

A VANTAGEM DOS MUTANTES RESISTENTES À ESTREPTOMICINA NA COMPETIÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE RHIZOBIUM PHASEOLI EM TURFA COMERCIAL¹

SONIA MARIA FONSECA², SIU MUI TSAI SAITO³ e CAIO VIDOR⁴

RESUMO - Avaliou-se a sobrevivência e a capacidade de competição de mutantes espontâneos de *Rhizobium phaseoli* resistentes à estreptomicina e espectinomomicina em turfa comercial não-esterilizada e esterilizada por irradiação (5 Mrad de radiação gama). Encontrou-se um elevado número de microrganismos antagonísticos (actinomicetos e protozoários) na turfa não-esterilizada, e a irradiação favoreceu o crescimento e a longevidade do *Rhizobium*, que, após 180 dias, permaneceu com um número de células viáveis para utilização agrícola (acima de 10^8). As taxas de mortalidade na turfa armazenada a 5°C foram, em geral, menores nos mutantes resistentes à estreptomicina que nos resistentes à espectinomomicina, principalmente na turfa não-irradiada. Outros experimentos conduzidos com turfa não-esterilizada confirmaram a superioridade dos mutantes resistentes à estreptomicina em comparação aos resistentes à espectinomomicina e novobiocina, mesmo quando inoculados juntos e em concentrações dez vezes menores. Os resultados obtidos atestam a possibilidade de utilização de mutantes com uma técnica rápida e precisa em estudos envolvendo a ação de fatores biológicos e não-biológicos sobre a população de *Rhizobium* em turfa não-esterilizada.

Termos para indexação: turfa esterilizada e não-esterilizada, microrganismos antagonísticos.

ADVANTAGES OF STREPTOMYCIN RESISTANT MUTANTS IN COMPETITION AND SURVIVAL OF RHIZOBIUM PHASEOLI IN COMMERCIAL PEAT

ABSTRACT - Survival and competitive abilities of spontaneous mutants of *R. phaseoli* resistant to antibiotics were studied by means of inoculation in commercial nonsterile and irradiated peat (5 Mrad of gamma radiation). There was a high number of microorganisms (actinomycetes and protozoa) antagonistic to *Rhizobium* in nonsterile peat and irradiation contributed to a better growth and survival of *Rhizobium*, which after 180 days remained with a number of agriculturally viable cells above 10^8 . The death rates during storage at 5°C of the streptomycin resistant mutants were smaller than those of spectinomycin resistant mutants, specially in the nonsterile peat. Other experiments carried out with nonsterile peat confirmed a better survival of the mutants' to streptomycin in comparison to those resistant to spectinomycin and novobiocin, even when inoculated both together and at rates ten times lower. The results demonstrate the advantageous use of mutants in studies involving the action of biotic and abiotic factors on *Rhizobium* survival in nonsterile peat.

Index terms: sterile and nonsterile peat, antagonistic microorganisms.

INTRODUÇÃO

A turfa constitui-se no veículo de maior utilização para a elaboração de inoculantes comerciais. Em razão do seu alto teor de matéria orgânica, ela apresenta alta capacidade de adsorção e retenção de umidade, além de ser uma fonte rica em elementos minerais e energéticos. Como consequên-

cia, ela propicia uma rápida proliferação e maior longevidade do *Rhizobium* nela introduzido e, com isso, o mantém vivo durante vários meses em alta densidade populacional, para fins de utilização como inoculante para as leguminosas (Alvarez et al. s.n.t.). Entretanto, a densidade populacional do *Rhizobium* no inoculante pode ser altamente afetada pelo tipo de tratamento a que a turfa é submetida antes de sua utilização como veículo na elaboração do inoculante. No Brasil, a produção industrial de inoculantes é feita com turfa seca ao ar e finamente moída. A irradiação é considerada como o melhor método de esterilização da turfa para a produção de inoculantes (Date & Roughley 1977). Contudo, ela não tem sido utilizada em larga escala em nosso meio, apesar de demonstrações experimentais que evidenciam maior sobrevivência de *Rhizobium japonicum* e *Rhizobium phaseoli*

¹ Aceito para publicação em 19 de abril de 1985. Pesquisa desenvolvida com apoio financeiro da FAPESP, Projeto Agronomia 81/1852-8 e Convênio EMBRAPA/FINEP: 00.28.20.50/14.

