



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - ICBS**  
**LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Jônatas Oliveira Costa

**DIVERSIDADE FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS NODULÍFERAS DE SOLOS DA**  
**CAATINGA ASSOCIADAS A *Enterolobium contortisiliquum* (Vell) Morong**

Maceió, AL

2022

JÔNATAS OLIVEIRA COSTA

**DIVERSIDADE FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS NODULÍFERAS DE SOLOS DA  
CAATINGA ASSOCIADAS A *Enterolobium contortisiliquum* (Vell) Morong**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - ICBS, da Universidade Federal de Alagoas - UFAL, Campus AC. Simões, como requisito para aprovação e obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

**ORIENTADORA:** Flávia de Barros Prado Moura

**COORIENTADOR:** Jakson Leite

Maceió, AL

2022

**Catlogação na Fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

C837d Costa, Jônatas Oliveira.  
Diversidade fenotípica de bactérias nodulíferas de solos da caatinga associadas a *Enterolobium contortisiliquum* (Vell) Morong / Jônatas Oliveira Costa. – Maceió, 2022.  
44 f. : il.

Orientadora: Flávia de Barros Prado Moura.  
Co-orientador: Jakson Leite.  
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas: licenciatura) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 30-35.  
Apêndices: f. 37.  
Anexos: f. 38-44.

1. Rizóbio. 2. Fenótipo. 3. Nodulação. I. Título.

CDU: 582.231

*As minhas avós Aurelina e Maria Lúcia,  
a minha amiga Ariana Monique (in memoriam),  
pelo carinho e afeto.*

***DEDICO***

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade Federal de Alagoas e ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, pela oportunidade de cursar a Graduação.

A Fundação de Amparo à Pesquisa de Alagoas (FAPEAL) pela bolsa de iniciação científica, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC).

A minha mãe Jeane Silva de Oliveira, meu pai Josuel da Silva Costa e às minhas irmãs Jessyka Oliveira Costa Viana e Jaiane Vitória Oliveira Costa, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim, e mesmo em momentos de angústia, sempre pegaram na minha mão e me incentivaram a estudar e conquistar meus sonhos.

A minha orientadora Flávia Moura, por todos os ensinamentos, apoio e dedicação, abrindo as portas do Centro de Referência em Recuperação de Áreas Degradadas (CRAD), para que eu pudesse vivenciar experiências ímpares, contribuindo diretamente para minha evolução enquanto pessoa e graduando.

Ao meu coorientador Jakson Leite, pelos ensinamentos, pela parceria e dedicação nos trabalhos, corroborando para o meu desenvolvimento.

A Ana Jessica, que realizou os experimentos iniciais para a realização do meu TCC, pelas orientações, simpatia e prestatividade.

Aos meus colegas de laboratório do CRAD, Fabiana, Lídia, Laura, Carlos, Valber, Eládio e Agberto, por ajudar no desenvolvimento do trabalho, pelo companheirismos e troca de experiências.

Ao professor Eurípedes Filho, pela autorização da utilização dos equipamentos do Laboratório de Genética e Microbiologia Aplicada.

## RESUMO

As bactérias nodulíferas são capazes de realizar a fixação biológica de nitrogênio e estabelecer interações complexas, que podem ser específicas ou vulgares com suas plantas hospedeiras. Essas simbioses formam um grupo ecológico e são comumente conhecidos como rizóbios, contendo representantes de diferentes gêneros, dentre eles, os mais conhecidos são: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Ensifer* e *Mesorhizobium*. A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro, que detém um alto grau de diversidade biológica, o que pode representar um ecossistema muito promissor para a prospecção de rizóbios eficientes no processo de FBN. A Fabaceae é uma das famílias mais importantes nos biomas florestais tropicais, devido a sua diversidade de espécies, grande número de indivíduos e a capacidade de associação com diferentes espécies de rizóbios, atribuindo-lhes a aptidão de captarem a maior parte do nitrogênio necessário para seu crescimento diretamente da atmosfera, por meio dessa relação mutualística. O objetivo do trabalho foi avaliar a diversidade fenotípica de bactérias associadas aos nódulos de Tamboril (*Enterolobium contortisiliquum*). Os 45 nódulos isolados nessa pesquisa foram oriundos de teste de captura previamente realizado de amostras de solos de quatro áreas de Caatinga no estado de Alagoas. Os nódulos foram submetidos a um processo de maceração e a suspensão bacteriana inoculada em meio de cultura YMA e após o crescimento foram tabuladas suas características culturais, tais com: tempo de crescimento, alteração do pH, cor da colônia, produção de muco e consistência. A capacidade de nodulação dos isolados foi avaliada através de teste de autenticação utilizando o vegetal em estudo. Após 60 dias de germinação das plantas, foi avaliada a nodulação. Foram isoladas 29 bactérias, que formaram 10 grupos fenotipicamente diversos. Ocorreu a predominância de isolados de crescimento lento, correspondendo a 58,62% da coleção e, já as de crescimento rápido, representaram 41,37%. Todos os isolados apresentaram capacidade de estabelecer interação específica com Tamboril, confirmada através formação de nódulos radiculares nas plantas. Conclui-se que, todas as amostras de solos utilizadas para a captura dos rizóbios, apresentam populações de bactérias nodulíferas nativas, fenotipicamente diversas, capazes de nodular *Enterolobium contortisiliquum*, podendo conter potencial promissor como inoculantes, por serem adaptadas as condições edafoclimáticas do bioma Caatinga.

**Palavras-chave:** Rizóbios, diversidade e nodulação.

## ABSTRACT

Nodular bacteria are able to carry out biological nitrogen fixation and establish complex interactions, which can be specific or common with their host plants. These symbionts form an ecological group and are commonly known as rhizobia, containing representatives of different genera, among them, the best known are: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Ensifer* and *Mesorhizobium*. The Caatinga is an exclusively Brazilian biome, which has a high degree of biological diversity, which can represent a very promising ecosystem for the prospection of efficient rhizobia in the BNF process. The Fabaceae is one of the most important families in tropical forest biomes, due to its diversity of species, large number of individuals and the ability to associate with different species of rhizobia, attributing to them the ability to capture most of the nitrogen necessary for their growth, directly from the atmosphere, through this mutualistic relationship. The aim of this study was to evaluate the phenotypic diversity of bacteria associated with Tamboril (*Enterolobium contortisiliquum*) nodules. The 45 nodules isolated in this research came from a capture test previously carried out on soil samples from four areas of Caatinga in the state of Alagoas. The nodules were submitted to a process of maceration and bacterial suspension inoculated in YMA culture medium and after growth their cultural characteristics were tabulated, such as: growth time, pH change, colony color, mucus production and consistency. The nodulation capacity of the isolates was evaluated through an authentication test using the plant under study. After 60 days of plant germination, nodulation was evaluated, 29 bacteria were isolated, which formed 10 phenotypically diverse groups. There was a predominance of slow-growing isolates, corresponding to 58.62% of the collection, while fast-growing isolates accounted for 41.37%. All isolates showed the ability to establish a specific interaction with Monkfish, confirmed by the formation of root nodules in the plants. It is concluded that all soil samples used to capture rhizobia present phenotypically diverse populations of native noduliferous bacteria capable of nodulating *Enterolobium contortisiliquum*, and may have promising potential as inoculants, as they are adapted to the edaphoclimatic conditions of the Caatinga biome.

**Key words:** Rhizobia, diversity and nodulation.

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	9
2. OBJETIVO.....	11
3.1 Geral: .....	11
3.2 Específico: .....	11
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	11
4.1 Diversidade de rizóbios .....	11
4.2 A espécie <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong .....	12
4.3 Fixação Biológica de Nitrogênio .....	13
4. METODOLOGIA.....	14
5.1 Origem dos nódulos .....	14
5.2 Isolamento das bactérias dos nódulos.....	16
5.3 Caracterização fenotípica das bactérias .....	17
5.4 Teste de nodulação dos isolados em Tamboril .....	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
6.1 Isolamento das bactérias dos nódulos.....	21
6.2 Características fenotípicas das bactérias nativas.....	22
6.3 Experimento de autenticação .....	26
7. CONCLUSÕES .....	31
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	31
REFERÊNCIAS .....	31
APÊNDICE 1: .....	37
ANEXO 1: .....	39
Experimento de captura das bactérias:.....	39
ANEXO 2 .....	40
Isolamento das bactérias dos nódulos: .....	40
ANEXO 3 .....	40

Meio de cultura:.....	40
ANEXO 4 .....	42
Caracterização fenotípica: .....	42
ANEXO 5 .....	43
Estocagem das bactérias: .....	43

## 1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos do solo estão envolvidos em numerosos processos ecológicos, desempenhando um papel importante na ciclagem de nutrientes nos ecossistemas. Um destes processos é a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) atmosférico, que é realizada por microrganismos procarióticos conhecidos como diazotróficos (Moreira, 2010), capazes de se associarem a diversas espécies de plantas em diferentes graus de especificidade, havendo representantes de vida livre no solo, endofíticos (presentes no tecido vegetal) e simbióticos (Hungria et al., 2007).

As bactérias nodulíferas estabelecem interações complexas (específicas ou vulgares) com suas plantas hospedeiras. Esses simbiontes fazem parte de um grupo ecológico polifilogenético (3 classes: Alfa, Beta e Gammaproteobacteria) de bactérias comumente conhecidas como rizóbios, contendo representantes de diferentes gêneros, dentre eles, os mais conhecidos são: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Ensifer* e *Mesorhizobium* (Moulin et al., 2001; Chen et al., 2001; Shamseldin et al., 2017; Shiraishi et al., 2010).

