



## ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO EM SIMBIOSE COM ESPÉCIES DE *Mimosa* EM ÁREA DE SOLOS ULTRAMÁFICOS DE BARRO ALTO (GO)

Carlos Roberto Hertel Junior – Faculdade Anhanguera, Planaltina, DF. Leide Rovenia Miranda de Andrade – Embrapa Cerrados, Planaltina, DF. André Alves de Castro Lopes - Embrapa Cerrados, Planaltina, DF. Miguel Ramon Pignata Alves – Universidade Estadual de Goiás, Formosa, GO. Euan Kevin James - The James Hutton Institute, Invergowrie, Dundee, UK Iêda de Carvalho Mendes - Embrapa Cerrados, Planaltina, DF. Fábio Bueno dos Reis Junior - Embrapa Cerrados, Planaltina, DF. ;

### INTRODUÇÃO

Solos ultramáficos apresentam excesso de metais potencialmente tóxicos, tais como cobalto, cromo, cobre e, principalmente, níquel, além de baixa disponibilidade de nutrientes, como cálcio, fósforo e nitrogênio, resultando em forte desequilíbrio mineral. As características dos solos ultramáficos levam à ocorrência de uma gama de espécies adaptadas a condições extremas e a presença de mecanismos fisiológicos vegetais distintos. A presença dessa flora característica certamente está relacionada a uma associação muito estreita com a microbiota da rizosfera. Um grupo particularmente importante desta microbiota e especificamente relacionado ao ciclo do nitrogênio é aquele constituído pelas bactérias diazotróficas (fixadoras de nitrogênio). Plantas do gênero *Mimosa* foram identificadas como pioneiras, com alta rusticidade, boa produção de biomassa e tolerante a altas concentrações de Ni e figuram dentre as espécies vegetais predominantes nos solos ultramáficos de Barro Alto (GO). Recentemente descobriu-se que espécies desse mesmo gênero, nativas do Cerrado brasileiro, formam simbiose com bactérias diazotróficas conhecidas como  $\beta$ -rizóbios, particularmente *Burkholderia* spp., e que provavelmente desempenhem papel de destaque na ciclagem de N nesse ecossistema (Reis Junior *et al.* 2010). Esses mesmos estudos sugerem que características ambientais, em maior proporção que as espécies hospedeiras, são responsáveis por determinar a distribuição de espécies de *Burkholderia*. Estudos anteriores demonstraram que solos ácidos, o que não é o caso das áreas ultramáficas, poderiam ser mais favoráveis à sobrevivência de *Burkholderia*. O pH neutro a básico é mais favorável a *Cupriavidus*, outro simbiote de *Mimosa* spp., mas ainda não encontrado no Brasil nodulando essas plantas em sistemas naturais. *Cupriavidus* também é conhecido como um gênero adaptado a condições de alta concentração de metais (Klonowska *et al.*, 2012). Consequentemente, pode-se esperar encontrar plantas endêmicas de *Mimosa* spp. que co-evoluíram com bactérias semelhantes nos solos ultramáficos. Diante disso, é lógico acreditar que em um ambiente tão particular quanto esse a fixação biológica de nitrogênio seja conduzida por microsimbiontes ainda desconhecidos.

### OBJETIVOS

Avaliar a ocorrência e caracterizar bactérias diazotróficas noduladoras em simbiose com plantas do gênero *Mimosa* no maciço ultramáfico de Barro Alto (GO).

