

MEMÓRIA
CPATC
Pesq. And. 23/97

pa

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária dos Tabuleiros Costeiros
Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Av. Beira-Mar 3.250, CP 44, CEP 49001-970 Aracaju SE
Fone (079) 217 1300 Fax (079) 231 9145 Telex 792318 EBPA
E-mail postmaster@cpatc.embrapa.br

PESQUISA EM ANDAMENTO

Nº 23, CPATC, junho/97, p.1-3

QUANTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIADAS A COQUEIRO (*Cocos nucifera* L.)

Marcelo Ferreira Fernandes¹
Roberta Pereira Miranda Fernandes²

Embora as bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* sejam as de maior importância econômica na agricultura, diversas outras bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico têm sido relatadas.

Essas bactérias não formam simbioses especializadas como as observadas entre os rizóbios e diversas leguminosas, mas podem ser encontradas livremente no solo ou estabelecendo relações denominadas associativas com diversas plantas não-leguminosas. Essas bactérias, denominadas diazotróficas, já foram encontradas em associação com cana-de-açúcar, cereais (trigo, arroz, milho), fruteiras, palmeiras, etc.

O isolamento, a identificação e a seleção de bactérias fixadoras do nitrogênio são de grande importância, já que a obtenção de sistemas simbióticos de alta eficiência pode representar uma grande economia de adubos minerais nitrogenados e reduzir os riscos de contaminação ambiental por esses fertilizantes.

O presente estudo tem como objetivo avaliar a presença dessas bactérias em coqueiros, bem como sua quantificação, isolamento e caracterizações morfológica, cultural e bioquímica e quanto à capacidade de fixação de nitrogênio.

Foram coletadas amostras de folha, raízes e solo rizosférico de coqueiros híbridos PB121 (anão-amarelo-da-malásia x gigante-do-oeste-africano - Goa), com 15 anos de idade, em Aracaju-SE.

Uma parte das amostras de folhas e raízes foram desinfetadas superficialmente, procedendo-se para isso, uma limpeza da superfície foliar com algodão embebido em álcool 70% e a imersão seqüenciada das raízes em soluções de cloramina-T (1%, 1h), água destilada (20min), tampão fosfato (0,5M, 20min) e água destilada (20min). A outra parte das folhas não foi submetida à limpeza com o álcool, e a de raízes ficou submersa em água destilada por um período equivalente ao necessário para o procedimento completo de desinfecção das raízes descrito acima (2h). Essa desinfecção de folhas e raízes permite determinar se os microrganismos isolados estão localizados superficialmente ou no interior desses órgãos.

¹ Eng.-Agr., M.Sc., Embrapa/CPATC, Av. Beira Mar, 3250, Caixa Postal 44, CEP 49001-970, Aracaju-SE.

² Bióloga, M.Sc., UFS, Cidade Universitária, Prof. José Aloísio de Campos, s/n, Rosa Elze, CEP 49100.000, São Cristóvão-SE.



Em seguida, procedeu-se à remoção do excesso de água utilizando-se papel absorvente. Pesaram-se 20g de folha e 15g de raízes provenientes de cada tratamento (com e sem desinfecção). Cada um desses materiais foi triturado em liquidificador, por 5 minutos, em 150ml de solução salina (0,9%, NaCl).

Os extratos obtidos foram diluídos 10^4 , 10^5 e 10^6 vezes, em solução salina. Três frascos de 10 ml, contendo 5ml de cada um dos seguintes meios semi-sólidos: LG (para isolamento de *Azotobacter* e *Azomonas* spp), NFb (para *Azospirillum*), JNFb (para *Herbaspirillum* spp.) e LGI-P (para *Acetobacter diazotrophicus*) foram inoculados com 0,1 ml de cada uma das diluições dos diferentes extratos obtidos.

Os frascos foram incubados por sete dias, em temperatura ambiente (mínima de 27°C e máxima de 31°C). Após este período foram feitas observações da formação da película característica do crescimento de bactérias diazotróficas, nos meios semi-sólidos.

Cada frasco que apresentou esta película foi considerado como positivo para a determinação do número mais provável de diazotróficos, por grama do material vegetal a partir do qual foram obtidos.

