



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agrobiologia
Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Caixa Postal 74505 - CEP 23851-970 - Seropédica, RJ
Fone (021) 682-1500 Fax (021) 682-1230
E-mail: sac@cnpab.embrapa.br

COMUNICADO TÉCNICO

Nº 43, dez/2000, p1-4



ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE *PSEUDOMONAS* SPP. FLUORESCENTES NATIVAS EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO AGRÍCOLA

Mônica Cristina Cardoso da Fonseca¹
Valéria Cristina Palmeira Zago²
Enderson Petrônio de Brito Ferreira³
Aline de Fátima Santos Câmara⁴
Norma Gouvêa Rumjanek⁵

O solo se encontra entre os habitats mais complexos do globo, e ainda assim, seu sistema biológico é pobremente conhecido. A interação da comunidade biótica com o solo tem um papel vital na produção agrícola e na manutenção da qualidade dos solos, por isso o conhecimento acerca dos organismos que nele habitam representa um elemento-chave no desenvolvimento da agricultura sustentável.

A caracterização morfológica de colônias de bactérias, embora trabalhosa e até certo ponto subjetiva, é importante como uma primeira aproximação para avaliação da diversidade de populações microbianas. O estudo de um maior número de representantes das populações pode tornar-se viável com o agrupamento morfológico de indivíduos semelhantes. Dessa forma,

¹ Estudante de Doutorado em Fitotecnia da UFRRJ.

² Estudante de Doutorado em Ciência do Solo da UFRRJ.

³ Estudante de Mestrado em Ciência do Solo da UFRRJ.

⁴ Estudante de Biologia da UFRJ e Bolsista de Iniciação Científica do CNPq

⁵ Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia, Caixa Postal 74505, CEP: 23851-970, Seropédica-RJ.

a seleção de representantes dos grupos permitirá que nas etapas posteriores de caracterização, um número menor de isolados possa ser avaliado com menor perda da informação acerca da diversidade do sistema agroecológico.

Grande ênfase tem sido dada ao estudo do gênero *Pseudomonas* em sistemas de produção agrícola devido a grande versatilidade nutricional, habilidade de crescer em uma ampla variedade de ambientes e grande potencial de colonização de raízes. Estas bactérias são encontradas em solos, folhagens, águas e sedimentos e, principalmente as bactérias fluorescentes, pertencentes a este gênero, são de muita importância em diversas áreas como Fitopatologia, Tecnologia de Alimentos e Controle Biológico.

Embora algumas das espécies de *Pseudomonas* spp. fluorescentes sejam bem conhecidas como fitopatógenos (como *P. syringae*), muitos membros deste grupo têm sido considerados promissores como rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCPs), pela produção de reguladores de crescimento vegetal e/ou outros metabólitos secundários (sideróforos, β -1,3-glucanase, quitinases, antibióticos e ácido hidrociânico) que inibem microrganismos deletérios, além da indução de resistência sistêmica nas plantas.

No Laboratório de Ecologia Molecular Microbiana da Embrapa-Agrobiologia são desenvolvidos estudos da diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio onde, mais recentemente, iniciou-se uma nova linha de trabalho com *Pseudomonas* spp. fluorescentes. O objetivo deste comunicado é divulgar as etapas iniciais adotadas como procedimento para o isolamento e caracterização morfológica deste gênero.

Os microrganismos habitantes da rizosfera podem desenvolver-se no solo, sobre a superfície radicular (epifíticos) e/ou no interior das raízes (endofíticos). A metodologia adotada neste laboratório preconiza que os isolados de solo rizosférico são obtidos após retirada da planta com torrão de solo e posterior remoção do excesso de solo. Os isolados de rizoplane são obtidos a partir de raízes finas submetidas a agitação com $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 M) como solução extratora. No caso dos isolados provenientes de interior de tecidos radiculares, as raízes são desinfestadas com soluções de etanol (70 %) e hipoclorito de sódio (3 %). É necessário uma etapa de ajuste para determinar a concentração eficaz para desinfestação da superfície dos tecidos, uma vez que esta poderá variar com a espécie e idade da planta. As raízes são lavadas e maceradas em solução extratora. Para comprovação da origem endofítica dos isolados, deve

ser verificada a ausência de crescimento microbiano em meio inoculado com alíquota da solução extratora usada na última lavagem do material antes da maceração.

