada deionizada - empregá-la em todas as operações envolvendo preparo de soluções, recuperação da resina e lavagem final de vidraria;
- b. resina trocadora de ânions tipo base forte (tipo Amberlite IRA-400);

- c. solução de cloreto de amônio (1 N) - dissolver 53,5 g de NH_4Cl por litro de solução. Usar reagente isento de fósforo (p.a., pró-análise, para análise);
- d. solução de ácido clorídrico (1 N) - diluir 86 mL de HCl p.a. por litro de solução;
- e. solução de bicarbonato de sódio 1 N - dissolver 84 g de NaHCO_3 p.a. por litro de solução, preparando-a no dia da análise. Não deixar o recipiente aberto, para evitar perdas de CO_2 e elevação de pH;
- f. solução de cloreto de sódio (1 N) em ácido clorídrico (0,1 N) - preparar com 58,4 g de NaCl p.a. e 8,6 mL de HCl concentrado p.a. por litro de solução.

Pré-condicionamento da resina

O pré-condicionamento da resina é necessário para dar-lhe condições adequadas de expansão, remover seus pedaços não consolidados em esferas e saturar possíveis pontos internos das esferas com elementos que, por vezes, são retidos de maneira irreversível em resinas não tratadas. Nesta fase, não há necessidade de utilizar drogas puras para análise.

A resina é deixada em solução ligeiramente ácida, contendo sais de fósforo, que são adicionados na base de um miliequivalente de sais por centímetro cúbico de resina, por duas ou três semanas, agitando-se ocasionalmente. A resina é transferida para um tubo grande do painel de recuperação de resinas, percolando lentamente várias soluções, de acordo com a técnica de lavagem descrita a seguir: para cada volume de resina passar, em seqüência, 5 volumes de água e 5 volumes de HCl (1 N). Repetir duas vezes. A seguir, passar 10 volumes de NH_4Cl (1 N), desta vez utilizando reagente para análise, e um volume de água. Após esse procedimento, a resina está pronta para o preparo para as análises, e deve ser guardada em um frasco identificado como resina recuperada. Nunca se deve deixar a resina secar, pois ela pode perder as propriedades de expansão.

Técnica de lavagem da resina

A lavagem da resina, em tudo de vidro, deve ser feita de forma a manter sempre um fluxo saturado de solução. Para isso, transferi-la, com solução, para um tubo do painel de recuperação de resina, deixando uma camada de líquido sobre ela, o que se consegue regulando, de forma lenta, o nível de saída do líquido. A operação de lavagem leva várias horas, o que é essencial para permitir uma boa troca das soluções na parte interna das esferas de resina.

Recuperação da resina

Depois de usada, a resina é recolhida em béquer e lavada, imediatamente, cinco vezes com água destilada, para remover grande parte dos sais, bem como os ciscos e as partículas de resina que não decantam com facilidade. Pela sua transferência de um béquer para outro, com auxílio de um jato de água, separa-se também a resina da areia, que fica na parte inferior. A resina pode, assim tratada, ser guardada, acumulando material de vários dias de análise, para proceder à recuperação uma vez por semana.

Preparo da resina para uso

Prepara-se o suficiente para o uso diário. Para cada volume de resina, preparar cinco volumes de NaHCO_3 (1 N). Em um copo, colocar a resina e cerca de 1/3 da solução de bicarbonato. Deixar em contato por pelo menos uma hora, agitando ocasionalmente até não saírem mais bolhas de CO_2 . Transferir a resina para o tubo de percolação e promover a passagem do restante de NaHCO_3 , o que deve levar algumas horas. Passar, lentamente, 20 volumes de água destilada deionizada. A resina deve ser usada imediatamente. É conveniente iniciar o preparo da resina com NaHCO_3 na véspera, deixando apenas a etapa de lavagem com água para o dia da análise.

Procedimento de extração

Transferir $2,5 \text{ cm}^3$ de terra para frasco de plástico de 80 mL, provido de tampa. Acrescentar 25 mL de água destilada e uma bolinha de vidro. Fechar o frasco e agitar durante 15 min para desagregar o solo. Retirar a bolinha e acrescentar $2,5 \text{ cm}^3$ de resina, medida com cachimbo provido de um fundo de malha de poliéster. Fechar o frasco e agitar, durante 16 horas, em agitador com movimento circular-horizantal, a uma velocidade de 220 rpm. Deve-se aproveitar o período noturno para a agitação.

No dia seguinte, transferir, com um jato de água, a suspensão para peneira (ou série de peneiras, se for usado o separador de resinas) com malha de poliéster de abertura de 0,4 mm. Lavar a resina na menor quantidade possível de água, até que a argila pare de sair. Virar a peneira sobre o funil (ou série de funis, no caso de separador de resinas), tendo por baixo um frasco cilíndrico de plástico de 100 mL de capacidade. Transferir a resina da peneira para o frasco de 100 mL contendo 50 mL da solução NaCl (1 N), e HCl (0,1 N). Pode-se usar, na operação, um dispensador para 25 mL.

Deixar o extrato de NaCl (1 N) em HCl (0,1 N) em contato com a resina por cerca de 30 min, para permitir a saída de gás. Fechar os frascos e agitar por uma hora a 220 rpm. O extrato está pronto para a determinação de fósforo.

Comentários

- a. este método, com a utilização de resina de troca de cátions, como concebido pelos autores, permite também a extração de cálcio, magnésio e potássio. Aqui, porém, isto foi omitido;
- b. é de grande importância proceder às lavagens da resina, com as diferentes soluções, permitindo bastante tempo de contato para estabelecimento do equilíbrio;
- c. nas agitações, é importante que o solo e a resina estejam em constante movimento, para acelerar a transferência dos íons do solo para a resina;
- d. as operações de separação da resina do solo e extração do elemento da resina serão aceleradas se for usado o aparelho separador de resinas, desenvolvido na Seção de Fertilidade do Solo do Instituto Agrônômico do Paraná.

25.2.3.2. Fósforo solúvel em ácido clorídrico e sulfúrico diluídos (Mehlich-1) (Nelson et al., 1953)

Princípio

Em solos com alta capacidade de adsorção de fosfatos, a mistura de ácidos diluídos é mais efetiva para dissolver formas inorgânicas de P ligadas a Ca, Al e Fe, em ordem decrescente de dissolução, que seriam assimiláveis pelas plantas.

Reagentes

- solução extratora: adicione 12 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) e 73 mL de ácido clorídrico concentrado (HCl) em 15 L de água destilada. Dilua a solução para 18 L com água destilada. A concentração dessa solução extratora é de, aproximadamente, 0,05 N (HCl) e 0,025 N (H_2SO_4);
- solução padrão de fosfato: dissolva 0,1098 g de KH_2PO_4 em 500 mL de solução extratora e dilua a solução para um litro com solução extratora. Esta solução contém 25 ppm de P.

Procedimento

Adicione 5 g de solo (previamente peneirado a 2 mm) e 50 mL da solução extratora (relação 1:10) em um frasco de 125 mL. Agite o frasco por 5 min a 220 rpm em um agitador mecânico. Após agitar, filtre a solução em papel de filtro Whatman nº. 40 e retire uma alíquota para análise. Alguns laboratórios deixam o extrato em repouso durante a noite, o que dispensa a filtragem. Prepare uma curva padrão a partir de alíquotas, na faixa de 0,5 mL a 4 mL, da solução padrão. Utilize um dos métodos de determinação indicados.

25.2.3.3. Fósforo solúvel em fluoreto ácido diluído (Bray-1) (Bray & Kurtz, 1945)

Princípio

A combinação de HCl e fluoreto de amônio (NH_4F) visa remover formas de P facilmente solúveis em ácido, principalmente fosfatos de cálcio e uma porção dos fosfatos de Fe e Al. O NH_4F dissolve fosfatos de Fe e Al por complexação destes metais, em solução ácida.

Reagentes

- solução extratora: adicione 15 mL de fluoreto de amônio (NH_4F), 1 N, e 25 mL de ácido clorídrico (HCl), 0,5 N, em 460 mL de água destilada. Esta solução contém NH_4F (0,03 N) e HCl (0,025 N) e pode ser mantida em frasco de vidro por mais de um ano;
- solução padrão de fosfato: dissolva 0,4393 g de KH_2PO_4 em 500 mL de água destilada e dilua a solução para 1 L. Esta solução contém 100 μg de P/mL. Prepare soluções contendo 1 μg e 10 μg de P/mL, diluindo alíquotas adequadas em água destilada.

Procedimento

Pese 1 g de solo em um frasco e adicione 10 mL da solução extratora (relação 1:10). Agite por 5 min. Após sedimentar ou filtrar a solução em papel de filtro Whatman nº. 40, retire uma alíquota para análise. Prepare uma curva padrão incluindo 2 mL da solução extratora na faixa de 0,1 µg a 1 µg de P/mL.

25.2.3.4. Fósforo solúvel em bicarbonato de sódio (Olsen) (Olsen et al., 1954)

Princípio

O fósforo do solo é extraído a pH 8,5 o que, em solos ácidos contendo fosfatos de Fe e Al, aumenta a concentração de P em solução. Reações de precipitação secundária são reduzidas a um mínimo, devido às concentrações de Al, Ca e Fe permanecerem em níveis baixos na presença deste extrator.

Reagentes

- a. solução de bicarbonato de sódio, (NaHCO_3), 0,5 M: ajuste o pH dessa solução para 8,5 com hidróxido de sódio (NaOH), 1 M. Adicione óleo mineral para evitar a exposição da solução ao ar. Prepare uma solução fresca, antes de usar, se ela estiver armazenada por mais de um mês em frasco de vidro. Para armazenar a solução por períodos superiores a um mês, utilize frasco de polietileno, mas verifique o pH da solução mensalmente;
- b. ácido sulfúrico (H_2SO_4), 5 N: adicione 141 mL de H_2SO_4 concentrado em 800 mL de água destilada. Esfrie a solução e dilua para 1 L com água destilada;
- c. solução padrão de fosfato: dissolva 0,4393 g de KH_2PO_4 em 500 mL de água destilada, dilua a solução para 1 L. Esta solução contém 100 µg de P/mL. Prepare soluções contendo 1 µg a 10 µg de P/mL, diluindo alíquotas adequadas em água destilada.

Procedimento

Adicione 5 g de solo em 100 mL da solução extratora em erlenmeyer de 250 mL (relação 1:20). Agite o frasco por 20 min. Espere sedimentar ou filtre a solução em papel de filtro Whatman nº.40. Coloque uma alíquota de 5 mL do extrato em um frasco volumétrico de 25 mL e acidifique com H_2SO_4 (5 N) até atingir pH 5,0. Isso pode ser feito tomando-se 5 mL da solução extratora e determinando a quantidade de ácido requerido para levar a solução a pH 5, pelo uso do indicador *p*-nitrofenol. Adicione, então, a quantidade de ácido necessária para todas as outras amostras. Prepare uma curva padrão pipetando alíquotas da solução padrão na faixa de 2 µg a 25 µg de P em frascos volumétricos de 25 mL. Adicione 5 mL da solução extratora em cada frasco.

25.2.3.5. Fósforo solúvel em CaCl_2 0,01 M

Princípio

Em solos com baixa disponibilidade de P, há um aumento na absorção de P pelas raízes, resultante do aumento na concentração de P na solução, mas que ocorre até um determinado limite. O objetivo deste método é determinar, como um índice de disponibilidade, a concentração de P em solução que limita o crescimento das plantas.

Reagentes

a. cloreto de cálcio 0,01 M: dissolva 1,109 g de CaCl_2 em 1 L de água destilada.

Procedimento

Adicione 8 g de solo seco ao ar em 20 mL de solução salina, em um frasco adequado para agitação contínua. Após 15 min de contato, agite por 30 min a 220 rpm. Centrifugue ou filtre (Whatman nº. 40) até obter uma extrato livre de partículas minerais. Utilize o método de determinação com verde-malaquita.

