

Tolerância ao sal e às altas temperaturas de estirpes de *Sinorhizobium* provenientes de zonas secas do Alentejo

Salt and temperature tolerance of *Sinorhizobium* strains isolated from dry environments in Alentejo

P. Fareleira¹, N. Matos¹, E. Ferreira² & J. F. Marques

RESUMO

O trabalho teve como principal objectivo a obtenção de estirpes de rizóbio adequadas à nodulação de luzernas anuais e adaptadas a sobreviver nas condições ambientais susceptíveis de ocorrer em solos degradados. Dado que as populações de rizóbio apresentavam variabilidade considerável no que respeita à tolerância a factores ambientais, os estudos focaram-se na pesquisa e na selecção de estirpes resistentes a condições adversas. Efectuaram-se colheitas de solos em diversas zonas no sul do País, seleccionando-se locais afectados por secura, temperaturas elevadas e, pontualmente, salinidade. A partir destes solos, isolaram-se estirpes de rizóbio, usando como planta hospedeira a luzerna anual *Medicago polymorpha*.

Estudaram-se os efeitos de condições de stresse ambiental, como a salinidade e as altas temperaturas, no crescimento das estirpes isoladas. Dos 41 isolamentos analisados, 11 apresentaram crescimento em meio contendo 1,4 M de cloreto de sódio e suplementado com 10% de extracto de terra, e 22 cresceram quando incubadas a 45 °C em

meio sem aditivos. Três estirpes mostraram ter capacidade para crescer sob os efeitos conjuntos da salinidade e da alta temperatura.

A análise de extractos etanólicos de estirpes tolerantes à salinidade revelou, na maior parte dos casos, a acumulação, induzida pelo sal, dos solutos compatíveis de *Sinorhizobium*: o dipéptido N - acetilglutaminil-glutamina amida, vários tipos de betainas, trealose, glutamato e prolina.

A observação, por NMR de ³¹P *in vivo*, de uma estirpe tolerante ao sal, proveniente de um solo xistoso de baixo teor em fósforo, mostrou a presença de níveis elevados de reservas intracelulares de fosfato inorgânico (polifosfato), sugerindo um bom potencial para utilização em solos onde os riscos de salinização se conjuguem com deficiências em fósforo assimilável.

ABSTRACT

The main objective of this work was to obtain rhizobial strains able to nodulate annual medics and highly adapted to the environmental conditions present in degraded

¹ Estação Agronómica Nacional, Departamento de Ciência do Solo, Quinta do Marquês, Av. da República, 2784-505 Oeiras, e-mail: paula.fareleira@oniduo.pt; ² Estação Florestal Nacional, Departamento de Ecologia, Recursos Naturais e Ambiente, Quinta do Marquês, Av. da República, 2784-505 Oeiras

soils. Since populations of rhizobia vary in their tolerance to environmental factors, screening for resistant strains was pursued. Soil samples were collected in different regions in Southern Portugal, severely affected by drought, high temperatures, and, in some places, salinity; rhizobial strains were isolated using *Medicago polymorpha* as trap-host.

The effects of environmental stressful conditions, such as salinity or high temperatures, in the growth of the isolated strains were studied. Among the 41 isolates that were analysed here, 11 showed good growth capacity in the presence of 1.4 M sodium chloride and 10% soil extract, and 22 could grow upon incubation at 45 °C. Three strains were able to grow under the simultaneous effects of salinity and high temperature.

NMR analysis of ethanolic cell-free extracts of salt tolerant strains showed that, in most cases, cell growth in medium containing high salt concentrations resulted in the accumulation of the compatible solutes described for *Sinorhizobium*: the dipeptide N-acetylglutaminylglutamine amide, betaines, trehalose, glutamate, and proline.

Analysis by *in vivo* ^{31}P -NMR of a salt tolerant strain originated from a schistous soil with low-phosphorus content, revealed the presence of high levels of intracellular inorganic phosphate reserves (polyphosphates). This suggests a high potential for the utilization of the strain in soils affected by both salinity and phosphorus deficiency.

INTRODUÇÃO

A fixação biológica de azoto tem vindo a adquirir importância crescente na agricultura, dado que constitui uma alternativa viável à aplicação de fertilizantes azotados químicos, cujo emprego, para além de poluente do meio ambiente, se torna factor de agravamento de consumos de energia na produção agrícola.

