



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA  
SISTEMAS AGROSILVIPASTORIS NO SEMI-ÁRIDO**

**OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM GRAMÍNEAS  
FORRAGEIRAS NA MICRORREGIÃO DE PATOS - PB**

**Márcia Carneiro Monteiro dos Santos**

**PATOS - PB  
2009**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA  
SISTEMAS AGROSILVIPASTORIS NO SEMI-ÁRIDO**

**OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM GRAMÍNEAS  
FORRAGEIRAS NA MICRORREGIÃO DE PATOS - PB**

Dissertação apresentado à Universidade Federal de Campina Grande como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia área de concentração Sistemas Agrosilvipastoris no Semi-árido para obtenção do título de Mestre.

Márcia Carneiro Monteiro dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Olaf Andreas Bakke

Co-orientador: Prof. Dr. Diércules Rodrigues dos Santos

**PATOS - PB  
2009**

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO  
CAMPUS DE PATOS - UFCG

S237o  
2009

Santos, Márcia Carneiro Monteiro dos

Ocorrência de bactérias diazotróficas em gramíneas forrageiras na microrregião de Patos – PB. / Márcia Carneiro Monteiro dos Santos - Patos: CSTR/UFCG, 2009.

53 p.: il.

Inclui bibliografia.

Orientador: Olaf Andréas Bakke.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia – Sistemas Agrassilvopastoris no Semi - Árido). Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

1 – Microbiologia do Solo – Dissertação. 2. Plantas forrageiras. 3 - Nutrição de Plantas. I – Título.

CDU: 631. 461



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**PROVA DE DEFESA DO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO**

**TÍTULO: “Ocorrência de bactérias diazotróficas em gramíneas forrageiras na microrregião de Patos-PB”**


**AUTORA: Márcia Carneiro Monteiro dos Santos**


**ORIENTADOR: Prof. Dr. Olaf Andreas Bakke**

**JULGAMENTO**

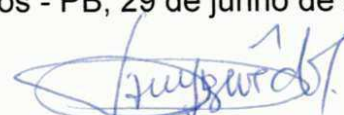
**CONCEITO: APROVADO**

  
Prof. Olaf Andreas Bakke  
Presidente

  
Profa. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos  
1º Examinadora

  
Profa. Ivonete Alves Bakke  
2º Examinadora

Patos - PB, 29 de junho de 2009

  
Prof. Aderbal Marcos de Azevêdo Silva  
Coordenador

## DEDICO

Ao meu Deus,

Aos meus pais, José Germano e

Laudicéia Monteiro (*in memoriam*).

Ao meu esposo Diércules.

Aos meus filhos Camila e Rodrigo.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela sua presença constante em minha vida, iluminando meu caminho, dando-me força, coragem e saúde para seguir em frente.

Ao Programa de Pós- Graduação em Zootecnia do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, pela oportunidade proporcionada para a realização deste curso.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida.

Aos professores do Programa de Pós- Graduação em Zootecnia, pelos conhecimentos compartilhados.

Ao Professor PhD. Olaf Andreas Bakke, pela amizade e orientação durante o curso.

Ao Professor Dr. Diércules Rodrigues dos Santos, pela amizade, co-orientação e paciência.

À Professora Dra. Ivonete Alves Bakke, pelo apoio, ensinamentos e amizade compartilhada durante o curso.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos e Dra. Ivonete Alves Bakke, pelas sugestões apresentadas.

Ao Professor Dr. Clebert José Alves, pela cessão do Laboratório de Microbiologia.

Aos funcionários deste centro, pelos serviços prestados, em especial Francinete, Natan, Ary e Aminthas.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Pernambuco, pelas análises realizadas.

A Antônio Tibério, pela valiosa ajuda.

Aos colegas do curso.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADA !**

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL .....	viii
ABSTRACT .....	ix
CAPÍTULO 1 .....	10
1 INTRODUÇÃO .....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	12
2.1 Bactérias diazotrófica do gênero <i>Azospirillum</i> .....	12
2.2 Distribuição ecológica .....	12
2.3 Aspectos morfológicos e fisiológicos .....	13
2.4 Modificações nas raízes causadas por bactérias diazotróficas endofíticas .....	14
2.5 Respostas das plantas à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas .....	15
2.5.1 Fixação biológica do nitrogênio atmosférico .....	15
2.5.2 Produção de fitormônios.....	18
2.6 Fatores que afetam os benefícios da inoculação .....	19
2.7 <i>Azospirillum</i> associadas à gramíneas forrageiras .....	20
3. REFERÊNCIAS .....	22
CAPÍTULO 2: Ocorrência de bactérias diazotróficas em gramíneas forrageiras na microregião do sertão paraibano .....	30
RESUMO .....	30
ABSTRACT .....	31
1. INTRODUÇÃO .....	32
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	33
2.1 Bactérias diazotróficas endofíticas .....	33
2.2 Fatores que influenciam as bactérias endofíticas .....	33
2.3 Identificação e avaliação do potencial para fixação do N <sub>2</sub> .....	34
2.4 Gramíneas forrageiras africanas .....	35
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	37
3.1 Área de estudo e espécies de gramíneas .....	37

3.2 Contagem e isolamento de bactérias diazotróficas .....	38
3.3 Avaliação da fixação do N <sub>2</sub> de bactérias endofíticas em cultura puras .....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
4.1 Número mais provável de bactérias diazotróficas endofíticas .....	41
4.2 Efeito do pré-tratamento no número de isolados bacterianos .....	43
4.3 Efeito sazonal no número de isolados bacterianos .....	44
4.4 Pré-caracterização morfológica dos isolados bacterianos .....	45
4.5 Avaliação da fixação do N <sub>2</sub> em culturas puras .....	47
5. CONCLUSÕES .....	50
6. REFERÊNCIAS .....	51



SANTOS, Márcia Carneiro Monteiro dos. **Ocorrência de bactérias diazotróficas em gramíneas forrageiras na microregião de Patos - PB.** Patos, PB: UFCG, 2009. 55 p. (Dissertação – Mestrado em Zootecnia – Sistemas Agrosilvipastoris no Semi -Árido)

## RESUMO GERAL

O nitrogênio (N) é um dos fatores mais limitantes para o crescimento das plantas em áreas semi-áridas. Bactérias diazotróficas podem suprir parte do N necessário às gramíneas, sem aumento dos custos de produção e com redução dos danos ambientais causados durante a produção e uso indiscriminado dos fertilizantes. Nas pastagens cultivadas na região semi-árida do Brasil predominam as gramíneas africanas devido à sua adaptação às condições edafoclimáticas estressantes em sua região de origem. Com o objetivo de obter informação acerca do potencial da associação dessas bactérias com gramíneas forrageiras utilizadas nas condições edafoclimáticas da região semiárida do nordeste do Brasil, e purificar isolados bacterianos associados a estas gramíneas nessa região com potencial para produção de inoculantes eficientes, conduziu-se um experimento no Laboratório de Microbiologia do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Patos (PB). Amostras de raízes de *Andropogon gayanus* Kunth (andropogon); *Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia (tanzânia) e *Cenchrus ciliaris* (buffel), cultivadas no setor de Agrostologia do Mestrado de Zootecnia do CSTR/ UFCG no Município de Patos (PB), foram coletadas no período chuvoso (março de 2008) e seco (agosto de 2008). As raízes usadas foram lavadas em água ou desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio. As bactérias foram isoladas em meio seletivo NFB (específico para *Azospirillum* spp.) e caracterizadas quanto a densidade e diversidade. Após purificação e caracterização morfológica, foram avaliadas quanto ao potencial para fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN), através da técnica da redução do acetileno. Obtiveram-se 72 isolados bacterianos, sendo 50 pré-selecionados *in-vitro* como os de maior potencial. As bactérias diazotróficas endofíticas apresentaram-se associadas às forrageiras andropogon, tanzânia e buffel. A densidade de bactérias diazotróficas endofíticas foi influenciada pelas variações sazonais e pelos pré-tratamentos. A maior ocorrência natural de bacterianos diazotróficos endofíticos nos capins andropogon, tanzânia e buffel cultivados na região semiárida foi observada no período seco. Os isolados bacterianos UFCG 22, 25, 26, 27 e 29 de andropogon, UFCG 31, 32,33, 34, 36, 37, 38 de tanzânia e UFCG 42, 45, 49 e 50 de buffel apresentaram-se promissores para fixação biológica de nitrogênio e devem ser considerados em estudos posteriores para nutrição mineral em N e crescimento de gramíneas forrageiras

**Palavras-chave:** Fixação biológica de N<sub>2</sub>; nutrição; *Azospirillum* spp.

SANTOS, Márcia Carneiro Monteiro dos. **Occurrence of diazotrophic bacteria in forage grasses in the microregion of Patos - PB**. Patos, PB: UFCG, 2009. 53 p. (Dissertation – Animal Husbandry M. Sc. Program – Agrosilvipastoral Systems in the Semiarid).

## MAIN ABSTRACT

Soil nitrogen (N) is one of the most limiting factors for plant growth in semiarid areas. Diazotrophic bacteria can supply part of N necessary to grass growth with no additional costs, while reduce the environmental toll involved in fertilizer production and use evil. African grasses prevail in cultivated pastures in the semi-arid area of Brazil due to their adaptation to the stressful edaphoclimatic conditions present in their native region. An experiment was carried out in the Laboratory of Microbiology at the Patos campus of the Federal University of Campina Grande with the objective to study the association between diazotrophic bacteria and forage grasses cultivated in the semiarid conditions of northeastern Brazil, as well as identify and purify isolates of bacteria with the potential to produce efficient inoculums for these grasses. Root samples of three forage grasses [*Andropogon gayanus* Kunth (andropogon), *Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzania (tanzânia) and *Cenchrus ciliaris* (buffel)] grown in the Agrostology Sector/Animal Husbandry Master Program facilities, in Patos-PB, were collected during the rainy (March of 2008) and dry (August of 2008) seasons. The sampled roots were washed in water or superficially disinfested with sodium hypochlorite. The bacteria were isolated in NFB selective media (specific for *Azospirillum* spp.) and characterized according to their density and diversity. After purification and morphological identification, their potential for atmospheric N biological fixation (NBF) was evaluated by means of the acetylene reduction technique. From the 72 observed strains, 50 were considered of higher potential for NBF after *in vivo* trials. The endophytic diazotrophic bacteria were observed associated to andropogon, tanzânia and buffel grasses. Seasonal variation and the pre-treatment of roots before isolation affected density. The largest densities bacterial isolated dizotróficos on andropogon, tanzânia e buffel were obtained in the dry period. Isolates UFCG 22, 25, 26, 27 and 29; UFCG 31, 32, 33, 34, 36, 37 and 38; and UFCG 42, 45, 49 and 50, associated, respectively, with adropogon, tanzânia and buffel grasses showed to be highly promising, and their potential to BNF, with the objective to save N-fertilizer in the growth of forage grasses, should be further studied.

Keywords: N<sub>2</sub> biological fixation; nutrition; *Azospirillum* spp.

## CAPITULO 1

### 1 INTRODUÇÃO

A pecuária é uma das atividades sócio-econômica mais importante da região sertaneja da Paraíba. A sua vegetação nativa, a Caatinga, é importante para a manutenção dessa atividade, pois fornece forragem, principalmente na época seca (BRASIL, 2008). Por outro lado, na época das chuvas e nas proximidades dos mananciais hídricos as pastagens cultivadas apresentam também grande importância para o sustento desses rebanhos na região.

Contudo, a produtividade dessas pastagens, é comprometida pelas características nutricionais desfavoráveis do solo, especialmente as limitações nos teores do nitrogênio (N). Além disso, a natureza caducifolia e o pequeno número de gramíneas forrageiras nativas com qualidade para suprir as necessidades nutricionais dos animais na Caatinga contribuem para a grande flutuação da disponibilidade de alimentos, especialmente nas épocas críticas (SILVA et al., 1987).

Entretanto, a adubação nitrogenada aplicada para suprir esta carência, geralmente em excesso, é prática bastante disseminada em pastagens de alta produtividade. Esta prática torna o adubo nitrogenado, o mais consumido no mundo e o que mais influencia no custo de produção de uma cultura, além de provocar danos ao ambiente.

A elevada dinâmica no solo apresentada pelo nitrogênio, o seu potencial poluidor e elevado custo de produção, fazem com que seja necessário criar alternativas viáveis que minimizem a aplicação de fertilizantes contendo esse nutriente e prolongem a sua disponibilidade no solo. A fixação biológica do nitrogênio (FBN) preenche os requisitos para construção de práticas agrícolas menos impactantes e acessíveis ao pequeno produtor.

A disponibilidade de nitrogênio em forma contínua a médio e longo prazos é possível através da associação de plantas com microrganismos procariontes, representados por uma grande variedade de bactérias, de vida livre ou simbioticamente (endofíticas), capazes de reduzir o N atmosférico ( $N_2$ ) à  $NH_3$ , e posteriormente na forma utilizada pelos vegetais (FARIA, 2002).

Vários estudos realizados com bactérias do gênero *Azospirillum* associadas a gramíneas forrageiras demonstram a importância desses microrganismos devido ao considerável aumento no

valor nutritivo das forragens. Isto se deve ao fato dessas bactérias fornecerem parte do nitrogênio requerido para o desenvolvimento da planta, através do processo denominado de fixação biológica de nitrogênio (FBN), além de outros benefícios não nutricionais.

