

## OCORRÊNCIA E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR

Karina Maria Lima Milani<sup>1</sup>, Oswaldo Machneski<sup>2</sup>, Elcio Liborio Balota<sup>3</sup>

1. Bióloga, Bolsista, Laboratório de Microbiologia do Solo, Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), Londrina, Paraná. (milanibio@gmail.com)

2. Analista de Ciência e Tecnologia, Mestre, Laboratório de Microbiologia do Solo, IAPAR.

3. Pesquisador, Doutor, Área de Solos, IAPAR. Brasil.

Data de recebimento: 07/10/2011 - Data de aprovação: 14/11/2011

### RESUMO

O objetivo neste trabalho foi o de avaliar a ocorrência e isolar bactérias diazotróficas na cultura da cana-de-açúcar. As amostras foram coletadas de diferentes variedades de cana-de-açúcar cultivadas na Estação Experimental do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), Londrina-PR, e na Estação Experimental da Universidade Federal do Paraná, Paranavaí-PR. As amostras de tecido vegetal e de solo foram submetidas a diluições sucessivas e inoculadas nos seguintes meios de cultura semi-seletivo: NFB para o isolamento de *Azospirillum brasiliense* e *A. lipoferum*, LGI-P para *Gluconacetobacter spp* e LGI para *A. amazonense*. A contagem da população de bactérias diazotróficas foi realizada através da técnica do Número Mais Provável (NMP), baseada na presença da película formada no meio semi-sólido. O isolamento foi realizado a partir dos frascos das últimas diluições, com crescimento positivo. Foi observado alto número de bactérias diazotróficas em todas as partes da planta de cana-de-açúcar (raiz, tolete, folha) e solo nas variedades avaliadas, variando de 5,42 a 7,33 ( $\log_{10}$  número de bactérias/g material úmido). Os resultados mostraram a presença das bactérias *Azospirillum brasiliense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense* e *Gluconacetobacter spp* em todas as partes da planta nas sete variedades estudadas e em solo rizosférico. Ao final do processo de isolamento, foram obtidos 26 isolados em meio de cultura NFB, 21 em meio LGI-P e 20 em meio LGI.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fixação biológica de nitrogênio, *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*

### OCCURRENCE AND ISOLATION OF DIAZOTROPHIC BACTERIA ASSOCIATED WITH SUGAR CANE

#### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the occurrence and isolate diazotrophic bacteria in sugarcane. The sugarcane samples were collected at the Experimental Station of Agronomic Institute of Paraná (IAPAR), Londrina, PR, and at the Experimental Station of Federal University of Parana, Paranavaí-PR. The serial dilutions of sugarcane tissue and rizosferico soil were inoculated in the following semi-solid media: NFB for the isolation of *Azospirillum brasiliense* and *A. lipoferum*, LGI-P for *Gluconacetobacter spp* and LGI for *A. amazonense*. The number of the

diazotrophs population was performed through the Most Probable Number method (MPN), based on the presence of the pellicles formed in the semi-solid media. The isolation was made from the bottles of the last dilution with positive growth. We observed a high number of diazotrophic bacteria in all parts of the sugar cane plant (root, stem, leaf) and soil in the varieties tested, varying from 5,42 a 7,33 ( $\log_{10}$  number of bacteria/g wet material). The results showed the presence of bacteria *Azospirillum brasiliense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense* and *Gluconacetobacter* spp in seven varieties and in all parts of the plant and rhizosphere soil. At the end of the process of isolation, 26 isolates were obtained in semi-solid media NFB, 21 in P-LGI and 20 in LGI.

**KEYWORDS:** Biological fixation of nitrogen, *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*.

## INTRODUÇÃO

Os microrganismos do solo têm um papel chave no equilíbrio e sustentabilidade dos solos, desempenhando um importante papel na ciclagem de nutrientes. Dentre os processos realizados por esses microrganismos destaca-se a fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN), que é realizada por microrganismos diazotróficos. Os diazotróficos podem ser de vida livre, estar associados a espécies vegetais ou, ainda, estabelecer simbiose com leguminosas. Além da fixação biológica de nitrogênio, as bactérias diazotróficas podem promover o crescimento do vegetal através da produção de substâncias promotoras de crescimento (auxinas), que aumentam o tamanho e a superfície radicular podendo contribuir para melhor absorção de nutrientes e água do solo (MOREIRA et al., 2010).