A associação entre rizóbio e plantas leguminosas é particularmente eficaz como fonte de azoto fixado por via biológica, sendo no entanto essencial que o microssimbionte e o hospedeiro que se pretende introduzir no solo interajam de modo adequado, formando simbioses eficazes no que respeita à fixação de azoto atmosférico. Em muitos casos, torna-se necessário proceder à inoculação do solo ou das sementes do hospedeiro com estirpes de rizóbio eficazes, no sentido de maximizar a produtividade do sistema (Smith, 1992). Uma estratégia chave para aumentar o desempenho destes inoculantes baseia-se na selecção de estirpes com capacidade para competir com as estirpes autóctones para a nodulação, ou para sobreviver saprofiticamente nas condições edafoclimáticas locais. Esta selecção torna-se particularmente importante em solos afectados por condições ambientais adversas (O'Hara *et al.*, 2002). Nestas situações, é essencial utilizar estirpes capazes de sobreviver no solo em condições de stresse e em número suficiente para garantir uma população capaz de nodular e fixar azoto, competindo com as estirpes indígenas, eventualmente menos eficazes. Os sistemas ambientais mais problemáticos para rizóbio encontram-se em solos marginais, com baixos níveis de precipitação, extremos de temperatura, baixos níveis de matéria orgânica e fraca capacidade de retenção de água (Zahran, 1999). Estas características são frequentes em regiões do sul de Portugal afectadas por problemas de pré-desertificação e más características dos solos. Nestas zonas, a introdução de estirpes de rizóbio bem adaptadas a sobreviver em situações de agressão ambiental, como altas temperaturas, secura ou salinidade, poderá ser intrinsecamente importante, tanto para sistemas de produção em regime de sequeiro, como para sistemas de irrigação sob risco de salinização.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolamento de estirpes de rizóbio

Para a obtenção das estirpes de rizóbio, foram escolhidos solos com relativa variabilidade de características. Seleccionaram-se zonas de solos degradados nas regiões do Alto e Baixo Alentejo, escolhendo-se, em locais particularmente afectados por baixos níveis de precipitação e temperaturas elevadas, solos com fraca capacidade de retenção de água, baixa capacidade de troca catiónica e baixo teor em matéria orgânica. Na altura de cada colheita, fez-se uma avaliação da intensidade aparente destes factores, com base na qual foi atribuído, a cada local, um grau de agressividade de condições ambientais, como indicado no Quadro 1. Como exemplo de local atingido por níveis elevados de salinidade sem excessos de temperatura, escolheu-se um solo constituído por sedimentos arenosos, num local periodicamente submerso em água do mar, no concelho das Caldas da Rainha (Salir do Porto).

Para além das características ambientais, a presença de luzernas anuais espontâneas foi factor determinante na escolha dos locais de amostragem. Todas as colheitas de solos foram realizadas durante os meses de Novembro de 2003 e Março de 2004.

Nos locais seleccionados, colheram-se amostras da camada superficial dos solos (1-10 cm), após o que se procedeu de imediato ao isolamento de estirpes de rizóbio, usando como hospedeiro-isco a cultivar Santiago, uma variedade comercial de *Medicago polymorpha*. O método de isolamento (Ferreira & Marques, 1992) consistiu na inoculação de plântulas de luzerna com alíquotas de aproximadamente 0,5 g de solo crivado (2 mm), em frascos com suporte de areia estéril suplementada com solução nutritiva (Wacek & Brill, 1976). As plantas cresceram em câmara fitoclimática, durante 4 a 6

semanas, com um fotoperíodo de 12 horas, com um nível de radiação fotossintética activa de aproximadamente $260 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperaturas diurna e nocturna de 22 e 15 °C, respectivamente. Decorrido o período de crescimento, as plantas foram retiradas e observadas quanto à presença de nódulos. Do conjunto das plantas inoculadas com solo de cada local, escolheram-se os nódulos radiculares de maiores dimensões, procedendo-se ao isolamento das estirpes de rizóbio de acordo com os procedimentos descritos por Vincent (1970).

Cada isolamento foi identificado por um código, constituído pelas 3 primeiras letras do concelho de origem, seguidas de uma letra maiúscula, que distingue diferentes locais de colheita no mesmo concelho e, por fim, um algarismo, indicando o número do isolamento no local.

Na totalidade, efectuaram-se 40 isolamentos a partir de solos, usando amostras provenientes de 18 locais distintos (Quadro 1). Os estudos a seguir descritos incluíram ainda uma estirpe pertencente à colecção da Estação Florestal Nacional, aqui designada por Ser-C1, proveniente de um solo derivado de xisto, de baixo teor em fósforo, isolada por procedimentos experimentais idênticos aos acima descritos.

Crescimento das estirpes isoladas em condições de stresse

A capacidade de crescimento de culturas das estirpes isoladas em condições de stresse foi avaliada em meio manitol-levedura líquido, suplementado com diferentes concentrações de cloreto de sódio e/ou incubado a temperaturas supra-óptimas (40 e 45°C). Adicionalmente, foi testada a inclusão de 10% de extracto de terra nos meios de cultura.