² Eng. - Agr., Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Caixa Postal 96, CEP 13400 Piracicaba, SP. Bolsista da FAPESP.

³ Eng.^a Agr.^a, Seção de Microbiol. do Solo CENA/USP. Bolsista do CNPq.

⁴ Eng. - Agr., Seção de Microbiol. do Solo (IPAGRO) e Prof.-Adj. Dep. de Solos (UFRS), Caixa Postal 776, CEP 90000 Porto Alegre, RS. Bolsista do CNPq.

em turfa irradiada (Lopes & Giardini 1977, Moretti & Saito 1978).

A esterilização da turfa elimina uma série de problemas de antagonismo e competição do *Rhizobium* com outros microrganismos, já que em condições normais ela apresenta intensa atividade microbiana. Quando introduzido na turfa, o *Rhizobium* passa por interações semelhantes às que ocorrem no solo, sendo que os efeitos físicos e biológicos adversos podem reduzir o seu crescimento e sua longevidade no substrato. Como o *Rhizobium* não apresenta formas especiais de resistência a condições adversas (Bisset 1952), torna-se indispensável que seja aumentada ou garantida a sua capacidade de competir com outros microrganismos, na utilização de metabólitos e substratos energéticos, para manter uma alta densidade de células no inoculante (Chowdhury 1977). Entre os principais microrganismos que exercem ação antagonística ao *Rhizobium*, o actinomiceto *Streptomyces* pode reduzir sensivelmente a população de *Rhizobium*, em decorrência da formação de estreptomina, cuja produção é estimulada pelo aumento do pH (Alexander 1977 e Eagle et al. 1952). A maior habilidade de sobreviver em meio contendo este antibiótico é uma característica desejável na seleção de estirpes de *Rhizobium*, especialmente quando inoculadas em solos contendo elevado número

de *Streptomyces*, produtores do antimetabólito (Scotti et al. 1982, Sá et al. 1983).

A presente pesquisa foi realizada com o objetivo de acompanhar o crescimento de estirpes mutantes de *Rhizobium phaseoli* resistentes a antibióticos, em turfas esterilizada ou tratada pelo sistema normalmente utilizado nas indústrias, bem como avaliar suas capacidades de competição saprofitica, quando inoculadas em misturas em turfa não esterilizada, durante dez dias, período de incubação e crescimento no substrato.

MATERIAL E MÉTODOS

Nas diversas etapas desta pesquisa, utilizaram-se, em diferentes combinações ou concentrações, as estirpes mutantes de *R. phaseoli* apresentadas na Tabela 1. Estes mutantes foram obtidos nos laboratórios de Microbiologia do Solo do CENA e no Departamento de Solos da UFRS, em pesquisas preliminares envolvendo avaliações da resistência natural das estirpes matrizes e da estabilidade mutagênica dos mutantes (Fonseca & Saito s.n.t.).

No primeiro experimento, estudou-se a sobrevivência dos mutantes C-88^{str+}, C-88^{spc+}, C-114^{str+} e C-144^{spc+}, quando inoculados individualmente em turfa irradiada e em turfa não-esterilizada. A turfa procedente da Turfal Indústria e Comércio de Curitiba, PR, foi acondicionada em porções de 100 g, em saquinhos de polietileno, e esterilizada por radiação gama a 5 Mrad, utilizando-se a fonte de Cobalto Gammabeam 650 (Atomic Energy of Canada Ltd) do CENA. Em amostras esterilizadas e não-esterili-

TABELA 1. Mutantes espontâneos de *Rhizobium phaseoli* resistentes à estreptomina, espectinomina e novobiocina, com os respectivos níveis de resistência expressos em microgramas do antibiótico por mililitro do meio de cultura.

Mutantes	Estirpe matriz	Nível de resistência $\mu\text{g/ml}$	Composição do antibiótico
C-88 ^{str+}	SEMIA-487	150	Sulfato de estreptomina (SE)
C-88 ^{spc+}	SEMIA-487	150	Dihidrocloridrato pentahidrato de espectinomina (DPE)
SEMIA-487 ^{nov+}	SEMIA-487	50	Sal sódico de novobiocina
C-114 ^{str+}	SEMIA-4005	150	SE
C-114 ^{spc+}	SEMIA-4005	150	DPE
CIAT-727 ^{str+}	CIAT-727	150	SE
CIAT-727 ^{spc+}	CIAT-727	150	DPE

zadas, mediu-se o pH da turfa e estimou-se a população de microrganismos antagonísticos ao *Rhizobium*, utilizando-se os métodos descritos por Aaronson (1970) para actinomicetos e de Danso et al. (1975) para protozoários.

