



## 063 - Isolamento e caracterização fenotípica de rizóbios obtidos de substrato de cupinzeiro, utilizando-se soja como planta-isca

*Isolation and phenotypic characterization of rhizobia obtained from termite substrate using soybean as a trap-host*

SILVA, Amanda Tomaz. UNIGRAN/Embrapa Agropecuária Oeste, amanda.tomaz@gmail.com; PORTILHO, Irzo Isaac Rosa. UEMS/Embrapa Agropecuária Oeste, irzo\_i@terra.com.br; COSTA, Maira Rejane. UEL/Embrapa Agropecuária Oeste, mairacosta@gmail.com; MERCANTE, Fábio Martins. Embrapa Agropecuária Oeste, mercante@cpao.embrapa.br.

### Resumo

Os térmitas são um importante grupo de insetos terrestres, caracterizados pela capacidade de fixar nitrogênio atmosférico através de microrganismos presentes no intestino desses isópteros. Considerando a capacidade dos térmitas de contribuir com a fertilização nitrogenada, por meio da fixação biológica de nitrogênio (FBN) em solos tropicais, estudos que visam avaliar a diversidade biológica desses microrganismos são de fundamental importância para promoção do conhecimento da sua taxonomia e avaliação da sua contribuição efetiva. Assim, o presente trabalho teve como objetivo realizar o isolamento e caracterização fenotípica de rizóbios obtidos de substrato de cupinzeiro, utilizando-se plantas de soja como plantas-isca. A coleta do substrato de cupinzeiros foi realizada na Fazenda Campana, Município de Rio Brillhante, MS. Duas estirpes de rizóbio recomendadas comercialmente para inoculação na cultura de soja: SEMIA 587 e SEMIA 5019 (*Bradyrhizobium elkanii*) e SEMIA 5079 e SEMIA 5080 (*Bradyrhizobium japonicum*) foram utilizadas como padrão comparativo de eficiência simbiótica, com os isolados obtidos de nódulos de soja, visando à construção de um fenograma. Do substrato de cupinzeiros, foram obtidas bactérias fixadoras de nitrogênio em soja, com ampla diversidade fenotípica, verificando-se a ocorrência de diversos grupos e subgrupos com diferentes níveis de similaridade.

**Palavras-chave:** diversidade microbiana , fixação biológica nitrogênio, térmitas.

### Abstract

*The termites constitute an important group of terrestrial insects, characterized by the ability to fix atmospheric nitrogen by microorganisms present in their gut. Considering the ability of termites to contribute to the nitrogen fertilization by nitrogen fixation (BNF) in tropical soils, studies aimed at assessing the biological diversity of these microorganisms are essential to promote knowledge of its taxonomy and evaluation of their effective contribution. Thus, the present work was aimed at the isolation and phenotypic characterization of rhizobia obtained from mound substrate using soybean plants as a trap-host. The collection of nest substrate was made at Fazenda Campana, municipality of Rio Brillhante, MS. Two strains of Bradyrhizobium commercially recommended for inoculation in soybean: SEMIA 587 and SEMIA 5019 (*Bradyrhizobium elkanii*) and SEMIA 5079 and SEMIA 5080 (*Bradyrhizobium japonicum*) were used as standards for comparison with the rhizobia isolates obtained from soybean nodules to construct the phenogram. Nitrogen-fixing bacteria in soybean with broad phenotypic diversity were obtained from the substrate mounds , revealing the occurrence of various groups and subgroups with different levels of similarity.*



**Keywords:** *biological nitrogen fixation, microbial diversity, termites*

## Introdução

- Os térmitas ou cupins são um importante grupo de insetos terrestres e um dos mais importantes e ativos decompositores de materiais ricos em lignocelulose, especialmente em regiões tropicais (AQUINO, 2008; CORREIA et al., 2003). Esse grupo de insetos é caracterizado por uma diversidade funcional, que, segundo Donovan et al. (2001), é baseado nos processos de decomposição e ciclagem de nutrientes (grupo trófico I- Térmitas inferiores, II- Térmitas superiores, III - Térmitas e IV – Térmitas geófagos).

