

## **Unidade IV**

---

### *Interacções microrganismo-planta: bactérias do género Rhizobium e a fixação de azoto*

Dorit Schuller

- |   |          |
|---|----------|
| <b>1. O papel dos microrganismos no ciclo do azoto</b>  | <b>2</b> |
| <b>2. A fixação de azoto na relação simbiótica planta – <i>Rhizobium</i></b>                  | <b>3</b> |
| <b>3. Isolamento de <i>Rhizobium</i> a partir de nódulos de raízes de plantas leguminosas</b> | <b>5</b> |

## 1. O papel dos microrganismos no ciclo do azoto

---

O azoto é um elemento químico necessário a todos os organismos vivos para a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e outros compostos. A atmosfera terrestre contém quase 80% de azoto molecular ( $N_2$ ) gasoso. A maioria dos organismos vivos só consegue usar azoto “fixado”, que é azoto na sua forma reduzida (em combinação com hidrogénio), na forma de amónia. O ciclo do azoto, conforme ilustrado na figura 4.1, é um ciclo contínuo, constituído por uma série de processos que convertem azoto molecular gasoso em substâncias orgânicas e que voltam a libertá-lo na natureza.

As plantas verdes, os maiores produtores de matéria orgânica, usam o nitrato ( $NO_3^-$ ) ou a amónia ( $NH_4^+$ ) do solo, que são assimilados em forma de prótidos. Os animais, sendo consumidores e organismos heterotróficos, alimentam-se da matéria vegetal e transformam os compostos orgânicos azotados, nas suas próprias macromoléculas azotadas. Os microrganismos decompositores quebram os compostos azotados dos excrementos de animais (ureia e ácido úrico) e degradam também as proteínas de organismos mortos, libertando iões amónia. Em solos com concentrações suficientemente altas de oxigénio ocorre um processo designado por nitrificação, constituído por duas transformações químicas. Primeiro, as bactérias do género *Nitrosomonas* oxidam amónia ( $NH_4^+$ ) a nitritos ( $NO_2^-$ ), que depois são transformados por bactérias do género *Nitrobacter* em nitratos ( $NO_3^-$ ), a forma de azoto mais usada pelas plantas. Em solos com baixas concentrações de oxigénio, e na presença de bactérias desnitrificantes, ocorre um processo designado por desnitrificação caracterizado pela transformação de nitrato em azoto gasoso molecular, o qual é libertado para a atmosfera, conduzindo assim ao empobrecimento de solos em compostos azotados. A grande quantidade de azoto molecular ( $N_2$ ) atmosférico não pode ser utilizado pelas plantas. No entanto, existem bactérias fixadoras de azoto, que transformam o azoto molecular em amónia, encontrando-se em associação simbiótica com plantas (por exemplo, *Rhizobium* ou *Frankia*) ou não (por exemplo, *Azotobacter* ou *Clostridium*). Cerca de 1,7 a 7,0 kg de azoto são fixados anualmente numa área de 1 hectare (média mundial).

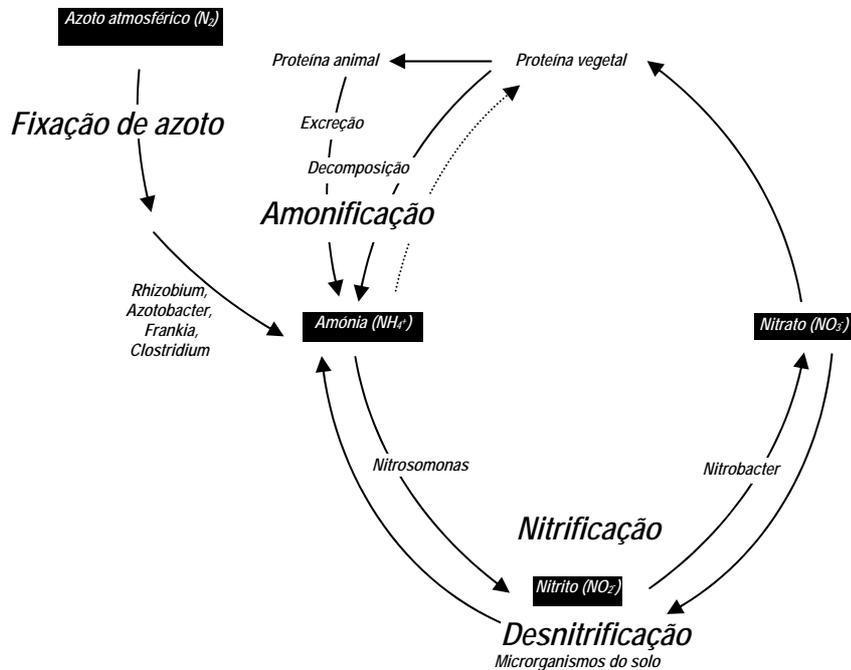


Figura 4.1 - Ciclo do azoto.