Os rizóbios concretizam sua compatibilidade com a planta hospedeira através do estabelecimento de uma relação mutualística, expressa a partir da formação de estruturas hipertróficas na região radicular de leguminosas e, em alguns casos no caule (Faria et al., 1999). Os nódulos são novos órgãos oriundos principalmente de células infectadas das plantas e, dentro deles, as bactérias assumem uma forma endosimbiótica, os bacteróides, que são capazes de reduzir o nitrogênio atmosférico à amônia (Broughton et al., 2006).

A espécie *Enterolobium contortisiliquum* (Vell) Morong, conhecida popularmente como tamboril, timbaúva, orelha-de-macaco, pertencente a família Fabaceae e subfamília Caesalpinioideae. É uma leguminosa arbórea, pioneira, com rápido crescimento e bem adaptada a região Nordeste (Lorenzi, 2002). Devido suas características, é reconhecida como uma espécie promissora, tendo seu uso indicado em projetos de reflorestamento e recuperação de áreas degradadas (Chaer et al., 2011). O principal atributo para a escolha de uma planta-isca, é sua ampla capacidade para estabelecer simbiose com bactérias nodulíferas (Lima et al., 2009; Jaramillo et al., 2013; Arsene et al., 2012; Castro et al., 2017), aspecto presente em tamboril (Moreira et al., 2010; Sousa et al., 2013; Jesus et al., 2014). Apesar de já ter sido descrito um inoculante para a espécie (Brasil, 2005), estudos que objetivaram avaliar o potencial da estirpe, apresentaram resultados de baixa eficiência na promoção do desenvolvimento de mudas da espécie (Souza et al., 2013; Jesus et al., 2014).

A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro que cobre quase 10% do território nacional (Castro et al., 2006) e, seu nome é de origem tupi-guarani e significa “floresta branca”, nome dado possivelmente devido às características da vegetação na estação seca (Albuquerque;Bandeira, 1995). Quando comparada a outras regiões semiáridas do Mundo, a Caatinga detém um alto grau de diversidade biológica (Leal et al., 2005; Mendes, 1997), o que pode representar um ecossistema muito promissor para a busca de microrganismos fixadores nitrogênio de importância ecológica e agrícola.

O estudo da diversidade de bactérias diazotróficas que nodulam leguminosas, visa promover o conhecimento e a seleção de populações mais eficientes e específicas e, concomitantemente, a obtenção de genótipos mais adaptados aos tipos de solos e tolerantes aos diferentes tipos de estresse (Ehrhardt-Brocardo et al., 2015). Uma melhor compreensão da diversidade da microbiota do solo pode propiciar o desenvolvimento de estratégias que permitam a otimização dos processos biológicos que, por sua vez, visem aumentar a sustentabilidade dos agrossistemas (Odum, 1988).

Portanto, pesquisas sobre a diversidade fenotípica de bactérias nodulíferas, antecedem qualquer outro viés na área de rizobiologia, visando investigar os benefícios ambientais e agronômicos, oriundos do processo de interação entre bactéria-hospedeiro, podendo corroborar diretamente para o alcance de resultados promissores em projetos de restauração de terras secas, através do incentivo a utilização desses simbiossomas como inoculantes, visto que áreas em processo de degradação perdem duas características biológicas, químicas e físicas, dificultado o estabelecimento das plantas.

Apesar do enorme potencial biotecnológico, os estudos sobre as populações de rizóbios e o estabelecimento de associações simbióticas com plantas nativas da Caatinga, objetivando descobrir novos gêneros e espécies de bactérias nodulíferas eficientes no processo de FBN e na promoção do crescimento vegetal, é pouco expressivo frente a alta biodiversidade desse bioma. Este trabalho consiste no cultivo e caracterização da diversidade fenotípica de bactérias oriundas de amostras de solo da Caatinga de quatro municípios do estado de Alagoas, isoladas de nódulos das raízes de tamboril e a realização do teste de autenticação, para confirmação empírica da associação bactéria-planta.

## 2. OBJETIVO

### 3.1 Geral:

Avaliar a diversidade fenotípica de bactérias nodulíferas oriundas de solos da Caatinga no estado de Alagoas, capazes de nodular *Enterolobium contortisiliquum*.

### 3.2 Específico:

- Isolar as bactérias do interior dos nódulos de *Enterolobium contortisiliquum* e cultivá-las *in vitro*;
- Caracterizar aspectos morfofisiológicos em meio de cultura e avaliar a diversidade fenotípica existente entre as bactérias isoladas;
- Realizar teste de autenticação simbiótica utilizando a espécie vegetal em estudo.

## 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 4.1 Diversidade de rizóbios

A biodiversidade do solo é responsável pela estabilidade e resiliência dos ecossistemas, atuando nos processos de formação e na ciclagem e armazenamento de nutrientes, estando diretamente relacionada à qualidade ambiental (Santos, 2007). Os estudos pioneiros de Hellriegel e Wilfarth (1888), foram determinantes para a compreensão de que são os microrganismos que residem dentro dos nódulos de leguminosas que lhes conferem a capacidade de obter nitrogênio do ar. No mesmo ano, o pesquisador Beijerinck isolou essas bactérias, as nomeando de *Bacillus radicales* e, em 1889 foram denominadas de *Rhizobium leguminosarum* por Frank (Silveira; Freitas, 2007), dando origem ao nome popular, utilizado até os dias atuais.

As bactérias nodulíferas, nomeadas coletivamente de “rizóbios”, formam um grupo ecológico de bactérias pertencentes a três filos distintos, que possuem capacidade de infectar e nodular leguminosas e *Parasponia* spp., uma planta não leguminosa (Silva, 2014; Taiz & Zieger, 2004). As bactérias diazotróficas que fazem simbiose pertencem aos gêneros *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Ensifer* (antigo *Sinorhizobium*), *Shinella*, *Pararhizobium*, *Phyllobacterium*, *Aminobacter*, *Mesorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Devosia*, *Azorhizobium*, *Methyobacterium*, *Microvirga*, *Blastobacter*, *Photrhizobium*, *Bradyrhizobium*, (Alphaproteobacteria), *Paraburkholderia* (antiga *Burkholderia*) e *Cupriavidus* (Betaproteobacteria) (Moulin et al., 2001; Chen et al., 2001; Shamseldin et al., 2017). Em estudo realizado por Shiraishi et al. (2010), encontrou genes simbiotes em *Pseudomonas* (Gammaproteobacteria), indicando que este gênero, até então compreendido como bactéria

endofítica de nódulos, evoluem para bactérias simbióticas através do processo de transferência horizontal de genes.

Nas últimas décadas, a busca por novas espécies de simbioses se intensificaram, especialmente no Brasil (Moreira et al., 2000; Moreira et al 2004., Moreira et al., 2006), entretanto, é inegável a possibilidade de se descobrir novos gêneros e espécies de bactérias nodulíferas nativas, em ecossistemas naturais (Silva, 2014), principalmente no bioma Caatinga, que detém características fitofisionômicas diversas, podendo se refletir no processo de evolução e adaptação desses organismos em resposta ao ambiente das florestas tropicais sazonalmente secas (Pennington et al., 2009).

As características fenotípicas são usadas com sucesso em estudos de ecologia de rizóbios (Vincent, 1970). Segundo Graham (1976), tais características fornecem informações importantes para identificar e agrupar espécies, possibilitando obter uma avaliação da diversidade desses microrganismos em diferentes localidades sob diferentes manejos de terra (Martins et al., 1997; Moreira et al., 1992; Pereira, 200; Melloni, 2001).

Para Santos (2007), estudar a variedade dessas bactérias com base em aspectos expressos no meio de cultura, com base na aferição de parâmetros como o tempo de crescimento, a alteração de pH, cor da colônia, a produção de muco e consistência, possuem vantagens por ser um processo mais rápido, quando comparados aos métodos genotípicos, possibilitando uma análise prévia da diversidade e na obtenção de microrganismo que poderão ser caracterizados, armazenados e utilizados posteriormente.

#### **4.2 A espécie *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong**

A espécie *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.), conhecida popularmente como tamboril, timbaúva, orelha-de-macaco, tamboril, timbaúba, timbó, ximbó, pacará (Lorenzi, 2002), dentre outros nomes, é uma leguminosa arbórea, pioneira, heliófita, de crescimento rápido, podendo chegar a 35m de altura e 160 cm diâmetro de largura, suas folhas são alternas, bipinadas (recompostas), com 3 a 7 pares de pequenos folíolos oblongos, sua copa é ampla e frondosa, proporcionando sombra, sendo uma espécie bem adaptada a região Nordeste. Suas características tornam a espécie promissora, tendo seu uso indicado em projetos de reflorestamento e recuperação de áreas degradadas (Chaer et al., 2011), principalmente devido ao seu rápido crescimento (Lorenzi, 2002), sua madeira também é bastante apreciada e utilizada na construção civil (Santos, 1987), na fabricação de brinquedos, barcos, canoas, compensados, armações de móveis, miolo de portais e caixotes, por conta do fácil manejo e acabamento (Lorenzi, 2002). O Tamboril, pertence à família Fabaceae Lindl., composta por plantas que

produzem vagens, embora haja algumas exceções. Essas vagens, são comumente conhecidas como legumes (Moreira et al., 2013). A espécie fazia parte da antiga subfamília Mimosoideae, que atualmente, encontra-se classificada dentro da nova subfamília Caesalpinioideae, deixando de existir isoladamente, enquanto Caesalpinioideae tornou-se mais homogêneo, agrupando todas as leguminosas com folhas bipinadas e a maioria com nectários extraflorais no pecíolo, contendo 148 gêneros, cerca de 4400 espécies (Azani, et al. 2017).

São conhecidas aproximadamente 20 mil espécies de leguminosas distribuídas em todo mundo, desde representantes herbáceas até arbóreas, constituindo, assim, a família mais bem representada nos ecossistemas brasileiros em termos de diversidade de espécies e número de indivíduos (Souza e Lorenti, 2005). No território brasileiro, encontram-se 222 gêneros nativos, contendo cerca de 2.807 espécies. No bioma Caatinga, ocorrem 88 gêneros e 373 espécies, já no estado de Alagoas, encontram-se 57 gêneros e 114 espécies (Lima, 2015).