Os meios de crescimento foram inoculados com culturas frescas de cada estirpe

QUADRO 1 - Estirpes de rizóbio isoladas de solos usando *Medicago polymorpha* como planta hospedeira e características dos respectivos locais de origem

Estirpe/código do isolamento	Concelho de origem	Características geológicas do local (Soares, 1983) e agressividade das condições ambientais *
Por-A-1	Portel	Xistos e grauvaques ○
Por-A-2		
Mou-A-1	Moura	Rochas carbonatadas, com dioritos e xistos ○
Mou-A-2		
Mou-B-1	Moura	Rochas carbonatadas ○
Mou-B-2		
Mou-B-3		
Ser-A-1	Serpa	Granitos ⊙
Ser-A-2		
Ser-A-3		
Ser-B-1	Serpa	Transição: dioritos, gabros/rochas carbonatadas/granitos ⊙
Ser-C-1**	Serpa	Xistos e grauvaques ⊙
Mer-A-1	Mértola	Xistos, quartzitos e anfíbolitos ●
Mer-A-2		
Mer-A-3		
Mer-A-4		
Mer-B-1	Mértola	Xistos argilosos, grauvaques e arenitos ⊙
Mer-B-2		
Mer-C-1	Mértola	Xistos argilosos, grauvaques e arenitos ●
Mer-C-2		
Mer-D-1	Mértola	Xistos argilosos, grauvaques e arenitos ●
Mer-D-2		
Mer-E-1	Mértola	Xistos argilosos, grauvaques e arenitos ●
Mer-E-2		
Mer-E-3		
Mer-F-1	Mértola	Xistos argilosos, grauvaques e arenitos ●
Mer-F-2		
Nis-A-1	Nisa	Granitos ●
Nis-A-2		
Cra-A-1	Crato	Granitos ●
Cra-B-1	Crato	Granitos ●
Cra-B-2		
Alt-A-1	Alter do Chão	Transição: xistos e grauvaques / areias, arenitos e argilas do Plio-Plistocénico ●
Avi-A-1	Avis	Rochas eruptivas ●
Mor-A-1	Mora	Transição: xistos e grauvaques / areias, arenitos e argilas do Plio-Plistocénico ⊙
Mor-A-2		
Mor-A-3		
Mor-A-4		
Cal-A-1	Caldas da Rainha	Areias ⊙
Cal-A-2		
Cal-A-3		

*○, média; ⊙, acentuada; ●, severa; ** proveniente da coleção de estirpes da EFN.

(preparadas em meio manitol-levedura sem aditivos), incubados com agitação orbital (100 rpm) e, à exceção dos testes de temperatura, mantidos a 27 °C. O crescimento foi avaliado por medições da absorvência das culturas a 600 nm. Todos os testes foram efectuados pelo menos em duplicado.

Preparação de extracto de terra

O extracto de terra obteve-se por modificação do procedimento anteriormente descrito (Zuberer, 1994), tendo-se utilizado um solo argiloso da Quinta do Marquês, em Oeiras. Misturou-se a terra com igual peso de água destilada e autoclavou-se por 3 vezes durante 1 hora a 120 °C, em 3 dias consecutivos, deixando arrefecer à temperatura ambiente entre cada autoclavagem. O sobrenadante da mistura foi decantado as vezes necessárias até se obter uma fracção límpida (extracto de terra), desprezando-se as fracções contendo resíduos grosseiros.

Extracção de solutos intracelulares para análise por NMR

Os perfis de solutos compatíveis acumulados pelas estirpes durante o crescimento em condições de salinidade elevada foram analisados em amostras obtidas por extracção etanólica (Reed *et al.*, 1984). Prepararam-se culturas em meio manitol-levedura contendo 4% de cloreto de sódio, que se incubaram até atingirem fase plena de crescimento exponencial. As células foram colhidas por centrifugação, lavadas 2 vezes com uma solução de cloreto de sódio a 4% e ressuspensas em água destilada. Os solutos intracelulares foram extraídos por ebulição em etanol a 80%, durante 10 minutos; o processo foi repetido 2 vezes e os extractos combinados foram evaporados sob vácuo. O resíduo foi dissolvido numa mistura de clorofórmio e água destilada (1:2) e os compo-

entes lipídicos foram removidos por centrifugação. A fracção aquosa foi concentrada por liofilização e redissolvida em água deuterada.

Os extractos assim obtidos foram analisados por NMR de ^1H e ^{13}C , usando as condições experimentais descritas anteriormente (Lamosa *et al.*, 1998; Lahav *et al.*, 2002). Os solutos foram identificados pela posição das ressonâncias nos espectros. Para todas as estirpes testadas, foram feitas experiências de controlo em que se utilizaram, para extracção, células cultivadas em meio sem sal.