Os mutantes foram crescidos em frascos contendo 100 ml de solução YWB (Fred et al. 1932), por um período de sete dias. A seguir, injetaram-se 40 ml deste meio, contendo em torno de 10^8 a 10^9 células/ml (Moretti & Saito 1978), nas porções de turfa esterilizadas e não-esterilizadas. Após homogeneização da suspensão celular com a turfa, esta foi incubada à temperatura de 28°C por dez dias, quando, então, realizou-se a primeira contagem dos inoculantes, segundo metodologia descrita por Vicent (1970), acrescentando-se os antibióticos respectivos para cada mutante. Após a primeira contagem, os inoculantes foram mantidos à temperatura de 5°C por um período de seis meses, a contar do momento da preparação dos mesmos. Durante este período, realizaram-se novas contagens aos 45, 67, 95, 137 e 179 dias após a inoculação.

No segundo experimento, utilizaram-se os mutantes CIAT-727^{str+}, CIAT-725^{spc+}, C-88^{str+}, C-88^{spc+} e SEMIA-487^{nov+} em diferentes relações de concentração entre mutantes provenientes da mesma estirpe matriz ($10^5:10^5$; $10^6:10^5$ e $10^5:10^6$). Injetaram-se 40 ml de meio contendo os mutantes na concentração desejada em 100 g de turfa não-esterilizada. A estimativa da população dos mutantes foi feita em duas amostras por tratamento, pela contagem em placas com meio YWA (Fred et al. 1932) contendo os respectivos antibióticos para cada mutante, imediatamente após a inoculação e após 3, 6, 12, 20 e 30 dias de incubação. Durante os primeiros doze dias, as amostras foram mantidas a 28°C e posteriormente a 5°C .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A esterilização da turfa por irradiação propiciou um maior número de células das estirpes mutantes, durante o período de condução do experimento, atingindo uma população superior a 10^8 células/g de inoculante, após um período de incubação de seis meses (Fig. 1, 2, 3 e 4). Em contrapartida, a população dos mutantes na turfa não-esterilizada apresentou um declínio gradual, atingindo uma densidade inferior a 10^7 células/g de inoculante no final do período de incubação. Como consequência, o inoculante é considerado de baixa qualidade, por não atender os requisitos exigidos pela legislação que regulamenta a produção e comercialização de inoculantes no Brasil. As taxas de mortalidade das estirpes na turfa esterilizada e não-esterilizada foram calculadas com relação ao período após a incubação a 28°C , quando normalmente, se consegue

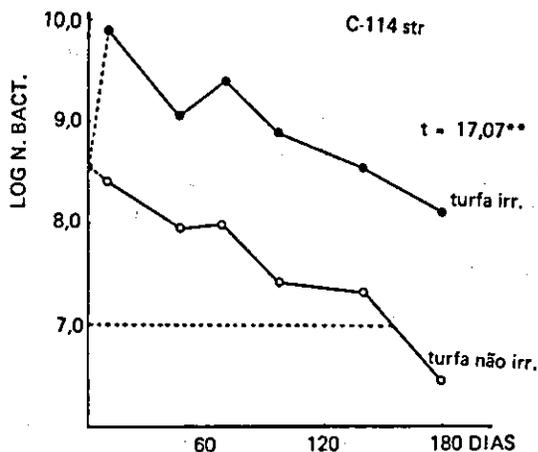


FIG. 1. Sobrevivência do mutante espontâneo de *R. phaseoli* C-114 resistente à estreptomicina, quando inoculado em turfa comercial irradiada a 5 Mrad (●) e turfa não-esterilizada (○). Cada ponto representa a média de quatro determinações (...) representa a contagem mínima de *Rhizobium* admitida em turfa comercial.

