

Caracteres culturais das bactérias dos nódulos de algumas leguminosas tropicais (*)

FERDINANDO GALLI

E. S. A. "Luiz de Queiroz"

(*) No presente trabalho foram utilizados materiais e instalações doados pelo Conselho Nacional de Pesquisas e pela Fundação Rockefeller.

INTRODUÇÃO

Em trabalho anterior (GALLI, 1958), apresentámos os resultados obtidos em ensaios de inoculação cruzada com as bactérias dos nódulos de algumas leguminosas tropicais, nativas ou exóticas, que se mostram com algum valor, real ou potencial, para a nossa agricultura.

No presente trabalho, apresentamos os resultados obtidos em laboratório, em testes que visaram determinar os característicos culturais das bactérias dos nódulos daquelas mesmas leguminosas.

MATERIAL E MÉTODOS

As culturas de bactérias dos nódulos empregadas no presente trabalho foram isoladas de nódulos de *Calopogonium mucunoides* Desv., *Centrosema pubescens* Benth., *Cratylia floribunda* Benth., *Desmodium adscendens* D. C., *D. discolor* Vog., *Indigofera mucronata*, *I. subulata* Vahl., *I. sumatrana* Gaertn. *Leucaena glauca* L., *Stylosanthes guyanensis* Sw., *Terramnus uncinatus* Sw., *Tephrosia candida* D. C., e *Vicia obscura* Vog. Foram também utilizadas culturas de *Rhizobium japonicum*, *R. trifolii*, *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. lupini*, *R. phaseoli* e *Rhizobium* sp., êste último isolado de nódulos de caupí (*Vigna sinensis*).

Além dos métodos e meios de cultura já descritos em trabalho anterior (GALLI, 1958), foram utilizados mais os seguintes:

Fontes de energia: foram usados os seguintes compostos de carbono como fonte de energia para as diversas culturas de *Rhizobium*: 1 — açúcares: arabinose, celobiose, dextrina, galactose, glucose, inulina, lactose, levulose, maltose, manose, rafinose, ramnose, sacarose, e xilose; 2 — álcoois: dulcitol, inusitol, e manitol; 3 — sais de ácidos orgânicos: sais de sódio dos ácidos acético, cítrico, láctico, oxálico e tartárico.

Usou-se o meio líquido de THORNTON (1953), como base, adicionando-se 0,5% da substância energética. Para se evitar possíveis modificações na constituição dos hidratos de carbono sob a ação do calor, a esterilização do meio de cultura contendo êsses compostos foi feita por filtração em filtro Berkefeld W. Depois de filtrado, o meio foi distribuído em tubos previamente esterilizados, em seguida incubado por alguns dias antes de ser usado. Os tubos foram inoculados com fio de platina em alça, de 5 mm de diâmetro. Para a inoculação foram usadas culturas líquidas de 5-10 dias de idade.

Redução de nitratos: As culturas foram repicadas em meio de RIKER, LYNEIS & LOCKE (1941), e a presença de nitrito e nitratos foi determinada a intervalo de 5 dias, usando-se as técnicas recomendadas pela SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS, (1954 b). Nitritos foram determinados com ácido sulfanílico e alfa-naftilamina e nitratos com difenilamina.

Produção de indol: Em culturas em meio de Clark e Lubs, descrito por HOFER (1941), determinou-se a produção de indol, fazendo-se a reação de Kovac, recomendada pela SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS (1954 b).

Produção de acetil-metil-carbinol: Empregou-se a reação de Voges Proskauer, de acôrdo com o usado por ALLEN (1951).

Reação em leite-brômo cresol púrpura: O meio foi preparado com leite desengordurado, distribuído em tubos e esterilizado em autoclave a 100°C durante trinta minutos, por três dias consecutivos. A cada tubo após a esterilização, foram adicionadas assêticamente, duas gotas de solução alcoólica de bromocresol púrpura a 0,5%. Os tubos foram incubados durante uma semana antes de serem utilizados. Após a inoculação, as culturas foram incubadas a 28°C durante trinta dias, e os exames das mesmas feitos a intervalos de cinco dias.

Coloração: Para o exame de culturas foram usadas a técnica de coloração negativa com solução aquosa concentrada de nigrosina, e a coloração com fucsina fenicada de Ziehl.

Para a coloração de Gram, foi usada a técnica de Hucker, segundo as normas da SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS, (1954 a).

RESULTADOS

As culturas de *Rhizobium* spp. são geralmente divididas em dois grupos, com respeito ao seu desenvolvimento em meio de extrato de levedura-manitol-agar: as de crescimento moderado e as de crescimento lento. As diversas culturas por nós isoladas apresentaram característicos de crescimento em meio n. 79 de FRED e WAKSMAN, (1928, que nos permitiram fazer a separação das mesmas nesses dois grupos.