Entre as funções ecológicas desempenhadas pelos térmitas, destaca-se a simbiose realizada por microrganismos (protozoários, fungos e bactérias) que habitam diferentes compartimentos do intestino desses insetos (AANEN, 2007; BRUNE; FRIEDRICH, 2000; CORREIA et al., 2008; OHKUMA; KUDO, 1996). Segundo Fröhlich et al. (2007), os cupins se alimentam de uma dieta pobre em nitrogênio, no entanto, as bactérias presentes em seu intestino realizam a fixação biológica de nitrogênio (FBN), visando complementar a deficiência desse nutriente em sua alimentação. Assim, a FBN em procariontes presentes em diferentes compartimentos do intestino de térmitas é um dos principais aspectos na biologia do solo.

As variações na atividade de organismos fixadores de nitrogênio, a evolução das espécies de térmitas e as diferentes populações microbianas responsáveis por fixarem nitrogênio nos intestinos dos térmitas, são de fundamental importância e, de acordo com Ohkuma e Kudo (1996), precisam ser melhor elucidadas, visando compreender o sistema simbiótico destes isópteros. Considerando a capacidade de térmitas contribuírem com a fertilização nitrogenada, através da FBN, em solos tropicais, estudos que visam avaliar a diversidade biológica desses microrganismos são de fundamental importância para pesquisas de filogenia, taxonomia, competitividade e ecologia de rizóbio. Neste sentido, torna-se possível identificar novos grupos taxonômicos capazes de melhorar ainda mais a eficiência do processo de FBN. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar o isolamento e caracterização fenotípica de rizóbios obtidos de substrato de cupinzeiro, utilizando plantas de soja como plantas-iscas.

## Metodologia

### Obtenção de rizóbios de cupinzeiro, isolados de nódulos de soja

A coleta do substrato de cupinzeiros foi realizada na Fazenda Campana (22°16'29"S; 54°48'57"W), Município de Rio Brilhante, MS, onde a produção de gado de corte representa a principal atividade. O clima da região é classificado como Cwa, mesotérmico úmido, com o verão quente e o inverno seco (FIETZ; FISCH, 2008). Foram selecionadas duas áreas de pastagens (*Brachiaria brizantha*) de com 1,0 ha cada. Área 1) caracterizada por poucos ninhos de cupins (*Cornitermes cumulans*), com média de 68 ninhos por hectare; Área 2) caracterizada por apresentar maior densidade de ninhos, com média de 128 ninhos por hectare, além de maior quantidade de árvores e arbustos entre a pastagem. No centro de cada área, foram selecionados, de forma aleatória, 12 ninhos de cupins. Do interior de cada ninho, foi coletada uma amostra composta, oriundas de oito subamostras, com trado holandês e acondicionadas em caixa térmica. Posteriormente, as amostras das duas áreas foram homogenizadas e utilizadas como substrato



para o plantio de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Foram obtidos 16 isolados de nódulos de soja, utilizada como planta-isca.

### Isolamento e caracterização fenotípica de rizóbios obtidos de nódulos de soja

Os nódulos coletados de plantas de soja foram reidratados em água destilada estéril, desinfestados superficialmente em hipoclorito de sódio, a 5%, por cinco minutos, e lavados dez vezes com água destilada estéril. Em seguida, foram esmagados e purificados em meio YMA-yeast manitol agar. Culturas puras dos isolados de rizóbio foram caracterizadas morfológicamente em placas de petri contendo meio YMA (VINCENT, 1970). As estirpes recomendadas comercialmente para inoculação em soja foram utilizadas neste estudo como padrão de comparação: SEMIA 587 e SEMIA 5019 (*Bradyrhizobium elkanii*) e SEMIA 5079 e SEMIA 5080 (*Bradyrhizobium japonicum*). Os isolados de rizóbio foram caracterizados quanto às seguintes características fenotípicas: tempo de crescimento; alteração de pH do meio de cultura; produção de muco; tipo de muco; cor das colônias; absorção de indicador; Transparência e Elasticidade. A matriz de similaridade foi construída baseada nas características analisadas, de acordo com o coeficiente “p-distance”, utilizando o programa MEGA (versão 4.0), através do método UPGMA.