25.3. Métodos de Preparo de Amostras de Tecidos

Existem, essencialmente, dois métodos de preparo de amostra de tecidos: 1) a digestão via úmida; e 2) a incineração via seca. A digestão úmida é a destruição do material orgânico por alta temperatura (em torno de 300° C) e digestão ácida. Os ácidos comumente usados são o H_2SO_4 , HNO_3 e HClO_4 , sozinhos ou em combinação. O ácido nítrico é normalmente incluído, na maioria das misturas de digestão, com adição de H_2SO_4 , para aumentar a temperatura. A adição de HClO_4 , ou H_2O_2 a 30 %, acelera a digestão. No Brasil, praticamente todos os laboratórios usam a digestão nitroperclórica e incineração via seca no preparo de extratos para macro e micronutrientes, e a digestão com ácido sulfúrico para nitrogênio total (Rajj et al., 1994).

25.3.1. Digestão Nitroperclórica

Reagentes

a. mistura nitroperclórica (4:1): misturar quatro partes de ácido nítrico concentrado e uma parte de ácido perclórico concentrado, em frasco plástico de polipropileno, homogeneizando bem.

Procedimento

Pesar 500 mg de tecido seco e moído (20 mesh) em um béquer ou tubo de digestão. Adicionar 7 mL da mistura nitroperclórica. Colocar o béquer sobre uma placa quente ou o tubo de digestão no bloco digestor. Regular a temperatura da placa ou bloco a 50° C. Após 30 min, aumentar a temperatura para 100° C e deixar que a fumaça âmbar intensa se dissipe. Ao verificar fumaça branca, aumentar para

170° C. Deixar digerindo por 2-3 horas, ou até a mistura ficar clara. Caso, após este período, a coloração ainda for escura, adicionar mais mistura nitroperclórica e deixar por mais tempo digerindo. Diluir a amostra com água pura para 30 mL. Agitar a amostra para a completa homogeneização. A digestão está pronta para análise.

Obs: o ácido perclórico não tem poder oxidante à temperatura ambiente. Quando em ebulição, porém, é o maior oxidante que se conhece e, em contato com substâncias susceptíveis à oxidação, pode reagir violentamente, provocando fogo e explosões, o que é evitado pela elevação lenta da temperatura. O superaquecimento também pode ocasionar perdas de fósforo por volatilização.

25.3.2. Incineração Via Seca

Procedimento

Pese 500 mg de tecido seco e moído (20 mesh) em cadinho de quartzo ou porcelana. Coloque o cadinho na mufla e regule para que a temperatura de 500° C seja atingida em, aproximadamente, 2 horas. Deixe o material incinerando por 4 a 8 horas. Remova o cadinho da mufla e deixe esfriar. Adicione 10 mL de ácido diluído (300 mL de HCl e 100 mL de HNO₃ em 1 L de água pura) para dissolver as cinzas. O cadinho e o conteúdo podem ser aquecidos para ajudar na dissolução das cinzas. Deixe o material em suspensão sedimentar. A solução está pronta para análise, podendo ser diluída caso haja necessidade.

25.4. Procedimentos para a Análise de Fósforo em Extratos de Solo e Planta

25.4.1. Introdução

A determinação espectrofotométrica do fósforo baseia-se na formação de espécies de cor azul do complexo fosfomolibdico, pela redução dos íons molibdato em meio ácido, em reação mediada por catalisadores. No Brasil, atualmente, são utilizados três métodos com base neste princípio: 1) Murphy & Riley (1962); 2) Braga & Defelipo (1974); 3) Raij & Quaggio (1983), sendo esta última uma modificação do método de Murphy & Riley (1962). As principais vantagens deste método são sua sensibilidade (5 µmol a 40 µmol de P/L) e a estabilidade da cor azul por longos períodos.

Estes métodos utilizam, como redutor, o ácido ascórbico e, para atingir a acidez do meio, o ácido sulfúrico. Os métodos diferem, porém, quanto ao catalisador utilizado. Os métodos 1 e 3 utilizam o tartarato duplo de antimônio e potássio e o método 2, o subcarbonato de bismuto.

Existe, ainda, um outro método utilizado na determinação de P total em tecido de plantas (Sarruge & Haag, 1974). Este baseia-se na formação da cor amarela do sistema vanadomolibdofosfórico. O método do vanadomolibdato de amônio apresenta sensibilidade para concentrações de 30 µmol a 600 µmol de P/L, o que corresponde a 10% da sensibilidade dos métodos baseados na redução do fosfomolibdato. Essa menor sensibilidade seria compensada pela boa estabilidade, rapidez de condução, e praticamente ausência de interferências em condições normais de análise de plantas.

Outro método foi desenvolvido para a determinação de concentrações de fósforo seis vezes menores do que daquelas determinadas pelo método de Murphy & Riley (1962). Este método é baseado na formação do complexo fosfomolibdato, em baixo pH, com verde malachita. O método tem sido utilizado para a determinação de P inorgânico em águas naturais (Fernández et al., 1985) e poderia ser uma alternativa para a determinação de P inorgânico solúvel em extratos de solo com CaCl_2 (Ohno & Zibilke, 1991), que tem mostrado boas correlações com a resposta da planta (Gonçalves et al., 1989). Sua utilização é limitada, porém, pelos métodos de determinação comumente usados, que não são suficientemente sensíveis à quantidade de P recuperado, a menos que demorados procedimentos de pré-concentração sejam realizados.

25.4.2. Métodos de Determinação

25.4.2.1. Método de Murphy & Riley (1962)

Reagentes

- a. ácido sulfúrico (5 N): diluir 70 mL de ácido sulfúrico concentrado em 500 mL;
- b. molibdato de amônio: dissolver 20 g de molibdato de amônio em água e diluir para 500 mL;
- c. tartarato duplo de antimônio e potássio: dissolver 0,2743 g de tartarato duplo de antimônio e potássio em água destilada e diluir para 100 mL;
- d. ácido ascórbico (0,1 M): dissolver 1,32 g de ácido ascórbico em 75 mL de água. Esta solução, se possível, deve ser preparada no dia do uso, já que o ácido ascórbico se oxida facilmente;
- e. mistura de reagentes: misturar 125 mL do ácido sulfúrico 5 N e 37,5 mL de molibdato de amônio. Adicionar 75 mL da solução de ácido ascórbico e 12,5 mL da solução de tartarato duplo de antimônio e potássio. Esta solução deve ser preparada apenas quando for usada, pois ela não pode ser mantida por mais de 24 horas.

Procedimento

Pipetar uma alíquota de 40 mL do extrato de solo ou material vegetal em um frasco de 50 mL calibrado, adicionar 8 mL da mistura de reagentes, completar o volume com água e misturar bem. Após não menos do que 10 min, proceder à leitura da densidade óptica da solução em 882 nm. Determinar o branco da mesma maneira, usando água destilada.

25.4.2.2. Método de Murphy & Riley (1962) modificado por Raij & Quaggio (1983)

Objetivo

Determinar o fósforo em extratos ácidos de cloreto de sódio, provenientes de sua extração de solos pela resina trocadora de íons.

Reagentes

- a. solução estoque de molibdato de amônio: dissolver 20 g de molibdato de amônio em 200 mL de água destilada. Aquecer, se necessário, até cerca de 60° C, para obter uma solução límpida, resfriando em seguida. Dissolver 700 mg de tartarato duplo de antimônio e potássio na solução de molibdato. Adicionar, lentamente, 320 mL de ácido sulfúrico concentrado, resfriando sob água corrente. Resfriar e completar o volume a um litro. Esta solução pode apresentar cor azulada, mas ficará incolor ao ser diluída;
- b. solução diluída de molibdato: preparar solução diluída de molibdato no dia de usá-la, diluindo 50 mL da solução estoque de molibdato a 1 L, acrescentando 1 g de ácido ascórbico.

Procedimento

Diluir 4 mL do extrato de NaCl 1 N + HCl 0,1 N, em 16 mL da solução diluída de molibdato. Após 15 min, proceder às leituras em comprimento de onda de 720 ou 885 nm. Traçar curva padrão e determinar o fator para converter as leituras em μg de P/cm³ de solo.

25.4.2.3. Método de Braga & Defelipo (1974)

Reagentes

- a. solução sulfomolibdica: em balão volumétrico de 100 mL, adicionar 100 mg de subcarbonato de bismuto, 20 mL de água e, com agitação 13,8 mL de ácido sulfúrico concentrado. O calor desenvolvido com a adição do ácido é suficiente para dissolver o subcarbonato de bismuto. Depois que o balão esfriar, adicionar, lentamente, e com agitação, solução aquosa contendo 2 g de molibdato de amônio. Completar o volume com água.

Procedimento

Pipetar uma alíquota de 45 mL do extrato de solo ou material vegetal em um frasco de 50 mL. Para formação do complexo fosfomolibdico, tomar 5 mL da solução sulfomolibdica. Antes da leitura no comprimento de onda de 725 nm, adicionar 40 mg de vitamina C. O método permite leituras a partir de 5 min até 24 horas após adicionados os reagentes.

25.4.2.4. Método de Sarruge & Haag (1974)

Reagentes

- a. molibdato de amônio (5 %): dissolver 50 g de molibdato de amônio em 1 L de água destilada;
- b. vanadato de amônio (0,25 %): dissolver 2,5 g de vanadato de amônio em 500 mL de água fervente. Esfriar, juntar 350 mL de ácido nítrico concentrado, completar até 1 L e guardar em frasco escuro;
- c. mistura de reagentes: misturar, pouco antes de usar, as soluções de molibdato de amônio e vanadato de amônio em volumes iguais;

- d. padrão de fósforo: solução estoque de 80 μg de P/mL. Pesar 0,3509 g de KH_2PO_4 , seco em estufa e dissolver em 300 mL de água destilada, 10 mL de H_2SO_4 10 N (280 mL de H_2SO_4 concentrado em 1L). Completar o volume até 1 L;
- e. padrões de trabalho: 0, 5, 10, 15 e 20 mL da solução estoque de P, mais 4 mL de H_2SO_4 10 N. Completar o volume a 100 mL.

Procedimento

Pipetar 2 mL dos extratos (1g de matéria seca em 100 mL de volume) e 3 mL de água destilada em tubos de ensaio. Em outros tubos, pipetar 5 mL dos padrões. Juntar, em cada tubo, 2 mL do reagente misturado e agitar. Após repouso por 5 min, ler em colorímetro com filtro azul (420 nm). A cor é estável por várias horas.

25.4.2.5. Método verde-malaquita (Ohno & Zibilske, 1991)

Reagentes

- a. molibdato de amônio: dissolver 18 g de molibdato de amônio em 300 mL de ácido sulfúrico concentrado e completar o volume até 1 L;
- b. solução de álcool polivinil (APV-3,5 g/L; 100 % hidrolisado; peso molecular 50.000) e verde-malaquita: aquecer água deionizada até atingir 80°C. Adicionar o APV e agitar até completa dissolução. Resfriar a solução até à temperatura ambiente e adicionar 350 mg de verde-malaquita. Completar o volume até 1 L;
- c. ambas as soluções são estáveis à temperatura ambiente.

Procedimento

Transferir um mL da solução de CaCl_2 , 0,01 M, para tubo de cultura com tampa, adicionar 0,2 mL da solução de molibdato de amônio e misturar. Após 10 min, adicione 0,2 mL da solução de APV e verde-malaquita. Misturar. Após 30 min, ler a absorvância no comprimento de onda de 630 nm.

Obs.: É importante que os padrões sejam preparados em CaCl_2 (0,01 M), pois este pode aumentar em até 5 % a absorvância.

25.5. Considerações Finais

Existem inúmeras limitações para a determinação dos teores de P no solo e nas plantas. Aqui foram expostos, porém, os principais métodos que hoje são usados no Brasil. Adaptações podem ser feitas em cada laboratório, desde que a eficiência das adaptações seja confirmada. Nos estudos de microbiologia do solo, particularmente nas áreas de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares e nos estudos de biomassa microbiana, essas análises são de grande importância.