Análise de células intactas por NMR de ^{31}P *in vivo*

Para análise de células intactas por NMR de ^{31}P *in vivo*, utilizaram-se suspensões de células preparadas de fresco a partir de culturas no final da fase exponencial de crescimento. As células de 1 litro de cultura foram colhidas por centrifugação, lavadas com uma solução tampão (MOPS-NaOH 30 mM, MgCl_2 1mM, pH 7,25) e ressuspensas no mesmo tampão, de modo a perfazer um volume final de 4 ml, contendo cerca de 30 mg de proteína por ml. Após adição de 5% (v/v) de água deuterada, a suspensão celular foi transferida para um tubo de NMR de 10 mm, iniciando-se a aquisição sequencial de espectros de NMR de ^{31}P . Os espectros foram obtidos com uma sonda multinuclear de banda larga, num espectrómetro Bruker DRX-500, a 202,45 MHz (Fareira *et al.*, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Crescimento das estirpes isoladas em condições de stresse

Os crescimentos obtidos nos 2 níveis de temperatura mais elevada (40 °C e 45 °C) e

nos 5 níveis de salinidade (2%, 4%, 6%, 7% e 8% de cloreto de sódio, p/v) encontram-se resumidos no Quadro 2. Para além das 40 estirpes isoladas neste trabalho, os testes de crescimento incluíram ainda uma estirpe da colecção da EFN e duas outras estirpes, classificadas nas espécies *Sinorhizobium meliloti* e *S. medicae*, obtidas em colecções de referência.

Trinta e quatro estirpes apresentaram crescimento a 40 °C e 22 cresceram a 45 °C. A temperatura óptima de crescimento para a maioria dos rizóbios situa-se na gama compreendida entre 27 e 31 °C, sendo muitos incapazes de crescer a temperaturas superiores a 37 °C (Graham, 1992). *S. meliloti* pode crescer optimamente até 35 °C (Allen & Allen, 1950). Dado que a sobrevivência de rizóbio a altas temperaturas é favorecida em ambientes secos (Graham, 1992), o facto de algumas das estirpes isoladas neste trabalho apresentarem crescimento em meio líquido a uma temperatura tão elevada como 45 °C sugere um bom potencial para sobrevivência a temperaturas extremas no solo.

No que respeita à tolerância ao sal, observou-se marcada variabilidade entre as estirpes analisadas. Onze estirpes apresentaram crescimento em meio contendo 8% de cloreto de sódio, na presença de extracto de terra; esta concentração, equivalente a 1,4 M, é bastante superior aos níveis mais elevados descritos na literatura como sendo tolerados pelas espécies mais resistentes de *Sinorhizobium* ou de outros géneros de rizóbio (Graham, 1992; Zahran, 1999). Três estirpes (Mer-A-3, Nis-A-1 e Cra-A-1) cresceram sob o efeito conjunto de salinidade e de temperatura elevada (4% de cloreto de sódio, 45 °C). Em muitos casos, a inclusão de extracto de terra nos meios de crescimento aumentou consideravelmente a tolerância ao sal e à temperatura: várias estirpes só apresentaram crescimento na presença de cloreto de sódio ou a 45 °C quando os meios

continham extracto de terra como aditivo.

Apesar de muitas das estirpes apresentarem elevada tolerância ao cloreto de sódio, outras mostraram grande sensibilidade a concentrações relativamente baixas; é o caso da estirpe Cal-A-1, isolada de um local periodicamente alagado por água do mar, de onde se isolaram também duas outras estirpes, ambas tolerantes ao stresse salino. Para avaliar a origem do efeito inibitório do cloreto de sódio no crescimento das estirpes sensíveis, testou-se a adição de polietileno glicol 6000, um polímero neutro de elevada solubilidade em água e um agente osmótico metabolicamente inerte para rizóbio, ao meio de cultura, nas concentrações necessárias para causar níveis de redução da actividade da água idênticos aos induzidos pelos teores de cloreto de sódio usados neste estudo. Nas condições referidas, o polietileno glicol não exerceu efeitos no crescimento de qualquer das estirpes (resultados não apresentados), mostrando que a inibição associada ao cloreto de sódio se deve a efeitos iónicos e não osmóticos.

Apesar da grande variabilidade na tolerância ao sal e às altas temperaturas em estirpes com a mesma origem, os dados obtidos sugerem uma correlação positiva entre a capacidade de crescer em condições de stresse e a agressividade das condições ambientais nos locais de origem das estirpes.

Análise de solutos compatíveis

Com base nos resultados obtidos nos testes de crescimento, seleccionaram-se algumas das estirpes mais tolerantes ao sal. A análise de extractos etanólicos de culturas destas estirpes por NMR de ¹H e de ¹³C (Quadro 3) mostrou ocorrer acumulação, induzida pelo sal, do dipéptido N-acetilglutaminilglutamina amida (NAGGN), vários tipos de betainas, glutamato, prolina e trealose.