Estes estudos demonstraram que essas bactérias com habilidade de colonizar o interior das plantas e de se localizar em nichos protegidos do oxigênio, mantendo no nível máximo o potencial da enzima nitrogenase para FBN, têm grande potencial de utilização como insumo biológico na agricultura, pecuária e reabilitação de áreas degradadas.

Várias bactérias capazes de reduzir  $N_2$  foram descritas no Brasil, sendo o gênero *Azospirillum* o mais estudado. Atualmente, este grupo engloba seis espécies de diazotróficas, dentre estas se destacam o *A. brasiliense*, *A. lipoferum* e *A. amazonense*, descritas como endófitas porque não são capazes de sobreviver por longos períodos no solo (BALDANI et al., 1997). Porém, o potencial de FBN desta associação endofítica pode ter sua eficiência aumentada através da seleção de estirpes de bactérias isoladas em condições edafoclimáticas peculiares aliadas às plantas hospedeiras compatíveis.

Para a maximização de sua contribuição, algumas estratégias são importantes para o sucesso na utilização e na aplicação da tecnologia de inoculação. Estas envolvem fatores ligados à eficiência da simbiose, e à implantação de práticas conservacionistas nos cultivos. Além da escolha da planta que apresente capacidade de formar uma associação eficiente, são necessários alguns cuidados prévios, que vão desde a obtenção de informações sobre a dinâmica destes microrganismos em seu habitat, ao isolamento e seleção de bactérias eficientes para a produção de inoculantes específicos.

O capim-buffel (*Cenchrus ciliaris*), capim tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia) e o capim adropogon (*Andropogon gayanus* Kunth) são gramíneas notáveis, adaptadas às condições edafoclimáticas da região semi-árida. Sabe-se que o valor nutritivo de uma planta forrageira é representado pela associação da composição bromatológica, da digestibilidade, além do consumo voluntário da forrageira, e que, geralmente, estas qualidades estão relacionadas às condições nutricionais da planta, principalmente do nitrogênio.

Este trabalho procura relatar as contribuições da FBN por bactérias diazotróficas associativas em gramíneas, ressaltando aspectos positivos da potencialização desta tecnologia para a construção de uma exploração agrícola sustentável.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Bactérias diazotrófica do gênero *Azospirillum*

As bactérias diazotróficas endofíticas, denominadas *Azospirillum*, são microrganismos heterotróficos capazes de fixar o nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) em condições micro-aeróbicas (ROPER e LADHA, 1995). Estes organismos podem crescer extensivamente na rizosfera de gramíneas (KENNEDY e TCHAN, 1992), podendo também ser encontrados na superfície ou crescendo endofiticamente nos espaços intercelulares das raízes, (BALDANI e DÖBEREINER, 1980).

O gênero *Azospirillum* foi definido por Tarrand et al.(1978) e hoje compreende seis espécies – *A. brasiliense* e *A. lipoferum* (TARRAND et al., 1978), *A. amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983), *A. halopraeferens* (REINHOLD et al., 1987), *A. irakense* (KHAMMAS et al., 1989) e *A. largomobile* (DEKHIL et al., 1997), caracterizadas com base na análise fenotípica e genotípica (homologia de DNA e na seqüencia da RNAr 16S).

As bactérias *A. lipoferum* e *A. brasiliense* têm sido isoladas de raízes e caule de plantas de arroz (LADHA et al., 1982), enquanto a *A. amazonense* pode ser isolada de raízes de milho (PEREIRA et al., 1988). Estudos quantitativos no Instituto Internacional de Pesquisa de Arroz (IRRI) estimam que o *Azospirillum* constitui mais de 1% do total dos aeróbicos heterotróficos existentes em solos cultivados com arroz, e que acima de 85% do *Azospirillum* isolado foi o *A. lipoferum*, sugerindo sua preferência pela colonização de plantas de arroz (LADHA et al., 1987).

Encontra-se, também, *A. brasiliense* e *A. lipoferum* em raízes, caules e folhas de cana de açúcar, e a *A. amazonense* se restringe às raízes e caule, sendo estas bactérias endofíticas facultativas (REIS et al., 2001).

### 2.2 Distribuição ecológica

A distribuição ecológica do *Azospirillum* é extremamente ampla e variada (DÖBEREINER e PEDROSA, 1987). Bactérias deste gênero têm sido encontradas na rizosfera de plantas mono e dicotiledôneas (BASHAN e HOLGUIN, 1997). As espécies *A. lipoferum* e *A.*

*brasiliense* são as mais freqüentemente encontradas colonizando a maioria das plantas de regiões tropicais e temperadas, mas, já foram isoladas em gramíneas de locais gelados como o Ártico (NOSKO et al., 1994)

O desenvolvimento do meio de cultivo semi-sólido NFb, sem nitrogênio, foi o principal avanço que propiciou o descobrimento das espécies de bactérias do gênero *Azospirillum* e de outras bactérias diazotróficas endofíticas. Essas bactérias, pela característica de sensibilidade ao oxigênio, se deslocaram para regiões do meio onde a taxa de difusão de oxigênio está em equilíbrio com sua respiração (DÖBEREINER et al., 1995), permitindo, assim, a expressão e a atividade da enzima nitrogenase. Com base neste princípio, e variando somente a fonte de carbono e o pH, desenvolveram-se outros meios de cultivo semi-sólidos, tais como JNFb, LGI, LGI, LGIP e JMB (DÖBEREINER et al., 1995), os quais permitem isolar e identificar a maioria das espécies de *Azospirillum* e outros gêneros, como: *Glucanacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*.

A maioria dos isolados de *Azospirillum* tem sido obtido de plantas de maior interesse agrônômico, como milho, arroz, sorgo e trigo (BALDANI et al., 1997). Mais recentemente, a espécie *A. lipoferum* foi isolada de raízes de cevada na região Sul do Brasil (DIDONET e DIDONET, 1998). Esta espécie também é abundante em raízes e folhas da forrageira *Miscanthus sinensis* cv. Giganteus cultivada na Alemanha (KIRCHHOF et al., 1997) e na seiva de milho crescido no campo (MARRIEL e CARDOSO, 1998). A espécie *A. amazonense*, inicialmente isolada de gramíneas forrageiras e da palmeira *Bactrix frassipus* (MAGALHÃES et al., 1983), apresenta uma distribuição ampla, incluindo os cereais milho e sorgo (BALDANI, 1984) e cana-de-açúcar (raízes, caules e folhas) e, juntamente com *A. lipoferum* e *A. brasiliense*, é detectada em grande número nessas gramíneas (BALDANI et al., 1997). Apesar de sua ampla ocorrência, o isolamento de *A. amazonense* tem se restringido a algumas regiões do Brasil. As demais espécies do gênero possuem distribuição ecológica muito menos restrita.

### **2.3 Aspectos morfológicos e fisiológicos**

Algumas características fisiológicas possibilitam distinguir as seis espécies de *Azospirillum* e têm sido usadas como base para os estudos de isolamento e pré-identificação nos

laboratórios. Como por exemplo, largura das células, desenvolvimento de células pleomórficas em meio alcalino, características de crescimento em meio com 3% NaCl, grau de necessidade de biotina, capacidade de hidrolisar a pectina, presença de genes de biossíntese de AIA, temperatura ótima de crescimento, faixa de pH para o crescimento tipo de fontes de carbono usadas (glicose, manitol e sacarose) (BALDANI et al., 1999). Tanto as espécies *A. lipoferum* como *A. brasiliense* utilizam malato como fonte de carbono, mas apenas a primeira consegue utilizar glicose, necessita de biotina como fator de crescimento e forma células pleomórficas em meio alcalino (BALDANI, et al., 1997). Ambas também têm habilidade de produzir fitormônio AIA. Os genes para biossíntese desse fitormônio, foram encontrados também em *A. amazonense*, mas não em *A. irakense* e *A. halopraeferens* (VANDE BROEK e VANDERLEYDEN, 1995).

#### **2.4 Modificações nas raízes causadas por bactérias diazotróficas endofíticas**

As raízes das plantas podem apresentar modificações em resposta a um estímulo ambiental, incluindo gravidade, luz, contato e invasão por microrganismos. As alterações freqüentemente levam às mudanças no crescimento, com respostas que requerem a percepção de um sinal externo, tradução do sinal, alteração no gene regulatório e, ou atividade protéica, bem como modificações no programa de divisão, expansão e diferenciação celular. Assim, os genes envolvidos nesse processo podem codificar produtos que afetam o crescimento da ponta do pêlo, tal como o fluxo de cálcio (AESCHBACHER et al., 1994).

O seu possível papel no crescimento dos pêlos radiculares, sugere que as bactérias diazotróficas modificam a expressão dos genes que codificam esta característica, em função de mudanças no nível de fitormônios (JAIN e PATRIQUIN, 1985; BASHAN e LEVANONY, 1990), mudanças na absorção de nutrientes minerais ou aumento da extrusão de prótons (BASHAN, 1990). As modificações na morfologia da raiz e dos pêlos radiculares têm sido mais estudadas em plantas inoculadas com *Rhizobium* (ERVIN e HUBBELL, 1985). Vários autores constataram o aumento da densidade de pêlos radiculares, da taxa de aparecimento de raízes secundárias e da superfície radicular quando as plantas são colonizadas por essas bactérias. Tal incremento resulta em aumento da absorção de água e nutrientes, elevando a capacidade da planta

de produzir e suportar estresses ambientais (BALDANI et al., 1983; KAPULNIK et al., 1985, 1987).

Bactérias diazotróficas associativas e endofíticas podem desenvolver mudanças no crescimento das raízes, tais como modificações no crescimento, morfologia e densidade de pelos radiculares. Patriquin et al., (1983) observaram efeito específico de estirpes de *Azospirillum* na ramificação do pêlo radicular de trigo, semelhante ao causado por estirpe de *Rhizobium* em leguminosas (PATRIQUIN et al., 1983). Estas ramificações foram atribuídas à presença do ácido indolacético produzido por *Azospirillum* (JAIN e PATRIQUIN, 1985), e podem melhorar o desempenho funcional da raiz com melhoria nutricional da planta hospedeira.

Goi et al.(1998), em estudo envolvendo os processos de infecção e colonização de bactérias diazotróficas endofíticas e seu efeito na distribuição e densidade de pêlos radiculares em raízes de plântulas de cana-de-açúcar mostraram variações nesses parâmetros nas diferentes zonas da raiz.

Ainda não está claro em que extensão a formação dos pêlos radiculares depende de fatores genéticos e, ou ambientais, ou mesmo da produção de substâncias promotoras de crescimento que são produzidas pela maioria das bactérias diazotróficas endofíticas.

## **2.5 Respostas das plantas à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas**

### **2.5.1 Fixação biológica do nitrogênio atmosférico**

A fixação biológica do nitrogênio por organismos de vida livre ocorre em solos por diversos procariontes aeróbicos (*Azotobacter*, *Beijerinckia*) ou microaerofílicos (*Azospirillum*), bem como em habitat marinho e em água doce, principalmente por heterocistos de cianobactérias. Em todos esses casos a conversão do nitrogênio molecular para amônio é realizada pela ação do complexo nitrogenase e oxigênio molecular (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000; TSAGOU ET AL., 2003).

Recentemente, muitos estudos têm sido relacionados com a fisiologia, ecologia e potencial do uso de bactérias de vida livre e associativas fixadoras de nitrogênio na agricultura e biotecnologia ambiental, especialmente de bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum*



(FRITZSCHE e NIEMMAN, 1990; KEFALOGIANNI e AGGELIS, 2002; TRIPATHI et al., 2002; TSAGOU et al., 2003; BAHAT-SAMET et al., 2004; BASHAN et al., 2004). As populações dessas bactérias são encontradas em ecossistemas naturais, especialmente na rizosfera de certos cereais e outras plantas (DÖBEREINER e DAY, 1976; BASHAN e HOLGUIN, 1997)

Cerca de 5% das bactérias procarióticas carregam os genes responsáveis pelo processo de fixação biológica do nitrogênio (RAYMOND et al., 2004), sendo esses processos distribuídos nos cromossomos ou nos plasmídeos.

Bactérias diazotróficas facultativas, como *Azospirillum* spp., e obrigatórias, como *Hebaspirillum* spp. e *Bulrkholderia* spp., são capazes de crescer no interior de plantas de arroz e de transferir o nitrogênio fixado diretamente para as plantas hospedeiras com muito mais eficiência que as bactérias diazotróficas rizosféricas (BALDANI, et al., 1986). Boddey et al. (1986) observaram que o trigo apresentou alta capacidade de assimilar o nitrato quando inoculada com a estirpe de *Azospirillum* BR11005.

Murty e Ladha (1988) observaram que a inoculação de *Azospirillum* também aumentou o P e o N em plantas de arroz, mas não diferenciaram se esse aumento foi resultante de uma melhor mobilização desses nutrientes ou um efeito secundário do melhor crescimento da raiz da plantas.

São relatados, porém, alguns problemas nesse processo. Por exemplo, a transferência de N fixado para a planta ocorre de forma muito lenta e apenas parte do N fixado se torna disponível para a planta (RAO et al., 1987). Alguns autores consideram que esse problema pode ser minimizado pelo uso de *Azospirillum* mutantes excretoras de  $\text{NH}^4$  (MACHADO et al., 1991).