Duas culturas de bactérias dos nódulos, de *Vicia obscura* e de *Leucaena glauca*, apresentaram crescimento moderado naquele meio de cultura. Em caixas de petri, as colônias tornaram-se visíveis a partir do 4.º dia de incubação a 28°C; eram

colônias circulares, convexas ou pulvinadas, com bordos inteiros, lisas, brilhantes, brancas, translúcidas. Quando se desenvolvendo abaixo da superfície do agar, eram bem menores, lenticulares, com extremidades ponteagudas. Quando transferidas para tubos com meio inclinado, em poucos dias apresentaram crescimento efuso, vigoroso, ocupando boa parte da superfície do agar.

As culturas restantes apresentaram crescimento lento no mesmo meio de cultura. As colônias somente se tornaram perceptíveis a partir do 9.^o ou 10.^o dia de incubação, e apareciam como pequenos pontos espalhados pela superfície do meio de cultura. A partir do 10.^o ou 11.^o dia mostraram-se com forma circular, com 1-2 mm de diâmetro, pulvinadas, com superfície lisa, com bordos inteiros, de tonalidade brancacenta e transparência variável de cultura para cultura. Quando transferidas para tubos com meio inclinado, tinham pequeno desenvolvimento e, mesmo depois de vários dias de incubação, apresentaram-se com crescimento filiforme, acompanhando as marcas deixadas pelo fio de platina sobre a superfície do agar, e depositando-se na parte inferior do meio de cultura inclinado.

Tôdas as culturas, quando crescendo em meio líquido de Thornton por 6 a 10 dias, mostraram ser constituídas de bastonetes Gram negativos. Culturas jovens foram facilmente coloridas com fucsina fenicada de Ziehl. Culturas mais idosas ofereciam certa dificuldade à coloração. Em esfregaços coloridos com fucsina fenicada ou com nigrosina (coloração negativa), ao microscópio, as bactérias se mostraram como bastonetes alongados, com 2-3 microns de comprimento. Em culturas mais velhas, os bastonetes apresentaram variações na forma e tamanho. Os caracteres morfológicos e suas variações, entretanto, não permitiram estabelecer diferenças entre as diversas culturas de bactérias.

Os dados referentes à utilização de hidratos de carbono e de sais de ácidos orgânicos como fonte de energia pelas culturas de bactérias dos nódulos utilizadas no presente trabalho, estão agrupadas na Tabela I. Tôdas as culturas, sem exceção, deram reação alcalina em meio contendo respectivamente inulina e acetato, lactato e tartarato de sódio como fonte de carbono. Por êsse motivo, esses resultados deixaram de figurar na tabela.

Nos casos em que houve produção de ácido, resultante do desdobramento dos hidratos de carbono, essa produção não foi muito intensa, a julgar pela coloração dada ao meio de cultura pelo azul de bromo timol.

TABELA I — Característicos das culturas de bactérias dos nódulos em vários meios de cultura (1)

Meio de cultura	arabinose	celobiose	dextrina	galactose	glucose	lactose	levulose	maltose	manose	rafínose	ramnose	sacarose	xilose	dulcitol	inústol	manitol	citrato de sódio	oxalato de sódio	leite-bromo cresol púrpura
Bactéria dos nódulos de:																			
I. sumatrana*	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al
I. mucronata	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al
I. subulata	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al
D. adscendens	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al
D. discolor*	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al
V. obscura*	Ac	Ac	al	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	al	O	al-s
C. pubescens	al	al	O	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	O	al
C. pubescens	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al
C. mucunoides*	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al
C. mucunoides	al	al	O	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	O	al	al
C. floribunda	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al
T. uncinatus**	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al
S. guyanensis	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al
T. candida*	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al
L. glauca*	Ac	Ac	al	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	O	al-s	al
Rhizobium meliloti	Ac	Ac	al	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	O	O	Ac-s
R. trifolii	Ac	Ac	al	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	O	O	al-s
R. leguminosarum	Ac	Ac	al	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	O	O	al-s
R. lupini	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al
R. phaseoli	Ac	Ac	al	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	O	O	al-s
R. japonicum	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al
Rhizobium de Vigna sinensis	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al	al

(1) al = reação alcalina; Ac = reação ácida; O = sem desenvolvimento; s = formação de sóro; (*) = duas linhagens de bactérias dos nódulos; (**) = três linhagens de bactérias dos nódulos.

No geral, as bactérias dos nódulos não se desenvolveram bem em meio com sais de ácidos orgânicos, com a exceção feita ao lactato de sódio. As culturas demoraram vários dias para mostrar indícios de desenvolvimento. Esse atraso foi mais acentuado quando crescendo em meio com citrato de sódio, onde, via de regra, só se notou mudança de reação no meio depois de 10 dias de incubação.