QUADRO 2 - Efeitos do sal, do extracto de terra e da temperatura de incubação na capacidade de crescimento de estirpes de rizóbio em meio de cultura líquido

	Aditivos do meio manitol-levedura / condições de incubação											
	2%	4%	6%	7%	0,2%	0,2%	4%	2%	4%	6%	8%	0,2%
NaCl	27°C	27°C	27°C	27°C	40°C	45°C	45°C	27°C	27°C	27°C	27°C	45°C
Temperatura	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	10%	10%	10%	10%	10%
Extracto de terra												
Estirpe												
Por-A-1	+	+	+	-	n.d.	+	n.d.	+	+	+	+	+
Por-A-2	+	+	+	-	+	+	n.d.	+	+	+	+	+
Mou-A-1	+	-	-	-	-	-	n.d.	+	+	-	-	-
Mou-A-2	+	-	-	-	-	-	n.d.	+	+	-	-	+
Mou-B-1	+	+	-	-	n.d.	+	n.d.	+	+	-	-	+
Mou-B-2	+	+	-	-	+	-	n.d.	+	+	-	-	+
Mou-B-3	+	+	+	-	+	-	n.d.	+	+	+	-	n.d.
Ser-A-1	+	-	-	-	-	-	n.d.	+	+	-	-	-
Ser-A-2	+	-	-	-	+	-	n.d.	+	-	-	-	-
Ser-A-3	+	-	-	-	+	+	n.d.	+	-	-	-	+
Ser-B-1	+	+	-	-	+	+	n.d.	+	+	-	-	+
Ser-C-1	+	+	+	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mer-A-1	+	+	-	-	+	-	n.d.	+	+	-	-	-
Mer-A-2	+	+	+	+	+	-	n.d.	+	+	+	+	-
Mer-A-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mer-A-4	+	+	-	-	+	-	n.d.	+	+	-	-	+
Mer-B-1	+	+	-	-	+	-	n.d.	+	+	-	-	-
Mer-B-2	+	+	-	-	+	-	n.d.	+	+	-	-	-
Mer-C-1	+	+	n.d.	+	+	-	-	+	+	+	-	-
Mer-C-2	+	+	+	-	+	-	n.d.	+	+	+	-	-
Mer-D-1	+	+	-	-	+	-	n.d.	+	+	-	-	-
Mer-D-2	+	-	-	-	+	-	n.d.	+	-	-	-	-
Mer-E-1	+	+	+	-	+	-	n.d.	+	+	+	-	-
Mer-E-2	+	+	+	-	+	-	n.d.	+	+	+	-	-
Mer-E-3	-	-	-	-	+	-	n.d.	+	-	-	-	+
Mer-F-1	+	+	+	+	+	+	n.d.	+	+	+	+	+
Mer-F-2	+	+	+	-	-	+	n.d.	+	+	+	+	+
Nis-A-1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Nis-A-2	+	+	+	-	+	+	n.d.	+	+	+	+	+
Cra-A-1	+	+	+	n.d.	+	+	+	+	+	+	+	+
Cra-B-1	+	+	-	-	+	+	n.d.	+	+	-	-	+
Cra-B-2	+	+	+	+	+	+	n.d.	+	+	+	+	+
Alt-A-1	+	+	+	-	+	+	n.d.	+	+	+	-	+
Avi-A-1	-	-	-	-	+	+	n.d.	+	-	-	-	+
Mor-A-1	+	-	-	-	+	+	n.d.	+	+	-	-	+
Mor-A-2	+	-	-	-	+	-	n.d.	-	-	-	-	-
Mor-A-3	-	-	-	-	+	+	n.d.	+	-	-	-	+
Mor-A-4	+	+	-	-	+	+	n.d.	+	-	-	-	+
Cal-A-1	+	-	-	-	+	+	n.d.	+	-	-	-	+
Cal-A-2	+	+	+	+	+	+	n.d.	+	-	+	-	+
Cal-A-3	+	+	+	+	+	+	n.d.	+	+	+	+	+
<i>S. meliloti</i> *	+	-	-	-	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. medicae</i> **	+	+	+	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

*Estirpe de colecção ATCC 30135; ** Estirpe de colecção LMG 18864; n.d., não determinado

Análise de solutos compatíveis

Com base nos resultados obtidos nos testes de crescimento, seleccionaram-se algumas das estirpes mais tolerantes ao sal. A análise de extractos etanólicos de culturas destas estirpes por NMR de ^1H e de ^{13}C (Quadro 3) mostrou ocorrer acumulação, induzida pelo sal, do dipéptido N-acetilglutaminilglutamina amida (NAGGN), vários tipos de betaínas, glutamato, prolina e trealose.

A acumulação intracelular de solutos compatíveis constitui um mecanismo muito comum de adaptação ao stresse osmótico em microrganismos. O aumento dos níveis citoplásmicos destes compostos orgânicos de baixa massa molecular, em resposta a alterações da osmolaridade externa, assegura a turgescência e o volume da célula, bem como a manutenção das funções vitais, protegendo a actividade de enzimas e outras macromoléculas intracelulares, sem interferir no normal metabolismo da célula (Da Costa *et al.*, 1998). Estes solutos podem ser sintetizados *de novo* no interior da célula, ou importados do meio externo. *S. meliloti* utiliza preferencialmente compostos osmoprotectores exógenos (Miller & Wood, 1996); estes

compostos podem estimular o crescimento em meios de alta osmolaridade ou ser transportados para o citoplasma onde, ou funcionam como solutos compatíveis, ou são convertidos em compostos com esta função. O perfil de solutos compatíveis acumulados em situações de stresse é, portanto, condicionado, entre outros factores, pela composição química do meio extracelular, ou seja, pelos nutrientes nele disponíveis. Por outro lado, a capacidade de transportar e/ou metabolizar um determinado composto osmoprotector presente em ambientes específicos, como por exemplo a rizosfera do hospedeiro simbiótico, pode constituir uma importante vantagem competitiva relativamente a outros microrganismos que sejam incapazes de o utilizar.