Panwar e Singh (2000) observaram em estudos de campo que rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) podem aumentar o teor de N e P nos tecidos das plantas, e atribuíram o fato a um maior crescimento das raízes, estimulado provavelmente pelos microrganismos. O efeito da inoculação com *Azospirillum* na produção de trigo em casa de vegetação e em condições de campo foi igualmente descrito por GANGULY et al., 1999.

Durante a última década, tem-se perguntado muito sobre os benefícios da inoculação com as bactérias *Azospirillum* fixadoras de nitrogênio. Para Okon e Labandera-Gonzalez (1994) a inoculação de *A. brasiliense* pode incrementar em mais de 30% a produção de grãos de trigo e outros componentes da produção em condições de campo, mas apenas com baixas doses de fertilizantes nitrogenados (50 - 60 kg ha<sup>-1</sup>). Dobbelaere et al., (2001) não observaram efeito no

incremento de produção de trigo inoculado em altas doses de N (100-170 kg ha<sup>-1</sup>). Contudo, isto implica na boa perspectiva de redução da quantidade de fertilizantes nitrogenados aplicados durante a manutenção da produção do trigo, quando inoculado com *Azospirillum*.

Embora esteja comprovado que o *Azospirillum* possa promover o aumento no desenvolvimento da planta e produção de grãos no trigo, aparentemente atribui-se estas respostas a uma pequena quantidade de N resultante diretamente da FBN (SAUBIDET e BARNEIX, 1998). Essa contribuição, proveniente da FBN foi quantificada pela técnica do N<sup>15</sup>, onde se verificou que o *A. brasiliense* e *A. lipoferum* aumentaram, respectivamente, em 7 e 10% o N em plantas de trigo (MALIK et al., 2001). Esta contribuição muitas vezes é um componente crítico para se obter uma grande produção com baixa aplicação de N.

As diferenças entre as respostas às estirpes de *Azospirillum* e suas habilidades para promover o crescimento de trigo em experimento de casa de vegetação são bastante documentados e, geralmente, são atribuídas à interação genótipo x estirpe (BALDANI et al., 1999).

A aplicação de *Azospirillum* no solo pode significar um aumento de 9 e 5 t ha<sup>-1</sup> na produção de cana-de-açúcar em plantas e ressoca em condições de campo, respectivamente. A inoculação de *Azospirillum* também aumentou significativamente o nível de N contido na cana-de-açúcar em condições de casa de vegetação (SHANKARIAH e HUNSIGI, 2001).

No Brasil, mesmo em solo com alta população de *Azospirillum*, foram observadas respostas positivas de plantas de milho, sorgo, arroz e trigo à inoculação com esta bactéria diazotrófica. Estes aumentos de produção foram atribuídos a uma maior assimilação do N aplicado em baixas doses e não diretamente à FBN (DOBEREINER et al., 1995; MENDONÇA, et al., 2006).

Fazendo-se um balanço dos resultados de experimentos de inoculação com *Azospirillum*, verifica-se a grande variabilidade (entre 20 e 30%) dos resultados em cultivos, principalmente em trigo, arroz, milho e sorgo. Poucos estudos são dedicados às gramíneas forrageiras, especialmente quando se busca resultados práticos de resposta à inoculação.

### 2.5.2 Produção de fitormônios

As bactérias diazotróficas endofíticas podem desempenhar importante papel na reabilitação e sustentabilidade dos ecossistemas, uma vez que podem incorporar de 25 a 50 kg de N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> por meio da fixação biológica, e produziram substâncias reguladoras do crescimento vegetal, como auxinas, giberilinas e citoquininas, as quais contribuem para melhorar a nutrição mineral e utilização de água pelas plantas (BAZZICALUPO e OKUN, 2000).

As auxinas estão entre as substâncias de crescimento produzidas por *Azospirillum* e outros gêneros de bactérias do solo, das quais o ácido indolacético (AIA) é a mais ativa e melhor caracterizada (CROZIER et al., 1988; KUSS et al., 2007). O AIA é conhecido por produzir respostas rápidas (aumento da alongação celular) e lentas (divisão e diferenciação celular) na planta infectada (DOBBELAERE et al., 2001).

*Azospirillum* são bactérias que habitam e exercem efeitos positivos às raízes da plantas, por isso são denominadas rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCP). Os efeitos positivos desses organismos podem ocorrer por influência direta (aumento da solubilização e entrada de nutrientes ou, como já foi mencionado, produção de reguladores de crescimento vegetal) ou indiretos (supressão de patógeno, por produção de sideróforos ou antibióticos) (ASGHAR et al., 2002).

As substâncias de crescimento produzidas pelas plântulas em resposta à colonização radicular pela bactéria diazotrófica têm sido consideradas como uma alternativa para o aumento da produção de massa seca em plantas inoculadas com *Azospirillum* (FALLIK et al., 1988). Desta maneira, os efeitos proporcionados pelas bactérias diazotróficas às plantas podem aumentar a produtividade das espécies forrageiras.

A produção de fitormônios por bactérias é considerado um dos fatores responsáveis pelo efeito estimulatório observado no crescimento de plantas inoculadas com estirpes eficientes de *Azospirillum* (CROZIER et al., 1988). Efeito estimulatório no crescimento de plantas de milho e arroz, como no caso da inoculação de estirpes de *Azospirillum* foi observado por Radwan et al., (2004).

Okon e Labandera-Gonzalez, (1994) avaliaram o potencial da inoculação de estirpes deste gênero em promover crescimento de plantas em diferentes solos e condições climatológicas e obtiveram respostas positivas significativas entre 5 - 30% de incremento.

## 2.6 Fatores que afetam os benefícios da inoculação

No ecossistema solo a sobrevivência e crescimento de populações de fixadores de nitrogênio de vida livre e /ou associativas no solo, podem ser afetados por condições químicas e físicas do solo, incluindo a concentração de componentes orgânicos naturais excretados pelas raízes de plantas, bem como a interação natural com outras populações de microrganismos e predadores do solo (SOLÉ et al., 1992; ROBERTS e STONE, 2004; BASTOLLA et al., 2005).

Por outro lado, a escolha de estirpes e seu estágio fisiológico, e a afinidade entre a estirpe e a cultivar (PATRIQUIN et al., 1983), o genótipo da planta (GARCIA DE SALOMONE et al., 1996) ou a espécie de planta (BALDANI e DÖBEREINER, 1980; WANI, 1990), podem melhorar os benefícios causados por bactérias diazotróficas endofíticas (REIS et al., 2000).

Estudos prévios de seleção de estirpes mostram que o uso de estirpes homólogas pode promover aumento de produção, porém esse conceito não tem sido aplicado com muita frequência nos trabalhos de inoculação de gramíneas em campo. Baldani et al., (1983 e 1987) comprovaram que a superioridade de estirpes de *A. brasiliense* (Sp245) inoculadas em trigo estava relacionada com uma seleção inicial e com o uso de estirpes homólogas.

O estágio fisiológico da bactéria também pode influenciar a sobrevivência do inóculo. Em estudo para avaliar a forma de melhorar a sobrevivência de bactérias do gênero *Azospirillum*, foi observado que elas são capazes de acumular poli- $\beta$ -hidroxiburirato (PHB), um material de reserva que lhe permite resistir em condições de estresse ambiental (TAL e OKON, 1985).

A competitividade com outras estirpes ou componentes da microbiota do solo pode inibir a colonização radicular por bactérias do gênero *Azospirillum* (DÖBEREINER e PEDROSA, 1987).

Embora a adição de nitrogênio amoniacal no meio de crescimento acentue o crescimento de *Azospirillum* sob condições aeróbicas (OKON et al., 1976), geralmente o crescimento bacteriano é inibido pela presença de altas doses de amônio e baixa concentração de oxigênio

dissolvido (TSAGOU et al., 2003; BASHAN et al., 2004). Entretanto, sob condições micro-aeróbicas, bactérias do gênero *Azospirillum* podem crescer em baixas concentrações de amônia, obtendo energia pela fixação do N<sub>2</sub> (FRITZSCHE e NIEMMAN, 1990; KEFALOGIANNI e AGGELIS, 2002).

Baldani et al. (1987), obtiveram um incremento de 28% na produção de grão de trigo com relação à testemunha (100 kg ha<sup>-1</sup> de N) quando inoculada com *A. brasiliense* (Sp245) em plantas suplementadas com 15 kg ha<sup>-1</sup> de N). Esta resposta foi atribuída ao melhor desenvolvimento do sistema radicular da planta. Didonet et al., (1996) não obtiveram diferença entre tratamentos idênticos ao estudo anterior e ao controle (45 kg ha<sup>-1</sup> de N), mostrando que as nuances dessa associação não estão totalmente elucidadas.

## **2.7 *Azospirillum* associadas a gramíneas forrageiras**

Em agroecossistemas pastoris, a FBN associada às plantas forrageiras é uma etapa importante no ciclo do N, visto que bactérias diazotróficas podem contribuir no suprimento de parte do N necessário às plantas (CHALK, 1991). As bactérias diazotróficas dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Bulkholderia* podem ser encontradas na ectorrizosfera e na endorrizosfera de gramíneas e outras famílias de plantas em diversos ecossistemas, as quais podem ser as responsáveis pela entrada de N nos agroecossistemas do semi-árido.

Em estudo para se estimar a população de *Azospirillum* spp. associada às espécies forrageiras *Elyonurus muticus* e *Axonopus pupusii*, nativas do Pantanal Matogrossense, e a *Brachiaria humidicola*, verificou-se menor número de bactérias em pastagens de *B. humidicola* do que em *E. muticus*, *A. pupusii*, demonstrando maior sensibilidade da associação entre a bactéria e a gramínea exótica nas condições edafoclimáticas locais. O maior número de bactérias foi maior nas raízes do que no solo (BRASIL, et. al., 2005). É provável que o potencial da FBN desta associação endofítica pode ser maximizado através da seleção de cultivares, assim como de bactérias mais eficientes na transferência do nitrogênio fixado para as gramíneas.

As primeiras medições da fixação biológica de N<sub>2</sub> foram realizadas usando-se a técnica do N<sup>15</sup>, sendo estimada uma fixação em torno de 40 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>, com *Paspalum notatum*,

suficiente para mantê-la verde o ano inteiro, sem adição de fertilizante nitrogenado (DE-POLLI et al., 1977), sendo a *Azotobacter paspali* considerada a bactéria responsável pela fixação.

Trabalhos da década de 60 a 80 evidenciaram a considerável contribuição da FBN para a nutrição nitrogenada de algumas gramíneas, sendo demonstrado que *Paspalum notatum* c.v. batatais obteve 10% (20 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>) (BODDEY et al., 1983) e *Brachiaria humidicola* e *B. decumbens* de 30 a 40% (30 - 45 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>) (BODDEY e VICTORIA 1986) do N requerido por estas espécies através da FBN. Estudos mais recentes usando fertilizantes nitrogenados contendo N<sup>15</sup>, demonstraram que o N<sub>2</sub> fixado representa de 20 a 40 % do total de N incorporado em algumas espécies de *Brachiaria* e capim colônia (*Panicum maximum*) (SIQUIRA e FRANCO, 1988).

Na década de 90, praticamente não houve estudos para avaliar a contribuição da FBN em gramíneas forrageiras. As pesquisas sobre FBN vêm trazendo novas perspectivas para o incremento a produtividade das pastagens, reduzindo a necessidade de uso de fertilizantes nitrogenados, e com isso minimizando os possíveis problemas ambientais provenientes pela aplicação desses compostos.

Entre as espécies de bactérias diazotróficas associadas à essas plantas, *Azospirillum amazonense* merece destaque, pois apresenta alta incidência em associação com *Brachiaria* spp. (REIS et al., 2001) e adaptabilidade a pH ácido (BALDANI et al., 1997), característica comum à maioria dos solos brasileiros.

Como a diversidade de bactérias associativas fixadoras de N pode, geralmente, estar condicionada à vegetação, é possível que diferentes genótipos de *Braquiaria* spp. possam exercer efeitos seletivos sobre as populações desses microrganismos, o que poderia resultar em diferentes respostas quando à contribuição da FBN obtida pelas plantas (REIS et al., 2006).

Assim, tanto a aquisição de nutrientes, principalmente N, como o aumento da disponibilidade de substâncias de crescimento, podem ser favorecidos pela inoculação de estirpes de bactérias diazotróficas eficientes durante a formação das pastagens. Estas estirpes podem tornar-se de grande importância ecológica e econômica em programas de exploração agropecuária para a região semi-árida.