Em simbiose com bactérias nodulíferas, algumas leguminosas da Caatinga superam o filtro da baixa disponibilidade de nitrogênio do solo, garantindo o suprimento necessário para seu crescimento, contribuindo para a entrada de N no ecossistema e a deposição de matéria orgânica no solo através do processo de FBN (Freitas et al., 2010). A principal característica para a escolha de uma planta-isca, é sua ampla capacidade para estabelecer simbiose com bactérias nodulíferas (Lima et al., 2009; Jaramillo et al., 2013; Arsene et al., 2012; Castro et al., 2017), aspecto presente em *Enterolobium cortotisiliquum* (Moreira et al., 2010; Sousa et al., 2013; Jesus et al., 2014). Apesar de já ter sido descrito um inoculante (BR 4406 *Bradyrhizobium* sp.) aprovado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para tamboril (Brasil, 2011), os estudos realizados por Souza et al. (2013) e Jesus et al., (2014), apresentaram resultados que relatam a existência de baixa eficiência da inoculação dessa estirpe em mudas da espécie.

#### **4.3 Fixação Biológica de Nitrogênio**

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) compõe a principal via de incorporação do N à biosfera e, junto à fotossíntese, são considerados os mais importantes processos biológicos. O nitrogênio é um dos elementos que mais limita o crescimento vegetal e a produção agrícola, considerado um dos mais abundantes da natureza, menos de 0,1% está na forma de compostos inorgânicos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) disponíveis às plantas ou a processos biológicos do ecossistema (Moreira e Siqueira, 2006). Sendo um dos principais constituintes dos aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, clorofila, e muitos outros constituintes celulares, tornando-se, assim, um elemento essencial para todos os organismos vivos (Soratto et al., 2010).

A FBN é um processo regulado pela necessidade do ambiente e das espécies fixadoras, pois, a enzima nitrogenase, responsável pela redução do N<sub>2</sub> (Rudnik et al., 1997). Os microrganismos diazotróficos estabelecem diferentes tipos de associação com variadas espécies vegetais e, de acordo com tal associação, são classificados como de vida livre, associativos e simbióticos. Segundo Moreira:

*Diversos processos são mediados por microrganismos do solo, desempenhando papel importante na ciclagem de nutrientes. Um desses processos é a fixação biológica de nitrogênio atmosférico, que é realizada por microrganismos procarióticos conhecidos como diazotróficos. Os diazotróficos podem ser de vida livre, estar associados a espécies vegetais ou, ainda, estabelecer simbiose com leguminosas (Moreira, et al. 2010).*

Os microrganismos diazotróficos simbióticos são coletivamente denominados rizóbios (Batista, 2015). Na fixação biológica de nitrogênio (FBN), o rizóbio captura o N<sub>2</sub> da atmosfera e converte em NH<sub>4</sub> (assimilada pelos organismos vivos), em condições biológicas, que posteriormente é disponibilizado para as plantas (Moreira e Siqueira, 2006; Sarita, et al., 2008).

Essa conversão de nitrogênio atmosférico em N amoniacal acontece dentro dos nódulos, local onde estão alojados os bacteroides, realizando o processo de FBN (Cassetari, et al., 2016). Portanto, a presença de estrutura hipertróficas na região radicular ou no caule de plantas leguminosas, caracteriza o fenótipo resultado da interação entre bactéria e hospedeiro (Guabiraba *et al.*, 2019, p. 140).

## **4. METODOLOGIA**

### **5.1 Origem dos nódulos**

As bactérias isoladas neste trabalho, são oriundas de experimento de captura previamente realizado (Figura 1) no Centro de Referência em Recuperação de Áreas Degradadas (CRAD) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), no Campus de Arapiraca. As amostras de solo utilizadas para captura das bactérias, estavam sob vegetação da Caatinga de quatro municípios do estado de Alagoas (Delmiro Gouveia, Olho D'água do Casado, Pão de Açúcar e Traipu), localizados no Baixo Sertão do São Francisco.

**Figura 1:** Experimento de captura de rizóbios.

**Fonte:** Guabiraba (2018).



Para a captura dos rizóbios, foi utilizada como “plantas-isca” uma espécie de leguminosa arbórea (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong), com ampla capacidade de associação simbiótica com bactérias nodulíferas do solo. O experimento foi conduzido em casa de vegetação em copos de plástico de 500 mL preenchidos com 200 g do solo coletados na profundidade de 0 – 10 cm em uma distância de 3 m entre elas em esquema quadrático e misturados a 50 g de vermiculita estéril.

Antes do plantio, as sementes foram escarificadas com lixa e, posteriormente, desinfestadas com álcool (70%) por 1 (um) minuto, hipoclorito de sódio (2%) por 3 (três) minutos e 6 (seis) lavagens sucessivas em água destilada estéril. Em seguida as sementes foram submetidas a um *hydropriming* (Liu et al., 2008), tratamento pré-germinativo em que as sementes são submersas em água por 24 horas. Aos 10 (dez) dias após emergência, foi feito o desbaste das plantas deixando duas plantas por copo. As plantas foram regadas uma vez por semana com 100 mL de solução nutritiva de Norris (Vincent, 1970) isenta de nitrogênio e com água autoclavada sempre que necessário. O experimento teve delineamento em blocos ao acaso com quatro repetições. A coleta das plantas foi realizada aos 60 (sessenta) dias após a emergência.

Os nódulos foram destacados das raízes e armazenados em tubos de ensaio com sílica gel para posterior isolamento das bactérias, caracterização fenotípica e teste de autenticação, realizados nas instalações do CRAD – UFAL, Campus AC Simões, Maceió – AL.

## 5.2 Isolamento das bactérias dos nódulos

Os nódulos foram distribuídos em tubos eppendorf, contendo 1 ml de água destilada, autoclavada e reidratados por 1 hora. Em seguida, a água foi removida e os nódulos foram submetidos ao processo de desinfecção externa em álcool (70%) por 1 (um) minuto e em hipoclorito de sódio (2%) por 5 (cinco) minutos. Logo após, foram realizadas 6 (seis) lavagens com água destilada e autoclavada para remoção de resíduos químicos e adicionado 50 µL de água destilada e autoclavadas, para dar início a extração das bactérias do interior dos nódulos.

Os nódulos foram submetidos ao processo de maceração com o auxílio de uma pinça de metal, possibilitando, assim, a formação da suspensão bacteriana. O procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar e, além da pinça, usou-se um maçarico para esterilizá-la toda vez que fosse feito o procedimento em nódulos distintos, evitando, assim, a contaminação e/ou mistura dos isolados em um mesmo cultivo. Um recipiente contendo água destilada e autoclavada e outro com álcool 70%, também foram utilizados para a remoção dos resíduos carbonizados dos nódulos, auxiliando na esterilização da pinça.

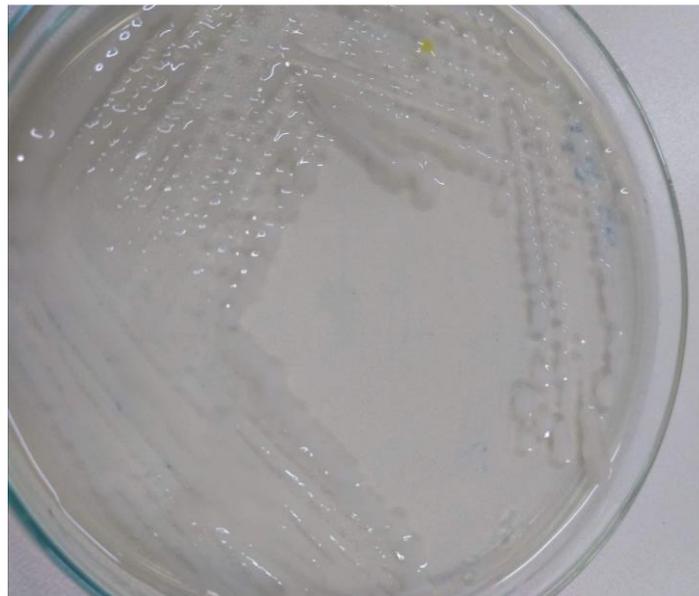
O procedimento seguiu os seguintes passos: a) flamba à pinça no maçarico, espera alguns segundos para ela esfriar e, em seguida, macera o nódulo dentro do eppendorf contendo 1 ml de água destilada e autoclavada; b) após o nódulo macerado, esteriliza a pinça novamente, mergulha sua ponta em água destilada autoclavada, realiza movimentos circulares para que os resíduos se destaquem, realizando o mesmo processo no álcool 70%; e, c) retirando a pinça do álcool, flamba, e repete o ciclo para a maceração dos demais nódulos.

Finalizada a etapa anterior, obteve-se 1 ml de suspensão bacteriana, sendo pipetados 20 µL e inoculados em placas de petri, contendo meio de cultura sólido 79 (Fred e Waksman, 1928), também conhecido como YMA (Vincent, 1970), realizando estrias com alça de platina, para obtenção das colônias (Anexo 2). Utilizou-se, também, o maçarico para esterilização da alça. Para cada 200 ml de meio de cultura (Anexo 3), foram adicionados 400 µL do fungicida comercial Nistatina (C<sub>46</sub>H<sub>77</sub>NO<sub>19</sub>), para combater o processo de contaminação por fungo. As placas foram incubadas em BOD a 28°C (Figura 2) até o surgimento das colônias. Realizou-se de 5 (cinco) a 6 (seis) repiques até a obtenção de colônias puras (Figura 3) e posterior caracterização fenotípica (tópico 5.3).

