

Associação de Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas do Gênero *Azospirillum* com Diferentes Espécies de *Brachiaria*



Documentos 81

Associação de Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas do Gênero *Azospirillum* com Diferentes Espécies de *Brachiaria*

Fábio Bueno dos Reis Junior
Kátia Regina dos Santos Teixeira
Segundo Urquiaga
Verônica Massena Reis

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Cerrados

BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza

Caixa Postal 08223

CEP 73310-970 Planaltina - DF

Fone: (61) 388-9898

Fax: (61) 388-9879

<http://www.cpac.embrapa.br>

sac@cpac.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Dimas Vital Siqueira Resck*

Editor Técnico: *Carlos Roberto Spehar*

Secretária-Executiva: *Nilda Maria da Cunha Sette*

Supervisão editorial: *Jaime Arbués Carneiro*

Revisão de texto: *Maria Helena Gonçalves Teixeira*

Jaime Arbués Carneiro

Normalização bibliográfica: *Shirley da Luz Soares*

Capa: *Leila Sandra Gomes Alencar*

Foto da capa: *Leo Nobre de Miranda*

Editoração eletrônica: *Leila Sandra Gomes Alencar*

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Souza*

Jaime Arbués Carneiro

Impresso no Serviço Gráfico da Embrapa Cerrados

1ª edição

1ª impressão (2003): tiragem 100 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Cerrados.

-
- A849 Associação de bactérias promotoras de crescimento de plantas do gênero *Azospirillum* com diferentes espécies de *Brachiaria* / Fábio Bueno dos Reis Junior... [et al.]. – Planaltina : Embrapa Cerrados, 2003.
52 p. – (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111; 81)

1. Pastagem - Braquiária. 2. Gênero *Azospirillum*. I. Reis Júnior, Fábio Bueno. II. Série.

633.2 - CDD 21

© Embrapa 2003

Autores

Fábio Bueno dos Reis Junior

Eng. Agrôn., Ph.D., Embrapa Cerrados,
fabio@cpac.embrapa.br

Kátia Regina dos Santos Teixeira

Biól., Ph.D., Embrapa Agrobiologia
katia@cnpab.embrapa.br

Segundo Urquiaga

Eng. Agrôn., Ph.D., Embrapa Agrobiologia
urquiaga@cnpab.embrapa.br

Verônica Massena Reis

Eng. Agrôn., Ph.D., Embrapa Agrobiologia
veronica@cnpab.embrapa.br

Apresentação

Devido a importância da atividade agropecuária para a economia do país, são justificáveis os estudos englobando a fixação biológica de nitrogênio em gramíneas forrageiras, já que a limitação do nitrogênio em pastagens é tida como um dos principais fatores que levam a sua degradação. Esta “Série Documentos” traz informações relevantes sobre o tema e apresenta resultados de um trabalho mostrando a associação de importantes bactérias fixadoras de nitrogênio com diferentes espécies de *Brachiaria*, abordando aspectos como a influência do genótipo da planta, do clima e do manejo das pastagens sobre a população destes microrganismos. Trabalhos como este contribuem com informações importantes para a geração de conhecimento sobre a FBN nestes sistemas. Esperamos que, no futuro, este conhecimento gerado possa vir a contribuir para a sustentabilidade das pastagens, representando um melhor uso da terra com a consequente preservação dos ecossistemas ainda intactos.

Roberto Teixeira Alves
Chefe-Geral da Embrapa Cerrados

Sumário

Introdução	9
A situação das pastagens no Brasil	9
Pastagens de braquiária	10
Impacto ambiental das pastagens de <i>Brachiaria</i>	12
Degradação de pastagens	13
Utilização de leguminosas em pastos de <i>Brachiaria</i>	15
Fixação biológica de nitrogênio por bactérias associadas a <i>Brachiaria</i> spp.	16
O gênero <i>Azospirillum</i>	17
Material e Métodos	20
Locais de Implantação dos experimentos	20
Sítio de Goiás	20
Sítio da Bahia	22
Isolamento, caracterização e quantificação de bactérias diazotróficas ...	23
Análise estatística	24
Atividade da nitrogenase	25
Produção de hormônio de crescimento (AIA – ácido indol acético) por isolados de <i>A. amazonense</i>	26
Resultados e discussão	28