Os resultados do número mais provável para o solo e para os órgãos da planta, submetidos ou não à desinfecção superficial, encontram-se na Tabela 1.

TABELA 1. Número mais provável de diazotróficos por grama de folha e raízes de coqueiro, submetidas ou não à desinfecção superficial, e por grama de solo rizosférico desta planta, nos diferentes meios seletivos usados.

Meios de cultura utilizados	Folha		Raiz		Solo rizosférico
	com desinfecção superficial	sem desinfecção superficial	com desinfecção superficial	sem desinfecção superficial	
Meio LG	1.5×10^2	3.0×10^2	4.7×10^2	1.0×10^3	3.0×10^2
Meio NFb	1.0×10^3	1.5×10^3	1.0×10^3	2.0×10^3	3.0×10^2
Meio JNFb	2.2×10^4	2.2×10^4	2.7×10^3	9.3×10^4	1.1×10^5
Meio LGI-P	7.0×10^2	7.0×10^2	1.3×10^3	1.3×10^3	3.5×10^3

Após quantificação, procedeu-se à repicagem das bactérias dos tubos positivos para novos frascos contendo o mesmo meio de cultura a partir do qual essas foram repicadas. Esta operação foi repetida mais duas vezes, excluindo-se sempre os frascos que não apresentaram a película característica. Após esta série de transferências, realizou-se a riscagem das culturas em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) sólido com o objetivo de isolar as bactérias existentes em cada frasco. Após este isolamento, três colônias morfológicamente distintas, de cada placa, foram repicadas para novos frascos contendo o mesmo meio semi-sólido do qual estas foram provenientes.

Após 7 dias de incubação, procedeu-se novamente o descarte dos frascos sem película dos diazotróficos, obtendo-se, nesta fase, 58 isolados de bactérias diazotróficas do coqueiro. A distribuição desses isolados, de acordo com a origem, o tratamento de desinfecção e o meio de cultivo, encontram-se na Tabela 2.

TABELA 2. Número de isolados de diazotróficos obtidos até o momento, de acordo com a origem de isolamento, com o tratamento de desinfecção superficial e meio seletivo utilizado para o isolamento.

Meios de cultura utilizados	Folha		Raiz		Solo rizosférico
	com desinfecção superficial	sem desinfecção superficial	com desinfecção superficial	sem desinfecção superficial	
Meio LG	6	6	3	1	2
Meio NFb	2	2	3	6	2
Meio JNFb	2	3	4	6	3
Meio LGI-P	0	0	0	2	0

Esses isolados foram caracterizados quanto à capacidade de alterar o pH do meio de cultura, observando-se a modificação causada pelo crescimento desses isolados na coloração dos meios. As porcentagens de diazotróficos acidificantes, alcalinizantes e que não modificaram o pH, dentro de cada um dos tratamentos encontram-se na Tabela 3.

TABELA 3. Porcentagens dos diazotróficos isolados que resultaram em acidificação, alcalinização ou que não alteraram o pH do meio de cultura, de acordo com a origem de isolamento, com o tratamento de desinfecção superficial e meio seletivo utilizado para o isolamento. O primeiro número indica a porcentagem de diazotróficos acidificantes, o segundo, a de alcalinizantes e o terceiro, a dos que não alteraram o pH.

Meios de cultura utilizados	Folha		Raiz		Solo rizosférico
	com desinfecção superficial	sem desinfecção superficial	com desinfecção superficial	sem desinfecção superficial	
Meio LG	100-0-0	100-0-0	100-0-0	100-0-0	100-0-0
Meio NFb	0-100-0	0-100-0	0-100-0	0-100-0	0-100-0
Meio JNFb	0-0-100	0-66-33	0-50-50	0-100-0	0-0-100
Meio LGI-P	-	-	-	0-100-0	-

Esses isolados serão avaliados quanto à capacidade de fixação biológica do nitrogênio utilizando-se a técnica de redução do acetileno, por meio de cromatografia gasosa. Após esta avaliação, os isolados que apresentaram maior eficiência de fixação biológica serão caracterizados morfológica e bioquimicamente, de forma a serem obtidas informações que auxiliem na identificação das espécies de diazotróficos isoladas.