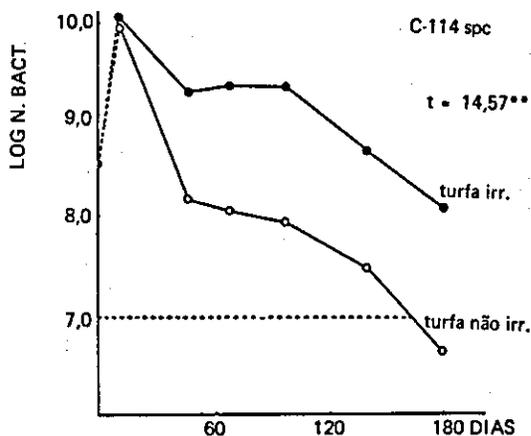


FIG. 2. Sobrevivência do mutante espontâneo de *Rhizobium phaseoli* C-114 resistente à espectinomicina, quando inoculado em turfa comercial irradiada a 5 Mrad (○) e turfa não-esterilizada (●). Cada ponto representa a média de quatro determinações (...) representa a contagem mínima de *Rhizobium* admitida em turfa comercial.

um máximo número de bactérias no meio (Tabela 2). Os resultados obtidos com a turfa esterilizada confirmam aqueles divulgados em outras pesquisas (Date & Roughley 1977, Lopes & Giardini

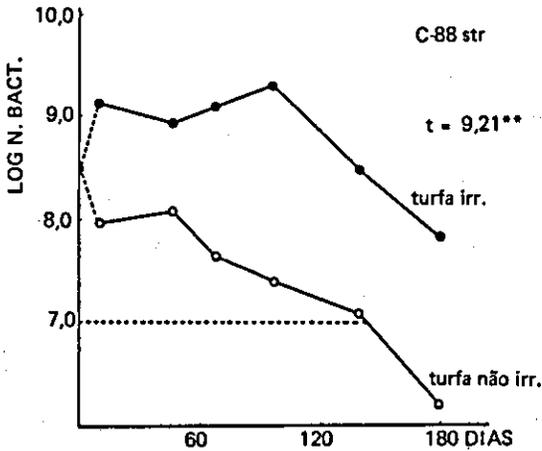


FIG. 3. Sobrevivência do mutante espontâneo de *Rhizobium phaseoli* C-88 resistente à estreptomicina, quando inoculado em turfa comercial irradiada a 5 Mrad (o) e turfa não-esterilizada (●). Cada ponto representa a média de quatro determinações. (...) representa a contagem mínima de *Rhizobium* admitida em turfa comercial.

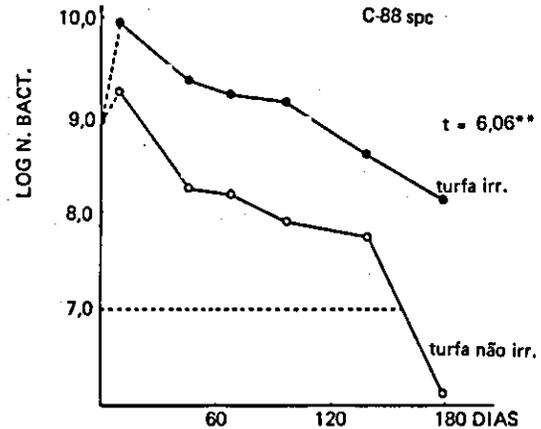


FIG. 4. Sobrevivência do mutante espontâneo de *Rhizobium phaseoli* C-88 resistente à espectinomicina, quando inoculado em turfa comercial irradiada a 5 Mrad (●) e turfa não-esterilizada (o). Cada ponto representa a média de 4 determinações (...) representa a contagem mínima de *Rhizobium* admitida em turfa comercial.

TABELA 2. Taxa de mortalidade dos mutantes resistentes a antibióticos em turfa comercial, determinada pela contagem em meio seletivo, contendo 100 µg/ml de antibiótico, relativa à contagem 10 dias após a inoculação. Médias de 4 placas.