### 3 REFERÊNCIAS

- AESCHBACHER, R.A.; SCHIEFELBEIN, J.W.; BENFEY, P.N. The genetic and molecular basis of root development. **Annals Review Physiology Plant Molecular Biology**, 45:25-45, 1994.
- ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A.; SRSHARD, M.; KHARLIQ. A. Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, p. 231-237, 2002.
- BAHAT-SAMET, E.; CASTRO-SOWINSKI, S.; OKON, Y. Arabinose content of extracellular polysaccharide plays a role in cell aggregation of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 237, p. 195–203, 2004.
- BALDANI VLD, DÖBEREINER J Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum spp.* **Soil Biology and Biochemistry**, v. 12, p. 433–439, 1980.
- BALDANI, J.I. **Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com as outras espécies deste gênero, em raízes de milho, sorgo e arroz.** 110, p.1984, (Dissertação-Mestrado), Rio de Janeiro: UFRRJ, Itaguaí, 1984.
- BALDANI, J.I., CARUSO, L., BALDANI, V.L.D., GOI, S.R., DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, 911–922, 1997.
- BALDANI, J.L.; AZEVEDO, M.S.; REIS, V.M.; TEXEIRA, K.R.S.; OLIVARES, F.L.; GOI, S.R.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; CARVALHO, J.G. eds. **Inter-relações fertilidade, biologia e nutrição de plantas.** Viçosa, SBCS/UFLA/DCS, 1999. p. 621-666.
- BALDANI, V.L.D., ALVAREZ, M.A., BALDANI, J.I., DOBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum spp.* in the rhizosphere and roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, v. 90, 35–46, 1986.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p.924-929, 1983.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum spp.* in Brazil. **Biology Fertility of Soils**, v.4, p.37-40, 1987.

BASHAN, Y. Short exposure to *Azospirillum brasilense* Cd inoculation enhanced proton efflux in intact wheat roots. **Canadian Journal of Botany**, 36: 419-425, 1990.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: enviomental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 103-121, 1997.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**. v. 50, p. 521-577, 2004.

BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal Microbiology**, v. 36, p. 591-608, 1990.

BASTOLLA, U.; LASSIG, M.; MANRUBIA, S.C.; VALLERIANI, A. Biodiversity in model ecosystems. Part I. Coexistence conditions for competing species. **Journal Theor. Biology**, v. 235, p. 521-530, 2005.

BAZZICALUPO, M.; OKON, Y. Associative and endophytic symbiosis. In: PEDROSA, F.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E., eds. **Nitrogen Fixation: from moleculaes to crop productivity**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 409-413.

BODDEY, R.M., and DÖBEREINER, J. The acetylene redution technique. Rio de Janeiro. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. INTENSIVE COURSE ON BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION. 1982.

BODDEY, R.M.; BALDANI, V.L.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen acumulation by field grown wheat. **Plant Soil**, v. 95, p. 109-121, 1986.

BODDEY, R.M.; CLARK, P.M.; VICTORIA, R.L.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J. The use of the <sup>15</sup>N isotope dilution tecnique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of *Paspalum notatum* cv. batatais. **Canadian Journal of Microbiology**, 29: 1036-1045, 1983.

BODDEY, R.M.; VICTORIA, R.L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Bachiaria Paspalum notatun* cv. batatais usisng <sup>15</sup>N labelled organic matter and fertilizer. **Plant Soil**, v. 90, p. 265-292. 1986.

BRASIL, M. S. ; FERNANDES , F. A.; BALDANI, V.L.D. Ocorrência de bacterias do gênero *Azospirillum* spp. associadas a gramíneas forrageiras no Pantanal da Nhecolândia. Brasília, EMBRAPA, CNPAB, 2000. 7 p. (Comunicado Técnico 46).



BRASIL, M. S. da; BALDANI, J.I.; BALDANI, B.L.D. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal Sul Motrogrossense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29. p. 179-190, 2005

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Departamento de Florestas. Programa Nacional de Florestas. Unidade de Apoio do PNE no Nordeste. **Manejo sustentado dos recursos florestais da Caatinga**. MMA. Natal: MMA, 2008. 29 p. (Comunicado Técnico.1)

CHALK, P.M. The contribution of associative and symbiotic nitrogen fixation to the nitrogen to non-legumes. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 132, p. 29-39, 1991.

CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J.M.; MONTEIRO, A.M.; SANDBERG, G. Analysis of indole-3-acetic acid and related indolis in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasiliense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, 2833-2837, 1988.

DEKHIL, S.B.; CAHILL, M.; STACKBRANDT, E.; SLY, L.I. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *Largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *Parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. **Systems Applied to Microbiology**, v. 20, p.72-77, 1997.

DE-POLLI, H.; MATSUI, E.; DOBEREINER, J.; SALETA, E. Confirmation of nitrogen fixation in two tropical grasses  $^{15}\text{N}_2$  incorporation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 9, p. 119-123, 1977.

DIDONET, A.D.; DIDONET, C.C.G.M. Caracterização fisiológica, bioquímica e molecular de isolados de *Azospirillum* spp. obtidos de raízes de cevada. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 23. REUNIÃO SOBRE MICORRIZAS, 7., SIMPOSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 5., REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 2., out. 1988, Caxambu, **Resumos**. Lavras, UFLA/sbcs/SBM, 1998. p. 187.

DIDONET, A.D.; RODRIGUES, O. ; KENNER, M.H. Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 645-651, 1996.

DOBBELAERE, S., CROONENBORGH, A., THYS, A., PTACEK, D., VANDERLEYDEN, J., DUTTO, P., LABANDERA-GONZALEZ, C., CABALLERO-MELLADO, J., AGUIRRE, J.F., KAPULNIK, Y., BRENER, S., BURDMAN, S., KADOURI, D., SARIG, S., OKON, Y. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 871-879, 2001.

DÖBEREINER, J. ; BALDANI, V.L.D. e BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Brasília, **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - CNPAB**,1995, 60 p.

DÖBEREINER, J. e PEDROSA, F.O. **Nitrogen-fixing bacteria in non-leguminous crop plants**. Madison, Science Tech, 1987. 155p. (Brock/Springer Contemporary Bioscience series)

DÖBEREINER, J.; DAY, J.M., Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: Newton, W.E., Nyman, C.J. (Eds.), **PROCEEDINGS OF THE 1ST INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON N<sub>2</sub> FIXATION**. Washington State University Press, Pullman. 1976.

EMBRAPA. **Manual de Métodos de Análise de solos**. 2ª ed. Centro Nacional de Pesquisa de Solo: Rio de Janeiro. 1997.

ERVIN, S.E.; HUBBELL, D.H. Root hair deformations associated with fractionated extracts from *Rhizobium trifolii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, p. 61-68, 1985.

FALLIK, J. ; OLON, Y.; FISHER, M. Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation effect on organic matter content, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, p. 45-50, 1988.

FARIA, S.M. **Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação de nitrogênio para espécies florestais**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, Jan. 2002. 16 p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 134).

FRITZSCHE, C.; NIEMMAN, E.G. Nitrogen fixation in continuous culture with NH<sub>4</sub>Cl-containing media. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1160–1161, 1990.

GANGULY, T.K., JANA, A.K., MOITRA, D.N. An evaluation of agronomic potential of *Azospirillum brasilense* and *Bacillus megaterium* in fibre–legume–cereal system in an Aeric haplaquept. **Indian Journal of Agricultural Research**, v. 33, p. 35–39, 1999.

GARCIA DE SALOMONE, I.E.; DÖBEREINER, J.; URQUIAGA, S.; BODDEU, R.M. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maiz genotype association as evaluated by <sup>15</sup>N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, v. 23, p. 249-256, 1996.

GOI, S.R.; SILVA, R.A. da; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Influência da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas na formação de pelos radiculares em cana- de- açúcar. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 23. REUNIÃO SOBRE MICORRIZAS, 7., SIMPOSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 5., REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 2., out. 1988, Caxambu, **Resumos**. Lavras, UFLA/sbcs/SBM, 1998. p.432.

KUSS, A.V.; KUSS, V.V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M.L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, 2007.

JAIN, D.K.; PATRIQUIN, D.G. Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching on wheat root hairs. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 206-210, 1985.

KAPULNIK, Y.; GAFNY, R.; e OKON, Y. Effect of *Azospirillum* spp. inoculation on root development and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake in sheat (*Triticum aestivum* cv. Mirian) in hydroponic system. **Canadian Journal of Botany**, v. 63, p. 627-631, 1985.

KAPULNIK, Y.; OKON, Y. e HENIS, Y. Yield response of spring wheat cultivars (*Triticum aestivum* e *T. turgidum*) to inoculation with *Azospirillum brasilense* under field conditions. **Biology Fertility of Soils**, v.4, p.27-35, 1987.

KEFALOGIANNI, I.; AGGELIS, G. Modelling growth and biochemical activities of *Azospirillum* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 352–357, 2002.

KENNEDY, I.R e TCHAN, Y. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops recent advances. **Plant and Soil**, v. 141, p. 93-118, 1992.

KHAMMAS, K.M.; AGERON, E.; GRIMONT, P.A.D.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research Microbiology**, v. 140, p. 679-693, 1989.

KIRCHHOF, G.; REIS, V. M.; BALDANI, J.I.; ECKHERT, B.; DÖBEREINER, J.; HARTMANN, A. Occurrence, physiological and molecular analysis of endofhytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. **Plant Soil**, v. 194, p. 45-55, 1997.

LADHA, J.K., BARAQUIO, W.L., WATANABE, I. Immunological techniques to identify *Azospirillum* associated with rice. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 28, p. 478–485. 1982.

LADHA, J.K., SO, R.B., WATANABE, I. Composition of *Azospirillum* species associated with wetland rice plant grown in different soils. **Plant and Soil**, v.102, p. 127–129, 1987.

MACHADO, H.B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasiliense* mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 549-553, 1991.

MAGALHÃES, F.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 417-430, 1983.

- MAGALHÃES, F.M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. **Revista Microbiologia**, v. 15, p. 246-252, 1984.
- MALIK, K.A., MIRZA, M.S., HASSAN, U., MEHNAZ, S., RASUL, G., HAURAT, J., MATTHEWS, S.S., SPARKES, D.L., BULLARD, M.J., The response of wheat to inoculation with the diazotroph *Azorhizobium caulinodans*. **Aspects of Applied Biology**, v. 63, p. 35–42. 2001.
- MARRIEL, I.E.; CARDOSO, E.J.B.N. Colonização natural seletiva de *Azospirillum lipoferum* em seiva de plantas de milho cultivadas no campo. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 23. REUNIÃO SOBRE MICORRIZAS, 7., SIMPOSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 5., REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 2., out. 1988, Caxambu, **Resumos**. Lavras, UFLA/sbcs/SBM, 1998. p. 187.
- MELLONI, R., NÓBRAGA, R.S.A., MOREIRA, F.M.S., SIQUEIRA, J.O. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita, em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, p. 85-93, 2004.
- MENDONÇA, M.M.; URQUIAGA, S.S.; REIS, V.M., Variabilidade genotípica de milho para acumulação de nitrogênio e contribuição da fixação biológica de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília v. 41, n. 11, p. 1681-1685, 2006.
- MURTY, M.G., LADHA, J.K. Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. **Plant and Soil**, v. 108, p. 281–285, 1988.
- NOSKO, P.; BLISS, L.C. e COOK, F.D. The association of free- living nitrogen-fixing bacteria with the roots of High Arctic graminoids. **Arcta Applied Review**, v. 26, p. 180-186, 1994.
- OKON, Y., LABANDERA-GONZALEZ, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, p. 1591–1601, 1994.
- OKON, Y.; ALBRECHT, S.L.; BURRIS, R.H. Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. **Journal of Bacteriology**, v. 127, p. 1248–1254, 1976.
- PANWAR, J.D.S., SINGH, O. Response of *Azospirillum* and *Bacillus* on growth and yield of wheat under field conditions. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 5, p. 108-110, 2000.
- PATRIQUIN, D.G.; DÖBEREINER, J.; JAIN, D.K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 900-915, 1983.
- PEREIRA, J.A.R., CAVALCANTE, V.A., BALDANI, J.I., DÖBEREINER, J. Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp. and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 110, p. 269–274, 1988.

RADWAN, T.EL-S. EL-D.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 10, p. 987-994, out. 2004.

RAO, V.; JENA, P.K.; ADHYA, R.W.F. Inoculation of rice with nitrogen-fixing bacteria. Problems and perspectives. **Biology Fertility Soils**, v. 4, p. 21-26, 1987.

RAYMOND, J.; SIEFERD, J.L.; STAPLES, C.R.; BLANKENSHIP, R.E. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, p. 541-554, 2004.

REINHOLD, B., HUREK, T.; FENDRUJM, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THEIELENANS, S. ; DE LEY, L. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L) Kuth). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 43-51, 1987.

REIS, F.B.J.; REIS, V.M.; TEXEIRA, K.R.S. Restrição do 16S-23S DNA intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n.3, p. 431-438, 2006.

REIS, V.M., BALDANI, J.I., BALDANI, V.L.D., DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19, p. 227-247, 2000.

REIS, V.M.; REIS JUNIOR, R.B. dos; QUESADA, D.M.; OLIVEIRA, O.C.A. de; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Biological nitrogen fixation associated with tropical pasture grasses. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 837-844, 2001.

ROBERTS, A.; STONE, L. Advantageous indirect interactions in systems of competition. **Journal Theory Biology**, v. 228, p. 367-375, 2004.

ROPER, M.M., LADHA, J.K. Biological N<sub>2</sub> fixation by heterotrophic and phototrophic bacteria in association with straw. **Plant and Soil**, v.174, p. 211-224, 1995.

SAUBIDET, M.I., BARNEIX, A.J. Growth stimulation and nitrogen supply to wheat plants inoculated with *Azospirillum brasiliense*. **Journal of Plant Nutrition**, v. 21, p. 2565-2577, 1998.