**Figura 2:** Placas na incubadora a 28°C.



**Figura 3:** Placa de petri com colônia pura.



### 5.3 Caracterização fenotípica das bactérias

A caracterização fenotípica (Anexo 4) dos isolados foi adaptada de Vincent (1970) e feito com base no tempo de crescimento para a formação das colônias (rápido: 1 a 3 dias; intermediário: 4 a 5 dias; lento: 6 dias; muito lento: >10 dias), alteração do pH no meio de cultura (ácido, neutro e alcalino) através do indicador azul de bromotimol, cor da colônia, produção de goma (polissacarídeos extracelulares) e consistência das colônias (aquosa ou consistente). Estas características culturais possibilitam a identificação de grupos de rizóbios que expressam o mesmo fenótipo.

Os fenótipos (Apêndice 1) foram convertidos numa matriz binária de presença (1) ou ausência (0) da característica. O agrupamento foi feito aplicando o método de distância UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) utilizando o índice de similaridade de Jaccard (Real e Vargas, 1996). A matriz foi utilizada para agrupar os isolados com características idênticas. Um dendrograma de similaridade foi construído para identificação dos tipos fenotípicos. A análise de agrupamento foi realizada empregando o programa PAST (Hammer et al., 2001).

Os isolados foram codificados, caracterizados e armazenados em microtubos contendo 1 mL de meio YMA (adaptado; sem corante e agar agar) com glicerol (20%) e com 300  $\mu$ L de fungicida Nistatina a  $-20^{\circ}\text{C}$  para a conservação das células (Anexo 5).

#### 5.4 Teste de nodulação dos isolados em Tamboril

O experimento de autenticação foi conduzido em condições assépticas. Para o preparo dos inoculantes, foi realizada a multiplicação bacteriana. Os isolados foram postos para crescer em meio de cultura YMA líquido, isento de azul de bromotimol e agar-agar (esterilizado a  $120^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos), pois, objetivou-se apenas a multiplicação bacteriana para a realização da inoculação. Utilizou-se recipientes de vidro com 50 mL de meio líquido para a produção dos inoculantes. Para cada recipiente, foi realizada uma alçada com os isolados bacterianos puros. Após a repicagem das células para o meio, utilizou-se papel alumínio para vedar os recipientes e, logo após, as bactérias foram incubadas em mesa agitadora a 150 rpm e  $28^{\circ}\text{C}$  de acordo com o tempo de crescimento (Figura 4).

**Figura 4:** Recipientes de vidro com o meio líquido inoculado, na mesa agitadora; bactérias crescidas em meio líquido.



Para equiparar o processo de crescimento dos isolados, inicialmente, colocou-se para crescer as bactérias de crescimento lento, que requerem mais tempo para seu desenvolvimento e, após 3 (três) dias, foram postas na mesa agitadora as de crescimento rápido. A montagem do

experimento foi realizada no mesmo dia em que foram retiradas da incubadora, evitando a contaminação e morte das células.

Para o preparo das sementes, as mesmas foram desinfestadas com hipoclorito (2% por 3 min) e álcool (70% por 1 min) e, em seguida, lavadas (6 lavagens) com água destilada e autoclavada (Figura 5).

**Figura 5:** Desinfestação das sementes de Tamboril em álcool 70% e hipoclorito a 2%.



As sementes de Tamboril (*Enterolobium contortisiliquum*), apresentam dormência devido à impermeabilidade tegumentar à água, o que torna sua propagação lenta e desuniforme (Lêdo, 1977; Eira et al. 1993). Para a quebra da dormência, foi realizada a escarificação mecânica com lixa 80 na porção basal da semente (Figura 6) e, posteriormente, hidratadas por 30 min em água destilada autoclavada antes de serem distribuídas nos vasos.

**Figura 6:** Processo de escarificação mecânica das sementes de Tamboril.



Utilizou-se vasos de Leonard com capacidade de 500 G cada, preenchidos com substrato composto de areia lavada e vermiculita, na proporção de 2:1. Os vasos foram isolados com tecido TNT (permite a passagem da água) durante o processo de autoclavagem a 120°C por 30 min, realizada 2 (duas) vezes em um intervalo de 24h. O substrato foi esterilizado diretamente dentro dos recipientes, visando o controle da contaminação na hora do manuseio.

Após o preparo dos recipientes, foram semeadas três sementes por vaso. Para a inoculação bacteriana, foi pipetado 1,0 mL de cultura líquida sobre cada semente, somando 3 mL por vaso (Figura 7). Cada isolado representou um tratamento, sendo ao todo 30 (trinta) tratamentos, contendo 29 (vinte e nove) isolados e uma testemunha não inoculada.

**Foto 7:** Sementes sendo inoculadas com as bactérias.



O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, contendo 4 (quatro) repetições cada, somando 30 (trinta) vasos por bloco, totalizando 120 (cento e vinte) unidades experimentais. Os vasos foram distribuídos em bancadas, numa distância de 3 (três) cm entre cada recipiente e 6 (seis) cm entre blocos, em sala adaptada para experimentação, com luz articulada amarela (Halogena Bulbo H100 70w 220v E27 2800k), em uma distância de 1,62 m dos tratamentos. O desbaste e tutoramento foram realizados aos 14 (quatorze) dias após a germinação, mantendo-se apenas uma planta por vaso (Figura 8).

**Figura 8:** Organização dos blocos; desbaste e tutoramento das plantas.



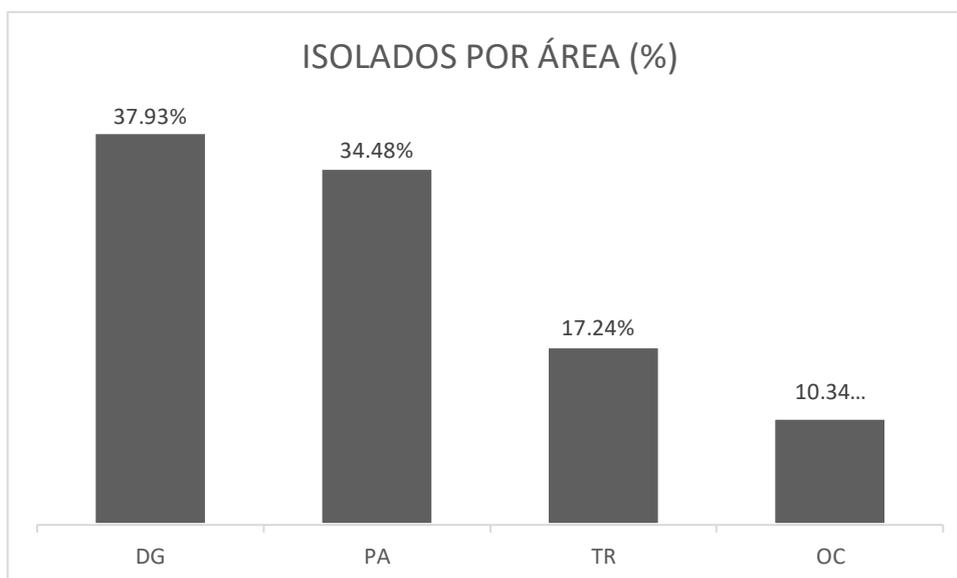
Com 18 (dezoito) dias, após a germinação e a queda dos cotilédones, todos os tratamentos receberam 50 ml de solução nutritiva isenta de nitrogênio (Norris & Date, 1976) uma vez por semana e, quando necessário, eram adicionados 50 ml de água autoclavada. O experimento foi avaliado 60 dias após a germinação, no qual foi avaliada a presença (+) ou a ausência (-) de nódulos nas raízes.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Isolamento das bactérias dos nódulos

Dos 45 nódulos oriundos das raízes de *Enterolobium contortisiliquum* que foram submetidos ao processo de maceração e extração do conteúdo de seu interior, obteve-se o total de 29 isolados nativos. As bactérias oriundas de Delmiro Gouveia (DG) possuem maior número de representantes, com cerca de 37,93% da coleção, em seguida está Pão de Açúcar (PA) com 34,48%, Traipu (TR) com 17,24% e Olho D'água do Casado (OC) apresentando 10,34% da amostragem (Figura 09).

**Figura 09:** Percentual de bactérias isoladas por área; DG = Delmiro Gouveia (11 isolados), PA = Pão de Açúcar (10 isolados), TR = Traipu (5 isolados) e OC = Olho D'água do Casado (3isolados).

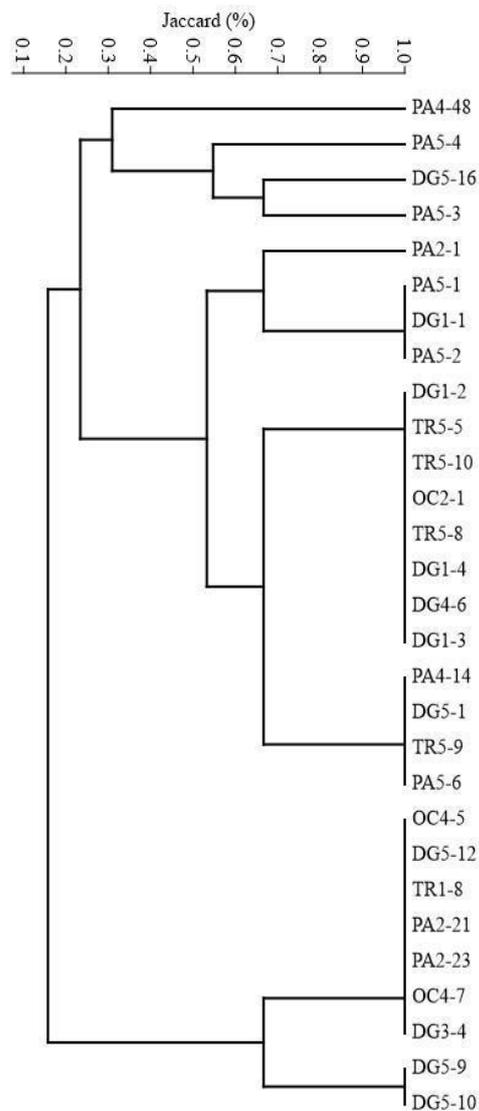


Embora DG contenha um maior número de representantes, quando comparado a OC, os resultados obtidos indicam a presença de simbioses capazes de nodular com *E. contortisiliquum* nas 4 (quatro) áreas analisadas. Tal aspecto é importante, em termos ecológicos, pois suporta a colonização da espécie em diferentes ambientes, uma vez que a presença do simbiote facilita o estabelecimento da leguminosa (Moreira & Siqueira, 2006).