Isolamento, caracterização e quantificação de bactérias diazotróficas ...	28
Isolamento e caracterização	28
<i>Coletas exploratórias (pré-experimentais)</i>	28
Quantificação de <i>Azospirillum</i> spp. associados as raízes de <i>Brachiaria</i>	
(NMP)	31
Sítio experimental de Goiás	31
Sítio experimental da Bahia	34
Atividade da nitrogenase	38
Produção de hormônio de crescimento (AIA – ácido indol acético) por	
isolados de <i>A. amazonense</i>	40
Conclusões	41
Referências Bibliográficas	42
Abstract	52

Associação de Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas do Gênero *Azospirillum* com Diferentes Espécies de *Brachiaria*

Fábio Bueno dos Reis Junior

Kátia Regina dos Santos Teixeira

Segundo Urquiaga

Verônica Massena Reis

Introdução

A situação das pastagens no Brasil

O Brasil, em 1998, detinha cerca de 20% de sua área agricultável coberta por pastagens, segundo a FAO, algo em torno de 185 milhões de hectares (atrás apenas de Austrália, China e Estados Unidos), possuindo o maior rebanho bovino comercial do planeta, com cerca de 159 milhões de cabeças. No entanto, em termos comparativos, a realidade brasileira não é tão satisfatória. A lotação média das pastagens está em torno de 0,85 cabeça por ha, menos da metade das lotações médias em países como a França, Nova Zelândia e Inglaterra. Nesses países, a predominância da exploração pecuária é baseada no uso de espécies C3, principalmente azevém perene (*Lolium perenne* L.), plantas com potencial produtivo menor que espécies C4, mais utilizadas no Brasil, como *Panicum maximum*, *Pennisetum* spp. e *Brachiaria* spp. Além disso, as condições de inverno dos países mencionados são extremamente rigorosas, resultando em estações de crescimento muito curtas e necessidade de confinamento dos animais. Quando todos esses fatores são considerados em conjunto, os índices zootécnicos e de produtividade da pecuária nacional tornam-se medíocres ([Silva & Sbrissia, 2000](#)). Para melhorar essa situação, deve-se salientar que as plantas forrageiras, quando consideradas dentro de um ambiente de pastagens, integram um ecossistema dinâmico e complexo. Perturbações naturais como pragas, doenças e seca ou manejo inadequado, conduz, invariavelmente, a uma queda na produtividade global do sistema e em sua rentabilidade.

Pastagens de braquiária

Capins do gênero *Brachiaria* desempenham um papel primordial na produção de carne e leite, por viabilizarem a pecuária em solos ácidos e de baixa fertilidade, predominantes no Cerrado, e por criarem novos pólos de desenvolvimento, graças a uma pujante indústria de produção de sementes, colocando o Brasil como o maior exportador desse insumo para o mundo tropical.

O gênero *Brachiaria* é considerado pantropical, com o seu centro de origem e diversidade na África. Muitas espécies de braquiárias são extensivamente utilizadas nas regiões de savanas e em regiões de florestas tropicais, na alimentação de ruminantes. As espécies utilizadas nos experimentos deste trabalho e suas principais características agrônômicas e exigências edafoclimáticas são apresentadas na [Tabela 1](#).

De maneira geral, o fósforo (P) é considerado o elemento mais limitante ao crescimento das forrageiras, por estar abaixo dos níveis críticos nos solos tropicais. Ademais, em pastagens formadas exclusivamente por gramíneas, o nitrogênio (N) é, geralmente um dos principais nutrientes limitantes da produtividade ([Lira et al., 1994](#)).

A maioria das espécies comerciais de *Brachiaria* são adaptadas a solos tropicais ácidos e de baixa fertilidade. [Rao et al. \(1996\)](#) citam alguns atributos para melhor explicar a adaptação dessas plantas a essas condições: (1) manutenção do crescimento radicular às expensas do crescimento da parte aérea; (2) aquisição e uso de nitrato e amônio como forma de nitrogênio; (3) aquisição de N via fixação biológica; (4) aquisição de P por meio de um sistema radicular intenso e associação com fungos micorrízicos; e (5) aquisição de Ca por meio de um sistema radicular extremamente ramificado com alto número de pontas de raízes ("root tips").