SHANKARIAH, C., HUNSIGI, G. Field responses of sugarcane to associative N<sub>2</sub> fixers and P solubilisers. In: Hogarth, D.M., (ed.), Proceedings of the 24th International Society of Sugarcane Technologists Congress, 17-21 September 2001. **The Australian Society of Sugarcane Technologists**, Brisbane, p. 40-45, 2001.

SILVA, C.M.M.S.; OLIVEIRA, M.C.; ALBUQUERQUE, S.C. Avaliação da produtividade de três cultivares de capim buffel na região semi-árida de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Viçosa, v. 22, p. 513-520, 1987.

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. **Biotecnologia do solo: Fundamentos e perspectivas**. Brasília, MEC-Ministério da Educação, ABEAS: ESAL-FAEPE; Lavras, 1988, 263 p.

SOLÉ, R.V.; BASCOMPTE, J.; VALLS, J. Stability and complexity of spatially extended two-species competition. **Journal Theory Biology**, v. 159, p. 469–480, 1992.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Review**, v. 24, p. 487–506, 2000.

TAL, S. E OKON, Y. Production of the reserve material poly-beta-hydroxybutarate and its function in *Azospirillum brasiliense* Cd. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 31, p. 608-613, 1985.

TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasiliense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, p. 967-980, 1978.

TRIPATHI, A.K.; NAGARAJAN, T.; VERMA, S.C.; LE RUDULIER, D. Inhibition of biosynthesis and activity of nitrogenase in *Azospirillum brasiliense* Sp7 under salinity stress. **Current Microbiology**, v. 44, p. 363–367, 2002.

TSAGOU, V.; KEFALOGIANNI, I.; SINI, K.; AGGELIS, G. Metabolic activities in *Azospirillum lipoferum* grown in the presence of  $\text{NH}_4^+$ . **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, p. 574–578, 2003.

VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. The genetics of the *Azospirillum*-plant root association. **Critical Review Plant Science**, v. 14, p. 445-466, 1995.

WANI, P. Inoculation with associative nitrogen-fixing bacteria: role in cereal grain production improvement. **Indian Journal of Microbiology**, v. 30, p. 363-393, 1990.

SANTOS, Márcia Carneiro Monteiro dos. **Ocorrência de bactérias diazotróficas em gramíneas forrageiras na microrregião de Patos - PB**: UFCG, 2009. 53 p. (Dissertação – Mestrado em Zootecnia – Sistemas Agrosilvipastoris no Semi-Árido).

## CAPITULO 2

### OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS NA MICRORREGIÃO DE PATOS

#### RESUMO

A fixação biológica do nitrogênio atmosférico por bactérias diazotróficas associadas a plantas forrageiras pode contribuir com parte do suprimento de N para as plantas, reduzindo os custos de produção e danos ambientais. O estudo da dinâmica e a seleção de isolados eficientes são cruciais para a maximização dessa contribuição. Com o objetivo de estimar a população de bactérias endofíticas nativas associadas a andropogon, tanzânia e buffel, nos período chuvoso e seco em região semi-árida, e avaliar a variação da atividade da nitrogenase dos isolados, foi conduzido um estudo no Laboratório de Solos da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos (PB). Amostras de raízes foram coletadas na época das chuvas e da seca (março e agosto 2008) de três gramíneas: andropogon (*Andropogon gayanus* Kunth), capim tanzânia (*Panicum maximum* Jacq.cv. Tanzânia) capim buffel (*Cenchrus ciliaris*), cultivadas no setor de Agrostologia do Campus de Patos-PB. As raízes foram submetidas a dois pré-tratamentos: lavagem com água e desinfestação superficial com hipoclorito de sódio. Utilizou-se o meio NFb (específico para *Azospirillum* spp). Procedeu-se a quantificação, caracterização fenotípica, e posteriormente, a purificação e avaliação da atividade da enzima nitrogenase dos isolados bacterianos, em meio semi-sólido sem nitrogênio. A maior ocorrência natural de bacterianos dizotróficos endofíticas nos capins andropogon, tanzânia e buffel cultivados na região semiárida foi observada no período seco. Os isolados bacterianos UFCG 22, 25, 26, 27 e 29 de adropogom, UFCG 31, 32,33, 34, 36, 37, 38 de tanzânia e UFCG 42, 45, 49 e 50 de buffel apresentaram-se promissores para fixação biológica de nitrogênio e devem ser considerados em estudos posteriores para nutrição mineral em N e crescimento de gramíneas forrageiras.

**Palavras-chave:** Fixação biológica de N<sub>2</sub>; nutrição; *Azospirillum* spp.

SANTOS, Márcia Carneiro Monteiro dos. **Occurrence of diazotrophic bacteria in grasses forage in the semiarid microregion of Patos - PB**: UFCG, 2009. 53 p. (Dissertation – Animal Husbandry M. Sc. Program – Agrosilvipastoral Systems in the no Semiarid).

## **OCCURRENCE OF DIAZOTROPHIC BACTERIA IN GRASSES FORAGE IN THE MICROREGION OF PATOS - PB**

### **ABSTRACT**

The biological fixation of the atmospheric nitrogen by diazotrophic bacteria associated with forage plants can provide part of the nitrogen necessary to plant growth, reducing production costs and environmental damages associated with fertilizer production. The maximization of this N contribution can be achieved by studying the dynamics and selection of N-efficient diazotrophic bacteria isolates. A study was carried out at the Soil Laboratory of the Federal University of Campina Grande, in Patos (PB), to examine the native diazotrophic endophytic bacteria associated with andropogon, tanzânia and buffel during the rainy and dry seasons in semi-arid regions, and evaluate the nitrogenase activity of the observed isolates. Root samples of three forage grasses [*Andropogon gayanus* Kunth (andropogon), *Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzania (tanzânia) and *Cenchrus ciliaris* (buffel)] grown in the Agrostology Sector/Animal Husbandry Master Program facilities, in Patos-PB, were collected during the rainy (March of 2008) and dry (August of 2008) seasons. The sampled roots were washed in water or superficially disinfected with sodium hypochlorite. The bacteria were isolated in NFb selective media (specific for *Azospirillum* spp.), quantified, phenotypically characterized, purified and evaluated for their nitrogenase activity in semi-solid free-N culture media. The density of diazotrophic endophytic bacteria was little affected by seasonal variation and pre-treatments of roots (water washing or sodium hypochlorite disinfection). The largest densities bacterial isolated dizotróficos on andropogon, tanzânia e buffel were obtained in the dry period. Isolates UFCG 22, 25, 26, 27 and 29; UFCG 31, 32, 33, 34, 36, 37 and 38; and UFCG 42, 45, 49 and 50, associated, respectively, with adropogon, tanzânia and buffel grasses showed to be highly promising, and their potential to BNF, with the objective to save N-fertilizer in the growth of forage grasses, should be further studied.

**Keywords:** N<sub>2</sub> biological fixation; nutrition; *Azospirillum* spp.



## 1 INTRODUÇÃO

A região semi-árida no Nordeste apresenta um regime de chuvas cuja deficiência hídrica ocorre na maior parte do ano, e abrange centenas de milhares de quilômetros quadrados, com grande heterogenidade espacial e temporal (MENEZES e SAMPAIO, 2000). Uma fração muito reduzida dessa região é utilizada para agricultura, estabelecendo-se assim aptidão para as pastagens nativas e cultivadas. Como ocorre em diversas áreas secas tropicais, a sua vegetação natural, apesar de vulnerável, é alvo de pastejo intensivo pelos rebanhos bovinos e caprinos.

Trabalhos de manipulação da vegetação nativa dessa região, com o fim de potencializar seu uso para a produção animal têm aumentado a disponibilidade de forragem (ARAÚJO FILHO et al., 2002). Esta região apresenta boa disponibilidade de fitomassa do estrato herbáceo nativo no período chuvoso, de baixa digestibilidade e qualidade nutritiva. O uso de gramíneas, como andropogon (*Andropogon gayanus* Kunth), tanzânia (*Panicum maximum* Jacq.cv. Tanzania) e buffel (*Cenchrus ciliaris*) de origem africana, com alto potencial para produção de foragens no sertão, por apresentar melhor valor nutritivo e digestibilidade, além da rusticidade e tolerância à seca, contribuíram para sua introdução. Entretanto, o seu potencial produtivo pode ser limitado pela deficiência de nitrogênio (N), geralmente comum em solos de regiões semi-áridas.

As bactérias diazotróficas endofíticas, formam associação natural com gramíneas, notadamente as do gênero *Azospirillum* spp.. Estas bactérias desempenham importante papel na nutrição das gramíneas e na reabilitação e sustentabilidade dos ecossistemas, pois incorporam N por meio da fixação biológica, apresentando potencial para uso nessa região, por ser um bioinsumo de baixo custo e ecologicamente correto. Entretanto, são escassos os estudos sobre bactérias diazotróficas associativas nestas e, ou em outras espécies com tal finalidade nessa região.

Este trabalho teve o objetivo de avaliar a ocorrência natural de bactérias diazotróficas endofíticas em andropogon, tanzânia e buffel cultivadas na região semiárida no período chuvoso e seco e o seu potencial para fixar nitrogênio.

## 2 REFERÊNCIAL TEORICO

### 2.1 Bactérias diazotróficas endofíticas

Bactérias diazotróficas endofíticas são aquelas que fixam  $N_2$  atmosférico e colonizam o interior de tecidos vegetais sem causar sintomas de doenças. Dentre as mais estudadas destacam-se as pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Acetobacter*, *Burkholderia* e *Azoarcus*. Bactérias do gênero *Azospirillum* são consideradas endofíticas facultativas (BALDANI et al., 1997), pois, além de colonizarem os hospedeiros podem sobreviver no solo na forma de cistos (BASHAN e HOLGUIN, 1997). Apesar da baixa especificidade com relação a seus hospedeiros (BALDANI et al., 1997), a associação dessas bactérias fixadoras de nitrogênio é mais freqüente com gramíneas (BALDANI et al., 1999).

Os microrganismos diazotróficos endofíticos do gênero *Azospirillum* podem desempenhar importante papel na reabilitação e sustentabilidade dos ecossistemas uma vez que incorporam N por meio da fixação biológica em quantidade que pode variar de 25 a 50 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> e ainda produzem e liberam substâncias reguladoras de crescimento vegetal, como auxinas, giberilinas e citocininas, as quais contribuem para melhorar a nutrição mineral e utilização de água pelas plantas (BAZZICALUPO e OKON, 2000; KUSS et al., 2007).

Atualmente há seis espécies descritas para o gênero *Azospirillum*: *A. brasiliense*; *A. amazonense*; *A. lipoferum*; *A. halopraeferens*; *A. irekense* e *A. largomorbilis*. As duas primeiras são as mais estudadas e as que ocorrem em grande abundância nas regiões tropicais em associações com gramíneas forrageiras, como milho, trigo, arroz e sorgo.

### 2.2 Fatores que influenciam as bactérias endofíticas

A ocorrência e a atividade de bactérias diazotróficas no solo e na planta são fortemente influenciadas por estresses físicos (baixa umidade e alta temperatura), químicos (acidez e baixos teores de nutrientes) e biológicos (espécie vegetal não hospedeira). Alguns destes fatores são comuns na região semi-árida, e podem influenciar as populações destas bactérias (BALDANI et al., 1999).

A diversidade dessas bactérias está diretamente relacionada com a espécie vegetal associada (BALDANI et al., 1999). Há casos de associação de *Azospirillum* nas raízes e solo de outras gramíneas, como milho e sorgo, no Sudeste do Brasil ( $10^6$  a  $10^7$  bactérias  $g^{-1}$  de solo) (DÖBEREINER, 1995), em raízes de pupunha e braquiária na Amazônia ( $10^5$  bactérias  $g^{-1}$  de solo) (MAGALHÃES e DÖBEREINER, 1984), em raízes desinfectadas superficialmente, e na rizosfera de espécies de braquiárias em Goiás e Minas Gerais ( $10^3$  a  $10^7$  bactérias  $g^{-1}$ ) (REIS JUNIOR et al., 2000; REIS JUNIOR, 2002).

A predominância de bactérias do gênero *Azospirillum* em colonizar raízes de gramíneas forrageiras foi observada em regiões tropicais no Pantanal do Mato Grosso do Sul, sendo observadas em maior quantidade na época da cheia do Pantanal. (BRASIL et al., 2005).

### **2.3 Identificação e avaliação do potencial para fixação do $N_2$**

É importante determinar a extensão e a dinâmica de estabelecimento de bactérias na rizosfera em ambientes controlados e não controlados para o conhecimento do potencial do *Azospirillum* de fixar eficientemente o nitrogênio atmosférico para uso como inoculante de culturas agrícolas (HAM e NEW, 1998; REIS et al., 2000). Embora, a identificação destas bactérias pelos métodos fenotípicos sejam muito utilizados, os métodos moleculares são considerados essenciais (KIRCHOF et al., 1997). As características morfológicas são também aplicáveis, e com bons níveis de precisão, em estudos exploratórios da diversidade destas bactérias em diferentes ambientes (MELLONI et al., 2004).