25.6. Referências Bibliográficas

- AMER, F.; BOULDIN, D. R.; BLACK, C. A.; DUKE, F. R. Characterization of soil phosphorus by anion exchange resin adsorption and ^{32}P equilibration. **Pl. Soil**, v.6, p.391-408, 1955.
- ANDERSON, G. Factors affecting the estimation of phosphate esters in soil. **J. Sci. Food Agric.**, v.11, p.497-503, 1960.
- ANDERSON, G. Assessing organic phosphorus in soils. In: KHASAWNEH, F. E.; SAMPLE, E. D.; KAMPRATH, E.J. ed. **The role of phosphorus in agriculture**. Madison: American Society of Agronomy, 1980. p.411-432.
- BARBOSA FILHO, M. P.; KINJO, T.; MURAOKA, T. Relações entre fósforo “extraível”, frações inorgânicas de fósforo e crescimento do arroz em função de fontes de fósforo, calagem e tempo de incubação. **R. bras. Ci. Solo**, v.11, p.147-155, 1987.
- BOWMAN, R. A.; OLSEN, S. R.; WATANABE, F. S. Greenhouse evaluation of residual phosphate by four phosphorus methods in neutral and calcareous soils. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.42, p.451-454, 1978.
- BOWMAN, R. A. A sequential extraction procedure with concentrated sulphuric acid and dilute base for soil organic phosphorus. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.53, p.362-366, 1989.
- BRAGA, J. M.; DEFELIPO, B. V. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solo e material vegetal. **R. Ceres**, v.21, n.113, p.73-85, 1974.
- BRAY, R. H.; KURTZ, L. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. **Soil Sci.**, v.59, p.39-45, 1945.
- CATTELAN, A. J.; HUNGRIA, M. Nitrogen nutrition and inoculation. In: FAO. **Tropical soybean-improvement and production**. Rome: FAO, 1994. p.201-215.
- CHANG, S.C.; JACKSON, M. L. Fractionation of soil phosphorus. **Soil Sci.**, v.84, p.133-144, 1957.
- CONDRON, L. M.; MOIR, J. O.; TIESSEN, H.; STEWART, J. W. B. Critical evaluation of methods for determining total organic phosphorus in tropical soils. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.54, p.1261-1266, 1990.
- COUTO, C.; NOVAIS, R. F.; COSTA, L. M.; BARROS, N. F.; NEVES, J. C. L. Efeito de características químicas, físicas e mineralógicas do solo sobre a solubilização da apatita-de-araxá. **R. bras. Ci. Solo**, v.11, p.239-244, 1987.
- DALLAL, R. C. Soil organic phosphorus. **Adv. Agron.**, v.29, p.83-117, 1977.

- FERNÁNDEZ, J. A.; NIELL, F. X.; LUCENA, J. A rapid and sensitive automated determination of phosphate in natural waters. **Limnol. Oceanogr.**, v.8, p.361-362, 1985.
- FIXEN, P. E.; GROVE, J. H. Testing soils for phosphorus. In: WESTERMAN, R. L. ed. **Soil testing and plant analysis**. Madison: Soil Science Society of America, 1990. p.141-180.
- GONÇALVES, J. L. M.; FIRME, D. J.; NOVAIS, R. F.; RIBEIRO, A. C. Cinética de adsorção de fósforo em solos de cerrado. **R. bras. Ci. Solo**, v.9, p.107-111, 1985.
- GONÇALVES, J. L. M.; NOVAIS, R. F.; BARROS, N. F.; NEVES, J. C. L.; RIBEIRO, A. C. Cinética de transformação de fósforo-lábil em não-lábil, em solos de cerrado. **R. bras. Ci. Solo**, v.13, p.13-24, 1989.
- GRANDE, M. A.; CURI, N.; QUAGGIO, J. A. Disponibilidade de fósforo pelos extratores de Mehlich e resina, em solos cultivados com arroz irrigado. **R. bras. Ci. Solo**, v.10, p.45-50, 1986.
- JUO, A. S. R.; FOX, R. L. Phosphate sorption characteristics of some benchmark soils of West Africa. **Soil Sci.**, v.124, n.6, p.370-376, 1977.
- KAMPRATH, E. J.; WATSON, M. E. Conventional soil and tissue tests for assessing the phosphorus status of soils. In: KHASAWNEH, F. E.; SAMPLE, E. D.; KAMPRATH, E. J. ed. **The role of phosphorus in agriculture**. Madison: American Society of Agronomy, 1980. p.433-469.
- LINS, I. D. G.; COX, F. R. Effect of extractant and selected soil properties on predicting the correct phosphorus fertilization of soybean. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.53, p.813-816, 1989.
- LOPES, A. S. **Solos sob "cerrado": características, propriedades e manejo**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1983. 162p.
- MACHADO, M. I. C. S.; BRAUNER, J. L.; VIANNA, A. C. T. Formas de fósforo na camada arável de solos do Rio Grande do Sul. **R. bras. Ci. Solo**, v.17, p.331-336, 1993.
- MEHTA, N. C.; LEGG, J. O.; GORING, C. A. I.; BLACK, C. A. Determination of organic phosphorus in soils: I. Extraction methods. **Soil Sci. Soc. Am. Proc.**, v.18, p.443-449, 1954.
- MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Anal. Chim. Acta**, v.27, p.31-36, 1962.
- NELSON, W. L.; MEHLICH, A.; WINTERS, E. The development, evaluation, and use of soil tests for phosphorus availability. **Agronomy**, v.4, p.153-188, 1953.
- NOVELINO, J. O.; NOVAIS, R. F.; NEVES, J. C. L.; COSTA, L. M.; BARROS, N. F. Solubilização de fosfato-de-araxá, em diferentes tempos de incubação, com amostras de cinco Latossolos, na presença e ausência de calagem. **R. bras. Ci. Solo**, v.9, p.13-22, 1985.

- OHNO, T.; ZIBILSKÉ, L. M. Determination of low concentrations of phosphorus in soil extracts using malachite green. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.55, p.892-895, 1991.
- OLSEN, S. R.; SOMMERS, L. E. Phosphorus. In: PAGE, A. L.; MILLER, R. H.; KEENEY, D. R., ed. **Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and microbiological properties**. Madison: American Society of Agronomy-Soil Science Society of America, 1986. p.403-430.
- OLSEN, S. R.; COLE, C. V.; WATANABE, F. S.; DEAN, L. A. **Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate**. S.I.: U. S. Department of Agriculture, 1954. (Circular, 939).
- RAIJ, B.VAN; QUAGGIO, J. A. Métodos de análise de solo para fins de fertilidade. **B. Técn. Inst. Agron.**, v.81, 1983.
- RAIJ, B.VAN; QUAGGIO, J. A.; SILVA, N. M. Extraction of phosphorus, potassium, calcium, and magnesium from soils by an ion-exchange resin procedure. **Commun. Soil Sci. Plant. Anal.**, v.17, n.5, p.547-566, 1986.
- RAIJ, B.VAN; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. Soil testing and plant analysis in Brazil. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.**, v.25, n.7-8, p.739-751, 1994.
- RESENDE, M. **Mineralogy, chemistry, morphology and geomorphology of some soils of Central Plateau of Brazil**. West Lafayette: Purdue University, 1976. 237p. (Tese de Doutorado).
- RESENDE, M.; CURI, N.; SANTANA, D. P. **Pedologia e fertilidade do solo: interações e aplicações**. Brasília: MEC/ESAL/POTAFOS, 1988. 84p.
- SANZONOWICZ, C.; LOBATO, E.; GOEDERT, W. J. Efeito residual da calagem e de fontes de fósforo numa pastagem estabelecida em solo de cerrado. **Pesq. agropec. bras.**, v.22, n.3, p.233-243, 1987.
- SARRUGE, J. R.; HAAG, H. P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1974. 56p. (Boletim Técnico)
- SAUNDERS, W. M. J.; WILLIAMS, E. F. Observations on the determination of total organic phosphorus in soils. **J. Soil Sci.**, v.6, p.247-267, 1955.
- SILVA, J. T. A.; BRAGA, J. M. Sensibilidade de extratores de fósforo e nível crítico de dez solos do Estado de Minas Gerais. **R. Ceres**, v.39, n.226, p.542-553, 1992.
- SIQUEIRA, J. O. Micorrizas arbusculares. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. ed. **Microrganismos do solo de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994.

- SMYTH, T. J.; CRAVO, M. S. Critical phosphorus levels for corn and cowpea in a Brazilian Amazon Oxisol. **Agron. J.**, v.82, p.309-312, 1990.
- THOMAS, G. W.; PEASLEE, D. E. Testing soils for phosphorus. In: WALSH, L. M.; BEATON, J. D. ed. **Soil testing and plant analysis**. Madison: Soil Science Society of America, 1973. p.115-132.
- VILLANI, E. M. A.; NOVAIS, R. F.; BARROS, M. F.; FONTES, L. E. F.; NEVES, J. C. L. Difusão de fósforo em solos com diferentes texturas e níveis de umidade. **R. bras. Ci. Solo**, v.17, p.343-347, 1993.
- WALKER, T. W.; ADAMS, A. F. R. Studies on soil organic matter: I. Influence of phosphorus content of parent materials on accumulations of carbon, nitrogen, sulfur and organic phosphorus in grassland soils. **Soil Sci.**, v.85, p.307-318, 1958.
- WARDLE, D. A.; HUNGRIA, M. A biomassa microbiana do solo e sua importância nos ecossistemas terrestres. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M., eds. **Microrganismos do solo de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. (no prelo).

CAPÍTULO 26

ANÁLISE DO CARBONO NOS ESTUDOS DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO

Bruno J. R. Alves¹

Júlio César F. dos Santos²

Segundo Urquiaga³

Robert M. Boddey³

26.1. Introdução

O carbono é o principal constituinte da matéria orgânica do solo, sendo, por isso, quase sempre estudados juntos. O teor de matéria orgânica do solo é sinônimo de fertilidade, pois tanto a disponibilidade de nutrientes quanto a atividade química e microbiológica do solo, especialmente nos trópicos, dependem da sua quantidade e qualidade.

Diferentes métodos têm sido propostos para avaliar as diversas formas de carbono do solo (carbonatos, carvão vegetal, resíduos de plantas, animais e microrganismos em diferentes graus de decomposição, etc). Segue-se uma revisão dos métodos de análise de maior eficácia para o estudo do carbono em solos tropicais.

26.2. Determinação do Carbono Total

A determinação do carbono total de uma amostra, principalmente se esta possui carbono na forma mineral, como no caso dos solos, é realizada através dos chamados métodos de combustão. A metodologia de combustão seca é considerada a mais exata para a determinação do carbono total. Na combustão seca (900° a 1.100° C), o CO₂ evoluído passa por uma série de "armadilhas", onde também é purificado e, em seguida, é absorvido por substâncias como ascarite ou NaOH, e quantificado por gravimetria ou titulometria (Allison, 1965). Analisadores modernos automatizados medem a concentração de CO₂ por condutividade térmica (ex.: analisador Leco CHN 600 ou Carlo Erba CHN 1500). Não obstante a sua eficácia, a pouca praticidade e o alto custo de aquisição dos equipamentos tornam este método pouco utilizado no Brasil.

¹ Engenheiro-agrônomo, M.Sc., curso de pós-graduação na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (CNPAB), km 47 da antiga Rio-São Paulo, CEP 23851-970, Itaguaí, RJ.

² Engenheiro-agrônomo, M.Sc., curso de pós-graduação no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) e Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), Cx. Postal 1331, CEP 86001-970, Londrina, PR.

³ Pesquisadores, Ph.D., EMBRAPA-CNPAB.