## 6.2 Características fenotípicas das bactérias nativas

Através dos dados alcançados oriundos da caracterização fenotípica dos isolados (Apêndice 1), foi elaborado um dendrograma de similaridade (Figura 10) utilizando o coeficiente de Jaccard, o qual, levou em consideração as características culturais das bactérias, tais como: tempo de crescimento, alteração do pH, produção de muco, cor da colônia e o tipo de goma (consistente; aquosa), permitindo a verificação da diversidade de microrganismos que foram isolados (Almeida et al., 2013) Foram identificados 10 grupos fenotipicamente diversos, sendo que 5 (cinco) grupos reuniram bactérias com o crescimento lento (C, D, F, G e H), representando 58,62% da coleção e, 5 (cinco) com o crescimento rápido, representando 41,37% da coleção (A, B, E, I e J) (Figura 11).

**Figura 10:** Dendograma de similaridade entre os grupos fenotípicos isolados de *E. contortisiliquum*. Cada terminal apresenta agrupamentos de isolados com características fenotípicas semelhantes.



Os fenótipos F, G e H, pertencentes ao agrupamento de isolados de crescimento lento (Figura 11), alcalinizaram o meio de cultura, possuem coloração branca e média a pouca produção de muco, possuem características típicas do gênero *Bradyrhizobium* sp. (Melloni et al., 2006). Enquanto que os tipos fenótipos C (DGS-15) e D (PAS – 3), também compostos por bactérias de crescimento lento, se diferenciam por não apresentarem alterações no meio de cultura e, apenas o isolado DGS-15 dentro do agrupamento, possui a cor creme (Figura 11).

**Figura 11:** Tabela de caracterização fenotípica dos grupos.

Fenótipo	Nº de isolados	Características fenotípicas				
		Tempo de crescimento	pH	Cor da colônia	Produção de muco	Tipo de muco
A	1	Rápido	Ácido	Amarela	Muito	Aquoso
B	1	Rápido	Neutro	Creme	Muito	Aquoso
C	1	Lento	Neutro	Creme	Muito	Aquoso
D	1	Lento	Neutro	Branca	Muito	Aquoso
E	1	Rápido	Alcalino	Branca	Muito	Aquoso
F	3	Lento	Alcalino	Branca	Muito	Aquoso
G	8	Lento	Alcalino	Branca	Pouco	Aquoso
H	4	Lento	Alcalino	Branca	Pouco	Consistente
I	7	Rápido	Neutro	Amarela	Pouco	Consistente
J	2	Rápido	Alcalino	Amarela	Pouco	Consistente

De acordo com Norris (1965), rizóbios que possuem o crescimento lento e que alcalinizam o meio de cultura são uma forma basal, estando geralmente associados a leguminosas tropicais que apresentam baixa eficiência simbiótica e habitam solos ácidos de baixa fertilidade, análogos às condições edafoclimáticas do bioma Caatinga. No entanto, a espécie *E. contortisiliquum*, apresentou associação com simbioses de crescimento rápido, contribuindo com estudos já realizados, confirmando sua ampla capacidade para estabelecer simbiose com bactérias nodulíferas (Moreira et al., 2010; Sousa et al., 2013; Jesus et al., 2014), além de estar bem adaptada à região Nordeste (Lorenzi, 1998; Silva et al., 2012) e, como espécie que possui a capacidade de adquirir nitrogênio, ocupa um papel importante na manutenção dos ecossistemas e na ciclagem de nitrogênio.

A pesquisa realizada por Barberi et al. (1998), que objetivou analisar o processo de nodulação em leguminosas florestais, constatou que das 39 bactérias isoladas em seu trabalho, cerca de 28 isolados obtidos de nódulos do *Centrolobium* sp, *Dalbergia nigra*, *Swartzia langsdorffii*, *Tipuana tipu*, *Acacia mangium*, *Platypodium elegans*, *Anadenanthera peregrina*, *Albizia lebbek* e *Enterolobium contortisiliquum*, possuem características morfofisiológicas típicas do gênero *Bradyrhizobium* sp, corroborando com a pressuposto sobre a preferência de *E. contortisiliquum* em estabelecer relação com estirpes que apresentaram tais especificidades. Entretanto, a espécie vegetal em estudo, apresentou a capacidade de nodular com diferentes tipos fenotípicos de rizóbios, contribuindo para a afirmativa de que se trata de uma leguminosa com ampla capacidade de associação com populações de bactérias nativas (Moreira et al., 2010; Sousa et al., 2013; Jesus et al., 2014).

As bactérias de crescimento rápido, tiveram uma maior heterogeneidade em relação à mudança no pH, os fenótipos B e I não expressaram mudanças (neutro), diferentemente dos fenótipos E e J que o alcalinizaram, aspecto comumente apresentado nos gêneros *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium* (Coutinho et al., 2000), já o fenótipo A, que acidificou o meio de cultura, possui característica comum dos gêneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Ensifer* (Lima, 2009). O fenótipo I é o segundo maior grupo de isolados (7 isolados) da coleção, ficando só atrás do G (bactérias de crescimento lento), sendo composto por bactérias de crescimento rápido, cor amarela e pH neutro, contendo representantes de todas as áreas do estudo.

Em levantamento realizado por Guabiraba et al (2018), visando avaliar a nodulação e a diversidade de bactérias da Caatinga, associadas aos nódulos de *Chloroleucon dumosum*, obteve-se 74 isolados e a formação de 11 grupos fenotípicos, no qual, os isolados de crescimento rápido, apresentaram maior tolerância a 1 e 2 % de NaCl e a 40°C. As bactérias de crescimento rápido, possuem características morfofisiológicas que lhes dão capacidade adaptativa à superação de filtros ambientais, como a própria multiplicação bacteriana em curto espaço de tempo, configurando-se como uma estratégia de sobrevivência, sendo mais tolerante a seca (Van Gestel et al., 1991), uma vez que esse tipo de bactéria investe em sua propagação a fim de perpetuar células viáveis e funcionais, portanto, tais características estão sendo relatadas em isolados de solos semiáridos (Freitas et al., 2007; Santos et al., 2007)

Segundo a pesquisa realizada por Santos et al. (2007) com amostras de solo de florestas tropicais do estado de Pernambuco, cerca de 90% de seus isolados foram de crescimento rápido, concentrando a maior parte dos representantes da amostra oriundos de solos da Caatinga, contribuindo com a afirmativa de que rizóbios com essa característica são mais comuns em regiões áridas, assim, cooperando para a elucidação do percentual (41,37%) de isolados de rápido crescimento encontrados na referente pesquisa e a presença desses simbioses em todas as áreas do estudo (TR. DG, OC e PA).

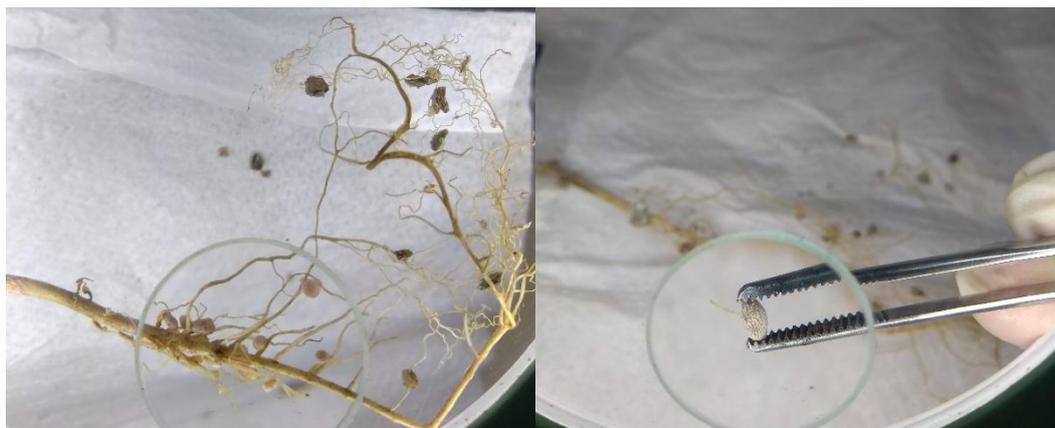
O estudo realizado por Neta et al. (2015), objetivou avaliar a diversidade cultural de bactérias de nódulos de jurema preta (*Mimosa* spp.) nativas de solos da Caatinga, todos os isolados apresentaram 100% de crescimento rápido, contrapondo-se ao achados nesta pesquisa, visto que obteve-se um maior número de isolados de crescimento lento, possibilitando afirmar que nas amostras de solo utilizadas para a captura de rizóbios oriundos da Caatinga alagoana, encontram-se presentes grupos de bactérias nodulíferas fenotipicamente diversas, capazes de nodular *Enterolobium contortisiliquum*, configurando-se como uma vantagem em termos adaptativos em relação a espécies que possuem maior especificidade na relação bactéria-planta, visto que o vegetal em estudo consegue estabelecer relação simbiótica com bactérias com ambas as características culturais, ressaltando, inclusive, a importância da espécie em projetos de recuperação de áreas degradadas.