Entre os métodos para avaliar a eficiência da fixação do nitrogênio pela bactérias diazotófricas a mensuração da atividade da nitrogenase é bastante utilizado em virtude de sua sensibilidade e praticidade. O complexo enzimático da nitrogenase é universalmente responsável pela redução microbiológica do nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) à amônia. Além de reduzir o  $N_2$ , a atividade da nitrogenase reduz o acetileno ( $C_2H_2$ ) e outros compostos. A atividade da enzima não é alterada quando o  $N_2$  é substituído pelo acetileno, apenas há troca de produtos, pois o etileno ( $C_2H_4$ ) é o único produto catalizado pela nitrogenase na redução de acetileno (HARDY et al., 1973). Este princípio possibilita a avaliação da atividade da enzima, saturando-se todos os sítios

de ativação com gás acetileno, o qual é reduzido a etileno pela enzima e quantificada em cromatógrafo de fase gasosa.

Han e New (1998) observaram variações na atividade da nitrogenase (redução do acetileno) de 285 isolados, crescendo em meio semi-sólido (NFb) sem nitrogênio. A atividade que variou entre 0 e 154,9 nmole C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> mg proteína<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Estes autores consideraram altas as taxas de fixação em culturas puras acima de 110 nmoles C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> mg proteína<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

## 2.4 Gramíneas forrageiras africanas

Na região semi-árida do Nordeste brasileiro, a pecuária é desenvolvida de maneira extensiva, com a alimentação dos rebanhos caprino e ovino constituída, principalmente, de pastagens de gramíneas nativas ou exóticas adaptadas às condições edafoclimáticas da região.

Nas pastagens cultivadas predominam as gramíneas africanas, devido principalmente à baixa digestibilidade das espécies nativas (MOREIRA et al., 2006). As espécies africanas mais adaptadas ao estresse hídrico e de melhor qualidade são *Cenchrus ciliaris* (capim-buffel), *Panicum maximum* Jacq. cv. tanzânia (capim-tanzânia) e o *Andropogon gayanus* Kunth (capim-andropogon). O termo “cultivado” restringe-se somente à retirada da vegetação nativa e à introdução de espécies forrageiras adaptadas, sem contudo, haver preocupação pertinente com a manutenção da fertilidade do solo, resultando em baixos índices produtivos. Outro aspecto relevante, é que, nessa região normalmente não se faz uso de insumos agrícolas, principalmente de fertilizantes nitrogenados no cultivo dessas pastagens, devido ao seu alto custo.

Originário da África, o capim-buffel é uma espécie perene, de porte variando de 0,6 a 1,5 m de altura, dependendo da variedade ou cultivar. De maneira geral, apresenta melhor crescimento em solos leves e profundos, pois possui enraizamento profundo, podendo também crescer satisfatoriamente em solos argilosos com boa drenagem. Seu valor nutritivo é alto, com boa palatabilidade e digestibilidade da matéria seca e de proteína bruta. A produtividade de matéria seca de diversas variedades do capim-buffel depende das condições locais, se situa entre 8 a 12 t ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> (OLIVEIRA, 1981).

Apesar da alta resistência à seca, o capim-buffel apresenta maior produção sob maiores níveis de umidade do solo, desde que as condições de solo e temperatura naturais sejam

favoráveis. Foram observados no Texas que a principal dificuldade no estabelecimento do capim-buffel irrigado é o baixo vigor das sementes e a severa competição com outras forrageiras perenes (BOVEY et al., 1980).

O potencial produtivo do capim-buffel foi estudado na Austrália durante duas estações de inverno, com e sem irrigação, sendo os baixos níveis de nutrientes no solo responsabilizados pelas baixas respostas da produção da gramínea à irrigação (TAYLOR e ROWLEY 1976).

A cultivar tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia) foi trazida da Tanzânia, África, introduzida e lançada no Brasil pela EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte – CNPGC, por apresentar boa aceitabilidade pelos animais, com ganhos de peso elevados e aumento relativo da taxa de lotação da pastagem. Possui 0,6 a 1,0 m de altura, boa produção de matéria seca, cobrindo bem o solo quando adubado e manejado de forma adequada. O tanzânia foi lançado em substituição ao capim colômbio, antes uma das forrageiras mais utilizadas no Brasil para engorda de bovino (EUCLIDES, 1994), mas perdeu espaço devido à pouca adaptabilidade a solos de baixa fertilidade, e à baixa tolerância à seca.

O capim-andropogon é uma gramínea forrageira perene, ereta, resistente à seca e ao frio, cresce formando touceiras de até 1,0 m de diâmetro e produz perfilho com altura variando entre 1,0 a 3,0 m. Originário da África tropical, encontra-se amplamente distribuído na maioria dos cerrados tropicais, com estação seca bem pronunciada. A produtividade do capim-andropogon é de 50-150 t ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>. Vegeta bem em altitudes de até 1 400 m. Tolerante até nove meses de seca, embora seu crescimento seja favorecido em regiões com três a cinco meses de estiagem. Mantém sua atividade fotossintética e metabólica sob condições de estresse hídrico, e rebrota logo com as primeiras chuvas (FILGUEIRAS, 1990).

Embora as gramíneas sejam frequentemente plantadas ou semeadas em algumas áreas nobres na região semi-árida no Nordeste, não há estudos sobre bactérias diazotróficas endofíticas em solos ou raízes de forrageiras nesta região. Informações sobre bactérias que possam ser usadas como biofertilizantes poderiam reduzir a dependência dos cultivos utilizando fertilizantes nitrogenados sintéticos, trazendo benefícios econômicos e ambientais para as populações da região semi-árida.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Área de estudo e espécies de gramíneas

Amostras de raízes de três gramíneas, foram obtidas no campo de cultivo de forragem no Setor de Agrostologia do Centro de Saúde e Tecnologia Rural na Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, situado na microrregião de Patos no sertão paraibano, tendo com coordenadas geográficas 07° 04' 32" S e 37° 16' 26" W. O solo da área é predominantemente Luvissoilo Crômico Órtico típico (EMBRAPA, 1999).

Foram utilizadas três espécies de gramíneas forrageiras, com potencial para cultivo na região semi-árida do Nordeste brasileiro: capim andropogon (*Andropogon gayanus*), capim tanzânia (*Panicum maximum* Jacq.cv. tanzânia) e capim buffel (*Cenchrus ciliaris*). As raízes foram coletadas aleatoriamente, tomando-se três repetições de cada espécie.

As coletas das raízes foram realizadas na época das chuvas (março) e de seca (agosto) em 2008. Os dados climatológicos estão apresentados na Figura 1. As amostras de raízes das forrageiras foram acondicionadas em sacos plásticos e prontamente transportadas para o Laboratório de Solos da Unidade Acadêmica de Engenharia Florestal da UFCG, Campus de Patos (PB).

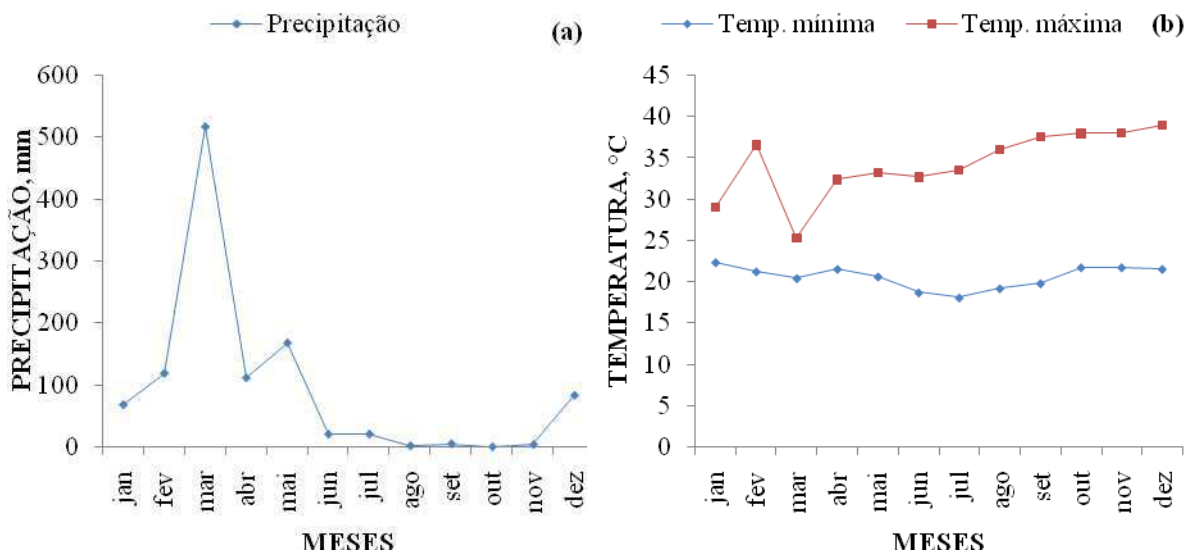


Figura 1. Distribuição de chuvas e temperaturas durante o período experimental. (Fonte: INMET/UFCG, 2008)

### 3.2 Contagem e isolamento de bactérias diazotróficas

Após a coleta foram preparadas amostras compostas de cada espécie no laboratório de Microbiologia do Campos de Patos da UFCG. Em seguida as raízes foram separadas em subamostras para análise da população de bactérias diazotróficas. Parte das raízes foi lavada com água destilada (RL) e parte foi desinfestada superficialmente (RDS) com solução de hipoclorito de sódio (2%) por cinco minutos.

O método utilizado para contagem de bactérias foi o Número Mais Provável (NMP), conforme descrito por Döbereiner et al., (1995). Para cada repetição foram utilizadas 10 g de raízes frescas cortadas em fagmentos de cerca de 2,0 cm e maceradas. Juntaram-se 90 mL de solução salina (sais do meio NFb) esterilizada contido em erlenmyer de 250 mL (10g de raiz fresca: 90 mL de solução salina), e diluídas seriadamente em tubos de ensaio com 9 mL de solução salina, homogenizadas em vortex.

O isolamento das estirpes seguiu-se com a inoculação de 1,0 mL de cada diluição em recipientes de vidro com capacidade de 12 mL com 5 mL de meio de cultura NFb semi-sólido, recomendado para isolamento e contagem de *Azospirillum* spp. com a seguinte composição por litro: 5,0 g - Ácido málico; 0,5 g -  $K_2HPO_4$ ; 0,2 g -  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,1 g - NaCl; 0,02 g -  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 2 ml de solução de micronutrientes (0,04g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ; 1,2 g  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 1,4 g  $H_3BO_3$ ; 1,0 g  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ ; 1,175 g  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ); 2 ml de azul de bromotimol (solução 0,5% em KOH 0,2 N); 4 ml de Fe EDTA (solução 1,64 %); 1,0 mL solução de vitamina (100 mg de biotina; 200 mg piridoxol-HCl). Em seguida, ajustou-se o pH para 6,5 com KOH e adicionou-se 1,8 g de Agar.

Utilizaram-se três frascos por diluição, contendo 5,0 mL de meio de cultivo. Estes, após repicagem, foram mantidos sob incubação em estufa bacteriológica (28-30 °C) por cinco dias. Após este periodo, foi feita a contagem das bactérias nas amostras, baseando-se na presença (+) e ausência (-) de película em forma de véu próximo a superfície do meio de cultura, características da presença ou não de crescimento bacteriano.

A Tabela de McCrady (Döbereiner et al., 1995) foi usada para determinar, pelo método estatístico do NMP, a população de bactérias diazotróficas (por gramas de raiz fresca) presentes nas amostras.

O isolamento do *Azospirillum* spp. e a avaliação da diversidade fenotípica foram realizados após a contagem, utilizando-se os frascos com películas das maiores diluições seriadas. As películas foram repicadas para novos meios semi-sólidos específico (NFb) com ajuda de alça de platina e incubadas por 72 horas em estufa bacteriológica (28 - 30°C). As novas películas formadas foram riscadas em placa de Petri que continham meio NFb com consistência sólida (15 g L<sup>-1</sup> de agar e extrato de levedura).

A purificação final das culturas de *Azospirillum* spp. foi realizada em meio de cultura batata (DÖBEREINER et. al., 1995). Nesta etapa, as características morfológicas das colônias crescidas foram comparados entre si e agrupados segundo os seguintes valores de descrição das características das colônias: 1º valor (diâmetro médio da colônia): 1 = < 1 mm, 2 = 1-3 mm, 3 = > 3 mm. 2º valor (cor das colônia): 1 = creme, 2 = creme de centro escuro, 3 = rosa, 4 = branco. 3º valor (consistência da colônia): 1 = mole, 2 = média, 3 = dura/quebradiça.

Após esse processo, as colônias foram novamente repicadas para o meio NFb semi-sólido e examinadas ao microscópio ótico. Após isolamento e purificação, os isolados de *Azospirillum* spp. foram estocados em meio de cultura batata, e as culturas foram imersas em vaselina líquida esterilizada de acordo com a metodologia descrita por Döbereiner et. al., 1995.

### **3.3 Avaliação da fixação do N<sub>2</sub> de bactérias endofíticas em culturas puras.**

Foram utilizados 25 isolados com melhor crescimento na fase anterior para verificar a capacidade de fixação de N<sub>2</sub> *in vitro* pelo método da redução do acetileno (HARDY et al., 1973).

Os isolados bacterianos foram repicados para o meio NFb semi-sólido em recipiente de vidro com capacidade de 12 mL com 5 mL de meio. Após o crescimento bacteriano caracterizado pela formação do veú, os vidros foram hermeticamente fechados com tampas de borracha. Em seguida, com auxílio de uma seringa, retirou-se 10% do volume de ar restante, injetando-se o mesmo volume de acetileno (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>), incubando-se por 24 horas em estufa bacteriológica.