## 2. A fixação de azoto na relação simbiótica planta – *Rhizobium*

As plantas leguminosas como as ervilheiras, feijoeiros ou trevoceiros têm geralmente nódulos nas suas raízes (Figura 4.2). Uma bactéria do género *Rhizobium* infecta as raízes das plantas leguminosas, levando à formação de nódulos onde ocorre a fixação de azoto. Trata-se de uma relação simbiótica, uma vez que o sistema enzimático bacteriano fornece azoto reduzido ( $NH_3$ ) à planta, que por sua vez disponibiliza nutrientes para o metabolismo bacteriano. *Rhizobium* é um género bacteriano que ocorre no solo, tem uma estrutura regular e oval, e a fixação de azoto ocorre apenas quando se associa a uma planta hospedeira. Neste caso, a bactéria adquire uma forma celular irregular e é designada por bacteroide (Figura 4.2).

A interacção entre a planta hospedeira e *Rhizobium* inicia-se pela libertação de certos compostos pelas células da raiz, que estimulam a multiplicação das células bacterianas na rizosfera. Outros compostos funcionam como mediadores de

reconhecimento entre a planta e as bactérias, uma vez que uma determinada estirpe de *Rhizobium* pode infectar apenas certas espécies de plantas leguminosas. *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* infecta apenas raízes de ervilhas, enquanto que o trevo é a planta hospedeira de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. O desenvolvimento do nódulo é um processo caracterizado por uma interação/regulação muito complexa de grupos de genes da planta hospedeira e da bactéria.

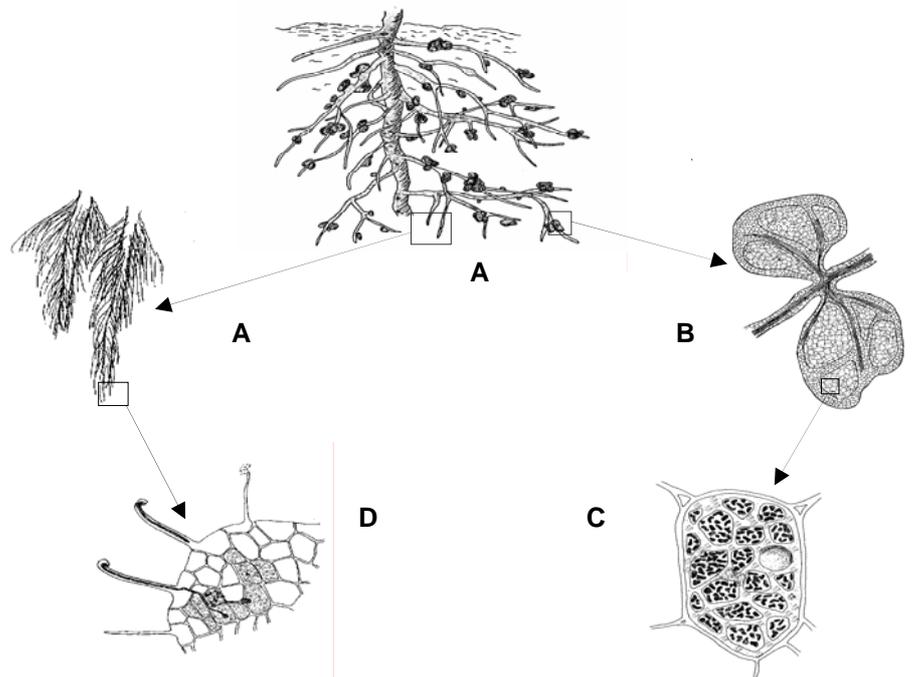


Figura 4.2. Representação esquemática da formação de um nódulo bacteriano na raiz da ervilha. A – raiz de ervilha com nódulos. B – Corte transversal de dois nódulos. C – célula contendo grupos de bacteroides envolvidos por uma membrana. D – processo de infecção da raiz na parte terminal dos pelos radiculares.