Todos os osmólitos detectados nas estirpes isoladas no presente trabalho por análise de extractos etanólicos foram já anteriormente descritos como solutos compatíveis em *S. meliloti* (Miller & Wood, 1996). A inclusão de extracto de terra nos meios de crescimento das culturas não levou à acumulação de novos tipos de solutos (resultados não apresentados). Observou-se, no entanto, alguma variabilidade nos perfis de compostos acumulados pelas várias estirpes na

QUADRO 3 - Solutos compatíveis detectados por NMR de ^1H e ^{13}C em extractos etanólicos de células de estirpes tolerantes ao sal, cultivadas em meio manitol-levedura contendo 4% de cloreto de sódio

Soluto	Mer-A-2	Mer-C-1	Mer-E-2	Mer-F-1	Nis-A-1	Cra-A-1	Cra-B-2	Cal-A-2
trealose/glucose	+	+	+	+	+	+	+	-
NAGGN*	+	+	+	+	+	+	+	-
Betaína I	+	+	+	+	+	+	+	+
Betaína II	-	-	+	+	+	-	-	-
Betaína III	-	-	+	+	+	-	-	-
Betaína IV	-	+	+	+	+	-	-	-
Betaína V	-	-	+	-	-	-	-	-
Glutamato	+	+	+	+	+	+	+	-
Prolina	+	+	+	+	+	+	+	-

*NAGGN, N-acetilglutaminilglutamina amida

presença de sal. Os dados actualmente disponíveis não permitem estabelecer qualquer relação entre padrões de solutos e características dos locais de origem das estirpes. O rastreio de mais estirpes tolerantes ao sal, no que respeita aos perfis de solutos compatíveis acumulados em diferentes condições de crescimento, poderá permitir uma avaliação mais sistemática dos efeitos de factores externos nas respostas de osmoprotecção destes organismos.

Acumulação e utilização de fosfato

Para o estudo da presença e mobilização de reservas intracelulares de fosfato inorgânico, seleccionou-se uma estirpe proveniente de um solo com baixo teor em fósforo e tolerante a condições de stresse osmótico (Ser-C-1), recorrendo-se à técnica

não invasiva de NMR de ^{31}P para análise de suspensões de células intactas. Os espectros obtidos *in vivo* revelaram a existência de níveis consideráveis de polifosfato intracelular (Figura 1). Para além da ressonância intensa devida aos grupos fosfato internos das cadeias de polifosfato, a -23 ppm, observam-se dois sinais de fosfato inorgânico (correspondentes ao fosfato citoplásmico e ao extracelular que, devido aos diferentes valores de pH de ambos os meios, apresentam sinais distintos), e ainda ressonâncias de compostos fosfodiésteres, fosfomonoésteres e nucleótidos da piridina. O facto de não se detectarem os sinais dos grupos fosfato terminais do polifosfato (que deveriam surgir a cerca de -5 ppm) sugere tratar-se de cadeias longas (Roberts, 1987).

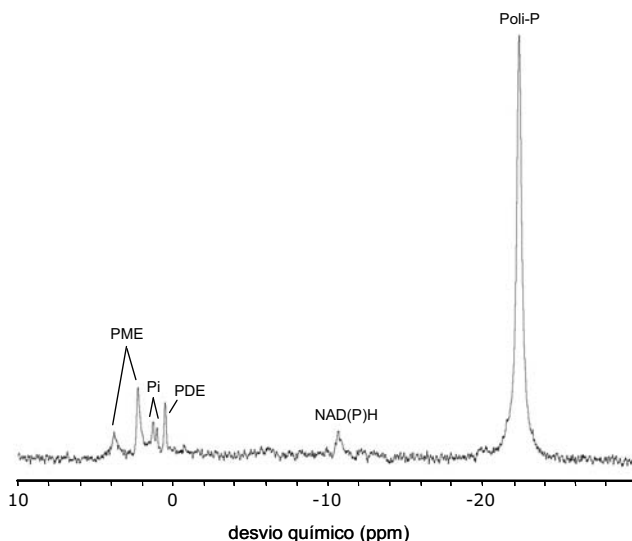


Figura 1 - Espectro de NMR de ^{31}P de uma suspensão de células da estirpe Ser-C-1 em tampão MOPS. Poli-P, resíduos de fosfato internos das cadeias de polifosfato; PME, compostos fosfomonoésteres; PDE, composto fosfodiéster; NAD(P)H, nucleótidos da piridina; Pi, fosfato inorgânico