Em avaliação consensual de trabalhos de pesquisa em fertilidade do solo efetuados na Região do Cerrado, a Embrapa Gado de Corte e a Embrapa Cerrados sugeriram a formação de grupos de exigências edafoclimáticas para as espécies forrageiras mais cultivadas. Entre essas, se encontram várias espécies e cultivares de *Brachiaria*. Um gradiente decrescente de adaptação à fertilidade foi proposto e está apresentado na [Tabela 2](#), em que também são sugeridos níveis mínimos de saturação por bases para a implantação das pastagens. A sazonalidade na disponibilidade de água aliada a baixa fertilidade do solo, exige das plantas cultivadas um alto grau de adaptação, que é uma característica marcante das braquiárias.

Tabela 1. Exigências edafoclimáticas e agronômicas de três espécies de *Brachiaria*.

Espécie	Vantagem	Desvantagem
<i>B. decumbens</i>	Alta produtividade sobre uso intensivo, tolerância à baixa fertilidade, boa performance sob sombra, boa qualidade forrageira	Susceptibilidade à cigarrinha-das-pastagens, baixa adaptação a solos mal drenados, susceptibilidade à podridão foliar fúngica, ocorrência de fotossensibilização hepatógena
<i>B. brizantha</i>	Alta resistência à cigarrinha-das-pastagens, alta resposta à aplicação de fertilizantes, alta habilidade de cobertura do solo com domínio sobre invasoras, boa performance sob sombra, boa qualidade forrageira, alta produção de raízes e de sementes	Baixa adaptação a solos mal drenados, resistência moderada à seca, necessidade de solos medianamente férteis para persistência em longo prazo, susceptibilidade à mancha foliar fúngica
<i>B. humidicola</i>	Hábito estolonífero com grande habilidade de enraizamento nos entrenós, adaptação a solos de baixa fertilidade, habilidade de cobertura do solo com domínio sobre invasoras, adaptação a solos mal drenados, baixo requerimento de P e Ca, tolerância à cigarrinha-das-pastagens	Baixa produção de sementes, baixa digestibilidade da matéria seca, baixa concentração de N e Ca na forragem, susceptibilidade à ferrugem foliar, ocorrência de “cara inchada” em equínos

Tabela 2. Graus de adaptação em gradiente decrescente das principais forrageiras às condições de fertilidade do solo e níveis de saturação por bases recomendada para implantação na região dos cerrados.

Espécie	Grau de adaptação à fertilidade	Saturação por bases (%)
	Grupo 1 – Espécies pouco exigentes	
<i>Brachiaria humidicola</i>	Alto	30-35
<i>Andropogon gayanus</i>	Alto	
<i>Brachiaria decumbens</i>	Alto	
<i>Brachiaria ruziziensis</i>	Médio	
	Grupo 2 – Espécies exigentes	
<i>Brachiaria brizantha</i>	Médio a baixo	40-45
<i>Hyparrhenia rufa</i>	Baixo	
<i>Setaria anceps</i>	Baixo	
<i>Panicum maximum</i>	Baixo a muito baixo	
	Grupo 3 – Espécies muito exigentes	
<i>Pennisetum purpureum</i> (Napier, Taiwan A-146)	Muito baixo	45-55
<i>Cynnodum</i> spp.	Muito baixo	
Coastcross, Tifton.	Muito baixo	

Fontes: Macedo (1997); Vilela et al. (1999).

Impacto ambiental das pastagens de *Brachiaria*

[Boddey et al. \(1996\)](#), sugerem que o impacto ambiental de pastagens de *Brachiaria* é bastante positivo. As plantas proporcionam boa cobertura do solo; facilitam a infiltração d'água e previnem erosão; a lixiviação de nutrientes solúveis é mínima; a FBN associada com alguns genótipos de *Brachiaria* pode diminuir o risco de declínio da pastagem; o sistema radicular denso e profundo possibilita um maior seqüestro de carbono atmosférico comparado ao de pastagens nativas, portanto, a grande área ocupada por braquiárias pode ser um dreno de CO₂ com importância global. No entanto, a possível degradação dessas pastagens tem impacto especialmente negativo.