No estudo realizado por Guabiraba (2018), visando avaliar a nodulação e a diversidade de bactérias da Caatinga, associadas aos nódulos de *Chloroleucon dumosum*, dos 74 isolados, houve alta ocorrência de isolados com produção de muco moderada a abundante pode ter relação com o ambiente de origem (Semiárido) e a época de coleta das amostras de solo, que aconteceu no período seco, corroborando com os resultados na pesquisa, a qual 60% com isolados, apresentaram muita produção de muco. A alta produção de exopolissacarídeos, têm sido abordada na literatura como uma das características que está diretamente relacionada à adaptação e sobrevivência dos rizóbios em condições ambientais adversas, como por temperatura elevada e baixa disponibilidade de água (Silva et al., 2007), impermeabilizando as células bacterianas e evitando sua dessecação (Xavier et al. 1998), como também, está associado a adesão do microsimbiontes aos pêlos radiculares.

### **6.3 Experimento de autenticação**

Verificou-se que todos os 29 isolados, que formaram 10 grupos fenotipicamente diversos, possuem à capacidade de estabelecer simbiose com *E. contortisiliquum*, ocorrendo a presença de nódulos radiculares em todos os tratamentos (Figura 11). A formação do nódulo é resultado do processo de interação entre bactéria e a planta hospedeira, constituindo-se um importante parâmetro para a avaliação de uma simbiose eficiente (Nóbrega et al, 2012).

**Figura 11:** Presença de nódulos nas raízes de Tamboril; nódulo destacado da raiz.



O teste de autenticação consiste na confirmação experimental do processo de simbiose dos rizóbios e planta hospedeira, pois, apesar do controle e assepsia no processo de isolamento das bactérias, pode-se ocorrer a contaminação cultural por outros micróbios do solo, alojados em rachaduras nos nódulos, suportando o processo de desinfecção. Outro fator importante, é a presença de bactérias não nodulíferas residindo dentro dos nódulos, que possivelmente, agem de forma oportunista no processo de infecção (formação do conduto de infecção) e penetrarem no tecido vegetal em companhia das bactérias nodulíferas (Kan et al., 2007).

As bactérias não nodulíferas (*Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Bacillus* e *Paenibacillus*), podem conviver em sinergia com os rizóbios dentro dos nódulos, e exercem outros processos que beneficiam a planta hospedeira, tais como: solubilização de fosfatos e produção de fitohormônios (Kan et al., 2007; Shiraishi et al., 2010; Costa et al., 2013; Marra et al., 2012). Portanto, tal experimento exerce função importante para a montagem da coleção de bactérias nodulíferas e, conseqüentemente, para a realização de futuros estudos.

O gênero *Enterolobium* pertença a tribo Ingeae (Brown, 2008), a mesma de *Calliandra* e *Inga*, que já possuem descrição sobre os tipos de rizóbios que nodulam esses gêneros. As espécies do gênero *Calliandra*, nodulam com *Paraburkholderia* (Silva et al., 2018), quando as espécies de *Inga* com estirpes *Bradyrhizobium* (da Silva et al., 2014). Embora *Calliandra* e *Inga* pertençam à mesma aliança Inga, seus simbioses são flogeneticamente distintos. Já *E. contortisiliquum* não tem aliança definida e pouco se conhece sobre a natureza de seus rizóbios simbioses. A identificação genética das bactérias isoladas dos nódulos de tamboril nesse estudo, permitirá conhecer melhor o espectro dos simbioses dentro da tribo Ingeae.

Embora todas as bactérias da coleção tenham apresentado a aptidão em induzir a formação de nódulos nas raízes de tamboril, seis repetições não apresentaram nódulos (figura 12). A amostra de solo de PA, como já mencionado, contém o segundo maior número de isolados, entretanto, os tratamentos PA2-23, PA4-48, PA5-6 tiveram repetições sem a presença dos nódulos, assim como, dois isolados pertencentes a área de TR (TR5-5 e TR5-8).

**Figura 12:** Tabela com o NN (número de nódulos) e MSN (massa seca dos nódulos) por tratamento e repetição.

Tratamento	Repetição	NN	MSN
DG1-1	1	3	<0,001
	2	10	0,002
	3	36	0,008
	4	23	0,016
DG1-2	1	24	0,006
	2	14	0,002
	3	33	0,011
	4	19	0,002
DG1-3	1	11	<0,001
	2	5	0,001
	3	9	0,002
	4	5	<0,001
DG1-4	1	13	0,002
	2	17	0,014
	3	8	0,003
	4	13	0,006
DG3-4	1	2	<0,001
	2	1	<0,001
	3	2	<0,001
	4	14	0,004
DG4-6	1	7	<0,001
	2	3	<0,001
	3	5	<0,001
	4	27	0,006
DG5-1	1	10	<0,001
	2	20	0,003
	3	12	0,013
	4	18	0,005
DG5-10	1	1	0,002
	2	5	0,005
	3	2	<0,001
	4	14	0,007
DG5-12	1	3	0,002
	2	10	0,003
	3	9	0,004
	4	5	0,006

<b>DG5-16</b>	1	9	0,002
	2	5	0,002
	3	2	<0,001
	4	15	0,008
<b>DG5-9</b>	1	8	<0,001
	2	5	0,002
	3	12	0,013
	4	15	<0,001
<b>OC2-1</b>	1	37	0,005
	2	8	0,004
	3	8	0,003
	4	15	0,029
<b>OC4-5</b>	1	1	<0,001
	2	15	0,005
	3	12	0,003
	4	8	0,016
<b>OC4-7</b>	1	14	0,006
	2	7	0,001
	3	7	0,005
	4	3	<0,001
<b>PA2-1</b>	1	7	0,002
	2	4	0,001
	3	7	0,003
	4	16	0,005
<b>PA2-21</b>	1	10	0,003
	2	1	<0,001
	3	5	0,003
	4	9	0,008
<b>PA2-23</b>	1	2	0,006
	2	3	<0,001
	3	0	0
	4	9	0,005
<b>PA4-14</b>	1	1	0,003
	2	0	0
	3	0	0
	4	1	0,004
<b>PA4-48</b>	1	3	0,002
	2	1	0,001
	3	3	0,003
	4	17	0,012
<b>PA5-1</b>	1	3	<0,001
	2	6	0,003
	3	10	0,007
	4	4	0,009
<b>PA5-2</b>	1	37	0,006
	2	16	0,004

	3	33	0,004
	4	18	0,005
<b>PA5-3</b>	1	16	0,008
	2	5	0,002
	3	6	<0,001
	4	9	0,005
<b>PA5-4</b>	1	12	0,005
	2	8	0,003
	3	4	0,001
	4	13	<0,001
<b>PA5-6</b>	1	0	0
	2	2	0,001
	3	5	0,001
	4	16	0,004
<b>TR1-8</b>	1	1	<0,001
	2	7	<0,001
	3	2	<0,001
	4	9	0,011
<b>TR5-10</b>	1	12	0,001
	2	13	0,003
	3	26	0,006
	4	25	0,012
<b>TR5-5</b>	1	7	0,016
	2	14	0,015
	3	0	0
	4	5	<0,001
<b>TR5-8</b>	1	33	0,003
	2	11	0,002
	3	17	0,007
	4	0	0
<b>TR5-9</b>	1	22	0,007
	2	9	<0,001
	3	3	0,002
	4	7	0,003
<b>Controle</b>	1	4	<0,001
	2	1	<0,001
	3	3	0,002
	4	2	0,006

## 7. CONCLUSÕES

Conclui-se que as amostras de solos oriundas dos municípios de Delmiro Gouveia, Olho D'água do Casado, Pão de Açúcar e Traipu, municípios pertencentes à região semiárida do estado de Alagoas, apresentam populações de bactérias nativas, fenotipicamente diversas, com capacidade de estabelecer relação mutualística com *Enterolobium contortisiliquum*, podendo conter potencial promissor como inoculantes, por serem adaptadas as condições edafoclimáticas do bioma Caatinga.

O teste de autenticação, apresentou a existência de infecções bacterianas específicas, obtendo-se a confirmação da relação rizóbio-planta por meio da formação de nódulos radiculares.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ressalta-se a necessidade da realização de pesquisas futuras, para uma melhor compreensão da simbiose de *Enterolobium contortisiliquum* e os rizóbios nativos da Caatinga, como a realização do sequenciamento do gene 16S rRNA, o qual forneceria informações a respeito dos gêneros e/ou espécies dos isolados capazes de se associar com tamboril.

O teste de eficiência simbiótica na planta hospedeira, poderia evidenciar isolados capazes de realizar FBN e promover o crescimento das mudas da espécie e, conseqüentemente, serem indicados como inoculantes eficazes, contribuindo diretamente em projetos de recuperação de áreas degradadas, através utilização da tecnologia de inoculação, proporcionando o desenvolvimento e estabelecimento das plantas no ambiente.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, L. A. PEREIRA, I. M.; LEITE, U. T.; BARBOSA, M. R.V. Análise da cobertura de duas fitofisionomias de caatinga, com diferentes históricos de uso, no município de São João do Cariri, Estado da Paraíba. *Revista Cerne*, Lavras, v. 11, n. 3, p. 253-262, 2005.
- ALMEIDA, G.S.; NASCIMENTO, L.O.; ALMEIDA, A.S.; CARDOSO, J.F.; LEAL, F.A. Capacidade de nodulação em *Inga* sp. de ocorrência na Amazônia Ocidental. *Enciclopédia Biosfera*, v. 9, n. 17, p.492-508, 2013.
- AZANI, N. et al. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *LPWG - Phylogeny and classification of the Leguminosae. TAXON*, v. 66, p.44–77. 2017
- ALBUQUERQUE, S. G.; BANDEIRA, G. R. L. Effect of thinning and slashing on forage phytomass from a caatinga of Petrolina, Pernambuco, Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v. 30, p. 885-891, 1995.

BRASIL. Ministério da Integração Nacional. Nova delimitação do Semiárido brasileiro. Brasília, DF, 2005. 32 p. il.

