

## CURVA DE SOBREVIVÊNCIA À LUZ ULTRAVIOLETA DO *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* (BEIJERIWCK, 1925)

OLIVIA MARCIA NAGY ARANTES\*

### RESUMO

*Estudo do Azospirillum brasilense, bactéria fixadora de nitrogênio em gramíneas, com o objetivo de fornecer subsídios para estudos genéticos sobre o A. brasilense através da determinação da curva de sobrevivência do microrganismo à luz ultravioleta. Estabeleceu-se o tempo de exposição à radiação de 1 minuto e obteve-se uma taxa de sobreviventes, representando uma dose recomendável para a indução de mutações, desde que se expõe suficientemente o DNA da bactéria ao agente mutagênico, sem contudo reduzir drasticamente a população irradiada, o que tornaria muito baixa a frequência de mutantes após o tratamento.*

### 1. INTRODUÇÃO

A vida na terra depende da energia solar. Essa energia é assimilada na produção de substâncias orgânicas que estão diretamente ligadas à existência de organismos verdes que realizam a fotossíntese.

O crescimento desses organismos depende do aproveitamento de dióxido de carbono na fotossíntese, porém, outros elementos são também essenciais para esse desenvolvimento.

O elemento que é considerado fator limitante do desenvolvimento dos organismos fotossintéticos é o nitrogênio, que apesar de ser encontrado em grande proporção na atmosfera, somente alguns organismos são capazes de utilizá-lo na forma livre.

Nas últimas décadas os fertilizantes químicos nitrogenados têm sido largamente usados na agricultura, visando o aumento da produção. O emprego desses fertilizantes em grande escala é dispendioso para a economia de um país devido a vultosa quantidade de energia utilizada na sua preparação.

Em vista disso, o interesse na fixação de  $N_2$  por microrganismos vem aumentando por ser um processo menos oneroso e apresentar uma grande vantagem sobre os fertilizantes nitrogenados: não é poluente.

O isolamento e identificação da bactéria *Spirillum lipoferum* como fixadora de  $N_2$  em gramínea abriu

enormes perspectivas na área de fixação de nitrogênio por microrganismos (DOBEREINER & DAY<sup>(7)</sup>).

KRIEG & TARRAND<sup>(9)</sup> mostraram que sob o nome de *S. lipoferum* existiam duas espécies distintas: uma delas foi chamada *Azospirillum brasilense*.

Várias publicações têm relatado a eficiência de fixação de  $N_2$  em algumas espécies de gramíneas inoculadas com *A. brasilense* (SMITH et alii<sup>(11)</sup>; BARBER et alii<sup>(3)</sup>; ALBRECHT et alii<sup>(1)</sup>).

Alguns estudos genéticos sobre a fixação de nitrogênio foram feitos com outras espécies de bactérias fixadoras: a) mapeamento dos genes *nif* — genes responsáveis pela codificação da nitrogenase, enzima que cataliza a fixação biológica de  $N_2$  — (DIXON & POSTGATE<sup>(6)</sup>; STREICHER et alii<sup>(12)</sup>; KENNEDY<sup>(8)</sup>); b) transferência desses genes para bactérias não fixadoras que passavam a fixar  $N_2$  (CANNON et alii<sup>(4)</sup>; CANNON & POSTGATE<sup>(5)</sup>).

Os trabalhos genéticos com *A. brasilense* iniciaram-se há pouco, envolvendo estudos plasmidiais e obtenção de linhagens com mutações para resistência a drogas, destinadas a serem usadas como marcadores genéticos facilitando mapeamentos (LEMOS et alii<sup>(10)</sup>; ARANTES & AZEVEDO<sup>(2)</sup>).

O presente trabalho tem como objetivo obter a curva de sobrevivência do

*A. brasilense* à radiação ultravioleta para ajustar a metodologia de aplicação desse mutagênico na obtenção de linhagens melhoradas geneticamente.

### 2. MATERIAL E MÉTODO

Culturas de *A. brasilense* foram postas a crescer em 40 ml de nutriente líquido (NL) (DIFCO) durante 3 dias à 37°C.

A seguir cada cultura foi submetida a 3194g pelo tempo de 20 minutos.

O sobrenadante de cada tubo foi desprezado e o precipitado foi ressuspensão com 20 ml de solução salina.