Degradação de pastagens

Apesar de apresentar aspectos positivos em relação ao impacto ambiental, as pastagens de *Brachiaria* geralmente apresentam sinais de degradação com o tempo. Declínio na produtividade com ingresso de ervas-daninhas são evidências do início desse processo ([Fischer & Kerridge, 1996](#)). Os solos ocupados por pastagens geralmente são marginais quando comparados aos usados pela agricultura de grãos. Esses solos apresentam problemas de fertilidade natural, topografia, pedregosidade ou limitações de drenagem. Portanto, é de esperar que as áreas de exploração pecuária apresentem problemas de produtividade e de sustentabilidade da produção ([Macedo, 2000](#)). A degradação de pastagens, segundo [Macedo \(1995\)](#), pode ser definida como um processo evolutivo de perda de vigor, de produtividade, de capacidade de recuperação natural das pastagens para sustentar os níveis de produção e qualidade exigida pelos animais, assim como o de superar os efeitos nocivos de pragas, doenças e invasoras, culminando com a degradação avançada dos recursos naturais em razão de manejos inadequados.

As causas mais importantes para a degradação das pastagens podem ser consideradas como as seguintes: germoplasma inadequado ao local; má formação inicial; manejo e práticas culturais inadequadas; ocorrência de pragas, doenças e plantas invasoras; manejo animal inadequado; ausência ou aplicação incorreta de práticas de conservação do solo ([Macedo, 2000](#)).

Em um estudo recente com pastagens degradadas de braquiária, em solos de Cerrado, mostrou-se que somente a adição de adubo nitrogenado poderia elevar consideravelmente a produção de pastagem, o que confirmou as suspeitas de que a perda de produção do pasto seria, principalmente, de ordem nutricional ([Boddey et al., 2000](#)). Na verdade, entre os fatores que levam a degradação, a limitação de N é um dos mais importantes ([Oliveira et al., 1997](#)). Tem sido demonstrado que o N pode ser removido do sistema solo-planta por meio da exportação por produto animal (carne, principalmente) e em maior quantidade por meio da volatilização do N depositado na forma de excretas bovinas ([Ferreira et al., 1995](#)). Em média 90% do total de N ingerido pelo animal retorna a superfície do solo na forma de urina e fezes ([Ball & Ryden, 1984](#)). 34 – 80% do N depositado na urina e aproximadamente 10% do N depositado nas fezes são perdidos por volatilização da amônia ou lixiviação ([Ferreira et al., 1995, 2000](#)).

A taxa de lotação dos animais nas pastagens também se apresenta como um fator importante no processo de degradação. Uma taxa muito elevada faz com que ocorra um decréscimo na deposição de liteira e conseqüentemente na reciclagem de N do sistema ([Boddey et al., 1994](#)). Assim, se existe limitação de nitrogênio, a pastagem se enfraquece e problemas como aparecimento de invasoras menos exigentes em nitrogênio, exposição do solo, compactação, erosão etc., causam degradação e torna cada vez mais difícil e caro a recomposição da pastagem ([Boddey et al., 2000](#)).

Vários têm sido os estudos que buscam encontrar uma forma de contornar o problema das perdas de N no sistema de pastagens e assim diminuir e/ou controlar sua degradação. As formas minerais desse elemento, NH_4^+ e NO_3^- , são altamente solúveis, e facilmente perdidas por lixiviação, volatilização de amônia, ou por redução do NO_3^- a formas gasosas (N_2O e N_2) por desnitrificação, por isso, as aplicações de adubo nitrogenado beneficiam a produtividade vegetal somente em curto prazo, tornando-se, para o caso das pastagens, inviável economicamente ([Boddey et al., 1993](#)).

As alternativas para um balanço de N mais sustentável nas pastagens buscam sistemas adequados de manejo do pasto e dos animais. Estudos anteriores mostraram que a adubação fosfatada, além de aumentar a produtividade vegetal da pastagem, também aumentou o teor de N (proteína) na gramínea. Os autores observaram um aumento da densidade das raízes e concluíram que o efeito positivo da adubação fosfatada foi devido a maior captação de N que, no tratamento sem P, foi perdido por lixiviação ([Boddey et al., 1993](#)). De acordo com [Boddey et al. \(2000\)](#), outra estratégia visando a diminuição das perdas de N, seria manter a pastagem sobre uma pressão de pastejo em que a quantidade de nutrientes reciclada no resíduo seja suficiente para atender à demanda da pastagem.

Para alcançar um balanço de N mais positivo, pode-se também contar com a fixação biológica de nitrogênio (FBN), via consórcio com leguminosas ou com a associação das plantas de *Brachiaria* com bactérias diazotróficas, como será visto a seguir.

Utilização de leguminosas em pastos de *Brachiaria*

Uma forma de aumentar o suprimento de N em pastagens é por meio da utilização de leguminosas em consórcio que, além de incorporarem N fixado simbioticamente, ainda contribuem efetivamente para a produção e sustentabilidade dos sistemas de pastejo, especialmente em regiões com limitações ambientais.