		Mutantes (Log número bact.)			
Tratamento	Período (dias)	C-114 ^{str+}	C-114 ^{spc+}	C-88 ^{str+}	C-88 ^{spc+}
Turfa irradiada	10- 45	23,80 (±3,27)	39,25 (±10,81)	10,83 (±3,53)	18,35 (± 8,12)
	45- 67	8,00 (±4,33)	13,75 (± 5,37)	3,40 (±0,56)	14,50 (± 3,44)
	67- 95	11,35 (±0,34)	8,50 (± 2,12)	4,50 (±0,35)	11,00 (0,0)
	95-137	10,00 (±0,24)	11,00 (± 2,21)	4,76 (±0,57)	10,85 (± 3,09)
	137-179	10,00 (0,0)	12,00 (0,0)	7,50 (±1,35)	10,00 (± 2,36)
Turfa não irradiada	10- 45	13,00 (±7,50)	49,50 (± 4,65)	1,00 (0,0)	28,60 (±12,93)
	45- 67	7,00 (±3,80)	30,25 (± 1,89)	5,00 (±3,60)	19,57 (± 7,23)
	67- 95	12,00 (±3,82)	23,50 (± 2,12)	6,75 (±1,48)	15,50 (± 4,24)
	95-137	9,00 (±2,36)	19,83 (± 1,95)	6,88 (±2,23)	11,42 (± 1,65)
	137-179	12,00 (±2,87)	19,00 (± 5,63)	10,00 (±2,86)	10,00 (± 1,03)

$$\text{Taxa de mortalidade} = \frac{\log \text{ número bact. } t_2 - \log \text{ número bact. } t_1}{t_2 - t_1}$$

1977 e Moretti & Saito 1978); reforçando a vantagem do uso de turfa esterilizada. A menor população no inoculante elaborado com turfa não esterilizada é resultante de fatores de natureza biológica, sendo que a alta densidade populacional de *Streptomyces* (5×10^8) e protozoários, como amebas

(5×10^4), flagelados (10^3) e cistos (10^5 /g de turfa), deve ter representado importante papel na redução da população de *Rhizobium phaseoli*, através de antagonismo e predação (Chowdhury 1977, Danso et al. 1975).

Os mutantes da estirpe C-114 resistentes à

estreptomicina e espectinomina apresentaram maior crescimento que os mutantes da estirpe C-88, tanto em turfa esterilizada quanto em turfa não-esterilizada, durante os primeiros 60 dias de incubação. Neste período, os mutantes resistentes à espectinomina apresentaram maior número de células após o tempo de incubação (Fig. 1, 2, 3 e 4) que os resistentes à estreptomicina. Apesar do alto número inicial dos mutantes C-114^{SPC+} e C-88^{SPC+}, a sua taxa de mortalidade foi maior que para os mutantes resistentes à estreptomicina, e ocorreu maior queda no número de bactérias viáveis entre 10 e 67 dias, principalmente com a C-114^{SPC+}, seguida da C-88^{SPC+}, na turfa não-irradiada (Tabela 2). Observa-se, também, que não houve diferenças apreciáveis na população das estirpes C-88 e C-114, durante o período de incubação. Entretanto, nos primeiros dez dias de incubação, a estirpe C-114 apresentou um crescimento mais rápido, provavelmente por apresentar um tempo de geração menor. As estirpes marcadas com estreptomicina não sofreram queda brusca de população durante todo o período de armazenamento, e se mantiveram com taxa de mortalidade relativamente proporcional ao tempo. O maior número de mutantes resistentes à espectinomina, em comparação com os resistentes à estreptomicina, poderia estar associado com maior capacidade de competir contra a população de microrganismos antagonicos (Fig. 1, 2, 3 e 4).

Para confirmar a superioridade de mutantes resistentes à estreptomicina, foram feitos experimentos com duas outras estirpes, que foram ainda inoculadas em mistura, em concentrações diferentes. Observou-se um predomínio dos mutantes resistentes à estreptomicina, em comparação com os mutantes resistentes à espectinomina e novobiocina (Fig. 5 e 6), em todos os tratamentos. Quando inoculados em concentrações semelhantes, houve superioridade numérica dos mutantes resistentes à estreptomicina, tanto para a estirpe SEMIA - 487 quanto para a CIAT-727. Para a CIAT-727, a partir do vigésimo dia de incubação, a diferença entre os dois mutantes permaneceu praticamente constante, com superioridade numérica para o resistente à estreptomicina. Mesmo em concentração em torno de dez vezes menor no inóculo, os mutantes resistentes à estreptomicina apresentaram maior núme-