Cada suspensão foi transferida para uma placa de Petri vazia e estéril e irradiada com luz ultravioleta durante o tempo de 1/4, 1/2, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 minutos.

Para cada tratamento foram feitas as diluições convenientes com água destilada e estéril, a seguir, semeados 0,1ml em placas contendo nutriente ágar. Para cada tempo de irradiação foram feitas três repetições. O material foi então incubado a 37°C por 48 horas, ao final dos quais procedeu-se a contagem das colônias formadas.

### 3. RESULTADOS

Os resultados das porcentagens de sobrevivência estão sumarizados na Tabela. A Figura mostra a curva de sobrevivência à luz ultravioleta.

\*Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas, Departamento de Biologia Geral - C.C.B., UEL.

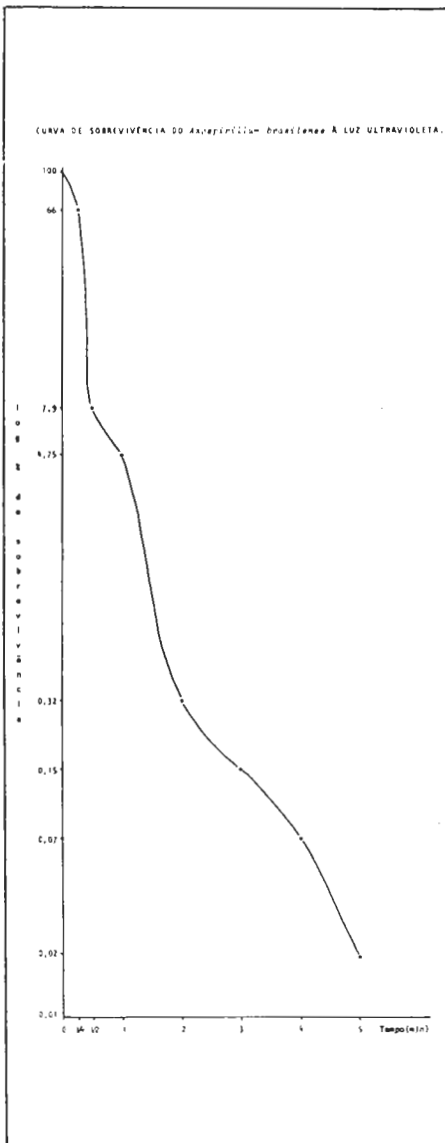


TABELA — Porcentagem relativa de bactérias sobreviventes ao tratamento com luz U.V.

TEMPO (MINUTOS)	N. MÉDIO COL/PLACA	DILUIÇÃO	TÍTULO BACT/ML	% RELATIVA SOBREVIVÊNCIA
sem radiação	12,0	10 <sup>-5</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>	100,00
1/4	8,0	10 <sup>-5</sup>	8,0 x 10 <sup>6</sup>	66,00
1/2	9,5	10 <sup>-4</sup>	9,5 x 10 <sup>5</sup>	7,90
1	57,6	10 <sup>-3</sup>	5,7 x 10 <sup>5</sup>	4,75
2	39,4	10 <sup>-2</sup>	3,9 x 10 <sup>4</sup>	0,32
3	18,2	10 <sup>-2</sup>	1,8 x 10 <sup>4</sup>	0,15
4	8,5	10 <sup>-2</sup>	8,5 x 10 <sup>3</sup>	0,07
5	23,0	10 <sup>-1</sup>	2,3 x 10 <sup>3</sup>	0,02

Com os dados da Tabela e da Figura fica evidente que se deve efetuar a irradiação com luz ultravioleta durante 1 minuto para se obter cerca de 5% de sobrevivência, porcentagem que é ideal para a obtenção de mutantes.

#### 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

É evidente que para tornar mais evidente o trabalho de melhoramento genético do *A. brasilense* visando a sua utilização como fixador de nitrogênio atmosférico, faz-se necessária a caracterização de um grande número de mutantes dessa bactéria.

Considerando que ARANTES & AZEVEDO<sup>(2)</sup> obtiveram mutantes resistentes a antibióticos, com relativa facilidade, é de se esperar que a luz ultravioleta possibilite o surgimento de outros tipos de mutantes em *A. brasilense*.