Também em meio com dextrina como única fonte de carbono o desenvolvimento se mostrou insatisfatório, tendo duas das culturas deixado de apresentar desenvolvimento nesse meio. Todas as culturas reduziram nitratos a nitritos. A presença destes no meio de cultura foi determinada a intervalos de 5 dias, e já na primeira determinação a maior parte delas deu resultados positivos quanto à presença de nitritos.

A maior parte das culturas não se desenvolveu em meio de Clark e Lubs. Algumas delas exibiram leve turvação após cerca de 15 dias de incubação. Nestas, não foi constatada a presença de indol, quando utilizado o teste de Kovac, nem a presença de acetil-metil-carbinol, quando feita a reação de Voges-Proskauer.

DISCUSSÃO

Os dados encontrados na literatura e referentes ao comportamento das bactérias dos nódulos face às características da utilização de açúcares e de outras fontes de energia, diferem entre si com relação a certos compostos. Assim, segundo GREGORY & ALLEN (1953), as bactérias de alfafa, trevo, feijão, *Vigna sinensis* e *Caragana arborescens* não se desenvolvem em meio com dextrina como única fonte de carbono. Entretanto, segundo BALDWIN & FRED (1927), as bactérias dos nódulos produzem reação fortemente alcalina, quando em meio com dextrina. JENSEN, (1928) mostrou que elas produzem um pequeno abaixamento no pH do meio de cultura contendo dextrina. No presente trabalho, as culturas de *Rhizobium*, com exceção de duas, desenvolveram-se em meio contendo dextrina como única fonte de carbono, produzindo reação acentuadamente alcalina; bactérias de *Leucaena glauca* e de *Vicia obscura*, entretanto, deram reação menos pronunciada. No mesmo meio, uma linhagem de bactéria de *Centrosema pubescens* e uma de *Calopogonium muconoides* não apresentaram desenvolvimento, possivelmente por incapacidade das bactérias de se utilizarem de dextrina como fonte de energia.

Os dados relativos às varias linhagens de bactérias dos nódulos de *Calopogonium mucunoides*, envolvidas no presente trabalho, diferem dos apresentados por AQUINO & MADAMBA (1940). Segundo êsses autores, essa bactéria produz reação levemente ácida em meio de cultura com manitol ou com glicose, o que não se verificou no presente trabalho.

Os caracteres culturais não permitem a separação das bactérias de *Vigna sinensis*, soja, tremôço e de várias outras leguminosas por nós examinadas. BALDWIN & FRED (1927), acharam que os caracteres de fermentação de várias bactérias dos nódulos eram bem definidos e correspondiam aos grupos estabelecidos por outros autores por meio de testes culturais e serológicos. Entretanto êles não conseguiram separar as bactérias da soja e de *V. sinensis*. BUSHNELL & SARLES (1937), encontraram caracteres culturais semelhantes para as bactérias dos nódulos de *Lupinus* e de várias outras plantas do grupo de *V. sinensis*.

Os dados obtidos não permitem a caracterização de cada uma das culturas de bactérias dos nódulos utilizadas no presente trabalho, principalmente se considerarmos que os caracteres culturais e fisiológicos das bactérias do gênero *Rhizobium*, relatados na literatura, são muitas vezes contraditórios, como vimos atrás. Êles, entretanto, auxiliam a caracterização da bactéria, quando empregados juntamente com os dados referentes a inoculações cruzadas, relatados anteriormente pelo Autor (GALLI, 1958). É o que veremos no capítulo seguinte.

RESUMO E CONCLUSÕES

O A. isolou 23 linhagens de bactérias dos nódulos de 13 leguminosas, nativas ou exóticas. Foram feitos testes culturais e fisiológicos seguintes: — desenvolvimento em meio de extrato de levedura-manitol-agar, crescimento em leite-bromo cresol púrpura, redução de nitratos, produção de indol, produção de acetil-metil-carbinol, utilização de vários açúcares, álcoois e sais de ácidos orgânicos.

Os caracteres culturais e fisiológicos revelados nos testes de laboratório não possibilitam a identificação de cada uma das diferentes culturas de bactérias dos nódulos utilizadas no presente trabalho. Entretanto, êles fornecem dados que auxiliam a caracterização da bactéria, quando empregados concomitantemente com os dados obtidos em ensaios de inoculação cruzada, relatados anteriormente pelo A. Nessas condições, as

leguminosas estudadas distribuem-se por quatro grupos de inoculação cruzada, cujas bactérias apresentam os seguintes característicos:

1 — bactérias dos nódulos de *Vigna sinensis*, *Calopogonium mucunoides*, *Centrosema pubescens*, *Desmodium adscendens*, *D. discolor*, *Indigofera mucronata*, *I. subulata*, *I. sumatrana*, *Stylosanthes guyanensis*, *Tephrosia candida* e *Teramnus uncinatus*: bactérias de crescimento lento; reação alcalina em leite-bromo cresol púrpura; não produção de ácido em meio com as fontes de carbono orgânico utilizadas neste trabalho.