A chamada combustão úmida, com a utilização de dicromato, tem sido considerada como um padrão para a determinação do carbono total, produzindo bons resultados em comparação ao processo seco. Este tipo de análise fornece uma medida indireta do carbono orgânico total, ou seja, mede a capacidade do carbono orgânico de reduzir o dicromato. Neste processo, a amostra é digerida a uma temperatura superior a 200° C, na presença de dicromato, em meio ácido. A solução ácida, dependendo do método, contém certas proporções de H_2SO_4 , H_3PO_4 , HIO_3 e CrO_3 , importantes para garantir, aliados à alta temperatura, toda a combustão do carbono orgânico até CO_2 , sem que haja formação de intermediários como CO e, também, para dissolver todo o mineral carbonatado, porventura presente na amostra (Nelson & Sommers, 1982). O CO_2 evoluído da amostra é carreado, em fluxo de ar pré-purificado, sendo absorvido em uma armadilha alcalina e podendo ser quantificado por titulometria ou gravimetria. A grande vantagem deste processo está no baixo custo do equipamento, cujos componentes podem ser encontrados, sem grandes dificuldades, em laboratórios de análise química. Em especial, a metodologia de Allison (1960), descrita a seguir, apresenta outras vantagens em relação à praticidade na montagem e no procedimento analítico.

Material

Os componentes do sistema de análise podem ser vistos na Figura 26.1. Representada pela letra B, tem-se uma torre de 25 cm de altura contendo óxido de cálcio, por onde o ar entra, através de uma “válvula de agulha”; C - frasco de 100 mL tipo Kjeldahl com boca para rolha de borracha nº. 2; D - condensador de refluxo com 4 bulbos contendo uma borracha nº. 2 na saída; E - funil de separação com capacidade para 60 mL; F-H - frascos 25 mm/90 mm com rolhas nº. 4; I-J - Tubo em U de 15 cm para retenção de água; K - bulbo Nesbitt (Armadilha I), para medida por gravimetria, ou Armadilha II, para titulometria. Usar borrachas de neopreno e tubos de silicone para as conexões. O sistema deve ser hermético e para isso devem ser utilizadas borrachas e juntas compatíveis com os frascos. Não usar lubrificantes nas juntas esmeriladas.

Reagentes

- a. mistura ácida para a digestão. Colocar 600 mL de ácido sulfúrico concentrado em 400 mL de ácido ortofosfórico a 85%. Deixar a mistura esfriar e guardá-la em um recipiente de vidro com tampa, para evitar absorção de vapor d'água;
- b. dicromato de potássio, p.a. (pró-análise);
- c. solução de iodeto de potássio a 50 % (dissolver 100 g de KI em 200 mL de água);
- d. solução de sulfato de prata, saturada;
- e. absorvedor de CO_2 , indicado em vários catálogos de produtos químicos (ex.: Ascarite, Thomas Co., Filadélfia).

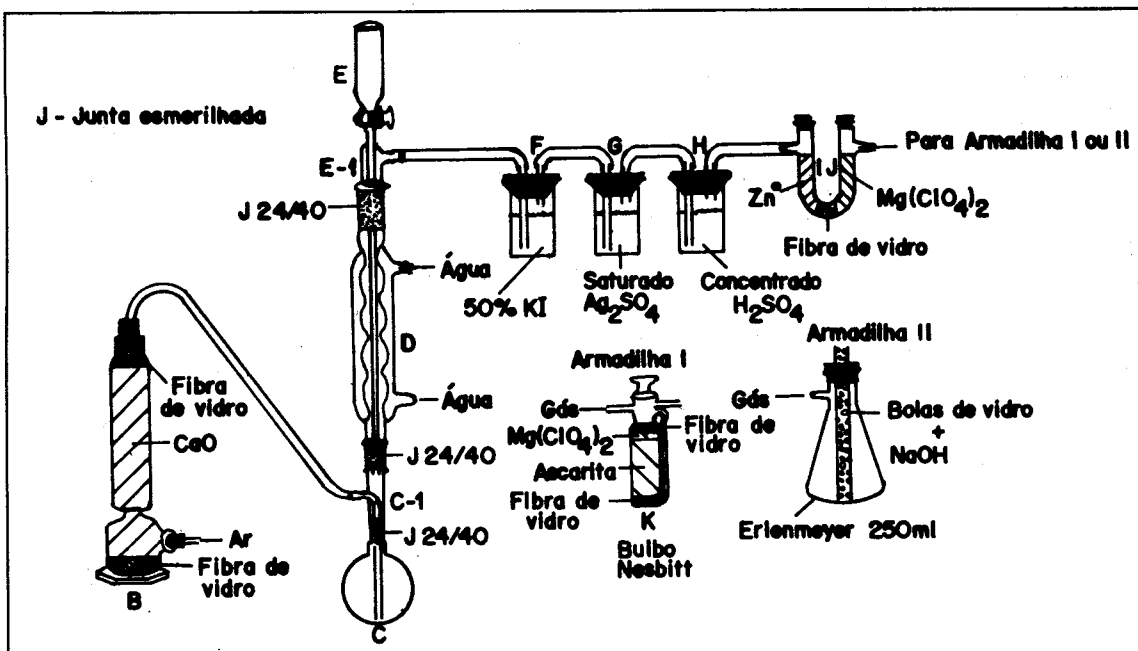


FIGURA 26.1. Representação esquemática de um sistema de análise de carbono através do processo de combustão úmida.

- f. óxido de cálcio, 8 a 14 mes;
- g. zinco granulado, < 30 mesh;
- h. perclorato de magnésio anidro ("Anhydrone").

Procedimento inicial

O fluxo de ar deve estar isento de CO_2 , fazendo-o passar pela torre B contendo CaO. A coluna é conectada ao frasco de digestão C através de um tubo de vidro, com a extremidade imersa cerca de 1 cm na solução ácida. A parte inferior do funil E (tubo de vidro) deve chegar até C-1, e a extremidade deve estreitar-se a cerca de 2 mm de diâmetro. As extremidades dos tubos de entrada dos frascos F-G devem ser estreitadas também. Preencher 2/3 do volume dos frascos F e G com solução de KI a 50% e de Ag_2SO_4 saturada, respectivamente. A extremidade do tubo de entrada de F não deve ser imersa mais do que 3,8 cm, e o limite, para G, é de 1,3 cm. O frasco H não deve ter mais do que 1/3 de seu volume preenchido com H_2SO_4 concentrado. O tubo de entrada para H pode ser feito com a extremidade de uma pipeta de 5 mL graduada, e esta não deve aprofundar mais do que 1,3 cm no ácido. Colocar fibra de vidro no tubo em U, de forma a dividi-lo em 2 volumes iguais. No lado conectado com o frasco H, preencher com Zn granulado para absorver algum vapor de ácido que escape de H. Do outro lado, preencher com $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ anidro, que reterá o vapor d'água presente no fluxo contendo CO_2 , antes de entrar no bulbo K. Preencher o bulbo K (Nesbitt) com o absorvente de CO_2 da seguinte forma: colocar uma cama de lã de vidro, uma camada de 3 cm de absorvente 8 a 14 mesh, outra camada de 2 cm de absorvente 20 mesh e uma outra de $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ anidro de 1 cm, cobrindo com lã de vidro.

Análise

Colocar 1 g de amostra, no caso de solo, finamente moída e seca em estufa, ou uma quantidade que apresente entre 20 e 40 mg de carbono dentro do frasco de digestão C. Adicionar, aproximadamente, 1 g de dicromato de potássio. Lavar o gargalo do frasco com cerca de 3 mL de água e conectá-lo ao condensador D. Pesar o bulbo Nesbitt (limpo cuidadosamente com papel de boa qualidade, deixando a superfície livre de estática) várias vezes, até que se tenha peso constante (~ 0,2 mg de erro). Conectá-lo ao sistema e abrir a válvula no topo do bulbo. Colocar 25 mL da solução ácida de digestão no funil E e cubri-lo com um béquer pequeno. Abrir a válvula de E, deixar a solução ácida fluir para dentro de C e fechá-la imediatamente. Ajustar o fluxo de ar, de modo que a ponta do tubo não fique imersa mais do que 1 cm na solução ácida durante a digestão. Neste momento, deixar a água passar pelo condensador D e ajustar o fluxo de ar para 2 bolhas/segundo, mantendo esta taxa durante a digestão. Aplicar uma chama (5 a 6 cm de altura) de forma a produzir ebulição entre 4 e 5 min. Manter em ebulição por 10 min, sempre evitando uma fervura muito forte. Após este tempo, remover a chama e deixar o ar fluir por mais 10 min, a uma taxa de 6 a 8 bolhas/segundo. Fechar a válvula do bulbo, desconectá-lo do sistema e limpá-lo com uma escova para retirada de poeiras. Pesá-lo imediatamente. Descartando-se o peso do bulbo, obtém-se o peso do CO₂. O procedimento deve ser repetido sem a amostra (branco). A porcentagem de carbono total pode ser obtida por:

$$C \text{ total (\%)} = \{[(g \text{ CO}_2 \text{ na amostra}) - (g \text{ CO}_2 \text{ no branco})] / \text{peso do solo seco em g}\} \times 0,2727 \times 100$$

sendo 0,2727 o fator que transforma os valores de CO₂ em unidades de carbono (C/CO₂=12/44=0,2727).

Comentários

O uso de KI e Ag₂SO₄ elimina a possibilidade de interferência do Cl⁻ que, como comentado anteriormente, também é oxidado pelo dicromato e na forma de Cl₂ também seria absorvido no bulbo, superestimando o total de CO₂ (Nelson & Sommers, 1982). Outra forma menos complicada de avaliar o CO₂ formado é através da titulometria. Substituir o bulbo por erlenmeyer de 250 mL com braço lateral dotado de rolha de borracha contendo um tubo de 22 cm de comprimento e 14 mm de diâmetro. Esta torre de vidro deve-se estender até cerca de 0,5 cm do fundo do erlenmeyer e deve ser completada com pérolas de vidro. Preencher a coluna com 25 mL de KOH, 1 N. Pode-se adicionar um tampão, para manter a alcalinidade do KOH durante a absorção do CO₂. O procedimento de combustão é o mesmo de antes. No fim do processo, lavar o KOH da torre com água destilada, tratada com 5 mL de BaCl₂ e algumas gotas de fenolftaleína. Titular com HCl padronizado. A porcentagem de C total pode ser obtida por:

$$C \text{ total (\%)} = \{[(\text{mL HCl branco}) - (\text{mL HCl amostra})] / \text{peso do solo seco em g}\} \times \text{Norm. HCl} \times 0,3$$

Caso haja quantidade significativa de carbonatos na amostra e o objetivo for a determinação da fração orgânica, deve-se proceder da seguinte maneira: antes de iniciar o processo, colocar a amostra nos frascos de digestão, conforme o procedimento anterior, e adicionar 3 mL de uma solução de H_2SO_4/Fe_2SO_4 (dissolver 57 mL do ácido sulfúrico concentrado e 92 g de sulfato ferroso heptahidratado em 600 mL de água deionizada, deixar esfriar e diluir para 1 litro). Deixar a amostra digerir por 20 min em temperatura ambiente. Aquecer o frasco até ebulição por 1 min 30 s, para destruir qualquer carbonato remanescente. Deixar esfriar e seguir com o procedimento anterior.