### Resultados e Discussão

Na Figura 1, está apresentado o fenograma obtido através da análise de agrupamento, utilizando o método UPGMA e o coeficiente de similaridade p-distance, cuja matriz de similaridade foi construída baseada na observação de características fenotípicas. Incluíram-se neste fenograma as estirpes de rizóbio recomendadas comercialmente para a cultura da soja no Brasil, SEMIA 587 e SEMIA 5019 de *Bradyrhizobium elkanii* e SEMIA 5079 e SEMIA 5080 de *Bradyrhizobium japonicum*, além de 16 isolados de rizóbio oriundos de solos de cupinzeiro, utilizando-se soja como planta-isca. De acordo com o fenograma, foi observada a formação de dois grupos: no primeiro grupo, as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 de *B. elkanii* formaram um grupo-irmão com as estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 de *B. japonicum*, confirmando, assim, a divisão proposta por Kuykendall et al. (1992). Foi observada ainda a presença do isolado CPAOS 1.13, formando um grupo-irmão com as estirpes de *B. japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080).

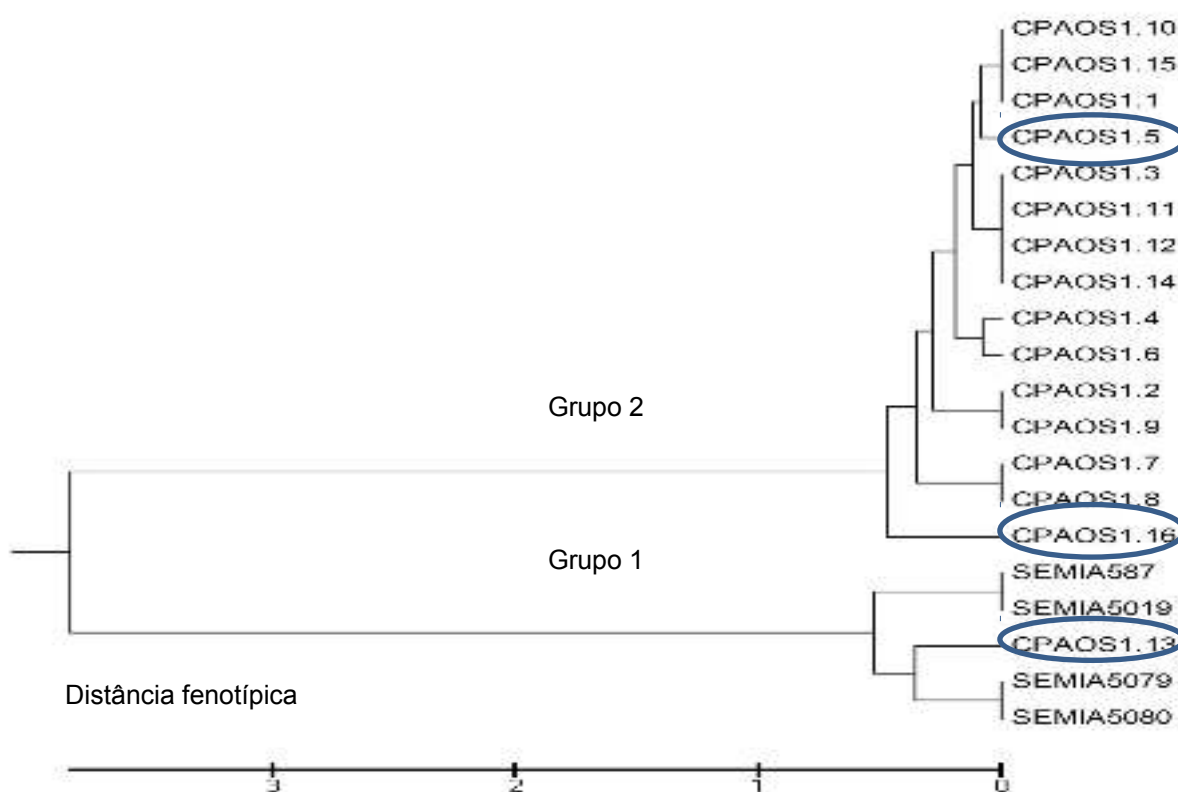
O segundo grupo caracterizou-se por uma ampla heterogeneidade entre os isolados de rizóbio avaliados, sendo possível observar a formação de vários subgrupos. Contudo, verificou-se uma distância fenotípica praticamente nula para alguns isolados pertencentes ao segundo grupo. No entanto, os isolados CPAOS 1.5 e CPAOS 1.16 foram caracterizados pela formação de um único grupo, quando comparado aos demais isolados de rizóbio obtidos de nódulos de soja.

