



Nº 12, Junho/96, p.1-4

COMUNICADO
TÉCNICO

**MEIOS DE CULTURA ESPECÍFICOS PARA O ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS
ENDOFÍTICAS QUE FIXAM N₂ ATMOSFÉRICO.**

Vera L. Divan Baldani¹
José Ivo Baldani²
Johanna Döbereiner²

A descoberta recente de que bactérias diazotróficas colonizam raízes, colmos e folhas de arroz, milho, sorgo e especialmente cana-de-açúcar explica muito mais fácil as grandes contribuições destas bactérias na nutrição das plantas. Bactérias que colonizam endofiticamente células e xilemas da plantas, praticamente não tem competição pelos nutrientes obtidos via fotossíntese pela planta. O nitrogênio atmosférico fixado fica diretamente disponível para a planta, assemelhando-se assim à simbiose das leguminosas.

A falta de estruturas visíveis durante o processo de infecção e colonização das plantas pelas bactérias diazotróficas endófitas requereu o desenvolvimento de meios específicos para o isolamento das mesmas. Dado a característica microaerofílica destas bactérias foi então desenvolvido o meio semi-sólido cuja praticidade pode ser avaliada pela quantidade de trabalhos desenvolvidos na área. Praticamente todos os estudos de ocorrência e isolamento de diazotróficos endófitos empregam o meio semi-sólido.

¹ Lic.Ciências Agrícolas, PhD., EMBRAPA/CNPAB

² Eng^{os} Agrônomos, PhD., EMBRAPA/CNPAB

Comunicado Técnico nº12, CNPAB, junho/96, p. 2/4

De acordo com a espécie endofítica de interesse diferentes partes da planta são usadas já que estas bactérias são endofitas obrigatórias e não são isoladas do solo. Raízes, folhas e colmos são normalmente lavadas em água esterilizada e trituradas em liquidificador com solução salina (1/4 dos sais do meio JNFb). Alíquotas de 0,1 ml deste macerado são inoculados em frascos contendo meio semi-sólido específico onde são formados películas características para cada bactéria em estudo.

O meio de cultura semi-sólido JMV aqui descrito permitiu o isolamento de um grupo de bactérias diazotróficas com características que permitiram incluí-las no gênero *Burkholderia*. Bactérias deste grupo foram isoladas de cana-de-açúcar, batata-doce, mandioca e principalmente de arroz cultivado no Brasil sendo o nome *B. brasiliensis* proposto para esta nova bactéria endofítica e fixadora de nitrogênio (Baldani, 1996). Na literatura se conhece somente uma espécie diazotrófica deste gênero denominada *B. vietnamiensis* (Gillis et al., 1995) e que foi isolada da rizosfera de raízes de arroz cultivado no Vietnã.

O meio JMV tem a seguinte composição por litro: 5g Manitol; 0,6g KH_2PO_4 ; 0,2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1g NaCl; 0,2g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2,0ml azul de bromotimol (solução 0,5% em 0.2N KOH); 2,0ml solução de micronutrientes (0,04g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 1,2g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,4g H_3BO_3 ; 1,0g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,175g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$); 1,0ml solução de vitaminas (100mg biotina; 200mg piridoxol-HCl); 4,0 ml FeEDTA (solução 1,64%). Ajustar o pH para 4.0 a 4.5 e adicionar 2,5g de agar (variável, de acordo com a marca do agar) no caso do preparo de meio semi-sólido ou 20 g de agar e 50 mg de extrato de levedura para o preparo do meio sólido.

No meio JMV semi-sólido uma película grossa é formada na superfície do meio 4 a 5 dias após a incubação a 32°C. A película se torna amarelo-laranja devido a presença do azul de bromotimol no meio. Ao microscópio, as células são pequenas ($1,5\mu \times 3,2\mu$) e pouco móveis. Quando crescidas em placas de Petri com meio JMV formam colônias côncavas, opacas, redondas e úmidas.

Outro grupo de endófitos fixadores de nitrogênio que foi isolado usando-se o meio semi-sólido JNFb é o do gênero *Herbaspirillum*, atualmente formado pelas espécies *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*. Este meio tem permitido os estudos sobre a ocorrência

Comunicado Técnico nº12, CNPAB, junho/96, p. 3/4

e isolamento rotineiro de estirpes desta duas espécies, assim como de outras bactérias ainda não identificadas, possivelmente pertencentes a este gênero.