A associação de bactérias diazotróficas com diversas culturas tem sido bastante estudada, devido ao potencial de contribuir para o aumento da produtividade das culturas, redução dos custos de produção ao diminuir a quantidade de adubos nitrogenados aplicados além de diminuir a possibilidade de contaminação do meio ambiente.

A cana-de-açúcar é uma das culturas que mais se beneficia com a fixação biológica de nitrogênio (PERIN, 2007). Apesar da cultura da cana-de-açúcar apresentar grande demanda por nitrogênio, na maioria das vezes não responde, de maneira consistente, à adubação nitrogenada. Desta forma tem sido sugerido que significativa parte do nitrogênio utilizado pela planta é proveniente do solo ou de processos naturais. Estima-se que a fixação biológica de nitrogênio na cana-de-açúcar no Brasil, pode gerar uma economia de N-fertilizante equivalente a US\$ 200 milhões, além da contribuição para a conservação do meio ambiente (URQUIAGA et al., 2005).

Assim, os estudos sobre a fixação biológica de nitrogênio associada à cana-de-açúcar tem se intensificado nos últimos anos e varias bactérias fixadoras de  $N_2$  foram isoladas de tecidos de diversas partes da planta (BALDANI et al., 2002). Dentre essas podemos encontrar representantes do gênero *Azospirillum*, *Gluconocetobacter*, *Herbaspirillum* e *Klebsiella*.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo verificar a ocorrência e o isolamento de bactérias diazotróficas em diferentes variedades de cana-de-açúcar.

## METODOLOGIA

As amostras foram coletadas na Estação Experimental do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Londrina, PR, e na Estação Experimental da Universidade Federal do Paraná, Paranavaí, PR. Foram coletadas amostras de tecido vegetal (raízes, tolete e folhas) de sete variedades de cana-de-açúcar e de solo da rizosfera. As variedades utilizadas (RB 85-5546, RB 84-5210, RB 85-5156, RB 72-454 e RB 86-7515) apresentavam diferentes comportamentos com relação à exigência ao nitrogênio e às variedades SP 71-1405 e SP 79-1011.

Na avaliação de ocorrência e de isolamento, 10 g do tecido vegetal (raízes, tolete e folhas) foram triturados em liquidificador com 90 mL de solução salina (8,5 g L<sup>-1</sup> NaCl) e 10 g de solo foram transferidos para frascos contendo 90 mL de salina permanecendo sob agitação constante para fragmentação dos agregados. As amostras foram submetidas a diluições sucessivas de 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-7</sup>, e, de cada diluição, 0,1 mL foi inoculado em 5 mL dos meios semi-sólido, LGI-P para o isolamento de *Gluconacetobacter spp*, NFB para *Azospirillum brasiliense* e *A. lipoferum* e LGI para *A. amazonense* em três repetições. Os frascos inoculados foram incubados por sete dias, a 28 °C no escuro, sendo considerados positivos para a contagem aqueles que apresentaram a formação da película característica produzida por esses microrganismos. A contagem da população de bactérias diazotróficas foi realizada através da técnica do Número Mais Provável (NMP), baseado na presença da película formada no meio semi-sólido, utilizando a tabela de McCrady para três repetições por diluição (DÖBEREINER et al., 1995).

Os frascos com crescimento positivo foram utilizados para repicagem em placas contendo meio sólido de enriquecimento para cada microrganismo a ser isolado, acrescido de 20 mg de extrato de levedura. Para a purificação, as colônias formadas no meio sólido foram novamente transferidas para meios de cultura semi-sólidos e, após isso, transferidas para placas de Petri contendo meio Ágar-Batata (BALDANI & DÖBEREINER, 1980). Uma vez isoladas, as colônias foram liofilizadas, armazenadas em glicerol no ultrafreezer a -80 °C, e identificadas de acordo com a sua procedência.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado alto número de bactérias diazotróficas em todas as partes da planta de cana-de-açúcar (raiz, tolete e folha) e solo nas variedades avaliadas, variando de 5,42 a 7,33 (log<sub>10</sub> número de bactérias/g material úmido).