BROWN; G. K. Systematics of the tribe Ingeae (Leguminosae-Mimosoideae) over the past 25 years. *Muelleria*; v. 26, n.1, p. 27-42, 2008.

BROUGHTON, W. J.; ZHANG F.; PERRET, X.; STAEHELIN, C. Signals exchanged between legumes and Rhizobium: agricultural uses and perspectives. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 252, n. 1, p. 129–137, may 2003.

BARBERI, A.; CARNEIRO, M. A. C.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas Gerais. *Cerne*, v.4, n.1, p.145-153, 1998.

BLOSSEY, B. E NÖTZOLD, R. Evolution and increased competitive ability in invasive nonindigenous plants: a hypothesis. *Journal of Ecology* 83:887-889. 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 13 de 24 de março de 2011. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=recuperarTextoAtoTematicaPortal&codigoTematica=1229256>>. Acesso em: 19/11/2022.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, S. A.; CARVALHO, R. DE.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. V. M.; MOREIRA, F. M. S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.48, n.9, p.1275-1284, set. 2013 DOI: 10.1590/S0100-204X2013000900012.

COUTINHO, H. L. C.; OLIVEIRA, V. M.; MOREIRA, F. M. S. Systematics of legume nodule nitrogen fixing bacteria: agronomic and ecological applications. In: PRIEST; F. G.; GOODFELLOW; M. (Ed.). *Applied Microbial Systematics*. Dordrecht: Kluwer; p. 107-134; 2000.

CHAER, G. M. et al. Nitrogen-fixing legume tree species for the reclamation of severely degraded lands in Brazil. *Tree Physiology*, v. 31, n. 2, p. 139-149, 2011. DOI: 10.1093/treephys/tpq116.

DANA, E.D.; Randall, R.P.; Sanz-Elorza, M. & Sobrino, E. 2003. First evidences of the invasive behaviour of *Leucaena leucocephala* in Europe. *Oryx* 37: 14-14.

DE OLIVEIRA, ISABELLY S.B. . Biogeografia de rizóbios de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) isolados dos biomas Caatinga e Mata Atlântica. 2018. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais). Instituto de Florestas, Departamento de Conservação da Natureza. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

EHRHARDT-BROCARD, N.; OLIVEIRA FILHO, L. C. L.; SANTOS, J. Diversidade cultural; morfológica e genética de diazotróficos isolados de nódulos de Bracatinga. *Revista Árvore*. v. 39, n. 5, p. 923-933. 2015.

FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, C. L.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; LYRA, M. C. C. P. Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil. *Bragantia*, Campinas, v. 66, n. 3, p. 497-504, 2007.

FREITAS, A. D. S. SILVA, T. O. MENEZES, R. S. C. SAMPAIO, E. V. S. B. ARAÚJO E. R. FRAGA V. S. Nodulação e fixação de nitrogênio por forrageiras da caatinga cultivadas em solos do semiárido paraibano. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v.40, n.9, p.1856-1861, 2011.

GUABIRABA, ANA JESSICA GOMES. Simbiose entre *Chloroleucon dumosum* (Benth) G.P. Lewis e rizóbios dos solos da Caatinga. Arapiraca, 2018. 57p. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente). Universidade Federal de Alagoas. Campus Arapiraca. Arapiraca, 2018.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p.

KIILL, L. H. P. *Árvore do conhecimento: Bioma Caatinga*. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. 2010. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/bioma\\_caatinga/arvore/CONT000glz1ehqv02wx5ok0f7mv200nvg0xn.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/bioma_caatinga/arvore/CONT000glz1ehqv02wx5ok0f7mv200nvg0xn.html)>. Acesso em: 27/10/2021.

KAN, F.L.; CHEN, Z.Y.; WANG, E.T. et al. . Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai-Tibet plateau and in other zones of China. *Archives of Microbiology*, v.188, p.103-115, 2007. DOI: 10.1007/s00203-007-0211-3.

JESUS, A. A. et al. Quality of *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. seedlings in function of inoculation and natural nodulation in soils from southwest of Piauí, Brazil. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 37, n. 2, p. 198-205, 2014

LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 4.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 384p.

LIMA, K. D.R.; CHAER, G. M. ROWS, J. R. C. et al., A. S. Seleção de espécies arbóreas para revegetação de áreas degradadas por mineração de piçarra na caatinga. *Revista Caatinga*, Mossoró, v. 28, n. 1, p. 203 – 213, 2015.

LIMA, A.S. Caracterização e seleção de rizóbios de macuna. Seropédica. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 79f. (dissertação de mestrado); 2009.

LIMA, H.C. et al. Fabaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB115>>. Acesso em 29 de outubro., 2022.

LIMA JÚNIOR, C.; ACCIOLY, L.J.O.; GIONGO, V. et al.. Estimativa de biomassa lenhosa da caatinga com uso de equações alométricas e índice de vegetação. *Cientia Forestalis*, 42:289-298, 2014.

LIU, H.; GUO, Z. G.; WANG, Y. R. Optimal conditions for hydropriming lucerne seeds. **New Zealand Journal of Agricultural Research**; Vol. 51: 69-75, 2008.

LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C.. **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife: UFPE, 2005.

MOREIRA, F. M. S.; LIMA A. S.; JESUS, E. C.. **Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas**. In: Fatima M. S. Moreira, Juvenil E. Cares, Ronald Zanetti, Sidney L. Stürmer. *O ecossistema do solo: Componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal*. Lavras: UFLA, 2013. p. 327-340.

MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. **Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam espécies de leguminosae**. In: Lavras; MG. P. 279 a 312. 2010.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Ed. EDUFLA; 2a Ed. pp. 501-529. 2006.

MENDES, B. V.. Biodiversidade e Desenvolvimento Sustentável do Semi-Árido. Fortaleza: SEMACE, 1997.

MELLONI, R.; MOREIRA, F. M. S.; NÓBREGA, R. S. A.; SIQUEIRA, J. O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, v. 30, p. 235-246, 2006.

MARRA, L.M.; SOARES, C.R.F.S.; OLIVEIRA, S.M. . Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, v.357, p.289-307, 2012. DOI: 10.1007/s11104-012-1157-z.

NOBLE, I.R. **Attributes of invaders and the invading process: terrestrial and vascular plants**. Pp 301-313. In Drake, J.A.; DiCasteri, F.; Groves, R.H.; Kruger, F.J.; Mooney, H.A.; Rejmánek, M. & Williamson, M.H. (eds.) *Biological Invasions: a global perspective*. New York: Willey. 1989.

NETA, S. J. C.; SILVA, A. F. S.; JÚNIOR, P. I. F.; MARTINS, L. M. V.; COSTA, T. L.; FREITAS, A. D. S. **Características de bactérias de nódulos de jurema preta nativas de solos da Caatinga**. Congresso Brasileiro de Ciências do Solo, 35., 2015, Natal. O solo e suas múltiplas funções: anais. Natal: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2015.

NORRIS, D.O.T.; M., L. The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp. in relation to their taxonomy and their agronomic use. **East African Agricultural and Forest Journal**, Nairobi, v.29, p214-235. 1964.

NÓBREGA, C.C.; SANTOS, D.R., ÓI, K. D. S.; OLIVEIRA, M.; SILVA, J. L. L. Efetividade de Linhagens de Rizóbios Nativos do Semiárido. **Scientia Plena**. 8, 047302 (2012).

ODUM, Ecologia. Guanabara Koogan, 1988.

SARITA, S. et al. Diversity of nifH gene amplified from rhizosphere soil DNA. **Current Science**; Bangalore; v. 94, p. 109-114. 2008.

SILVA, M. A. P.. **Diversidade de rizóbios na estruturação de comunidades de plantas nativas da Floresta Atlântica**. 2014. 113p. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais e Florestais, Conservação da Natureza). Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

SILVA, V. C.; ALVES, P. A. C.; RHEM, M. F. K.; SANTOS, J. M. F.; JAMES, E. K.; GROSS, E. Brazilian species of *Calliandra* Benth.(tribe Ingeae) are nodulated by diverse strains of *Paraburkholderia*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 41, n. 3, p 241-250, 2018.

DA SILVA, K.; DE MEYER, S. E.; ROUWS, L. F. M.; FARIAS, E. N. C., DOS SANTOS, M. A. O.; O'HARA, G.; ARDLEY, J. K.; WILLEMS, A.; PITARD, R. M.; ZILLI, J. E. Bradyrhizobium ingae **sp. nov., isolated from effective nodules of Inga laurina grown in Cerrado soil**. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3395-3401, 2014.

SILVEIRA, A. P. D., FREITAS, S. S. F. **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2007. 312 p.: il. ISBN: 978-85-85564-14-8.

SOUZA, W. C. et al. Fontes de nitrogênio e caule decomposto de *Mauritia flexuosa* na nodulação e crescimento de *Enterolobium contortsiliquum*. **Revista Árvore**. v. 37, n. 5, p. 969-979, 2013. DOI:10.1590/S0100-67622013000500019.

SANTOS, C. E. R.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P. et al.. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 2, n. 4, p. 249-256, 2007.

SHAMSELDIN, A.; ABDELKHALEK, A.; SADOWSKY, M. J. Recent changes to the classification of symbiotic; nitrogen-fixing; legume-associating bacteria: a review. **Symbiosis**; v. 71; n., 2 p. 91-109. 2017.

SANTOS, E. **Nossas madeiras**. 1.ed. Belo Horizonte: Editora Itatiaia, 1987. 313p.

TAÍZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. Trad. SANTARÉM; E.R. et al.; 3° ed.; Porto Alegre: Artemed; 2004; p.719.

TEIXEIRA, F. C. P.; BORGES, W. L.; XAVIER, G. R. Characterization of indigenous rhizobia from caatinga. **Brazilian Journal of Microbiology**. V. 41: 201-208. 2010.