Diversos trabalhos com pastagens consorciadas mostram sua superioridade, quando comparadas às pastagens puras de gramíneas. Muitas espécies de leguminosas têm sido utilizadas em consórcio com diversas espécies de *Brachiaria*, mas poucas têm persistido depois do terceiro ano de utilização sob pastejo, possivelmente devido ao hábito de crescimento prostrado e agressividade da gramínea. Entre as espécies de *Brachiaria*, *B. humidicola* é conhecida como a mais agressiva ([Fischer & Kerridge, 1996](#)).

Em um estudo realizado em área de Cerrado, com um consórcio de *Brachiaria ruziziensis* com uma leguminosa forrageira (*Stylosanthes guianensis*), a produção vegetal e animal da pastagem consorciada foi bem superior a da pastagem em monocultura ([Ayarza et al., 1997](#)). [Zimmer & Correa \(1993\)](#) também mostraram o efeito positivo da consorciação de leguminosas em pastagens. Desse estudo, foi possível deduzir que a presença da leguminosa em consórcio, dependendo do manejo aplicado, pôde produzir resultados que se equiparam a pastos de gramínea pura adubados com até 100 kg N. ha⁻¹.

Em condições de solos ácidos e de baixa fertilidade do Cerrado, as leguminosas que mais têm persistido em consórcio com *Brachiaria* são: *Calopogonium muconoides*, *Stylosanthes guianensis* cvs. Bandeirante e Mineirão, *S. macrocephala* cv. Pioneiro e *Arachis pintoi* ([Valle et al., 2000](#)).

Tanto os dados experimentais obtidos por [Cadish et al. \(1994\)](#), quanto às simulações baseadas em modelos teóricos ([Thomas, 1992](#)), indicam que nessas regiões uma composição botânica contendo aproximadamente 30% de leguminosas na pastagem consorciada é suficiente para balancear as perdas de N do sistema e manter a produtividade vegetal e animal assim como a fertilidade do solo, em longo prazo.

Apesar de todos os resultados positivos, na prática, o uso da consorciação continua sendo pouco significativo. Diversos fatores têm limitado sua expansão, em geral o fracasso na utilização de pastagens consorciadas é atribuído à falta de persistência das leguminosas nas pastagens, a exigência de melhor manejo que pastagens de gramíneas puras, a necessidade de solos mais férteis, a susceptibilidade a doenças provocadas por fungos e nematóides ou, ainda, pelas leguminosas não se adaptarem às regiões de implantação.

Fixação biológica de nitrogênio por bactérias associadas a *Brachiaria* spp.

A primeira associação entre uma gramínea forrageira tropical e bactérias fixadoras de nitrogênio estudada detalhadamente, foi a descrita entre *Paspalum notatum* e *Azotobacter paspali* ([Döbereiner & Campelo, 1971](#)). Estimativas da FBN em cilindros com amostras de solo e plantas intactos utilizando a metodologia de redução de acetileno, mostraram valores na ordem de 340 g N.ha⁻¹.dia⁻¹. Experimentos com atmosfera enriquecida com ¹⁵N₂, conduzidos em vasos menores, apresentaram uma fixação de 110 g N.ha⁻¹.dia⁻¹ ([Neyra & Döbereiner, 1977](#)). [Boddey et al. \(1993\)](#), utilizando a técnica de diluição isotópica de ¹⁵N, demonstraram que *P. notatum* cv. Batatais conseguiu obter aproximadamente 10% do seu N (20 kg N. ha⁻¹. ano⁻¹) via fixação biológica.

Em *Brachiaria*, mesmo com as observações de perdas de N, existem relatos na literatura que indicam que alguns genótipos não apresentam reduções significativas em sua produtividade. Essas perdas de N poderiam estar sendo compensadas pela FBN que, pelos poucos estudos disponíveis poderia ser responsável pela introdução de 30 a 45 kg de N.ha⁻¹.ano⁻¹ no sistema solo-planta ([Boddey & Victoria, 1986](#); [Loureiro & Boddey, 1988](#)).