Ao término desse período, amostras de 5mL do gás do interior dos frascos foram colocadas em Vacuteiner e remetidos para análise em cromatógrafo de fase gasosa no Departamento de Química da Universidade Federal de Pernambuco.

Os resultados foram submetidos à análise da variância de acordo com o delineamento inteiramente casualizado e a comparação das médias foi feita pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Assistat, versão 7,5 beta (SILVA, & AZEVEDO, 2002).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Número mais provável de bactérias diazotróficas endofíticas

Os resultados indicam a ocorrência de bactéria diazotrófica *Azospirillum* spp. em solo do sertão paraibano associadas às três espécies de gramíneas forrageiras estudadas (Tabela 1). Bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* também foram observadas em gramíneas forrageiras por Magalhães et al., (1983), em região e condições edáficas diferentes, indicando ampla distribuição desses organismos nos trópicos.

Tabela 1. Densidade (Número Mais Provável) de microrganismos diazotróficos endofíticos em raízes lavadas (RL) e desinfestadas (RDS) de gramíneas forrageiras coletadas no período chuvoso e seco em Patos - PB.

Forrageiras	Períodos							
	Chuvoso				Seco			
	RL		RDS		RL		RDS	
	Limites*		Limites*		Limite*		Limite*	
	(NMP x 10 <sup>3</sup> ) bactérias g <sup>-1</sup> de raiz							
Andropogon	0,3	0,066-0,8	45,0	10-210	93,0	23-380	-	-
Tanzânia	2,5	0,66-8,1	0,9	0,2-3,7	>1100,0		-	-
Buffel	25,0	6,7-86	11,5	3,0-44,0	210,0	61-760	-	-

\*95% de Probabilidade. RL = raízes lavadas; RDS = raízes desinfestadas.

A quantidade estimada de bactérias diazotróficas isoladas das raízes das plantas diferiu conforme a forma de isolamento( raízes lavadas (RL) e raízes desinfestadas (RDS)), bem como os períodos do ano (chuvoso e seco). Em geral, o período chuvoso curto e o seco prolongado ao qual a região semi-árida esta submetida, influenciou o número de bactérias *Azospirillum* spp. associadas às três espécies forrageiras estudadas. No período chuvoso foi observada uma diminuição do número de bactérias nas raízes em relação ao da seca.

As maiores densidades de *Azospirillum* foram observadas nas raízes lavadas, principalmente no período seco. Observou-se também, variações de densidade de bactérias entre

espécies de plantas, indendentemente se em raízes lavadas ou desinfestadas. As maiores populações na raízes das forrageiras foram estimadas no período seco e seguem a seguinte ordem: tanzânia > buffel > andropogon. Sugerindo uma preferência dos isolados bacterianos pelo hospedeiro. O maior número de *Azospirillum* spp. originário de raízes lavadas do que nas raízes desinfestadas também foi observado em outras gramíneas forrageiras como *Brachiaria humidicola* e *B. decumbens* (REIS JUNIOR 2002), e *B. humidicola*, capim mimoso (*Axonopus purpusii*) e capim corona (*Elyonurus muticus*) no Pantanal Matogrossense (BRASIL et al., 2005). Reis Junior (2002) observou correlação significativa entre raízes lavadas e atividade da nitrogenase, divergindo do obtido nas raízes desinfestadas. Indicando, que as bactérias diazotróficas endofíticas são as principais responsáveis pela fixação biológica do N<sub>2</sub> em gramíneas forrageiras.

De forma geral, os valores máximos de densidade de bactérias diazotróficas obtidos neste estudo apresentou amplitude entre 10<sup>3</sup> e 10<sup>6</sup>. Resultados similares ao observado por Reis Junior et al., (2000), em raízes e rizosfera de braquiárias cultivadas em solos de Goiás e Minas Gerais. Indicando haver relação direta entre as Poaceaseae e estas bactérias, independentemente do tipo de solo, conforme atribuído por Baldani et al., (1999) em estudo idêntico.

Nas RL do capim buffel registraram-se as maiores densidades populacionais de bactérias (25 x 10<sup>3</sup> bactérias g<sup>-1</sup> de raiz fresca) em relação as demais forrageiras no período chuvoso, enquanto nas RL do capim tanzânia registraram-se densidades maior (1100 x 10<sup>3</sup> g<sup>-1</sup> bactérias de raiz fresca) do que as demais no período seco.

As maiores densidades de bactérias foram obtidas RL no período seco para todas as gramíneas estudadas. Este fato pode estar relacionado a baixa disponibilidade de nutrientes e matéria orgânica, e alta competição microbiana no solo em contra ponto à busca da bactéria por um ambiente menos adverso. Geralmente, na região sob influência da raiz há grande circulação de nutrientes. Este estresse pode provocar ocorrência rara ou nula dessa bactéria no ambiente mais distanciado da raiz (MELLONI et al., 2004). É provável que inúmeros fatores tenham favorecido esta migração à superfície das raízes, dentre eles: aderência das bactérias, baixa competição com outros organismos, especificidade com a gramínea hospedeira (BALDANI 1984), ou mesmo, devido à plasticidade adaptativa das forrageiras sob às variações sazonais (ALLEN e VALLS (1987).

A população de bactérias endofíticas obtidas em RDS no período das chuvoso variou em relação as gramíneas, apresentando-se, sendo no adropogom cerca de 400 vezes maior que no buffel e este 10 vezes maior que em tanzânia. Entretanto, a população na RDS no período seco foi nula, muito embora tenha ocorrido mudança de pH no meio de cultura (para alcalino), mas sem a formação do véu característico do crescimento do *Azospirillum*. Resultados similares foram observados por Baldani et al., 2000, que sugeriram que estas bactérias podem estar em um estado viável, mas não cultivável.

#### 4.2 Efeito do pré-tratamento no número de isolados bacterianos

O número total de isolados bacterianos por gramíneas forrageiras em diferentes períodos (chuvoso e seco) e formas de coleta nas raízes (lavadas e desinfestadas), encontra-se no quadro 2.

Tabela 2. Números de isolados diazotróficos endofíticos por gramínea forrageira obtidos em raízes nos períodos chuvoso e seco, utilizando o meio NFb

Forrageiras	Chuva		Total	Seca		Total
	RL	RDS		RL	RDS	
<b>Andropogon</b>	3	10	13	11	-	11
<b>Tanzânia</b>	6	2	8	10	-	10
<b>Buffel</b>	9	8	17	13	-	13
<b>Total</b>			38			34

O isolamento realizado a partir da maior diluição confirmou a presença de bactéria diazotróficas do gênero *Azospirillum* spp. associadas às três forrageiras na região em estudo. Foram obtidos isolados dessas bactérias em todas as forrageiras nos períodos chuvoso e seco nas RL, mas não foram obtidos isolados no periodo seco em RDS.

Do total de isolados obtidos (72) nas forrageiras avaliadas, o maior percentual foi obtido em RL (72,28%) contra 27,72% em RDS, sendo 30,56% originários de adropogon, 22,27% de tanzânia e 19,45% de buffel (Figura 2).

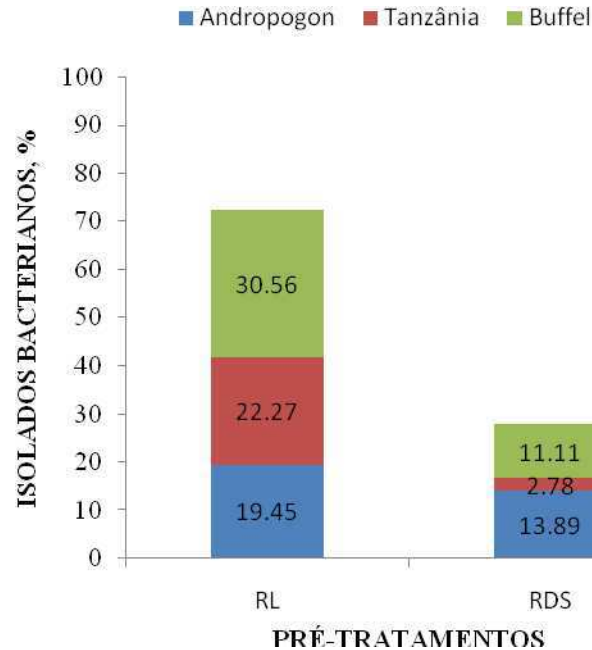


Figura 2. Percentagem de isolados bacterianos coletados das raízes de andropogon, tanzânia e buffel lavadas (RL) e desinfestadas superficialmente (RDS) em Patos - PB.

Este fato pode indicar maior preferência destes microrganismos pelas condições ambientais da superfície das raízes do andropogon e do buffel em relação ao capim tanzânia. Os percentuais de isolados obtidos também variaram com relação às forrageiras, sendo maiores em RL.

Este resultado concorda com o de outros autores, os quais verificaram que as bactérias diazotróficas isoladas em sua maioria, também foram originárias das raízes lavadas de plantas (MAGALHÃES et al., 1983; REIS JUNIOR et al., 2000; REIS JUNIOR, 2002; BRASIL et al., 2005).

#### 4.3 Efeito sazonal no número de isolados bacterianos

Em geral os períodos de coleta (chuvoso e seco), pouco influenciaram no percentual de isolados bacterianos associados às três espécies forrageiras estudadas. Muito embora o capim

buffel tenha apresentado maior variação sazonal, sendo os índices de recuperação em meio de cultura de isolados foram superiores que os demais (Figura 3).

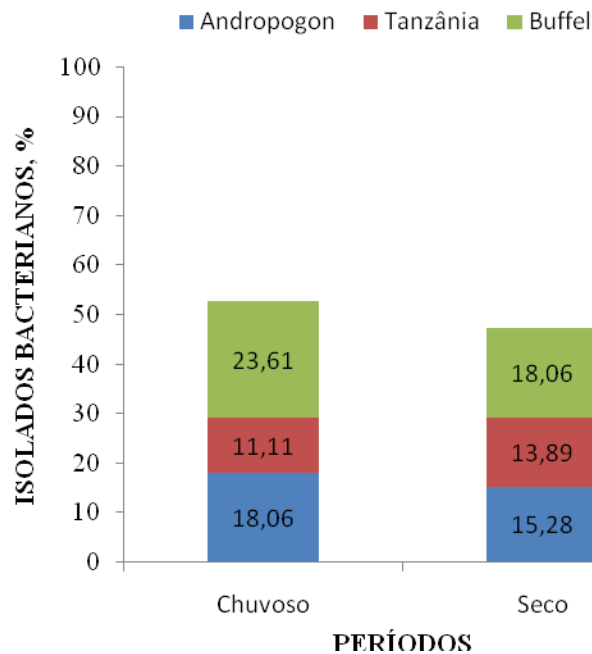


Figura 3. Percentagem de isolados bacterianos coletados das raízes de andropogon, tanzânia e buffel nos períodos chuvoso e seco em Patos - PB.

Parece provável que esta espécie de forrageira por ser mais adaptada a estas variações que as demais, propicia melhores condições rizosféricas e que beneficia estas bactérias. Afinidade entre bactérias endofíticas e espécies de plantas hospedeiras são moduladas pela via fitossintética mais eficiente em situações ambientais específicas (BALDANNI et al., 1999).

#### 4.4 Pré-caracterização morfológica dos isolados bacterianos

Os 50 isolados de bactérias endofíticas obtidos nas forrageiras em estudo diferenciou-se em oito grupos de acordo com as similaridades de características culturais das bactérias isoladas (diâmetro médio da colônia, cor das colônia e consistência da colônia) (Tabela 3). Sendo, três no grupo I, três no grupo II, um no grupo III, dois no grupo IV, quatro no grupo IV, onze no grupo VI, vinte e cinco no grupo VII e um no grupo VIII. Estes resultados mostram pequena diversidade fenotípica quando comparados com os obtidos por Melloni et al. (2004), que

observaram 36 grupos (fenótipos) de isolados bacterianos em outras espécies de gramíneas e em áreas de campo e de serra em áreas de mineração em recuperação na região sudeste do Brasil, sugerindo uma pretensa estabilidade biológica dessas bactérias no solo do presente estudo.

Tabela 3. Descrição das características dos fenótipos culturais (morfologia das colônias) com os respectivos isolados de bactérias endofíticas, obtidas em raízes frescas de capim andropogon, tanzânia e bufel.

Fenótipo cultural	Descrição <sup>(1)</sup>	Isolados (Prefixo UFCG)
I	2 – 1 – 1	27,29,50
II	2 – 1 – 2	15,40,40
III	2 – 2 – 2	21
IV	2 – 1 – 3	20,22
V	2 – 2 – 1	18,43,45,48
VI	2 – 4 – 1	4,6,7,13,14,16,17,19,30,32,34
VII	2 – 4 – 2	1,2,3,5,8,9,10,11,12,23,24,26,28,31,33,35,36,37 38,39,41,42,44,46,47
VIII	2 – 4 – 3	25

<sup>(1)</sup> Descrição: 1º valor (diâmetro médio da colônia): 1 = < 1 mm, 2 = 1-3 mm, 3 = > 3 mm. 2º valor (cor das colônia): 1 = creme, 2 = creme de centro escuro, 3 = rosa, 4 = branco. 3º valor (consistência da colônia): 1 = mole, 2 = média, 3 = dura/quebradiça.