A amostra de material vegetal ou solo a ser utilizada deve manter a relação de 1:10 com a solução extratora de forma a permitir diluições seriadas. A partir de cada diluição, alíquotas de 100 µl são inoculadas em meio King B e as placas incubadas a 30 °C por 48 horas. A partir das placas que apresentam 30 a 300 colônias, são isoladas aquelas que apresentaram diferenças morfológicas visíveis. Após nova incubação, as colônias são observadas quanto à presença ou não de um halo esverdeado e, posteriormente, são submetidos a avaliação da fluorescência sob luz UV (366nm). São atribuídos valores que variam de 1 a 3 para a intensidade da fluorescência sob luz UV (1 = pouca, 2 = média e 3 = muita). De modo geral, observa-se que as colônias que apresentam o halo esverdeado exibem intensidade de fluorescência sob luz UV igual a 3.

A caracterização morfológica das colônias isoladas que apresentam qualquer intensidade de fluorescência é realizada com auxílio de uma lupa. Os aspectos considerados são: tamanho, forma, borda, homogeneidade, cor, transparência, elevação, muco e elasticidade. Sendo divididos em categorias: tamanho (>2 mm, 1-2mm, puntiforme), forma (circular ou irregular), borda (lisa ou ondulada), homogeneidade (homogênea ou heterogênea), cor (amarelo, amarelo claro, amarelo esverdeado, amarelo forte, creme e branco), transparência (transparente ou opaca), elevação (presença ou ausência), muco (pouco, médio e muito) e elasticidade (pouca, média e muita). As características como: tamanho, forma, borda, homogeneidade, transparência, elevação são avaliadas nas colônias isoladas, enquanto que cor, muco e elasticidade são observadas na massa celular sobre as estrias mais densas.

A elevação foi definida como uma diferença significativa entre a altura da colônia em relação ao nível do meio de cultura. Colônias elevadas não são muito freqüentes, porém quando exibida, esta característica é comumente associada à presença de muito muco.

A homogeneidade refere-se à aparência da colônia, sendo caracterizada como heterogênea aquela de aspecto desigual, exibindo o centro mais escuro ou mais denso que a região periférica.

A elasticidade é verificada tocando a massa celular com uma alça de platina e ao erguê-la levemente, sucessivas vezes, quando muito elástica, esta apresenta um fio longo (cerca de 1

cm) entre a massa celular e a alça; média, quando um fio mais curto é observado e pouca elasticidade, na ausência de fio.

Quanto ao muco, os isolados que apresentam pouco muco exibem uma massa celular de aspecto mais seco e menos abundante, enquanto as categorias médio e muito muco mostram um crescente aspecto viscoso e mais abundante.

Nas coleções de *Pseudomonas* spp fluorescentes obtidas no Laboratório de Ecologia Molecular Microbiana observou-se que a forma e tipo de borda não são aspectos relevantes para diferenciar os isolados, predominando aqueles com forma circular e borda lisa. A maioria dos isolados destas coleções mostra coloração nos tons de amarelo citados. No entanto, as demais características apresentam um considerável grau de diferenciação entre os isolados.

Após identificação de alguns isolados pelo "kit API20NE" observou-se que aqueles classificados como *P. fluorescens* apresentaram, em sua maioria, pouca elasticidade, enquanto que aqueles identificados como *P. putida* mostraram muita elasticidade. Provavelmente, esta característica é importante na diferenciação entre as espécies deste gênero, no entanto, faz-se necessário verificar se há reprodutibilidade desta observação em outros estudos.

Observou-se que a caracterização morfológica foi relevante como ponto de partida no estudo da diversidade das populações de *Pseudomonas* spp. fluorescentes nos sistemas de produção orgânica de olerícolas e frutíferas e de plantio direto na sucessão trigo-soja. Análises genotípicas tais como as que empregam técnicas do tipo PCR-RAPD, devem ser realizadas para determinação segura do agrupamento filogenético e avaliação de variabilidade através do polimorfismo intra-específico.