Fröhlich et al. (2007) avaliaram a ocorrência de rizóbios no intestino de térmitas superiores de *Nasutitermes nigriceps* e isolaram a estirpe bacteriana simbiótica M3A, que apresentou uma similaridade (coeficiente 0,757) com *Ensifer meliloti* B. Por outro lado, o mesmo isolado M3A exibiu características diferentes para *Ensifer fredii* e *Ensifer meliloti*. Bactérias pertencentes à família Rhizobiaceae - *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (*Ensifer*), são caracterizadas por serem organismos fixadores de nitrogênio.

Em outro estudo, Warnecke et al. (2007) avaliaram a diversidade da comunidade microbiana, através de uma análise metagenômica da porção do intestino posterior do térmita xilófago *Nasutitermes* sp. Os resultados obtidos revelaram a ocorrência de 12 tipos de filos e 216 filotipos

de bactérias. Ainda, neste mesmo estudo, doze genes homólogos *nifH* foram identificados, demonstrando a presença de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> associadas a este térmita.

Por fim, os isolados representativos no segundo agrupamento, devido à sua grande heterogeneidade com base nas características fenotípicas, sugerem a necessidade de realização de novos estudos para melhor conhecimento. Tais estudos incluem a avaliação da eficiência simbiótica e caracterização genotípica, visando selecionar os isolados de maior importância para a FBN e, conseqüentemente, para produção de inoculantes mais eficientes para a cultura da soja.



**Figura 1.** Fenograma com base em características fenotípicas das estirpes de *Bradyrhizobium* spp utilizadas em inoculantes comerciais para soja, além de 16 isolados de rizóbio obtidos de substrato de cupinzeiro, utilizando soja como planta-isca.

### Conclusões

De modo geral, as plantas de soja produziram uma nodulação abundante, a partir de substrato de cupinzeiros como inóculo, indicando a presença de bactérias fixadoras de nitrogênio eficazes para esta cultura. Do substrato de cupinzeiros, foram obtidas bactérias fixadoras de nitrogênio, com ampla diversidade fenotípica, verificando-se a ocorrência de diversos grupos e subgrupos com diferentes níveis de similaridade.

### Referências

AANEN, D. K. et al. Patterns of interaction specificity of fungus-growing termites and



- Termitomyces* symbionts in South Africa. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 7, n. 115, 2007.
- BRUNE, A.; FRIEDRICH, M. Microecology of the termite gut: structure and function on a microscale. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 3, n. 3, p. 263-269, 2000.
- CORREIA, M. E. F. et al. **Associação entre térmitas e microrganismos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 20 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 254).
- DONOVAN, S. E. et al. Gut content analysis and a new feeding group classification of termites. **Ecological Entomology**, Oxford, v. 26, n. 4, p. 356-366, 2001.
- FIETZ, C. R.; FISCH, G. F. **O clima na região de Dourados, MS**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2008. 32 p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 92).
- FRÖHLICH, J. et al. Occurrence of rhizobia in the gut of the higher termite *Nasutitermes nigriceps*. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 30, n. 1, p. 68-74, 2007.
- KUYKENDALL, L. M. et al. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, n. 6, p. 501-503, 1992.
- OHKUMA, M. Termite symbiotic systems: eficiente bio-recycling of lignocellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 61, n. 1, p. 1-9, 2003.
- OHKUMA, M.; KUDO, T. Phylogenetic diversity of the intestinal bacterial community in the termite *Reticulitermes speratus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 62, n. 2, p. 461-468, 1996.
- OHKUMA, M. et al. Phylogenetic diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic microbial community in the gut of diverse termites. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 11, p. 4926-4934, 1999.
- VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. p. 3-4.
- WARNECKE, F. et al. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. **Nature**, London, v. 450, n. 7169, p. 560-565, 2007.