O conhecimento crescente do geno-

ma dessa espécie deverá acelerar a obtenção de melhor linhagem quanto à capacidade de fixar nitrogênio. Essas aquisições em perspectiva se revestem de grande interesse econômico desde que a aplicação de enormes quantidades de fertilizantes químicos no cultivo de gramíneas poderá ser substituída pela disseminação de linhagens melhoradas desse microrganismo no solo.

Um dos requisitos básicos para que seja viabilizada essa redução de custos na agricultura consiste no amplo conhecimento da genética dessa espécie de bactéria. Entendemos então que a curva de sobrevivência que ora estabelecemos, juntamente com a dose ideal de luz ultravioleta que determinamos, são subsídios de grande utilidade para empreendimentos futuros de obtenção de mutantes e consequente melhoramento genético das linhagens de *A. brasilense* fixadoras de nitrogênio.

#### ABSTRACT

*Study of Azospirillum brasilense, a bacterium that acts to fix nitrogen in gramineous plants, with the aim of aiding genetic studies concerned with A. brasilense by means of determining the survival curve for the microorganism exposed to ultraviolet light. A time span of one minute of exposure to radiation was established, and a 5% rate of survival was obtained, representing a recommendable dosage for the induction of mutations, provided that the DNA of the bacteria be sufficiently exposed to the mutagenic agent without, however, drastically reducing the irradiated population, as a radical reduction would cause the frequency of mutants after treatment to become very low.*

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBRECHT, S.L.; OKON, Y.; BURRIS, R.H. Effects of light and temperature on the association between *Zea mays* and *Spirillum lipoferum*. *Plant Physiology*, 60: 528-531, 1977.
- ARANTES, O.M.N. & AZEVEDO, J.L. de. Resistência a drogas em *Azospirillum brasilense*. *O solo*, 71: 35-39, 1979.
- BARBER, L.E.; TJEKEMA, J.D.; RUSSEL, S.A.; EVANS, H.J. Acetylene reduction (nitrogen fixation) associated with corn inoculated with *Spirillum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 32 (2): 108-113, 1976.
- CANNON, F.C.; KENNEDY, C.K.; POSTGATE, J.R.; DIXON, R.A. Construction of an F-prime factor carrying the *Klebsiella pneumoniae* nif genes: a genetic tool for analysis of the nif system. In: NEWTON, W.W. & NYMAN, C.J., ed. *Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Symposium on Nitrogen Fixation*. Washington, Washington State University Press, 1976. p.320-26.
- \_\_\_\_\_ & POSTGATE, J.R. Expression of *Klebsiella* nitrogen fixation genes (nif) in *Azotobacter*. *Nature*, 260: 271-273, 1976.

6. DIXON, R.A. & POSTGATE, J.R. Transfer of nitrogen fixation genes by conjugation in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature (Lond.)*, 234: 47-48, 1971.
7. DÖBEREINER, J. & DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: NEWTON, W.W. & NYMAN, c.J., ed. *Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Symposium on Nitrogen Fixation*. Washington, Washington State University Press, 1976. p. 518-38.
8. KENNEDY, C. Linkage map of the nitrogen fixation (*nif*) genes in *Klebsiella pneumoniae*. *Molecular General Genetics*, 157: 199-204, 1977.
9. KRIEG, N.R. & TARRAND, J.J. Taxonomy of the root-associated nitrogen-fixing bacterium. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE LIMITAÇÕES E POTENCIAL DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO NOS TRÓPICOS. Brasília-DF., 1977.
10. LEMOS, M.V.F.; SANTOS, D.S.; TRABULSI, L.R.; AZEVEDO, J.L. de. Possible role of plasmid deoxyribonucleic acid in nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON ASSOCIATION N<sub>2</sub> - FIXATION. West Palm Beach, C.R.C. Press, 1979.
11. SMITH, R.L.; BOUTON, J.H.; SCHANK, S.C.; QUESENBERY, M.E.; MILAN, J.R.; GASKINS, M. H.; LITTELL, R.C. Nitrogen fixation in grasses inoculated with *Spirillum lipoferum*. *Science*, 193: 1003-1005, 1976.
12. STREICHER, S.L.; GURNEY, E.; VALENTINE, R.C. Transduction of the nitrogen fixation genes in *Klebsiella pneumoniae*. *Proceeding of the National Academy of Science*, 68 (6): 1174-1177, 1971.
-