O meio JNFb semi-sólido tem a seguinte composição por litro: 5,0g ácido málico; 0,6g K_2HPO_4 ; 1,8g KH_2PO_4 ; 0,2g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1g NaCl; 0,02g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 2ml solução de micronutrientes (vide JMV); 2ml azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2N KOH); 4ml FeEDTA (sol 1,64%); 1ml solução de vitaminas (vide JMV). Ajustar o pH para 5,8 com KOH e adicionar 1,8g de agar (variável com a marca do agar) no caso de meio semi-sólido. Para meio sólido acrescenta-se 16,0g de agar, 20,0 mg de extrato de levedura e 6ml de azul de bromotimol. No meio semi-sólido uma película fina como véu é formada por todas as espécies de *Herbaspirillum* e o meio torna-se azul devido ao uso do malato. Em placas contendo JNFb, as duas espécies formam colônias pequenas (1 a 2 mm) com centro azul escuro. As células, assim como as de *Burkholderia*, são pequenas ($0,6\mu \times 3-4\mu$) quando crescidas em meio semi-sólido e apresentam movimento espiriloide quando próximas da bolha de ar em lâminas visualizadas ao microscópico ótico. A espécie *H. rubrisubalbicans*, que causa estria mosqueada em cana-de-açúcar, se distingue de *H. seropedicae* pelo uso de N-acetil-glucosamina e meso-eritritol como fontes de carbono quando crescidas em meio de cultura semi-sólido. O *H. rubrisubalbicans* usa meso-eritritol somente em presença de N-mineral, enquanto que o *H. seropedicae* utiliza o N-acetil glucosamina sob condições de fixação de nitrogênio. As variedades de cana-de-açúcar brasileiras, que foram selecionadas com baixas aplicações de N, são completamente resistentes a estria mosqueada e, como outras variedades, são colonizadas pelas duas espécies de *Herbaspirillum*, além da *Burkholderia brasilensis* e de uma outra bactéria diazotrófica endófito denominada *Acetobacter diazotrophicus*.

O *A. diazotrophicus* foi encontrado em cana-de-açúcar e batata-doce, plantas estas que se propagam vegetativamente e tem sido facilmente isolado através do meio semi-sólido LGI-P. A composição do meio LGI-P por litro é a seguinte: 100g sacarose ou açúcar cristal; 0,2g K_2HPO_4 ; 0,6g KH_2PO_4 ; 0,2g $MgSO_4 \cdot 2H_2O$; 0,02g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,002g $Na_2Mo_4 \cdot 2H_2O$; 5ml Azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2N KOH); 0,01g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$.

Comunicado Técnico nº12, CNPAB, junho/96, p.4/4

Ajustar o pH para 5,5 a 6,0 com ácido acético e completar o volume para 1000ml com água destilada. Adicionar 1,8g de agar (variável com a marca do agar) no caso de preparo do meio semi-sólido e 17g de agar e 20mg de extrato de levedura para o preparo de meio sólido.

As células de *A. diazotrophicus* possuem tamanho de 0,7-0,8 x 2-4µm e não apresentam movimento espiralado. Uma película de cor amarelada é formada em meio semi-sólido 7 a 10 dias após a inoculação, sendo que o meio abaixo da mesma fica incolor devido possivelmente à assimilação do azul de bromotimol pelas bactérias. As colônias formadas em placas de meio LGI-P são de cor laranjas e pequenas. Quando riscadas em meio batata-P as colônias formadas são inicialmente claras e úmidas, tornando-se de coloração chocolate após 7 a 10 dias de incubação. Maiores detalhes sobre o isolamento e identificação desses endófitos e de outras bactérias fixadoras de nitrogênio associadas às gramíneas e outras plantas não-leguminosas de importância agrônômica podem ser encontradas na publicação Döbereiner et al., (1995).

REFERÊNCIAS

- BALDANI, V.L.D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** Itaguaí: UFRRJ, 1996. 290p. Tese Doutorado.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas.** Brasília: EMBRAPA-SPI; Itaguaí: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60p.
- GILLIS, M.; TRAN VAN, V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HERBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HEULIN, T.; FERNANDES, M.P. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.45, p.274-289, 1995.