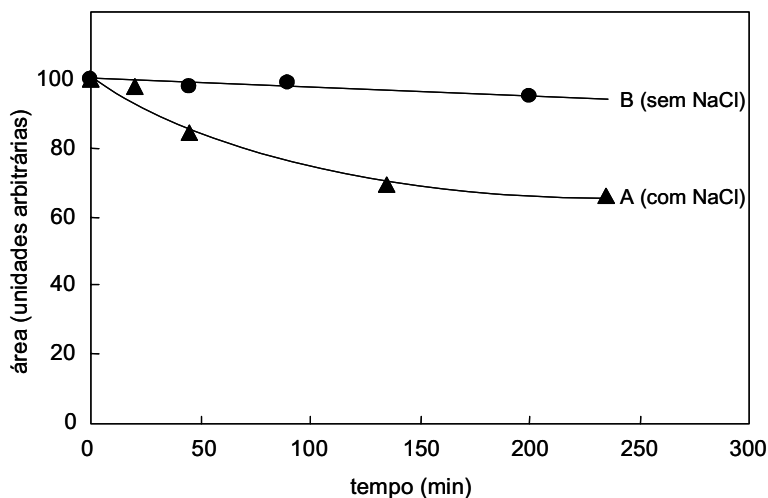


Figura 2 - Evolução ao longo do tempo da intensidade da ressonância de NMR de ^{31}P dos resíduos de fosfato internos das cadeias de polifosfato, em suspensões de células da estirpe Ser-C-1 em tampão MOPS, contendo 4,5 % de cloreto de sódio (A), ou sem aditivos (B)

A aquisição sequencial de espectros de uma suspensão de células desta estirpe em solução tampão de baixa osmolaridade não revelou evolução significativa da intensidade da ressonância dos resíduos internos das cadeias de polifosfato ao longo do tempo. Contudo, em tampão contendo 4% de cloreto de sódio, observou-se um decréscimo progressivo na intensidade deste sinal: decorridos 235 minutos de incubação nestas condições, a área integrada do sinal dos resíduos internos das cadeias de polifosfato correspondia a cerca de 65% da observada na experiência controle (Figura 2).

A acumulação de polifosfatos intracelulares foi anteriormente observada em rizóbio. Em estudos com *Bradyrhizobium japonicum*, verificou-se que células cultivadas em altas concentrações de fosfato apresentavam grânulos intracelulares de polifosfato, que desapareciam após redução da concentração de fosfato no meio (Cassman *et al.*, 1981). Os solos degradados são frequentemente deficientes em nutrientes essenciais como o

fósforo; nestes solos, a concentração de fosfato em solução está dependente da liberação do fosfato imobilizado na fase sólida. Mesmo em solos não deficientes, o fosfato dissolvido na rizosfera pode ser esgotado pelas raízes da planta e atingir concentrações da ordem de $0,1 \mu\text{M}$ ou inferiores, suficientemente baixas para afectar a maioria das estirpes de rizóbio (Bielecki, 1973). Por esta razão, a colonização da rizosfera de plantas leguminosas por rizóbios aplicados como inoculantes pode ser melhorada, usando estirpes com elevada capacidade de armazenamento de fosfato, que tinham sido cultivadas em meios com elevado teor de fosfato.

A estirpe estudada apresentou níveis significativamente elevados de polifosfato intracelular, após crescimento em meio rico em fosfato, comparativamente a outras estirpes isoladas no presente trabalho e analisadas nas mesmas condições (resultados não mostrados), sugerindo tratar-se de um microrganismo potencialmente interessante

para utilização como inoculante em solos com baixo teor em fósforo solúvel. A diminuição da intensidade do sinal dos polifosfatos em condições de stresse osmótico poderá ser o resultado da conversão em cadeias mais longas e imobilizadas, não totalmente detectáveis por NMR, como foi anteriormente sugerido para a alga *Dunaliella salina* (Bental *et al.*, 1991). Outra possibilidade, é a utilização dos polifosfatos como reserva de energia para situações de agressão ambiental, como foi observado em células de levedura (Roberts, 1987).

CONCLUSÕES

Muitos solos em risco de desertificação, são também ameaçados por uma possível salinização. Nos casos em que está prevista a utilização de leguminosas forrageiras ou de pastagens em locais afectados por este problema, torna-se necessário avaliar os efeitos da salinidade nas estirpes de rizóbio a introduzir, dado que, nestas condições, a produtividade agrícola vai depender da capacidade do sistema simbiótico rizóbio/leguminosa tolerar os aumentos da salinidade do solo. Embora a resistência a factores de stresse esteja muitas vezes associada à presença de genes manipuláveis, a sobrevivência saprofítica de bactérias no solo é um processo complexo que, além da tolerância a condições físicas desfavoráveis, implica a capacidade de crescer em ambientes com nutrientes limitados, em competição no seio de um microbiota fortemente adaptado às condições locais. Assim, é importante dispor de estirpes com características bem adaptadas ao local, quer para o estudo dos respectivos mecanismos de tolerância a factores desfavoráveis, quer como base genética manipulável para introdução de genes de resistência, com garantia de boa sobrevivência saprofítica.