O maior número de bactérias diazotróficas foi observado nas raízes e o menor número na folha e tolete, com exceção do meio LGI-P onde o menor valor foi observado na folha (Tabela 1). Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos com cana-de-açúcar que mostraram maior número de bactérias diazotróficas dos gêneros *Gluconacetobacter* (PERIN, 2003), *Azospirillum* e *Herbaspirillum* (REIS JUNIOR et al., 2000) no sistema radicular. Isso ocorre pelo fato das raízes das plantas fornecerem nos seus exsudatos, substâncias ricas em carboidratos, ácidos orgânicos e vitaminas e, o solo contribuir com macro e micronutrientes, possibilitando assim, o desenvolvimento de grande número de bactérias próximo às raízes (PERIN, 2007).

O número elevado de bactérias diazotróficas associadas ao tolete sugere a potencialidade da transmissão desses microrganismos através de material vegetal, confirmando observações anteriores feitas por SILVA et al., (2007) que encontraram um número significativo de bactérias diazotróficas em colmos da cultura do arroz

irrigado. Entretanto em outro estudo foi verificado que nos colmos e folhas, a população manteve-se em números relativamente baixos ao longo do ciclo da cana-de-açúcar, independentemente da variedade e época de coleta (GOMES et al., 2005).

**TABELA 1.** NMP de bactérias diazotróficas (transformados para  $\text{Log}_{10}$ ) associados às partes vegetativas da cana-de-açúcar e solo

<b>Partes da Planta e Solo</b>	<b>Meio NFB</b>	<b>Meio LGI-P</b>	<b>Meio LGI</b>
Raiz	6,94 a	6,89 a	7,28 a
Solo	6,24 ab	6,37 ab	6,64 ab
Folha	5,50 b	5,50 b	5,69 b
Tolete	5,42 b	5,86 ab	5,69 b

As letras comparam as médias na coluna entre as partes da planta dentro do meio de cultura pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Valores médios dos 7 genótipos avaliados.

Com relação à população dos microrganismos nas diferentes variedades de cana-de-açúcar, os maiores números de bactérias diazotróficas foram observados na variedade RB 85-5546, considerada exigente ao nitrogênio, diferindo significativamente apenas das variedades SP 71-1405 e SP 79-1011 nos meios NFB e LGI-p respectivamente, enquanto que no meio LGI não houve diferença entre as variedades avaliadas (Tabela 2). O fato da variedade RB 85-5546 apresentar maior população de microrganismos diazotróficos pode ser uma evidência do papel destas bactérias no fornecimento do nitrogênio à planta, considerada exigente a altos teores de nitrogênio no solo.

Em estudos anteriores a variedade RB 72-454 foi considerada como uma das mais eficientes, juntamente com outras variedades utilizadas (RB 73-9735, RB 82-5336 e SP 70-1143), quanto ao ganho de N pelo processo de fixação biológica de  $\text{N}_2$  aos seis meses de cultivo (COELHO et al., 2003). Entretanto, no presente estudo a RB 72-454 apresentou nível intermediário de número de bactérias diazotróficas, comparado com as variedades classificadas como exigentes e aquelas pouco e não exigentes ao nitrogênio. Assim, as variedades que são consideradas como não exigentes aos altos teores de nitrogênio no solo, seriam naturalmente selecionadas para ambientes com baixos teores do nutriente, podendo assim, apresentar maior eficiência de FBN. Entretanto, o menor número de bactérias diazotróficas, comparativamente com outras variedades, não implica, de maneira obrigatória, em menor eficiência de FBN.

Deve ser salientado também que o número de bactérias diazotróficas presentes nos tecidos vegetais das plantas, bem como a eficiência destas bactérias na FBN pode variar devido às condições ambientais. Por exemplo, estudos com a variedade SP 70-1143 que anteriormente havia sido considerada altamente promissora para a FBN (URQUIAGA et al., 1992) apresentou os menores valores de eficiência da FBN, comparado com outras variedades (COELHO et al., 2003).

Tem sido evidenciado também que o processo de melhoramento genético da cana-de-açúcar tem selecionado variedades cada vez mais adaptadas às condições de baixa disponibilidade de N no solo (COELHO et al., 2003). O que de certa forma pode otimizar a contribuição do processo de FBN na cultura (REIS et al., 2000).