26.3. Determinação de Carbono Orgânico (técnicas rápidas)

Neste procedimento, a amostra é tratada com um forte oxidante ($K_2Cr_2O_7$) em meio a uma solução ácida, para permitir uma oxidação quantitativa do carbono orgânico. Walkley & Black (1934) propuseram uma metodologia em que a amostra recebe uma solução de $K_2Cr_2O_7$ e, em seguida, H_2SO_4 concentrado. A hidratação do ácido sulfúrico, adicionado no recipiente que continha amostra e a solução de dicromato, faz com que a temperatura da mistura final se eleve e auxilie na oxidação. O dicromato não reagido é quantificado, através de titulometria, usando-se sulfato ferroso amoniacal (solução de Mohr). Embora esta metodologia tenha larga utilização no Brasil, pela rapidez e praticidade na obtenção dos resultados, estes devem ser multiplicados por um fator ($\sim 1,3$) para compensar a oxidação incompleta do carbono orgânico em razão da baixa temperatura fornecida (Nelson & Sommers, 1982). Outra metodologia, muito semelhante à anterior quanto ao processo de oxidação, é a de Mebius modificada, descrita por Nelson & Sommers (1982) e recomendada para análise de rotina pela Sociedade Americana de Ciência do Solo. Neste método, o procedimento assemelha-se ao de Walkley & Black (1934), mas a amostra, colocada junto à mistura de H_2SO_4 e $K_2Cr_2O_7$, é posta em ebulição, sob refluxo, durante 30 min. O aquecimento fornecido ao sistema possibilita a oxidação total do carbono e, com isso, a obtenção de resultados mais exatos e precisos, tomando como padrão os métodos de combustão via seca e úmida (Nelson & Sommers, 1982; Yeomans & Bremner, 1988). Embora mais exato, este método exige um material especial, o que causa certa rejeição em sua utilização. Dessa forma, Yeomans & Bremner (1988) modificaram o método com o intuito de torná-lo prático, principalmente para laboratórios que já possuem uma rotina para análise de nitrogênio por digestão Kjeldahl. Esta metodologia, que será integralmente descrita a seguir, foi testada em vários solos típicos de clima temperado e, no trabalho de Dias et al. (1991), em solos do Brasil. Em ambos os estudos, a metodologia mostrou boa exatidão e precisão, aliadas à praticidade, em comparação com outras metodologias.

Material

- a. bloco digestor para tubos usados em digestão Kjeldahl;
- b. tubos de digestão refratários, tipo pyrex, com 25 mm de diâmetro por 300 mm de comprimento.

Reagentes

- a. ácido sulfúrico concentrado;
- b. solução de dicromato de potássio, 1 N: dissolver 49,025 g de dicromato de potássio (preaquecido a 140° C) em 800 mL de água destilada, diluindo a solução para um volume final de 1 L em um balão volumétrico (primeiro padrão do método);
- c. solução do sal de Mohr, 0,2 N: dissolver 156,8 g de sulfato ferroso amoniacal $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ em 100 mL de ácido sulfúrico concentrado. Diluir para um volume final de 2 L em um balão volumétrico. Esta solução sempre deve ser padronizada antes do uso, pois oxida-se naturalmente com o tempo;
- d. solução indicadora: dissolver 100 mg de ácido N-fenilantranílico e 100 mg de Na_2CO_3 em 100 mL de água destilada.

Procedimento

Pesar uma quantidade de amostra finamente moída contendo não mais do que 8 mg de carbono orgânico (500 mg de amostra no caso de solo), em um tubo de digestão, e adicionar 5 mL da solução 1 N de dicromato e 7,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Levar a estante de tubos ao bloco digestor preaquecido a 170° C. Após 30 min, remover os tubos do bloco e deixar esfriar por, aproximadamente, 15 min. Transferir o conteúdo dos tubos quantitativamente com água destilada para erlenmeyers graduados até um volume em torno de 50 mL. Deixar esfriar em temperatura ambiente. Adicionar 0,3 mL da solução indicadora e titular com a solução do sal de Mohr. A viragem se dá do violeta para um verde-brilhante e é bem repentina. São requeridos pelos menos dois controles (brancos). Um deles passa pelo processo de digestão e outro serve como padrão para averiguar a perda de dicromato no processo de ebulição. Em cada controle, adicionar 5 mL de dicromato, 1 N, e 7,5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

$$C \text{ org (\%)} = (A \times \text{Norm. sol. Mohr} \times 0,003 \times 100) / \text{peso da TFSA em g}$$

$$A = [(\text{br dig.} - \text{amostra}) \times (\text{br não dig.} - \text{br dig.}) / \text{br não dig.}] + (\text{br dig.} - \text{amostra})$$

O fator 0,003 representa os gramas de C por miliequivalente de carbono.

Comentários

A metodologia proposta permite a realização de mais de 100 análises por dia, em um equipamento comum em laboratórios que fazem análise de nitrogênio em rotina. O processo de aquecimento permite a oxidação total do carbono, produzindo resultados com alta exatidão e precisão (Dias et al., 1991). Na

medida do possível, deve-se tentar incluir mais um ou dois controles, para aumentar a precisão do método. Contudo, deve-se ter cautela em relação a possíveis interferências de outros elementos, que podem superestimar o resultado final da análise.

Extratos de carbono orgânico do solo também podem ser analisados. Para isso, dependendo do teor de carbono do extrato, pipetar uma alíquota (10 a 50 mL) em um tubo de digestão Kjeldahl (o mesmo utilizado na metodologia anterior), e adicionar 1 mL do reagente H_2SO_4/Fe_2SO_4 descrito anteriormente. Reduzir o volume do extrato até 3 mL ou menos, colocando o tubo em estufa a 60° C. Prosseguir com uma das metodologias descritas.

26.4. Fracionamento da Matéria Orgânica do solo

26.4.1. Introdução

Desde o conhecimento de que os restos vegetais alteravam sua composição bioquímica durante o processo de degradação (Kononova, 1966), muitos estudos têm sido conduzidos no sentido de caracterizar o produto desta degradação, ou seja, o húmus do solo (Dabin, 1976; Turcheneck & Oades, 1979; Beyer, 1993). Contudo, o húmus do solo possui uma infinidade de substâncias, pertencentes às mais variadas funções químicas, com estruturas desde as mais simples até as extremamente polimerizadas. Outra característica está em relação ao estágio de decomposição da matéria orgânica, pois, no solo, pode-se considerar a existência de um certo gradiente entre formas que ainda guardam características fortes do material original até os mais avançados estágios de decomposição.

Com base na solubilidade em álcali ou em ácido, o húmus do solo é dividido em três frações: 1) ácidos húmicos, que são solúveis em meio alcalino diluído, porém precipitam com a acidificação deste meio; 2) ácidos fúlvicos, que ainda permanecem solúveis com a acidificação do meio alcalino; e 3) humina, que não se solubiliza em meio alcalino ou ácido. Como revisado por Stevenson (1982), estas três frações são quimicamente semelhantes, diferindo no peso molecular, no teor de alguns elementos, como o nitrogênio, e no conteúdo de grupos funcionais, além de os ácidos fúlvicos possuírem menor peso molecular, porém maior teor de grupos funcionais contendo oxigênio (CO_2H , OH , $C=O$) por unidade de peso. Características importantes dos compostos húmicos são a alta resistência à degradação microbiana, a capacidade de formar complexos com íons metálicos e substâncias orgânicas não húmicas (açúcares, ácidos graxos, proteínas, pesticidas, herbicidas, etc.) solúveis e insolúveis em água e de interagir com minerais de argila no solo.

A separação granulométrica do solo e, dessa forma, da matéria orgânica associada à fração textural, é um procedimento que pode ser associado aos métodos químicos. Através deste procedimento, a matéria orgânica ainda não humificada, presente na fração superior a 50 μm , pode ser separada. Segundo este método, a matéria orgânica de um solo corresponde a todo o material orgânico que passa na peneira de 200 μm , sendo chamada matéria orgânica leve o material de degradação incompleta, contido na fração acima de 50 μm (McDonagh, 1993).

A combinação do método granulométrico com o químico permite um agrupamento razoável de materiais com propriedades afins, proporcionando um melhor estudo do papel da matéria orgânica nos solos.

Adiante descrevem-se o método de separação granulométrica de Feller (1979) e o método de fracionamento químico de Dabin modificado, ambos descritos em Cerri et al. (1990).

26.4.2. Metodologia de Separação Granulométrica

O método descrito a seguir separa gradativamente a matéria orgânica, através de uma seqüência de peneiramentos, até obtenção de uma menor do que 50 μm . Um dos problemas com esta metodologia é a presença de agregados, que contêm material orgânico coloidal como agente cimentante, e pode ser computado como uma fração grosseira do solo. Para tanto, pode-se fazer uso do ultra-som para a máxima desagregação.

Material

- a. centrífuga;
- b. peneiras de 2000 μm , 200 μm e 50 μm , com 21 cm de diâmetro;
- c. ultra-som.

Procedimento

Em um recipiente de plástico com 1 L de capacidade, colocar 100 g de solo, TFSA, 300 mL de água destilada, três pérolas de vidro e fechar. Colocar em agitador rotativo e deixar por 1 hora a 50 rpm.

Separação da fração 200 a 2.000 μm

Colocar uma peneira de malha de 200 μm e 21 cm de diâmetro em uma bacia de plástico. Despejar o conteúdo do recipiente de plástico sobre a peneira com ajuda de água destilada. É importante e necessário que todo o material contido no recipiente passe para a peneira, porém o excesso de água deve ser evitado, para facilitar a recuperação das frações menores, obtidas posteriormente. Adicionar água à bacia até que seu nível aflore na peneira. A peneiragem é facilitada por um movimento rotativo. A fração maior do que 200 μm permanece na peneira. A fração menor do que 200 μm passa para a bacia. Lavar a fração da peneira com água destilada e passar para béquer de 600 mL. Pode-se separar a fração orgânica da fração mineral colocando-a em suspensão por um leve movimento de rotação do líquido e despejando-o sobre uma pequena peneira de 50 μm . Esta operação deve ser repetida várias vezes até que a transferência da matéria orgânica se complete. A matéria orgânica é, então, passada para um béquer de 250 mL e seca em estufa a 80°C. Obtém-se assim a fração orgânica de 200 a 2.000 μm .

Tratamento com ultra-som

Adicionar 200 mL de água destilada à fração mineral obtida anteriormente em um béquer de 600 mL. Deixar em cuba de ultra-som por 5 min para desagregar o solo. Após o tratamento, passar o conteúdo do béquer em peneira de 200 μm . A fração menor do que 200 μm é adicionada àquela que já havia passado na peneira antes do tratamento. A fração mineral retida na peneira corresponde à areia grossa. Este procedimento deve ser repetido tantas vezes quantas forem necessárias para completa desagregação e obtenção da fração areia grossa isenta de agregados.

Separação da fração 50 μm a 200 μm

Utiliza-se o mesmo procedimento usado para fração 200 μm a 2.000 μm , exceto pela peneira, que possui malha de 50 μm . Por ela se faz passar todo o líquido recolhido no processo anterior. É importante observar, em lupa, o material que fica retido na peneira, para constatar se há presença de agregados. O tratamento de ultra-som deve ser feito enquanto estes forem observados. A fração mineral retida na peneira corresponde à areia fina.

Separação da fração < 50 μm

Todo o líquido obtido dos processos anteriores deve ser deixado em repouso durante uma noite, para que haja sedimentação das partículas. Todo o excesso de líquido pode ser descartado, desde que se tome cuidado para que não haja perda de material. O material remanescente é, então, repartido em tubos de centrifuga e submetido a 8.000 rpm a 10.000 rpm por 10 min. O resíduo é recolhido em béquer tarado e colocado em estufa para secar a 80° C. Notando-se turbidez no tubo, precipitar a suspensão, ajustando o pH para 2,5 com HCl 2 N. Recuperar o precipitado e juntá-lo ao resíduo. Dessa forma obtém-se a fração < 50 μm .

O tratamento químico descrito a seguir (seção 26.4.3) pode ser feito sobre o resíduo obtido nesta última etapa.

O fracionamento é considerado bom se $98,5 < 100S/M < 100$

onde: S = somatório das massas das frações orgânicas e minerais do procedimento;

M = massa da amostra seca a 105° C, usada na extração.

26.4.3. Extração Química e Purificação das Frações Húmicas

Do grande número de extratores que têm sido empregados na extração da matéria orgânica do solo, os mais freqüentes são NaOH 0,1 N a 0,5 N e pirofosfato de sódio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) 0,1 M com pH ajustado para 9,8 ou 7,0.