A fixação de azoto por *Rhizobium* é um processo de grande relevância para a agricultura. Certas plantas leguminosas como a soja são componentes fundamentais para a alimentação de animais. Estas plantas são capazes de crescer bem em solos pobres, onde o azoto é insuficiente para suportar o crescimento de outras espécies de plantas. Após a colheita, as raízes das plantas leguminosas são degradadas nos solos, libertando compostos orgânicos azotados em quantidade suficiente para permitir o bom desenvolvimento de outras plantas em cultivos futuros. Os agricultores aproveitam esta fertilização natural, alternando entre culturas de plantas leguminosas e não-leguminosas,

minimizando assim o uso excessivo de adubos comerciais, que contribuem de modo significativo para a poluição de lagos e de rios.

Trabalhos de investigação actuais têm como objectivo a inserção de genes que codificam para enzimas envolvidas na fixação de azoto em cereais, como por exemplo trigo, milho e arroz. Deste modo, será possível minimizar o uso de fertilizantes e aumentar o teor proteico das plantas de cultivo.

### **3. Isolamento de *Rhizobium* a partir de nódulos de raízes de plantas leguminosas**

---

A fixação de azoto ocorre apenas nos nódulos das raízes e não na bactéria que vive livre no solo. A incapacidade de *Rhizobium* fixar azoto quando se encontra na forma livre, pode ser demonstrada verificando a ausência de crescimento num meio sem azoto (neste caso um meio sem extracto de levedura). No laboratório, o exterior do nódulo deve ser quimicamente esterilizado e o nódulo esmagado para libertar as bacteroides. O extracto é inoculado num meio de cultura com agar, que contém fontes de azoto, carbono, e alguns sais minerais. No nódulo activo, que fixa azoto para a planta, encontram-se cerca de  $6 \times 10^9$  bacteroides, e o interior apresenta uma cor rosa/avermelhada. O interior dos nódulos jovens, que ainda não fixam azoto, é branco ou acinzentado.

|  |                     |
|--|---------------------|
|  | <i>Procedimento</i> |
|--|---------------------|

1. Corte um pedaço de uma raiz com cerca de 1 cm, que tenha pelo menos um nódulo, usando uma lâmina. Lave com água para remover a terra.
2. Colocar várias gotas de álcool a 70 % (p/v) numa caixa de Petri estéril usando uma pipeta de Pasteur (a pipeta não necessita estar estéril para esta operação). Transferir o pedaço da raiz para a caixa de Petri usando uma pinça e deixar imerso no álcool durante 2 minutos.

*As manipulações a seguir devem ser realizados em assépsia*

3. Transferir cerca de 15 ml de água estéril para uma caixa de Petri usando uma pipeta de Pasteur estéril e uma tetina.

4. Transferir o nódulo para a água estéril na caixa de Petri com o auxílio de uma pinça esterilizada (mergulhada em álcool e depois flamejada).
5. Rejeitar a água da caixa de Petri e colocar novamente água esterilizada. Repetir este processo de lavagem para remover o álcool residual.
6. Pipetar algumas gotas de água estéril para uma nova caixa de Petri e introduzir a porção de raiz usando uma pinça estéril. Macerar os nódulos usando uma pinça esterilizada até obter um líquido leitoso. Colocar a pinça num recipiente com desinfectante.
7. Esterilizar uma ansa e retirar um pouco do nódulo macerado e riscar numa placa de meio MYEA. Voltar a flamejar a ansa. Preparar outra placa de meio MA (meio sem fonte de azoto). Inverter as placas e incubar à temperatura ambiente durante 3 a 4 dias.
8. Tratar de forma adequada do material contaminado.
9. Desenhar um nódulo.
10. Montar numa lâmina com uma gota de água um corte transversal de um nódulo e desenhar a observação ao microscópio.

|  |                                    |
|--|------------------------------------|
|  | <i>Interpretação de resultados</i> |
|--|------------------------------------|

#### **- Crescimento de *Rhizobium* nos meios MA e MYEA**

A fixação de azoto ocorre apenas no nódulo, na situação de simbiose entre a planta e *Rhizobium*. Uma vez isoladas a partir dos nódulos, as bactérias perdem a sua capacidade de fixar azoto atmosférico, e crescem apenas em meios de cultura com uma fonte de azoto apropriada, como o extracto de levedura que faz parte dos constituintes do meio MYEA.