**TABELA 2.** NMP de bactérias diazotróficas (transformados para Log<sub>10</sub>) associadas às variedades de cana-de-açúcar

Variedades	Meio NFB	Meio LGI-P	Meio LGI
RB 85-5546 Exigente	7,33 a	7,17 a	6,74 a
RB 84-5210 Pouco exigente	6,30 ab	6,63 ab	6,63 a
RB 72-454 Pouco exigente	6,03 ab	6,58 ab	6,57 a
RB 86-7515 Não exigente	5,97 ab	6,34 ab	6,34 a
RB 85-5156 Não exigente	6,19 ab	5,9 ab	5,9 a
SP 71-1405	4,72 b	5,59ab	6,01 a
SP 79-1011	5,64 ab	4,87 b	5,63 a

As letras comparam as médias na coluna dentro do meio de cultura pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados referentes as médias das partes vegetativas e solo dentro de cada variedade.

Os resultados da ocorrência de bactérias diazotróficas associadas às variedades de cana-de-açúcar mostraram a presença das bactérias *Azospirillum brasiliense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense* e *Gluconacetobacter spp* nas sete variedades e em todas as partes da planta e solo rizosférico. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos da ocorrência de bactérias em diferentes genótipos de cana-de-açúcar que demonstraram a presença dessas bactérias (REIS JUNIOR et al., 2000) .

Ao final do processo de isolamento, foram obtidos 26 isolados em meio de cultura NFB, 21 em meio LGI-P e 20 em meio LGI (Tabela 3). O maior número de isolados foi obtido em meio de cultura NFB que favorece o crescimento de *Azospirillum brasiliense* e *A. lipoferum*.

Os isolados obtidos foram incluídos na coleção de Microrganismos Diazotróficos do Laboratório de Microbiologia do Solo do IAPAR e estão sendo caracterizados quanto a sua morfologia e fisiologia.

**TABELA 3.** Números de isolados obtidos pelos diferentes meios de cultura nas diferentes partes da planta da cana-de-açúcar

Partes da Planta	Meio NFB	Meio LGI-P	Meio LGI
Raiz	2	6	5
Folha	10	5	5
Tolete	9	5	5
Solo	5	5	5

## CONCLUSÃO

Os resultados mostraram a ocorrência de grande número de bactérias diazotróficas associadas às diferentes partes da planta e no solo rizosférico das variedades de cana-de-açúcar, com predominância de *Azospirillum brasiliense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense* e *Gluconacetobacter spp* nas sete variedades estudadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane – reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, v. 29, p. 417-423, 2002.

BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum spp*. **Soil Biology and Biochemistry, Oxford**, v. 12, n. 4, p. 433-439, 1980.

COELHO, C. H. M. et al. Identificação de genótipos de cana-de-açúcar quanto ao potencial de contribuição da fixação biológica de nitrogênio. **Agronomia**, v. 37, n. 2, p. 37-40, 2003.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Itaguaí: **Embrapa-CNPAB**, 1995, 60p.

GOMES, A. G.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R. Relação entre distribuição de nitrogênio e colonização por bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.40, n.11, p.1105-1113, 2005.

MOREIRA, F. M. S; Silva, K; NÓBREGA, R. S. A; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.

PERIN, L. **Ecologia e diversidade de isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* associados à cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum spp*)**. 2003, 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciências do solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

PERIN, L. **Estudos da comunidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em associação com cana-de-açúcar e descrição de *Burkholderia silvatlantica***. 2007. 88p. Tese (Doutorado em Agronomia - área de concentração em ciência do solo), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

REIS JUNIOR, F. B.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 985-994, 2000.

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

SILVA, D. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; JACQUES, R. J. S.; VOSS, M. Bactérias Diazotróficas nas folhas e colmos de plantas de arroz irrigado (*Oryza sativa* L.). **R. Bras. Agrociência**, Pelotas, v. 13, n. 2, p.181-187, 2007.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, p. 105-114, 1992.

URQUIAGA, S.; JANTALIA, C. P.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Contribuição da FBN na produtividade dos sistemas agrícolas na América Latina. Em: *Processo Biológicos no sistema Solo-Planta*. AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. (Ed), **Embrapa Agrobiologia**, Brasília, DF, 2005. 368p.