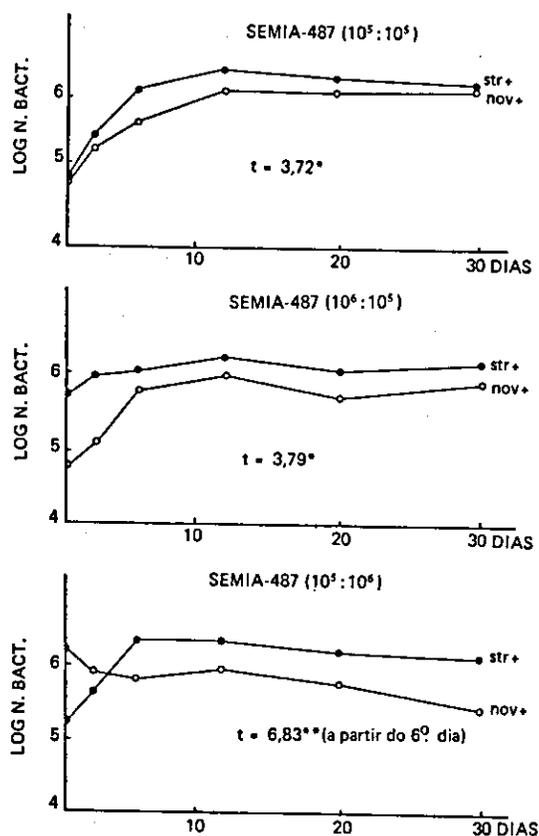


FIG. 5. Sobrevivência dos mutantes espontâneos de *R. phaseoli* SEMIA 487^{str+} (●) e SEMIA 487^{nov+} (○), quando inoculados em turfa comercial não-esterilizada, em misturas de suspensões celulares equalizadas, conforme as relações de concentração 10⁵:10⁵; 10⁶:10⁵ e 10⁵:10⁶ entre os mutantes resistentes à estreptomicina e novobiocina, respectivamente. Cada ponto representa a média de 4 determinações.

ro a partir do oitavo dia de incubação, e as diferenças entre os mutantes da estirpe CIAT-727 foram bem mais pronunciadas.

A maior sobrevivência dos mutantes resistentes à estreptomicina, quando em competição com *Rhizobium* resistente a outros antibióticos, poderia estar relacionada com uma maior capacidade competitiva em turfa não-esterilizada, resultante de menor sensibilidade à antibiose exercida por *Streptomyces*, ou de maior tolerância a antimetabólitos presentes no inoculantes. A maior resistência do *Rhizobium* ao antibiótico excretado por certas espécies de actinomicetos poderia ser atri-

REFERÊNCIAS

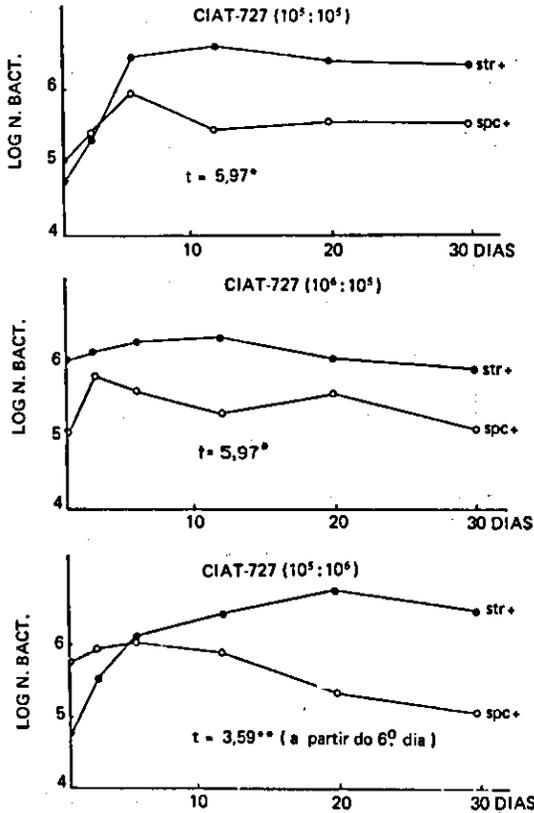


FIG. 6. Sobrevivência dos mutantes espontâneos de *R. phaseoli* CIAT-727^{str+} (●) e CIAT-727^{spc+} (◐), quando inoculados em turfa comercial não-esterilizada, em misturas de suspensões celulares equalizadas, conforme as relações de concentração $10^5:10^5$, $10^6:10^5$ e $10^5:10^6$ entre os mutantes resistentes à estreptomicina e espectinomicina, respectivamente. Cada ponto representa a média de 4 determinações.