[Pereira et al. \(1981\)](#), já haviam demonstrado que diferentes espécies de *Brachiaria* parecem obter contribuições via FBN de forma diferenciada, com *B. radicans* apresentando atividade de redução de acetileno (ARA) muito inferior a *B. ruziziensis*. Os estudos para a quantificação da FBN efetuados por [Boddey & Victoria, \(1986\)](#), nos quais foi utilizada a metodologia de diluição isotópica de ¹⁵N, demonstraram que as espécies *B. decumbens* e *B. humidicola* receberam uma quantidade de N via FBN bem mais significativa que aquelas apresentadas por *B. radicans* e *B. ruziziensis*. [Loureiro & Boddey, \(1988\)](#), utilizando essa

mesma metodologia, demonstraram que as raízes de *B. humidicola* apresentaram um enriquecimento de ^{15}N (% ^{15}N) significativamente menor que as outras espécies estudadas, sugerindo assim uma maior contribuição da FBN para essa espécie.

Embora esses estudos tenham mostrado que as contribuições da FBN não ultrapassaram 30% a 40% do N acumulado pelas plantas, é possível que, para sistemas de manejo mais extensivos em que as vias de perdas são menos expressivas, a quantidade de N fixado seja suficiente para proporcionar um balanço nulo ou até positivo de N para o sistema solo-planta, e com isso, permitir uma maior longevidade da pastagem com uma produtividade a nível aceitável.

A maioria dos estudos de isolamento e identificação de bactérias fixadoras de N_2 em gramíneas forrageiras ocorreram entre as décadas de 1960 e 1980. Nesse período alguns diazotróficos associados a *Brachiaria* spp. foram isolados, destacando-se dentre eles, as espécies do gênero *Azospirillum* ([Neyra & Döbereiner, 1977](#); [Döbereiner & Day, 1976](#)).

O gênero *Azospirillum*

[Döbereiner & Day \(1976\)](#), consideravam *Spirillum lipoferum*, logo depois reclassificada como *Azospirillum lipoferum*, a bactéria mais importante em relação à fixação biológica de nitrogênio associada a forrageiras tropicais. Em vários experimentos esses autores correlacionaram a atividade da nitrogenase em pedaços de raízes com a população de *Azospirillum lipoferum* encontrada, sugerindo ser esse microrganismo o principal responsável pela atividade da nitrogenase encontrada nessas raízes. No entanto, ao longo dos anos, novas bactérias desse e de outros gêneros foram sendo descobertas em associação com plantas forrageiras tornando mais difícil a determinação de qual ou quais microrganismos seriam realmente os principais responsáveis pela FBN. De acordo com a classificação de [Tarrand et al. \(1978\)](#), baseada na homologia de DNA de 60 estirpes oriundas de diferentes origens, duas espécies compunham esse gênero, *A. lipoferum* e *A. brasilense*.

Nos anos 80, uma bactéria com características semelhantes as do gênero *Azospirillum* foi isolada dos solos e raízes de gramíneas e algumas outras plantas, em várias localidades da Região Amazônica ([Magalhães, 1981](#)) e do Rio

de Janeiro ([Souto, 1982](#); [Baldani, 1984](#)). Pelas características apresentadas foi proposta a inclusão de uma nova espécie dentro desse gênero, denominada *Azospirillum amazonense* ([Magalhães et al., 1983](#)). Os estudos de [Souto \(1982\)](#), mostraram uma maior ocorrência de *A. amazonense* comparada com *A. lipoferum* e *A. brasilense*, em uma série de espécies forrageiras como *Digitaria decumbens* e *Pennisetum purpureum*. Contagens comparativas indicaram que *A. amazonense* ocorre em números mais altos do que as espécies conhecidas de *Azospirillum* e de *Beijerinckia*, em raízes de *Brachiaria humidicola* ([Magalhães & Döbereiner, 1984](#)).

Até o presente apenas três espécies das sete pertencentes ao gênero *Azospirillum* foram isoladas em associação com gramíneas forrageiras tropicais ([Baldani et al., 1997](#)), *A. lipoferum* ([Tarrand et al., 1978](#)), *A. brasilense* ([Tarrand et al., 1978](#)) e *A. amazonense* ([Falk et al., 1985](#)). Essas três espécies são também as que apresentam um maior espectro de hospedeiros ([Baldani et al., 1997](#)), ao contrário de *A. irakense* ([Khammas et al., 1989](#)) isolado apenas de plantas de arroz, *A. halopraeferans* ([Reinhold et al., 1987](#)) que apresenta uma associação rizosférica bastante específica com “kallar grass”, *A. largimobile* com ocorrência restrita às águas de um lago na Austrália ([Dekhil et al., 1997](#)) e *A. dobereineriae*, uma nova espécie isolada da gramínea *Miscanthus sinesensis* intimamente relacionada com as espécies *A. lipoferum*, *A. largimobile* e *A. brasilense* ([Eckert et al., 2001](#)).