A matéria orgânica do solo é solúvel em bases diluídas. Contudo, o uso de NaOH pode gerar problemas, como modificação da estrutura química e de outras características da matéria orgânica. A

ação do pirofosfato depende da habilidade do ânion $P_2O_7^{4-}$ de interagir com cátions polivalentes ligados à matéria orgânica do solo para formar precipitados insolúveis ou complexos metálicos solúveis, e também da interação do Na^+ com a matéria orgânica para formar um sal solúvel.

No método modificado de Dabin (Cerri et al., 1990), usado nos laboratórios do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP, Piracicaba, São Paulo), descrito a seguir, adota-se um fracionamento mais detalhado da matéria orgânica, no qual se obtém, ao fim da extração, uma fração hidrossolúvel e frações de ácidos húmicos e fúlvicos com diferentes graus de interação com o solo.

Os ácidos fúlvicos e húmicos podem ser purificados para minimizar o conteúdo de cinzas e de moléculas orgânicas de baixo peso molecular. Um processo de purificação específico para ácidos húmicos envolve o tratamento com uma solução de HCl e HF. Os ácidos fúlvicos podem ser purificados por repetidas passagens em resinas de troca catiônica na forma H.

Material

- a. centrífuga;
- b. frascos de polipropileno;
- c. liofilizador;
- d. funil com lã de vidro.

Reagentes

- a. ácido fosfórico, 2 M: diluir 136 mL de H_3PO_4 concentrado, até atingir o volume final de 1 L de solução;
- b. pirofosfato de sódio deca-hidratado, 0,1 M: pesar 44,6 g de $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ e dissolver em 500 mL de água destilada; completar o volume até 1 L;
- c. hidróxido de sódio 0,1 N: dissolver 4 g de NaOH em 500 mL de água destilada e completar o volume até 1 L;
- d. ácido sulfúrico 2,0 N e 0,1 N: para a preparação da solução 2 N, adicionar 55,5 mL do H_2SO_4 concentrado em 800 mL de água destilada e completar o volume até 1 L; para preparar a solução 0,1 N, adicionar 5 mL da solução 2 N em 500 mL de água e completar o volume até 1 L;
- e. solução de ácido clorídrico/ácido fluorídrico: dissolver 5 mL de HCl concentrado e 5 mL de HF a 52 % em 990 mL de água destilada;
- f. amberlite IR-120 ou resina trocadora de cátions Dowex-50 (forma H).

Procedimento de extração

Separação da fração hidrossolúvel - pesar 20 g de TFSA, moída e peneirada em malha de 0,5 mm. Transferir para tubo de centrífuga de 100 mL. Adicionar 80 mL de água destilada. Agitar por 30 min e centrifugar por 10 min a 3.500 rpm. Guardar o sobrenadante, o qual foi filtrado em funil de lã de vidro. Reservar o extrato. Repetir a operação por mais duas vezes. Juntar os extratos obtidos.

Separação do ácido fúlvico livre - adicionar 80mL de ácido fosfórico 2 M ao resíduo no tubo da centrífuga. Agitar por 2 horas. Centrifugar durante 20 min a 3.500 rpm. Filtrar para outro frasco com a mesma lã de vidro do processo anterior. Repetir a operação até obter um líquido claro. Juntar os extratos obtidos.

Separação da matéria orgânica leve - o resíduo do tubo da centrífuga é ressuspenso em 80 mL de água, agitado por 1 hora e centrifugado por 15 min a 3.500 rpm. Filtrar para outro frasco, com a mesma lã de vidro da extração anterior. Repetir a operação até que o último extrato tenha pH 3,5 (papel indicador). O material contido na lã de vidro é a matéria orgânica leve. Secar a lã de vidro em estufa a 60° C e moer.

Separação dos ácidos fúlvicos e húmicos - adicionar 80 mL da solução de pirofosfato de sódio 0,1M ao resíduo no tubo da centrífuga. Agitar por 2 horas na primeira vez e 1 hora nas demais repetições. Centrifugar durante 15 min a 3.500 rpm. Repetir a operação até o último extrato ficar claro. Juntar os extratos obtidos.

Separação do ácido húmico ligado ao pirofosfato de sódio - tomar uma alíquota do extrato. Ajustar a pH 1 com ácido sulfúrico 2 N. Esperar precipitar. O precipitado é o ácido húmico. Centrifugar por 15 min a 3.500 rpm. Separar o sobrenadante, cuidadosamente, para não perder o precipitado. Adicionar 50 mL de ácido sulfúrico 0,1 N ao tubo da centrífuga, agitar com bastão de vidro e centrifugar por 15 min a 3.500 rpm. Retirar o sobrenadante. Repetir a operação. Adicionar 50 mL de água destilada, agitar com bastão de vidro e centrifugar novamente por 15 min a 3.500 rpm. Adicionar 20 mL de NaOH 0,1 N, para solubilizar o precipitado e colocar o material em um béquer de 250 mL. Neste se encontra o ácido húmico. No total dos extratos está o ácido fúlvico.

Extração com hidróxido de sódio - no resíduo do tubo da centrífuga obtido na etapa de separação dos ácidos fúlvicos e húmicos, adicionar 80 mL de NaOH 0,1 N, agitar por 2 horas e centrifugar por 15 min a 3.500 rpm. Repetir a operação até o extrato ficar claro. Juntar os extratos obtidos.

Separação do ácido húmico ligado à solução de hidróxido de sódio - proceder da mesma forma como na separação do ácido húmico ligado ao pirofosfato de sódio.

Determinação da humina - o resíduo do tubo da centrífuga é considerado a humina. Retirá-la com um mínimo de água destilada e neutralizar com ácido sulfúrico 2 N até pH 7.

Procedimento de purificação

Ácidos húmicos - os extratos contendo ácidos húmicos em NaOH são ultracentrifugados a 20.000 rpm para separar a fração argila. Em seguida, adiciona-se a solução HCl-HF 1 N. Após um período de 12 horas, o precipitado é dialisado em água destilada e liofilizado.

Ácidos fúlvicos - o extrato contendo ácidos fúlvicos deve ser passado duas ou três vezes em sucessão em uma coluna de Amberlite IR-120 (forma H). Obtêm-se os ácidos fúlvicos puros, que posteriormente são liofilizados.

Comentários

Em todos os extratos obtidos, nas diferentes fases do fracionamento, quando a solução se apresentar turva, pela presença de material coloidal em suspensão, deve-se adicionar 2 g de Na₂SO₄ para floculá-lo. Deixar em repouso durante uma noite para decantar. Centrifugar por 3 min a 3.500 rpm. O resíduo precipitado deve ser adicionado à fração humina para quantificação.

A determinação do carbono nas frações pode ser feita seguindo o procedimento descrito na seção 26.3.

26.5. Considerações Finais

Existem diversos métodos para determinar carbono total, carbono orgânico e as frações da matéria orgânica do solo. Grandes esforços têm sido realizados na procura de métodos que sejam facilmente adaptáveis à maioria dos laboratórios de análise de solo, sem que ocorra perda de precisão e exatidão dos resultados. Assim, neste trabalho foram propostos os métodos que melhores resultados têm proporcionado às diferentes pesquisas realizadas em solos brasileiros.

26.6. Referências Bibliográficas

- ALLISON, L.E. Organic carbon. In: BLACK, C.A., ed. **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, 1965. p.1367-1378.
- ALLISON, L.E. Wet-combustion apparatus and procedure for organic and inorganic carbon in soil. **Soil Sci. Soc. Am. Proc.**, v.24, p.36-40, 1960.
- BEYER, L. Estimation of soil organic matter composition according to a chemical separation of litter and humic compounds. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.**, v.24, p.211-226, 1993.
- CERRI, C.C.; FEIGL, B.; PICCOLO, M.C. **Manual de aula prática**. Piracicaba: CENA, 1990. 78 p.
- DABIN, B. Methode d'extraction et de fractionnement des matières humiques du sol. Application à quelques études pédologiques et agronomiques dans les sols tropicaux. **Cah. ORSTOM**, sér. Pédol., v. XIV, p.287-297, 1976.

- DIAS, L.E.; JUCKSCH, L.; RICCI, M.S.F.; ALVAREZ V., V.H. Comparação de diferentes métodos de determinação de carbono orgânico em amostras de solos. **R. bras. Ci. Solo**, v.15, p.141-144, 1991.
- FELLER, C. Une méthode de fractionnement granulométrique de la matère organique des sols. Application aux sols tropicaux à textures grossières, très paudres en humus. **Cah. ORSTOM**, sér. Pédol., v. XVII, p.339-346, 1979.
- KONONOVA, M.M. **Soil organic matter**. Enisford: Pergamon, 1966. 544 p.
- MCDONAGH, J.F. **Nitrogen benefits from legumes to cropping systems in Northeast Thailand**. Wye: Wye College, 1993. 236 p. (Tese de Doutorado).
- NELSON, D.W.; SOMMERS, L.E. Total carbon, organic carbon and organic matter. In: PAGE. A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R., eds. **Methods of soil analysis: chemical and microbiological properties**. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p.539-579.
- STEVENSON, F.J. Organic forms of soil nitrogen. In: STEVENSON, F.J., ed. **Nitrogen in agricultural soils**. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p.67-122.
- TURCHENECK, L.W.; OADES, J.M. Fractionation of organo-mineral complexes by sedimentation and density techniques. **Geoderma**, v.21, p.311-343, 1979.
- WALKLEY, A.; BLACK, I.A. An examination of the Degtjareff method for determinig soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. **Soil Sci.**, v.37, p.29-38, 1934.
- YEOMANS, J.C.; BREMNER, J.M. A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.**, v.19, p.1467-1476, 1988.

ANEXOS

ANEXO 1. Lista de Figuras

Figura 1.1.	Representação esquemática das partes de um microscópio óptico.	26
Figura 1.2.	Relação entre o diâmetro do rotor e os valores de g e rpm em ultracentrífugas.	29
Figura 1.3.	Representação esquemática de uma câmara de fluxo vertical.	31
Figura 1.4.	Representação esquemática de uma câmara de fluxo horizontal.	31
Figura 1.5.	Câmara asséptica que pode ser construída no laboratório.	32
Figura 1.6.	Esquema representativo de uma autoclave do tipo “panela de pressão”.	33
Figura 1.7.	Esquema de confecção de uma alça de platina.	34
Figura 1.8.	Esquema de confecção de um bastão de vidro para espalhar inóculo líquido.	35
Figura 1.9.	Inoculação em um tubo contendo meio sólido.	39
Figura 1.10.	Representação esquemática da riscagem em placas com meio sólido. À esquerda, a técnica mais utilizada em isolamentos iniciais e à direita, a técnica recomendada para a obtenção de colônias isoladas.	40
Figura 1.11.	Colônias isoladas obtidas pela técnica de semeadura em placa com meio sólido.	40
Figura 2.1.	Flores de <i>Phaseolus coccineus</i> , típicas da subfamília Papilionoideae.	46
Figura 2.2.	Nódulos no caule de <i>Discolobium</i> , na região do Pantanal Mato-grossense.	48
Figura 2.3.	Raiz nodulada de soja.	53
Figura 2.4.	Raiz nodulada de <i>Crotalaria mucronata</i>	53
Figura 2.5.	Corte de nódulos de soja aos 15 dias após a emergência.	58
Figura 2.6.	Raiz nodulada de soja, na época do florescimento, mostrando a coloração interna rósea dos nódulos.	58
Figura 3.1.	Esquema de um vaso de Leonard modificado. Segundo Somasegaran & Hoben (1985). ...	69
Figura 3.2.	Vasos esterilizados adaptados com frascos de vidro com solução nutritiva e papel absorvente (poroso) como suporte das plantas.	70
Figura 3.3.	Esquema de dobradura de papel para os vasos adaptados para condução de experimentos sob condições estéreis.	72
Figura 3.4.	Esquema representativo do procedimento das diluições em série para a estimativa do número mais provável (NMP) de rizóbio, pelo teste de infecção em plantas.	73
Figura 4.1.	Comportamento típico do <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> SEMIA 4064 num cultivo em fermentador.	97
Figura 4.2.	Comportamento típico do <i>B. japonicum</i> SEMIA 587 num cultivo em fermentador.	97
Figura 4.3.	Comportamento do <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> SEMIA 4064 em um meio de cultura com concentração inicial da fonte de carbono (sacarose) de 18 g/L.	99
Figura 4.4.	Curva de crescimento típica de um cultivo de microrganismo.	107
Figura 4.5.	Influência de X_0 sobre o crescimento de <i>Rhizobium phaseoli</i> (Boiardi, 1983).	108
Figura 4.6.	Influência da concentração de água de levedura no cultivo de <i>B. japonicum</i> SEMIA 587.	114
Figura 4.7.	Influência da concentração de água de levedura no cultivo de <i>B. japonicum</i> SEMIA 5019.	115
Figura 4.8.	Resultados de um cultivo em garrafão de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> SEMIA 4064. ...	116
Figura 4.9.	Resultados de um cultivo em garrafão de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA 587.	117
Figura 4.10.	Exemplo típico de fluxograma de uma planta industrial para produção descontínua de biomassa de <i>B. japonicum</i>	117
Figura 4.11.	Resultados de um cultivo descontínuo-alimentado de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> em fermentador.	119
Figura 4.12.	Esquema de um sistema de cultivo de células por fermentação contínua (Bailey, 1986). ..	121
Figura 4.13.	Diagrama do sistema contínuo utilizado para análise neste texto.	121