buída ao desenvolvimento de mecanismos que determinaríamos um bloqueio da ação ou inativação do antibiótico (Davis 1962). Estas características possibilitariam aos mutantes maior densidade populacional e maior longevidade de inoculantes elaborados com os mesmos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão de bolsa de Iniciação Científica à primeira autora e auxílio financeiro à pesquisa. À EMBRAPA, agradecimentos pelo apoio.

- AARONSON, S. Experimental microbial ecology. s.l., Academic Press, 1970. 236p.
- ALEXANDER, M. Introduction to soil microbiology. 2. ed. New York, J. Wiley & Sons, 1977.
- ALVAREZ, A.; MAS, J. & MARGOSIAN, C. Produção industrial de inoculantes. In: REUNIÃO LATINO-AMERICANA DE *RHIZOBIUM*, 5., Rio de Janeiro, RJ, 1970. Anais... s.n.t. p.346-8.
- BISSET, K.A. The interpretation of appearances in the cytological staining of bacteria. *Exp. Cell Res.*, 3: 681-8, 1952.
- CHOWDHURY, M.S. Effects of soil antagonistics on symbiosis; exploiting the legume-*Rhizobium* symbiosis in tropical agriculture. s.l., Univ. of Hawaii, 1977. p.385-411. (Misc. Publ., 145).
- DANSO, S.K.A.; KEYA, S.O. & ALEXANDER, M. Protozoa and the decline of *Rhizobium* population added to soil. *Can. J. Microbiol.*, 21: 884-95, 1975.
- DATE, R.A. & ROUGHLEY, R.J. Preparation of legume seed inoculants. In: HARDY, R.W.F. & GIBSON, A. H., eds. A treatise on dinitrogen fixation. s.l., J. Wiley & Sons, 1977. p.243-75.
- DAVIS, R.J. Resistance of rhizobia to antimicrobial agents. *J. Bacteriol.*, (84):187-8, 1962.
- EAGLE, H.; LEVY, M. & FLEISCHMAN, R. The effect of pH of the medium on the antibacterial action of penicillium, streptomycin, chloramphenicol, terramycin and bacitracin. *Antibiot. Chemother.*, 11: 563-74, 1952.
- FONSECA, S.M. & SAITO, S.M.T. Determinação da sobrevivência de *Rhizobium phaseoli* mutante em turfa comercial. s.n.t. Trabalho apresentado na XI Reunião Latinoamericana de *Rhizobium*, Lima, Peru, out. 1982.
- FRED, E.B.; BALDWIN, I.L. & MAC COY, E. Root nodule bacteria and leguminous plants. s.l., Wisconsin Univ., 1932. (Wisconsin Univ. Studies, 5).
- LOPES, E.S. & GIARDINI, A.R. Sobrevivência de *Rhizobium phaseoli* em turfa esterilizada. *Bragantia*, Campinas, 36, 1977.
- MORETTI, V.L. & SAITO, S.M.T. Crescimento e sobrevivência de *Rhizobium phaseoli* em torta de filtro de cana, "peat-moss" e turfa comercial. *O Solo*, 70(1):44-8, 1978.
- SÁ, N.M.H.; SCOTTI, M.R.M.L.; VARGAS, M.A.T. & DÖBEREINER, J. Resistência natural à estreptomicina e eficiência das estirpes de *Rhizobium* nativas nos cerrados associadas a *Strylosanthes*. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 18(3):213-18, mar. 1983.
- SCOTTI, M.R.M.L.; SÁ, N.M.H.; VARGAS, M.A.T. & DÖBEREINER, J. Susceptibility of *Rhizobium* strains to antibiotics; a possible reason for legume failure in Cerrado soil. In: GRAHAM, P.H. & HARIP, S.C., eds. Biological nitrogen fixation. s.l., 1982. 768p.
- VICENT, J.M. A manual of the practical study of the root nodule bacteria. Oxford, Blackwell, 1970. 163p. (Int. Biol. Program. Handbook, 15).