PENNINGTON RT, LAVIN M, OLIVEIRA-FILHO A.) Woody Plant Diversity, Evolution, and Ecology in the Tropics: Perspectives from Seasonally Dry Tropical Forests. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics** 40:437–457. (2009).

VELOSO, H. P.; R. ANGEL FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal. IBGE, Rio de Janeiro. 123 p. 1991.

VINCENT, J.M. *A manual for the practical study of root nodule bacteria*. Oxford: Blackwell Scientific Publications; p 119. 1970.

VAN GESTEL, M.; LADD J.N.; AMATO, M. Carbon and nitrogen mineralization from two soils of contrasting texture and microaggregate stability: influence of sequential fumigation, drying and storage. **Soil Biology and Biochemistry**, v.23, p.313-322, 1991.

XAVIER, G. R. et al. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea; rhizobia population. *Biology and Fertility of Soils*; Berlin; v.27; p.386-392. 1998.

**APÊNDICE 1:**

ISOLADO	TEMPO DE CRESCIMENTO	ALTERAÇÃO DE pH	PRODUÇÃO DE MUÇO	COR DA COLÔNIA	TIPO DE GOMA
DG1-1	lento	alcalino	muito	branca	aquosa
DG5-1	lento	alcalino	pouco	branca	consistente
DG1-4	lento	alcalino	pouco	branca	aquosa
TR5-9	lento	alcalino	pouco	branca	consistente
DG5-16	lento	neutro	muito	creme	aquosa
PA 5-3	lento	neutro	muito	branca	aquosa
PA 5-1	lento	alcalino	muito	branca	aquosa
PA 5-2	lento	alcalino	muito	branca	aquosa
DG4-6	lento	alcalino	pouco	branca	aquosa
DG1-3	lento	alcalino	pouco	branca	aquosa
TR5-8	lento	alcalino	pouco	branca	aquosa
OC2-1	lento	alcalino	pouco	branca	aquosa
TR5-10	lento	alcalino	muito	branca	aquosa
TR5-5	lento	alcalino	pouco	branca	aquosa
PA 4-14	lento	alcalino	pouco	branca	consistente
PA 5-6	lento	alcalino	pouco	branca	consistente
DG1-2	lento	alcalino	pouca	branca	aquosa
OC4-5	rápido	neutro	pouco	amarela	consistente
DG5-9	rápido	alcalino	pouco	amarela	consistente
DG5-12	rápido	neutro	pouco	amarela	consistente
PA 4-48	rápido	ácido	muito	amarela	aquosa
PA 2-1	rápido	alcalino	muito	branca	aquosa
PA 5-4	rápido	neutro	muito	creme	aquosa
TR1-8	rápido	neutro	pouco	amarela	consistente
PA 2-21	rápido	neutro	pouco	amarela	consistente
PA 2-23	rápido	neutro	pouco	amarela	consistente
OC4-7	rápido	neutro	pouco	amarela	consistente
DG3-4	rápido	neutro	pouco	amarela	consistente
DG5-10	rápido	alcalino	pouco	amarela	consistente

**ANEXO 1:****Experimento de captura das bactérias:**

1. Coleta de amostras de solos de determinada região que quer ser analisada a população de rizóbios;
2. Uso de planta-isca (leguminosa) que possui potencial de nodulação;
3. Montar o experimento em blocos ao acaso com **x** repetições para cada solo;
4. De preferência usar sementes já pré-germinadas (se necessário submetê-las a um hydropriming (LIU et al. 2008), que é um tratamento pré-germinativo em que as sementes são submersas em água por 24 horas), se houver dormência, fazer a escarificação das sementes;
5. Logo após, desinfestar superficialmente as sementes com álcool (70%) por 1 minuto, hipoclorito de sódio (2%) por 3 minutos e 5 lavagens sucessivas em água destilada estéril;
6. Utilizar vasos com capacidade para 500 mL;
7. Plantar no mínimo 2 sementes pré-germinadas por vaso;
8. Realizar desbaste após 10 dias de emergências, deixar uma ou duas plantas por vaso;
9. Irrigar as plantas uma vez por semana com 100 mL de solução nutritiva de Norris (VINCET, 1970) isenta de nitrogênio e com água autoclavada sempre que necessário (poderá haver modificações em relação a quantidade de solução/água);
10. Coletar as plantas com 60 dias após a emergência;
11. Coletar as raízes, lavar e destacar os nódulos, contá-los e armazenar em sílica gel desidratada para preservação e posterior isolamento das bactérias.

**Nota:** Tais procedimentos são passíveis de adaptações.

## ANEXO 2

### Isolamento das bactérias dos nódulos:

1. Colocar os nódulos armazenados em tubos de 1,5 mL (um por tubo), identificar e hidrata-los em água destilada e autoclavada por 1 hora;
2. Desinfestar os nódulos em álcool (70%) por 1 minuto e em hipoclorito de sódio (2%) por 5 minutos, seguido de seis lavagens em água destilada e autoclavada;
3. Para o isolamento das bactérias, adicionar 50 µL de água destilada e autoclavada nos tubos com os nódulos já desinfestados;
4. Macerá-los com o auxílio de uma pinça para formação da suspensão bacteriana;
5. Após esse processo, inocular 20 µL da suspensão em placas com meio de cultura, estriando com alça de platina para obtenção das colônias;
6. Incubar as placas em BOD a 28°C até o surgimento das colônias;
7. Caso necessário, realizar sucessivos repiques até se obter colônias puras para posterior caracterização fenotípica.

## ANEXO 3

### Meio de cultura:

Meio de cultura 79 (FRED E WAKSMAN, 1928), também conhecido como YMA (VINCENT, 1970).

#### **Equipamentos, vidraria e materiais:**

- Beaker 500 ml (para a mistura dos reagentes);
- Pipetas (1, 2, 4 e 5 ml);
- Placa de petri;
- Proveta de 1000 ml;
- Bastão de vidro;
- Papel alumínio;
- Algodão;
- Espátula;
- Erlenmeyer/mamadeiras.

#### **Reagentes e soluções**

- Ácido Sulfúrico a 5% 4;
- Açúcar Cristal ou Manitol;
- Agar;
- Azul de Bromotimol a 0,5 % em 0,2 N de KOH P/V4;
- Cloreto de Sódio a 10% P/V4;
- Extrato de Levedura 5;
- Fosfato de Potássio Dibásico a 10% P/V4;
- Fosfato de Potássio Monobásico a 10% P/V4;
- Hidróxido de Potássio a 10% P/V4;
- Sulfato de Magnésio Heptahidratado a 10% P/V4.

**Nota:** Os reagentes devem ser de qualidade analítica e a água deve ser destilada ou desmineralizada.

#### **Procedimento**

Receita: Adicionar aproximadamente 400 ml de água destilada em um becker de 500 ml e adicionar os reagentes abaixo relacionados, na ordem que se apresentam, misturando com bastão de vidro levemente entre uma adição e outra:

1. 10 g de Açúcar Cristal ou Manitol
2. 1 ml de solução de Fosfato de Potássio Dibásico ( $K_2HPO_4$ );
3. 4 ml de solução de Fosfato de Potássio Monobásico ( $KH_2PO_4$ );
4. 2 ml de solução de Sulfato de Magnésio Heptahidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ );
5. 1 ml de solução de Cloreto de Sódio (NaCl);
6. 0,4 g Extrato de Levedura ou 100 ml de Extrato Líquido de Levedura;
7. 5 ml de Solução de Azul de Bromotimol
8. Transferir para a proveta e completar o volume a 1000 ml com água destilada,
9. Ajustar o pH para 6,8-7,0 com solução de hidróxido de potássio (KOH) a 10%;
10. Adicionar agar, na seguinte quantidade:
  - a. 15 g por litro para meio sólido (para cada 200 ml distribuídos nos Erlenmeyer colocar aproximadamente 3 g);
11. Distribuir no erlenmeyer, vedar com rolhas de algodão e cobrir com papel alumínio;

12. Distribuir o meio de cultura nas mamadeiras/ Erlenmeyer, vedar com rolhas de algodão e cobrir com papel alumínio
13. Autoclavar o material preparado por 20 minutos a 120° C;
14. Deixar esfriar e reservar para uso em local adequado (verter em placa de petri).

**Nota:** Ao iniciar qualquer tipo de procedimento, é necessário que ocorra a limpar da bancada, piso e as paredes da capela com hipoclorito e álcool 70%, como também, é indicado passar pano com água e hipoclorito no piso do laboratório, diminuindo o risco de contaminação das placas. Após a limpeza, antes de verter o meio de cultura nas placas de petri, adicionar 400 µl de fungicida comercial Nistatina (C<sub>46</sub>H<sub>77</sub>NO<sub>19</sub>) para cada 200 ml de meio (usar pipeta azul, regular para 040).

#### ANEXO 4

##### Caracterização fenotípica:

A caracterização fenotípica dos isolados é constituída através da adaptação de Vincent (1970, feita com base no:

- Tempo de crescimento:
  - Rápido: 1 – 3 dias;
  - Intermediário: 4 – 5 dias;
  - Lento: 6 dias;
  - Muito lento: > 10 dias.
- Alteração do pH no meio de cultura:
  - Ácido;
  - Neutro;
  - Alcalino.
- Cor da colônia;
- Produção de goma (polissacarídeos extracelulares):
  - Muita;
  - Pouca.
- Consistência da colônia:
  - Aquosa;
  - Consistente.

**Nota:** Estas características são suficientes para identificar os grandes grupos de rizóbios.

## ANEXO 5

### Estocagem das bactérias:

Após a caracterização fenotípica:

- Com a placa pura, adicionar 6 mL de glicerol (20%) e fazer a raspagem das colônias com a ponteira;
- Armazenar os isolados em triplicatas em microtubos contendo 1 mL de meio YM com glicerol (20%) e com 300  $\mu$ L de fungicida Nistatina a  $-20^{\circ}\text{C}$ .