2 — bactérias de ervilha e de *Vicia obscura*: bactérias de crescimento moderado; reação alcalina, com formação de sôro, em leite-bromo cresol púrpura; produção de ácido nas mesmas fontes de carbono.

3 — bactérias de *Leucaena glauca*: bactéria de crescimento moderado; reação alcalina e formação de sôro em leite-bromo cresol púrpura; produção de ácido em meio com rafiinose e dulcitol.

4 — bactéria de *Cratylia floribunda*: bactéria de crescimento lento; reação alcalina em leite-bromo cresol púrpura; produção de ácido em meio com manose e ramnose.

SUMMARY

23 isolates from root nodules of 13 leguminous species were tested in laboratory for cultural and physiological characteristics.

The following conclusions can be drawn:

1 — The cultural and physiological characters were not enough to identify the different isolates.

2 — The data from cultural and physiological tests help the identification of the bacteria, when checked with data from cross-inoculation tests reported elsewhere (GALLI, 1958). The bacteria studied herein may be grouped as the following:

a) nodule bacteria from *Vigna sinensis*, *Calopogonium muconoides*, *Centrosema pubescens*, *Desmodium adscendens*,

D. discolor, *Indigofera mucronata*, *I. subulata*, *I. sumatrana*, *Stylosanthes guyanensis*, *Tephrosia candida* and *Teramnus uncinatus*: bacteria with scanty growth; alkaline reaction in milk-brom cresol purple; no acid production in medium with any of the carbohydrates used.

b) nodule bacteria from pea and from *Vicia obscura*: bacteria with moderate growth; alkaline reaction, with serum zone, in milk-brom cresol purple; acid production in medium with all the carbohydrates used.

c) nodule bacteria from *Leucaena glauca*: bacteria with moderate growth; alkaline reaction, with serum zone, in milk-brom cresol purple; acid production from raffinose and manitol.

d) nodule bacteria from *Cratylia floribunda*: bacteria with scanty growth; alkaline reaction in milk-brom cresol purple; acid production from mannose and ramnose.

BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, O. N., 1951 — Experiments in soil bacteriology. Burgess Publishing Co., Minneapolis. 127 p.
- AQUINO, D. I. & A. L. MADAMBA, 1940 — A study of root nodule bacteria of certain leguminous plants. Phillipine Agric. 28: 120-132.
- BALDWIN, I. L. & E. B. FRED, 1927 — The fermentation characters of the root nodule bacteria of the leguminosae. Soil Sci., 24: 217-230.
- BUSHNELL, O. A. & W. B. SARLES, 1937 — Studies on the root nodule bacteria of wild leguminous plants in Wisconsin. Soil Sci. 44: 409-423.
- FRED, E. B., & S. A. WAKSMAN, 1928 — Laboratory manual of general microbiology. McGraw-Hill Book Co., Inc. New York. 145 p.
- GALLI, F., 1958 — Inoculações cruzadas com bactérias dos nódulos de leguminosas tropicais. Rev. Agric. (Piracicaba) 33: 139-150.
- GREGORY, K. F. & O. N. ALLEN, 1953 — Physiological variation and host plant specificities of rhizobia isolated from *Caragana arborescens*. L. Can. J. Bot. 31: 730-738.

-
- HOFER, A. W., 1941 — A characterization of *Bacterium radiobacter* (Beijerinck and van Delden) Lohnis. J. Bact. 41: 193-244.
- JENSEN, H. L., 1942 — Nitrogen fixation in leguminous plants: 1. General characters of root-nodule bacteria isolated from species of *Medicago* and *Trifolium* in Australia. Linnean Soc. New South Wales, Proc. 67: 98-108.
- RIKER, A. J., MARY M. LYNEIS & S. B. LOCKE, 1941 — Comparative physiology of crown gall, attenuated crown gall, *Radiobacter* and hairy root bacteria. Phytopat. 31: 964-977.
- SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS, 1954 a. — Manual of methods for the pure culture study of bacteria. Leaflet IV — Staining methods. Biotech Publications, Geneva, N. Y. 11.^a ed. 24 p.
- , 1954 b. — Manual of methods for the pure culture study of bacteria. Leaflet V — Routine tests for the descriptive chart. Biotech Publications, Geneva, N. Y. 13.^a ed. 28 p.
- THORNTON, G. D., 1953 — Soil microbiology (Mimeografado) 21 p.