Bactérias isoladas de mesma forrageira distribuíam-se em grupos de similaridades diferentes. Sendo, a maioria dos isolados de andropogon, tanzânia e buffel distribuída principalmente nos grupos VI e VII, embora tenham sido observados isolados originários de vários grupos de similaridade com os do andropogon (seis grupos) e buffel (cinco grupos) (Figura 4).

Tais resultados podem estar relacionados com a composição química dos exudados liberados pela planta. Isto sugere preferência de alguns isolados por determinadas espécies de plantas, muito embora ainda não tenha sido demonstrada especificidade hospedeira típica entre as espécies de *Azospirillum* spp. e a planta hospedeira (BASHAN e HOLGUIN, 1997).

Grayston et al., (1998) observaram que a variedade de compostos orgânicos liberados pela planta influencia a diversidade de microorganismos presentes na sua rizosfera.

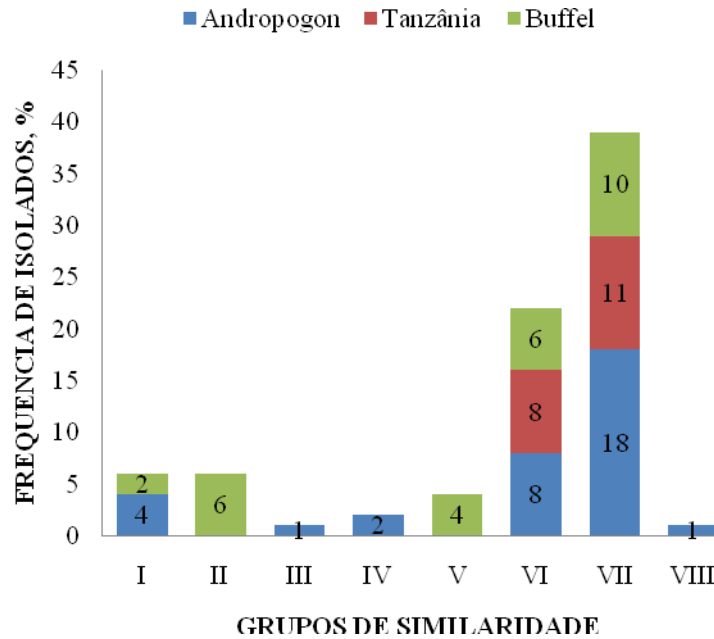


Figura 4. Frequência dos isolados de andropogon, tanzânia e buffel em cada grupo de similaridade formado pela características morfológicas das colônias

#### 4.5 Avaliação da fixação do N<sub>2</sub> em culturas puras

Os isolados vinte e cinco isolados tiveram confirmadas a habilidade para fixar N<sub>2</sub>, pela presença de atividade da enzima nitrogenase, avaliada pela redução do acetileno (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) a etileno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) (Figura 5).

Todos os isolados bacterianos avaliados apresentaram ampla variação da redução do acetileno (26 a 256 nmoles C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> h<sup>-1</sup>), contudo, a maioria dos resultados obtidos neste estudo, superaram os resultados obtidos por Han e New, (1998) em cultura pura.



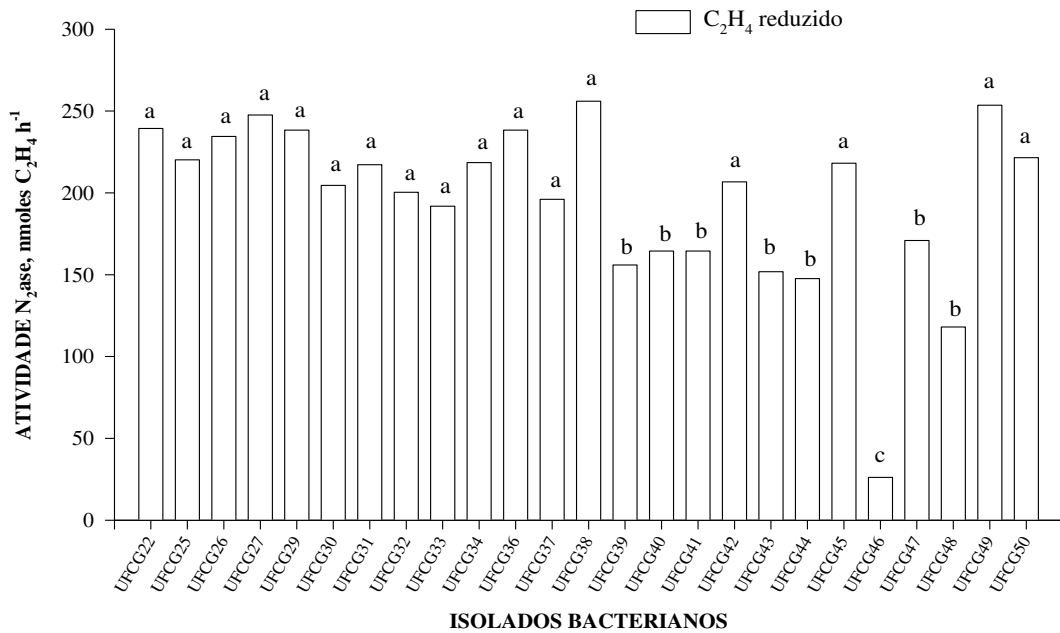


Figura 5. Comparação da fixação de nitrogênio (redução do acetileno) pelos isolados representativos das forrageiras em culturas puras. Colunas seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si a 5% pelo teste de Scott-Knott.

Observou-se que os isolados bacterianos isolados UFCG 22, 25, 26, 27 e 29 do adropogom e UFCG 31, 32,33, 34, 36, 37, 38 de tanzânia, exceto a UFCG 39 desta segunda, não apresentam diferença significativas entre si, com atividades da nitrogenase com valores entre 192 e 256 nmoles C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> h<sup>-1</sup>.

Os isolados provenientes do capim buffel apresentaram maior variação da atividade da nitrogenase do que as outras forrageiras. Os isolados UFCG 42, 45, 49 e 50 apresentaram-se comparáveis aos melhores valores obtidos nos isolados de andropogom e de tanzânia, enquanto os isolados UFCG 40, 41, 43, 44, 47 e 48 deferiram destes. O UFCG 46 apresentou atividade muito inferior aos dos demais isolados (26 nmoles C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> h<sup>-1</sup>). Grandes variação da atividade da nitrogenase de isolados naturais foram também observadas por Han e New, (1998), entre os membros da população amostrais coletadas em trigo. Esta variação pode sugerir maior

plasticidade genética dos isolados bacterianos diazotróficos obtidos no capim buffel do que dos isolados das outras espécies de forrageiras avaliadas.

Resultados da atividade da nitrogenase *in vitro* superiores a 110 nmoles  $C_2H_4$  mg proteína<sup>-1</sup> são considerados altos (HAN e NEW, 1998), o que indica de forma geral que os isolados bacterianos obtidos das forrageiras neste estudo apresentam grande potencial para fixação biológica de  $N_2$ .

## 5 CONCLUSÕES

A maior ocorrência natural de bacterianos dizotróficos endofíticos nos capins andropogon, tanzânia e buffel cultivados na região semiárida foi observada no período seco.

Os isolados bacterianos UFCG 22, 25, 26, 27 e 29 de adropogom, UFCG 31, 32,33, 34, 36, 37, 38 de tanzânia e UFCG 42, 45, 49 e 50 de buffel apresentaram-se promissores para fixação biológica de nitrogênio e devem ser considerados em estudos posteriores.

## 6 REFERÊNCIAS

- ALLEM, A.C.; VALLS, J.F.M. **Recursos forrageiros nativos do Pantanal Matro-Grossense**. Braiília: EMBRAPA-CENARGEN, 1987, 339p. (Embrapa-CENARGEN, Documentos, 8).
- ARAÚJO FILHO, J.A.; CARVALHO, F.C.; SILVA, N.L. Felonogia y valor nutritivo de follajes de alguns especies forrajeras de la Caatinga. **Agrofloretria em las Américas**, v.9, p.33-37, 2002.
- BALDANI, J.L. **Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com as outras espécies deste gênero, em raízes de milho, sorgo e arroz**, 1984, 110 f. (Tese de Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itajaí, 1984.
- BALDANI, J.L.; AZEVEDO, M.S.; REIS, V.M.; TEXEIRA, K.R.S.; OLIVARES, F.L.; GOI, S.R.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; CARVALHO, J.G. eds. **Inter-relações fertilidade, biologia e nutrição de plantas**. Viçosa, SBCS/UFLA/DCS, 1999. p. 621-666.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**,30, p.485-491, 2000.
- BALDANI, V.L.D.; OLIVEIRA, E.; BOLOTA, E.; BALDANI, J.L.; KIRCHHOF, G.; DÖBEREINER, J. *Burkholderia brasiliensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. In: ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIA. Rio de Janeiro, **Anais...** Rio de janeiro, 1997, p. 116.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Azospirillum-plant relationships envoiemental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, 43, p. 103-121, 1997.
- BAZZICALUPO, M.; OKON, Y. Associative and endophytic symbiosis. In: PEDROSA, F.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E., eds. **Nitrogen Fixation: from moleculaes to crop productivity**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 409-413.
- BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R.P. Identification os giferellins A1, A3 e iso-A3 in cultures of *Azospirillum lupoferum*. **Plant Physiology**, v, 9, 45-47 p. 1989.
- BOVEY, R.W.; BAUR, J.R.; MARKLEY, M.G. Response of kalein grass and buffel grass to herbicides. **Agronomy Journal**, v.72, n.1, p.53-55, 1980.
- BRASIL, M. S. da; BALDANI, J.I.; BALDANI, B.L.D. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal Sul Matogrossense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29. p. 179-190, 2005.

DÖBEREINER, J. ; BALDANI, V.L.D. e BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Brasília, **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - CNPAB**,1995, 60 p.

DOREREINER, J. ; MARRIEL, I.E. ; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 22, p. 1464-1473, 1976.

EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Brasília: Brasília Produção de Informação, Rio de Janeiro, Embrapa Solos, 1999.

EUCLIDES, V.P.B. **Algumas considerações sobre manejo de pastagens**. Campo Grande Embrapa-CNPAG, 1994. 31p. (Embrapa-CNPAG. Documentos, 57).

FILGUEIRAS, T.S. Africanas no Brasil: Gramíneas introduzidas da África. **Caderno de Geociências**, 1990. 57 p.

GRAYSTON, S.J.; WANG, S.; CAMPBELL, C.D.; EDWARDS, A.C. Delective influence of plant species on microbiol diversity in the rizosphere, **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, p.369-378, 1998.

HAN, S.O. e NEW, P.B. Variation in nitrogen fixing ability among natural isolates of *Azospirillum*. **Microbial Ecology**, v. 36, p.193-201, 1998.

HARDY, R. W. F., BURNS. R. C., HOLSTEN, R. D. Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 5, p. 47-81, 1973.

KIRCHHOF, G.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; ECKHERT, B.; DÖBEREINER, J.; HARTMANN, A. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. **Plant Soil**, v. 194, p.45-55, 1997.

KUSS, A.V.; KUSS, V.V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M.L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, out. 2007.

MAGALHÃES, F.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Academia Brasileira de Ciência**, v. 55, p.417-430, 1983.

MAGALHÃES, F.M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. **Revista de Microbiologia**, v. 15, p. 246-252, 1984.

MELLONI, R., NÓBRAGA, R.S.A., MOREIRA, F.M.S., SIQUEIRA, J.O. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita, em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 85-93, 2004.

MENEZES, R.S.C.; SMPAIO, E.V.S.B. Agricultura sustentável no semi-árido nordestino. In: OLIVEIRA, T.S.; ROMERO, R.E.; ASSIS JÚNIOR, R.M.; SILVA, J.R.C.S. (eds.). **Agricultura, sustentabilidade e o semi-árido**. Fortaleza: SBCS: UFC-DCS, 2000. p. 20-46.

MOREIRA, J.N.; LIRA, M.A.; SANTOS, M.V.F.; FERREIRA, M.A.; ARAÚJO, G.G.L.; FERREIRA, R.L.C.; SILVA, G.C.da. Caracterização da vegetação de Caatinga e da dieta de novilhos no Sertão de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41. n. 11, p. 1643-1651, 2006.

OLIVEIRA, C.M. **O capim-buffel nas regiões secas do Nordeste**. Petrolina: Embrapa CPATSA, 1981. 19 p. (Circular Técnica, 5).

REIS JUNIOR, F.B.; SANTOS, S.R.; TEXEIRA, K.R.S.; REIS, V.M.; DÖBEREINER, J. N<sub>2</sub> – fixing bacteria associated with *Bachiaria pastures*. In: PEDROSA, F.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E., (eds.) **Nitrogen Fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 432.

REIS JUNIOR, F.B. **Ecologia e diversidade de bactérias do gênero *Azospirillum* em associação com pastagens de *Brachiaria* spp.**, 2002. 97f. (Tese de Doutorado) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Seropédica, 2002.

REIS, V.M., BALDANI, J.I., BALDANI, V.L.D., DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19, p. 227–247, 2000.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.4, n.1, p.71-78, 2002..

TAYLOR, A.O.; ROWLEY, J.A. Potential of new summer grasses in Northland: warm season yields under dry land and irrigation. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 19, p. 127-133, 1976.