Figura 4.14.	Comportamento da concentração celular (X), da concentração de substrato (S) e da produtividade (XD) em função da vazão específica de alimentação D para um cultivo contínuo que obedece ao modelo de Monod (Aiba, 1973).	124
Figura 4.15.	Cultivo contínuo de <i>B. japonicum</i> SEMIA 587.	126
Figura 4.16.	Produção de inóculo e controle de contaminações.	134
Figura 6.1.	Processo de fermentação utilizado para a produção de inoculantes pela TURFAL.	151
Figura 7.1.	Microfotografia eletrônica de bacteróides isolados dos nódulos de trevo.	158
Figura 7.2.	Tipos de colônias de rizóbios em placas com meio sólido: 1 - colônia achatada; 2 - colônia em forma de cúpula; e 3 - colônia cônica.	161
Figura 7.3.	Aspecto de colônias de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> em placas com meio YM. À esquerda, colônias gomosas (KIM5s) e à direita, colônias secas (KM5021).	161
Figura 7.4.	Cápsulas de <i>Rhizobium etli</i> coloridas com violeta cristal.	162
Figura 7.5.	Colônias de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 em placas com meio YM contendo azul de bromotimol. Colônias amareladas porque absorvem o corante acidificado.	165
Figura 8.1.	Formação de "lattices" na reação antígeno-anticorpo.	172
Figura 8.2.	Padrões básicos da reação de precipitação de imunodifusão dupla em ágar-gel.	173
Figura 8.3.	Reação de imunofluorescência direta.	174
Figura 8.4.	Reação de imunofluorescência indireta.	174
Figura 8.5.	Ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA, Enzyme-Linked Imunoadsorbent Assay); reação indireta.	176
Figura 9.1.	Reação de alongamento da cadeia analisada pela DNA polimerase (segundo Styrrer, 1992)	185
Figura 9.2.	Diagrama ilustrando o uso de PCR para amplificar moléculas de DNA <i>in vitro</i> (segundo Gardner et al. 1991).	187
Figura 9.3.	Padrão de bandas obtido com a estirpe BTAi 1, comparando ampliações a partir de diferentes concentrações de células rompidas e DNA purificado, utilizando o oligonucleotídeo OPP-20 (5'GACCCTAGTC3').	193
Figura 9.4.	Dendrograma mostrando o nível de relação genética entre as estirpes de rizóbio, baseado em informações de RAPDs.	195
Figura 9.5.	Método de determinação da distância genética pela comparação de marcadores RAPD. ...	196
Figura 10.1.	"Sanduíche" de transferência para detecção imunológica de produtos gênicos em membrana de nitrocelulose.	221
Figura 12.1.	Curva teórica de competição pela nodulação entre duas estirpes igualmente competitivas.	244
Figura 12.2.	Curvas reais de competição entre a estirpe original e uma mutante menos competitiva (A) e entre a estirpe original e a variante com fenótipo restaurado (B).	245
Figura 13.1.	Representação esquemática do auto-analisador para ureídeos. Segundo Glenister & LaRue (1987).	273
Figura 14.1.	Folhas de soja aos 25 dias após a emergência, inoculada com uma estirpe eficiente (à esquerda) e não inoculada (à direita).	287
Figura 14.2.	Soja sem inóculo (frente) e com inóculo de uma combinação de estirpes eficientes (fundo), na região do Cerrado, em primeiro ano de plantio.	288
Figura 14.3.	Raízes de soja inoculadas com diversas estirpes para verificar a nodulação na raiz principal	290
Figura 14.4.	Plantas de soja, inoculadas com subestirpes da SEMIA 5019 (=29w) que foram isoladas de nódulos que apresentaram taxas de ARA de 0,3 μ mols, 0,9 μ mols ou 1,8 μ mols de C ₂ H ₄ /g de nódulo (h).	291
Figura 14.5.	Placa utilizada em ensaios de sorologia, para a identificação da porcentagem de nódulos ocupados pelas estirpes.	304
Figura 14.6.	Raiz de soja com inóculo (a) e sem inóculo (b) da estirpe SEMIA 5080.	307

Figura 15.1. Estrutura floral do feijoeiro e etapas no cruzamento do feijão.	329
Figura 15.2. Método de retrocruzamento modificado.	331
Figura 15.3. Método de descendência de uma semente.	332
Figura 15.4. Método de famílias derivadas de F.	333
Figura 16.1. Colônia de <i>Derxia</i> sp. em meio LG.	341
Figura 16.2. Células de <i>Derxia</i> sp. em meio batata sólido.	341
Figura 16.3. Células de <i>Derxia</i> sp. em meio Nfb semi-sólido (ácido málico substituído por manitol). ..	341
Figura 16.4. Colônia de <i>Derxia</i> sp. em meio batata com 10 dias.	341
Figura 16.5. Colônia de <i>Derxia</i> sp. em meio GNA com 11 dias.	341
Figura 16.6. Cápsulas características de <i>Beijerinckia fluminensis</i>	343
Figura 16.7. Película de <i>Azospirillum amazonense</i> em meio semi-sólido.	344
Figura 16.8. Células de <i>Azospirillum lipoferum</i> em meio semi-sólido com 14 dias.	344
Figura 16.9. Colônias de <i>Azospirillum lipoferum</i> em meio batata.	347
Figura 17.1. Teste para a produção de amônia.	358
Figura 17.2. Diagrama do FIA para determinação de amônia.	361
Figura 17.3. Teste para avaliação dos oxidantes do amônio.	364
Figura 20.1. Classificação dos fungos micorrízicos arbusculares, segundo Morton & Benny (1990). ...	392
Figura 20.2. a) Esporos de <i>Acaulospora</i> sp. com presença de hifa de origem aderida lateralmente; b) esporos de <i>Entrophospora</i> sp. com hifa e vesícula-mãe aderidas.	393
Figura 20.3. a) Esporos de <i>Glomus</i> sp.; b) esporocarpos de <i>Glomus</i> sp.; c) esporocarpos de <i>Sclerocystis</i> sp.	393
Figura 20.4. Esporos de <i>Gigaspora</i> sp. (a) e de <i>Scutellospora</i> sp. (b).	394
Figura 20.5. Algumas características de esporos de fungos micorrízicos arbusculares utilizadas para identificação: a) ornamentação de paredes; b) paredes múltiplas.	395
Figura 20.6. Esporos de fungos micorrízicos arbusculares extraídos do solo por peneiramento úmido e centrifugação em sacarose.	398
Figura 20.7. Colonização de raízes com fungos micorrízicos arbusculares coradas com azul de tripano	406
Figura 20.8. Estruturas típicas de colonização radicular com fungos micorrízicos arbusculares: arbúsculos; b) vesícula intra-radicular.	406
Figura 20.9. Raízes micorrizadas coradas com: a) azul de tripano; e b) fucsina ácida.	407
Figura 20.10. Esporo germinado de <i>Scutellospora</i> sp.	411
Figura 20.11. Crescimento micelial de esporos de fungos micorrízicos arbusculares <i>in vitro</i>	412
Figura 21.1. C-CO ₂ liberado de um solo que recebeu glicose e inibidores seletivos.	428
Figura 21.2. Resposta respiratória da biomassa microbiana após a adição de glicose, em solos perturba- dos, solos estressados e solos não perturbados.	430
Figura 23.1. Esquema de montagem do sistema de destilação a vapor para análise de nitrogênio.	452
Figura 23.2. Esquema de montagem do sistema de fluxo contínuo (FIA) para análise de amônio em extratos de solo com KCl 2M, de acordo com Alves et al. (1993).	461
Figura 23.3. Esquema de montagem do sistema de fluxo contínuo (FIA) para análise de nitrato em extratos de solo com KCl 2M, de acordo com Giné et al. (1980).	463
Figura 24.1. Acumulação de N derivado do solo e do ¹⁵ N-fertilizante (Ndff) por duas plantas-controle num solo marcado com dose única de sulfato de amônio marcado com ¹⁵ N aplicada no plantio.	477
Figura 24.2. Mudança do enriquecimento de ¹⁵ N em arroz (controle não fixador de N ₂) com o tempo em solo, no campo, marcado com aplicação única de sulfato de amônio marcado com ¹⁵ N ou matéria orgânica marcada com ¹⁵ N.	478
Figura 24.3. Influência de uma variabilidade de 10% do enriquecimento de ¹⁵ N nas estimativas da por- centagem de N derivado da FBN (%Nd _f a). 484	
Figura 26.1. Representação esquemática de um sistema de análise de carbono através do processo de combustão úmida.	515