### MATERIAL E MÉTODOS

Duas áreas foram escolhidas para esse estudo, uma sob solo saprolítico e outra sob solo laterítico, com maior e menor biodisponibilidade de Ni, respectivamente. Nessas áreas foram encontradas duas espécies de *Mimosa* de

ocorrência abundante, *M. somnians* e *M. clausenii*. Os nódulos foram coletados e preparados para o isolamento das bactérias diazotróficas de acordo com os métodos clássicos propostos por Vincent (1970) e Somasegaran & Hoben (1994). Ainda no campo alguns nódulos coletados foram cortados pela metade e aqueles que se apresentaram potencialmente ativos e efetivos, foram transferidos para tubos com capacidade de 2,0mL contendo 2,5% de glutaraldeído em 50mM de tampão fosfato (pH 7,5) para posterior análise de microscopia e imunomarcagem com anticorpo contra o gênero *Burkholderia*, afim de determinar se esse era o simbiote presente (Reis Jr *et al.*, 2010). Os isolados obtidos foram morfológicamente caracterizados de acordo com seu tempo de crescimento, tamanho da colônia, forma, elevação, borda, superfície, produção de muco, consistência, detalhes ópticos e cromogênese. Além disso, foi avaliada a resistência máxima dos isolados contra concentrações crescentes de Ni em placas de meio-de-cultivo seguindo metodologia proposta por (Klonowska *et al.*, 2012)

## RESULTADOS

Os nódulos que foram examinados por microscopia ótica apresentaram estrutura típica de nódulos eficazes de *Mimosa*. As bactérias simbióticas presentes nesses nódulos foram identificadas como *Burkholderia* por meio de imunomarcagem com um anticorpo, gênero específico, produzido contra *B. phymatum* STM815. Apesar de todos os 86 isolados obtidos aparentarem pertencer ao gênero *Burkholderia*, observaram-se diferenças morfológicas entre suas colônias, indicando diversidade inter e/ou intra-específica. Esses mesmo isolados também apresentaram respostas variáveis nos testes de tolerância a diferentes concentrações de Ni.

## DISCUSSÃO

Nossos resultados preliminares indicam que, mesmo em solos com características aparentemente não adequadas para *Burkholderia*, como os solos ultramáficos desse estudo, essa bactéria permanece como o simbiote principal e preferido de plantas do gênero *Mimosa* no Brasil. Posteriormente, será verificado se a diversidade encontrada entre os isolados está correlacionada com a espécie de *Mimosa* e/ou a biodisponibilidade de níquel. Estudos futuros de identificação desses isolados irão mostrar se eles pertencem a uma ou mais espécies do gênero *Burkholderia*. Espera-se que os resultados desse trabalho auxiliem no avanço do conhecimento da simbiose entre bactérias diazotróficas e leguminosas presentes em solos com altas concentrações de metais, assim como, forneçam subsídios que poderão ser importantes para programas de recuperação de áreas impactadas pela mineração.

## CONCLUSÃO

A nodulação de *Mimosa* é um carácter comum e os simbiosites preferenciais das espécies encontradas nos solos ultramáficos de Barro Alto (GO) são pertencentes ao gênero *Burkholderia*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KLONOWSKA, A.; CHAINTREUIL, C.; TISSEYRE, P.; MICHE, L.; MELKONIAN, R.; DUCOUSSO, M.; LAGUERRE, G.; BRUNEL, B.; MOULIN, L. 2012. Biodiversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts (*Cupriavidus taiwanensis*, *Rhizobium mesoamericanum*) in New Caledonia and their adaptation to heavy metal-rich soils. *FEMS Microbiology Ecology*. 81: 618-635.

REIS JR, F.B.; SIMON, M.F.; GROSS, E.; BODDEY, R.M.; ELLIOTT, G.N.; NETO, N.E.; LOUREIRO, M.F.; QUEIROZ, L.P.; SCOTTI, M.R.; CHEN, W.M.; NORÉN, A.; RUBIO, M.C.; DE FARIA, S.M.; BONTEMPS, C.; GOI, S.R.; YOUNG, J.P.W.; SPRENT, J.I.; JAMES, E.K. 2010. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. *New Phytologist*. 186:934-946.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. 1994. Handbook for rhizobia: methods in Legume rhizobium technology. Springer-Verlag, New York.

VINCENT, J. M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP handbook 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

## **Agradecimento**

Agradecimentos a Mineradora Anglo American do Brasil e ao CNPq