As colónias de *Rhizobium* são brancas, apresentando uma superfície lisa e brilhante (Figura 4.3-A). As colónias com outras morfologias não são consideradas como pertencendo a este género, tratando-se de contaminantes intracelulares do nódulo ou de outros microrganismos do solo que não foram removidos pelo tratamento de desinfecção e de lavagem.

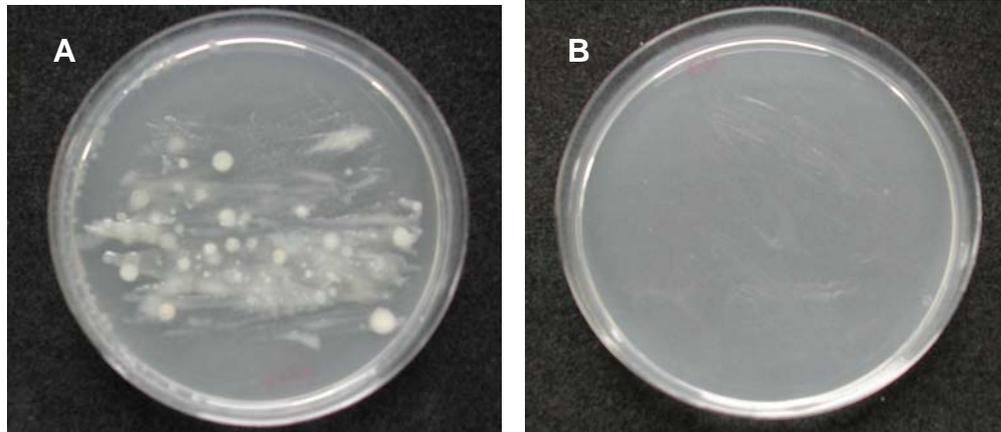


Figura 4.3 - A) Colônias de *Rhizobium* em meio MYEA; B) Ausência de crescimento de *Rhizobium* em meio MA.

|  |                                  |
|--|----------------------------------|
|  | <b><i>Material biológico</i></b> |
|--|----------------------------------|

Plantas leguminosas (ervilha, feijão, trevo) com nódulos na raiz.

|  |                                       |
|--|---------------------------------------|
|  | <b><i>Material de laboratório</i></b> |
|--|---------------------------------------|

**Material geral (por grupo de trabalho)**

1 Bico de Bunsen ou lamparina  
1 Ansa  
1 Tetina  
Lâminas e lamelas  
1 Pinça de metal  
1 Marcador  
3 caixas de Petri esterilizadas  
1 pipeta de Pasteur esterilizada

**Soluções (por grupo de trabalho)**

Água desionizada esterilizada (ca. 100 ml)  
Desinfetante  
Álcool 70 % (v/v) (ca. 20 ml)

**Meios de cultura (por grupo de trabalho)**

1 placa de meio MYEA

1 placa de meio MA

**Composição e preparação de meios de cultura****Meio MYEA (Manitol-Yeast Extract Agar)**

Manitol 10,0 g

Hidrogenofosfato de potássio 0,5 g

Cloreto de sódio (NaCl) 0,1 g

Extracto de levedura 1,0 g

Sulfato de magnésio heptahidratado 0,2 g

Dissolver os compostos em 1 l de água e acertar o pH a 7,0.

Seguidamente adicionar r

Carbonato de cálcio 0,3 g

Agar 15,0 g

Autoclavar a 121°C durante 15 min. Verter placas tendo o cuidado de distribuir o CaCO<sub>3</sub> (não dissolvido) de maneira uniforme antes de verter as placas.**Meio MA (Manitol Agar)**

Como o meio MYEA, mas sem adição de extracto de levedura.

**Tópicos de discussão**

1. Que tipos de plantas possuem nódulos nas suas raízes?
2. Qual a designação para esta relação entre a planta e as bactérias?
3. Qual a vantagem desta interacção para a planta e para as bactérias?
4. Qual o objectivo do tratamento da raiz com etanol?
5. Por que motivo foram inoculadas as placas com os dois meios de cultura diferentes?
6. Qual o resultado esperado no que respeita o crescimento microbiano nos dois meios de cultura?

|  |            |
|--|------------|
|  | <i>WWW</i> |
|--|------------|

<http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/nitrogen.htm>

<http://academic.reed.edu/biology/Nitrogen/>