ANEXO 2. Lista de Tabelas

Tabela 1.1.	Tempo necessário para atingir a temperatura de 121°C, em uma autoclave, em função do volume de líquido e do número de recipientes, considerando uma temperatura inicial de 26°C a 28°C. Segundo Phillips & Miller (1975).	36
Tabela 1.2.	Tempo necessário para a esterilização pelo método calor seco (com ar quente).	37
Tabela 1.3.	Comparação entre o tamanho de diversas partículas e o poder de resolução do olho humano e dos microscópios.	41
Tabela 1.4.	Coloração adquirida após a preparação de tecidos com corantes empregados nos estudos de microscopia óptica.	41
Tabela 2.1.	Nome vulgar e científico das leguminosas mais estudadas quanto à fixação do N ₂	47
Tabela 2.2.	Principais diferenças entre os gêneros <i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> e <i>Azorhizobium</i> . Segundo Giller & Wilson (1993).	49
Tabela 2.3.	Espécies de <i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> e <i>Azorhizobium</i> e principais hospedeiros.	50
Tabela 3.1.	Solução nutritiva para crescimento de plantas. (Norris & Date, 1976).	68
Tabela 3.2.	Solução nutritiva para crescimento de plantas (Somasegaran & Hoben, 1985).	71
Tabela 3.3.	Números Mais Prováveis para uso com diluições decimais e três tubos, probabilidades de ocorrência e limites mínimo e máximo do intervalo de confiança (IC) a 95%.	77
Tabela 3.4.	Números Mais Prováveis para uso com diluições decimais e quatro tubos, probabilidades de ocorrência e limites mínimo e máximo do intervalo de confiança a 95%.	80
Tabela 3.5.	Números Mais Prováveis para uso com diluições decimais e cinco tubos, probabilidades de ocorrência e limites mínimo e máximo do intervalo de confiança a 95%.	84
Tabela 4.1.	Composição de um autolisado de leveduras (Zabriskie, sem data).	101
Tabela 4.2.	Valores típicos de μ e t_g para cultivo de rizóbio.	110
Tabela 4.3.	Valores de velocidade de transferência de O ₂ dissolvido e resultados obtidos para cultivo de rizóbio.	111
Tabela 4.4.	Influência da temperatura no crescimento de <i>B. japonicum</i> SEMIA 587.	113
Tabela 4.5.	Fontes de C para cultivo de rizóbio.	113
Tabela 4.6.	Resultados do crescimento de <i>R. phaseoli</i> (Boiardí, 1985).	125
Tabela 4.7.	Estados estacionários obtidos no experimento da Figura 4.14.	127
Tabela 6.1.	Número de células de <i>B. japonicum</i> SEMIA 586 (CB 1809) em inoculante turfoso produzido pela utilização de caldo concentrado e diluído.	153
Tabela 8.1.	Preparo dos padrões de sulfato de bário (BaSO ₄) ou nefelômetro de McFarland.	177
Tabela 9.1.	Comparações entre as propriedades e aplicações de várias DNA polimerases termo-resistentes.	188
Tabela 9.2.	Exemplo da composição e das concentrações de reagentes utilizados nas 53 reações de RAPD.	191
Tabela 9.3.	Oligonucleotídeos que apresentaram boas ampliações com <i>Rhizobium</i> e <i>Bradyrhizobium</i>	195
Tabela 10.1.	Volumes (em mL) dos ingredientes necessários para o preparo de géis de corrida e empilhamento para o aparelho Mini Protean II da fábrica Bio-Rad (de acordo com instruções do fabricante).	220
Tabela 11.1.	Relação de algumas estirpes de <i>Escherichia coli</i> e plasmídeos empregados em análises genéticas de <i>Rhizobium</i>	228
Tabela 11.2.	Modo de ação dos antibióticos mais comumente empregados em microbiologia e mecanismos de resistência de bactérias a esses antibióticos.	232

Tabela 14.1. Algumas diferenças encontradas entre as espécies <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	309
Tabela 14.2. Características diferenciais entre estirpes do Tipo I e do Tipo II que nodulam o feijoeiro. Segundo Martínez et al. (1985, 1988, 1991) e Brom et al. (1988).	314
Tabela 14.3. Algumas características fenotípicas que diferenciam as espécies que nodulam o feijoeiro (Martínez-Romero et al., 1991).	315
Tabela 17.1. Soluções estoques para o preparo do meio de cultivo dos microrganismos nitrificadores. Segundo Schmidt & Belser (1982).	357
Tabela 17.2. Meios de cultura para crescimento de microrganismos nitrificadores (Saad & Conrad, 1993).	362
Tabela 19.1. Efeito da inoculação das estirpes SEMIA 5080 + SEMIA 5019, juntamente com a inoculação de <i>Bacillus</i> spp. ou seus metabólitos, na ocupação dos nódulos de soja, em solos com população estabelecida, em Londrina e Ponta Grossa, PR.	378
Tabela 19.2. Efeito da inoculação em sementes de soja, cv. BR-37, dos metabólitos e células de <i>Bacillus subtilis</i> (AP-3 e A3-5) sobre a germinação e fenótipo das raízes. Londrina, PR.	379
Tabela 20.1. Principais diferenças entre gêneros de fungos micorrízicos arbusculares. (Extraído de Silveira, 1992).	390
Tabela 20.2. Métodos e reagentes utilizados para clarear e corar raízes para avaliação da colonização micorrízica.	403

APÊNDICES

APÊNDICE 1. Abreviações e símbolos de unidades.

Abreviação	Unidade	Abreviação	Unidade
A	Ampère	log	Logaritmo decimal
Å	Angstrom	µm	Micrometro
atm	Atmosfera	µmol	Micromole
bp	Pares de base (= pb)	M	Concentração molar
C	Coulomb	MRad	Megarad
cal	Caloria	m	Metro
Ci	Curie	mg	Miligrama
cm	Centímetro	m/min	Minuto
d	Dia	mL	Mililitro
Da	Dalton	mm	Milímetro
dm	Decímetro	mol	Mole
g	Gramma	mV	Milivolt
h	Hora	N	Concentração normal
J	Joule	nm	Nanômetro
kb	Quilobase	pH	- log [H ⁺]
kcal	Quilocaloria	pK [?]	- log K [?]
kJ	Quilojoule	PM	Peso molecular
K	Kelvin	r	Revolução
K [?]	Constante de equilíbrio	s	Segundo
L	Litro	S	Unidade Svedberg
ln (log _e)	Logaritmo neperiano	V	Volt

APÊNDICE 2. Alguns prefixos utilizados no sistema internacional de unidades.

Múltiplo	Prefixo	Abreviação
10^9	giga	G
10^6	mega	M
10^3	quilo	k
10^{-1}	deci	d
10^{-2}	centi	c
10^{-3}	mili	m
10^{-6}	micro	μ
10^{-9}	nano	n
10^{-12}	pico	p
10^{-15}	femto	f

APÊNDICE 3. Alguns fatores de conversão.

Comprimento

$$1 \text{ cm} = 10 \text{ mm} = 10^4 \mu\text{m} = 10^7 \text{ nm} = 10^8 \text{ \AA}$$

Massa

$$1 \text{ g} = 10^{-3} \text{ kg} = 10^3 \text{ mg} = 10^6 \mu\text{g} = 10^9 \text{ ng} = 10^{12} \text{ pg} = 10^{15} \text{ fg}$$

Temperatura

$$^\circ\text{C} = 5/9(^\circ\text{F} - 32), \text{ K} = ^\circ\text{C} + 273$$

APÊNDICE 4. Algumas constantes matemáticas.

$$\Pi = 3,1416$$

$$e = 2,718$$

$$\ln x = 2,303 \log x$$

APÊNDICE 5. Informações úteis para o preparo de soluções.

Molaridade:

$$1 \text{ M} = 1 \text{ mol/L}$$

Normalidade:

$$1 \text{ N} = \text{eqg/L}$$

1 eqg = peso molecular/número de oxidação do cátion ou do ânion.

APÊNDICE 6. Medidas e informações úteis para os trabalhos com DNA.

- Peso molecular (médio) de um par de bases de DNA: 649 Da
- Peso molecular (médio) de um aminoácido: 110 Da
- 1 $\mu\text{g/mL}$ de DNA: 3,08 μM de fosfato
- 1 $\mu\text{g/mL}$ de DNA de 1 kb: 3,08 nM de terminais 5'
- 1 μmol de DNA do plasmídeo pBR322 (4363 bp): 2,38 g
- 1 pmol de DNA terminais 5', linearizados, do plasmídeo pBR322: 1,4 μg
- 1 A_{260}^* de DNA de fita dupla: 50 μg
- 1 A_{260} de DNA de fita simples: 37 μg
- 1 kb de DNA: capacidade de codificação para 333 aminoácidos
 - 6,5.10⁵ Da de DNA de fita dupla (sal sódico)
 - 3,3.10⁵ Da de DNA de fita simples (sal sódico)
 - 3,4.10⁵ Da de RNA de fita simples (sal sódico)
- 10 kDa de proteína: \cong 91 aminoácidos
 - \cong 273 nucleotídeos

* 1 A_{260} : Uma (1) unidade de absorvância a 260 nm.

APÊNDICE 7. Propriedades das soluções comerciais concentradas de ácidos e bases e volume necessário para fazer uma solução 1 N.

Composto	P.M.	Gravidade Específica	Porcentagem (peso/peso)	g/100 mL	Normalidade aproximada (N)	mL necessários para fazer 1 L de solução 1 N
HCl	36,5	1,19	37	44,0	12,1	82,5
HNO ₃	63,0	1,42	70	91,0	15,8	63,5
H ₂ SO ₄	98,1	1,84	96	173,0	35,2	29,0
H ₃ PO ₄	98,0	1,71	85	146,0	44,5	22,5
HClO ₄	100,5	1,66	70	116,2	11,6	86,5
HCOOH	46,0	1,20	88	105,6	24,0	41,6
CH ₃ COOH	60,0	1,06	100	106,0	17,4	57,5
NH ₃	17,0	0,91	28	22,8	14,8	67,5

APÊNDICE 8. Preparo de tampão fosfato, 0,1 M, com diversos pH, a partir de duas soluções-estoque.

Soluções-estoque:

Solução A: 0,2 M

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	15,60 g/500 mL
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	13,80 g/500 mL
NaH_2PO_4	11,99 g/500 mL

Solução B: 0,2 M

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	26,807 g/500 mL
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	35,814 g/500 mL
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	17,799 g/500 mL

Preparar as soluções estoque conforme descrito acima e mantê-las em geladeira. Para preparar 200 mL de tampão fosfato 0,1 M, tomar X mL da solução A e Y mL da solução B, de acordo com o pH final desejado, conforme a tabela abaixo, misturar e diluir até 200 mL com água destilada. Caso haja necessidade de empregar tampão esterilizado no procedimento, preparar a mistura antes de esterilizá-la. Alternativamente, podem-se manter soluções estoque esterilizadas, diluindo-as com água destilada esterilizada na hora de preparar o tampão.

pH	mL A (X)	mL B (Y)	pH	mL A (X)	mL B (Y)
5,7	93,5	6,5	6,9	45,0	55,0
5,8	92,0	8,0	7,0	39,0	61,0
5,9	90,0	10,0	7,1	33,0	67,0
6,0	87,7	12,3	7,2	28,0	72,0
6,1	85,0	15,0	7,3	23,0	77,0
6,2	81,5	18,5	7,4	19,0	81,0
6,3	77,5	22,5	7,5	16,0	84,0
6,4	73,5	26,5	7,6	13,0	87,0
6,5	68,5	31,5	7,7	10,5	90,5
6,6	62,5	37,5	7,8	8,5	91,5
6,7	56,5	43,5	7,9	7,0	93,0
6,8	51,0	49,0	8,0	5,3	94,7

APÊNDICE 9. Preparo de tampão acetato, 0,1 M, tampão citrato-fosfato, 0,05M e tampão Tris, 0,1M.

As soluções-estoque (ver rodapé da tabela abaixo) devem ser preparadas e mantidas conforme descrito para o caso do tampão fosfato. Para preparar os tampões, misturar as soluções-estoque, de acordo com o pH final desejado, e diluir com água conforme instruções no rodapé da tabela abaixo:

pH	Valor de X (mL) a Ser Empregado no Preparo dos Tampões		
	Acetato ¹	Citrato-fosfato ²	TRIS-HCl ³
4,0	41,0	30,7	-
4,2	36,8	29,4	-
4,4	30,5	27,8	-
4,6	25,5	26,7	-
4,8	20,0	25,2	-
5,0	14,8	24,3	-
5,2	10,5	23,3	-
5,4	8,8	22,2	-
5,6	4,8	21,0	-
5,8	-	19,7	-
6,0	-	17,9	-
6,2	-	16,9	-
6,4	-	15,4	-
6,6	-	13,6	-
6,8	-	9,1	-
7,0	-	6,5	-
7,2	-	-	44,2
7,4	-	-	41,4
7,6	-	-	38,4
7,8	-	-	32,5
8,0	-	-	26,8
8,2	-	-	21,9
8,4	-	-	16,5
8,6	-	-	12,2
8,8	-	-	8,1
9,0	-	-	5,0

¹ Misturar X mL de solução 0,2 M de ácido acético com (50 - X) mL de solução 0,2 M de acetato de sódio e diluir para 100 mL.

² Misturar X mL de solução 0,1 M de ácido cítrico com (50 - X) mL de solução 0,2 M de Na₂HPO₄ e diluir para 100 mL.

³ Misturar 50 mL de solução 0,2 M de TRIS-Base com X mL de solução 0,2 M de HCl e diluir para 100 mL.