Uma fracção muito significativa das estirpes de rizóbio isoladas neste trabalho a partir de solos degradados do sul do País, apresentou um elevado grau de tolerância ao sal e às altas temperaturas, parecendo potencialmente adequadas para utilização em pastagens de luzernas anuais em condições ambientais extremas de temperatura e salinização. A acumulação de níveis intracelulares elevados de polifosfato, observada numa das estirpes tolerantes ao sal, sugere a possibilidade de utilização em solos deficientes em fósforo assimilável, mesmo em condições de elevada salinidade.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi realizado no âmbito do projecto POCTI/AGG/46371/2002, aprovado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia e pelo POCTI e participado pelo fundo comunitário europeu FEDER. Os autores agradecem a Maria Delfina Cabrita Navalhas todo o auxílio nos trabalhos laboratoriais. Agradece-se à empresa "Fertiprado" a cedência de sementes de *Medicago polymorpha* cv. Santiago. Todas as análises por NMR foram realizadas no Instituto de Tecnologia Química e Biológica, em Oeiras, em colaboração com o grupo de NMR e Fisiologia Microbiana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, O.N. & Allen, E.K. 1950. Biochemical and symbiotic properties of the rhizobia. *Bacteriol. Rev.*, **14**: 273-330.
- Bental, M., Pick, U., Avron, M. & Degani, H. 1991. Polyphosphate metabolism in the alga *Dunaliella salina* studied by ³¹P-NMR. *Biochim. Biophys. Acta*, **1092**: 21-28.

- Bielecki, R. 1973. Phosphate pool, phosphate transport and phosphate availability. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **24**: 225-252.
- Cassman, K.G., Munns, D.N. & Beck, D.P. 1981. Phosphorus nutrition of *R. japonicum*: strain differences in phosphate storage and utilization. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **45**: 517-519.
- Da Costa, M.S., Santos, H. & Galinsky, E. A. 1998. An overview of the role and diversity of compatible solutes in *Bacteria* and *Archaea*. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, **61**: 117-153.
- Fareleira, P., Santos, B.S., António, C., Moradas-Ferreira, P., LeGall, J., Xavier, A.V. & Santos, H. 2003. Response of a strict anaerobe to oxygen: survival strategies in *Desulfovibrio gigas*. *Microbiology*, **149**: 1513-1522.
- Ferreira, E.M. & Marques, J.F. 1992. Selection of portuguese *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strains for production of legume inoculants. *Plant and Soil*, **147**: 151-158.
- Graham, P.H. 1992. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.*, **38**: 475-484.
- Lahav, R., Fareleira, P., Nejidat, A. & Abeliovich, A. 2002. The identification and characterization of osmotolerant yeast isolates from chemical wastewater evaporation ponds. *Microbial Ecology*, **43**: 388-396.
- Lamosa, P., Martins, L.O., Da Costa, M. S. & Santos, H. 1998. Effects of temperature, salinity and medium composition on compatible solute accumulation by *Thermococcus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 3591-3598.
- Miller, K.J. & Wood, J.M. 1996. Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **50**, 101-136.
- O'Hara, G., Yates, R. & Howieson, J. 2002. Selection of strains of root nodule bacteria to improve inoculant performance and increase legume productivity in stressful environments. In: D. Herridge (ed) *Inoculants and Nitrogen Fixation in Vietnam*, pp. 75-80. ACIAR Proceedings 109e.
- Reed, R.H., Richardson, D.L., Warr, S.R.C. & Stewart, W.D.P. 1984. Carbohydrate accumulation and osmotic stress in cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **130**: 1-4.
- Roberts, M.F. 1987. Polyphosphates. In: C. Tyler Burt (ed) *Phosphorus NMR in Biology*, Cap. 4, pp. 85-94. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA.
- Smith, R.S. 1992. Legume inoculant formulation and application. *Can. J. Microbiol.*, **38**: 485-492.
- Soares, A.M. 1983. *Carta Litológica de Portugal*. Atlas do Ambiente, Comissão Nacional do Ambiente, Lisboa.
- Vincent, J.M. 1970. *A manual for the practical study of root-nodule bacteria*. IBP Handbook nº15. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom.
- Wacek, T.J. & Brill, W.J. 1976. Simple, rapid assay for screening nitrogen-fixing ability in soybean. *Crop Science*, **16**: 519-523.
- Zahran, H.H. 1999. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**: 968-989.
- Zuberer, D.A. 1994. Recovery and enumeration of viable bacteria. In R. W. Weaver *et al.* (eds) *Methods of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties* – SSSA book Series, nº5, Soil Science Society of America, Madison, USA.