Além da habilidade de fixar nitrogênio, as espécies que se associam com gramíneas forrageiras são capazes de produzir fitohormônios como o ácido-indol-acético ([Vande Broek & Vanderleyden, 1995](#)). Essas substâncias estimulam o desenvolvimento radicular, aumentando a densidade e crescimento das raízes laterais e sua área superficial (Okon & Labandera-Gonzalez, 1994).

Apesar desses organismos serem geralmente classificados como bactérias de rizosfera, colonizando principalmente a zona de alongação e os pêlos radiculares ([Döbereiner et al., 1995b](#)), algumas estirpes de *Azospirillum* também podem ser encontradas no interior do vegetal ([Döbereiner et al., 1995b](#); [Boddey & Döbereiner, 1995](#)). De acordo com resultados de estudos de infecção e colonização de plantas por *Azospirillum*, [Baldani et al. \(1997\)](#), propuseram o termo endófito facultativo para essas bactérias, capazes de infectar e colonizar o interior das plantas e, ao mesmo tempo, com boa capacidade de sobrevivência no solo.

Embora o gênero *Azospirillum* seja constituído de sete espécies, a quase totalidade dos experimentos de inoculação, feitos em mais de 20 anos, refere-se a *A. brasilense*, seguida de *A. lipoferum*, e apenas alguns poucos trabalhos, conduzidos no Brasil usaram estirpes de *A. amazonense* ([Baldani et al., 1999](#)). A maioria desses trabalhos de inoculação foi feita com cereais (trigo, arroz, milho), no entanto, também existem relatos do efeito da inoculação em gramíneas forrageiras. Nos Estados Unidos, experimentos de inoculação de *A. brasilense* feitos com as forrageiras *Pennisetum americanum*, *Panicum maximum* e *Digitaria decumbens*, indicaram que por volta de 40 kg N. ha⁻¹. ano⁻¹ eram fornecidos pela inoculação (Smith et al., 1978, citado por Okon & Labandera-Gonzalez, 1994). Em Israel, a inoculação com *A. brasilense* também causou incrementos significativos na produção de *Panicum miliaceum* ([Okon et al., 1988](#)). [Itzigsohn et al. \(2000\)](#) mostraram que a inoculação com *A. brasilense* aumentou a produção de pastagens nativas em regiões semi-áridas de Israel.

Avaliando dados de experimentos de inoculação com *Azospirillum* durante 20 anos em todo o mundo, Okon & Labandera-Gonzalez (1994), concluíram que esses organismos são capazes de promover incrementos na produtividade de importantes culturas em diferentes situações edafoclimáticas. O extenso número de dados avaliado por esses autores, mostra que entre 60% e 70% dos experimentos apresentam resposta positiva com aumentos estatisticamente significativos na ordem de 5 a 30%.

[Baldani et al. \(1999\)](#), destacam a importância de se considerar fatores como ambiente, estirpes e genótipos em estudos de inoculação e quantificação da FBN. Embora o termo especificidade hospedeira não seja usado para caracterizar essas associações, tem-se demonstrado que existe certa afinidade entre estirpes e cultivares ou entre a bactéria e espécies de plantas ([Baldani & Döbereiner, 1980](#); [Penot et al., 1992](#); [Boddey & Döbereiner, 1988](#)). Alguns autores sugerem, para trabalhos com inoculação, o uso de estirpes homólogas, isto é, isoladas do mesmo tipo de planta que se deseja inocular ([Boddey & Döbereiner, 1988](#)). Exemplos da influência do genótipo da planta sobre a FBN têm sido demonstrados em milho ([Garcia de Salomone et al., 1996](#)), trigo ([Avivi & Feldman, 1982](#)) e cana-de-açúcar ([Urquiaga et al., 1992](#)).

Embora alguns estudos pioneiros tenham demonstrado a presença de bactérias diazotróficas em *Brachiaria* spp., nenhum deles foi feito de forma regular e sequer por um intervalo de tempo de um ano com as plantas submetidas a

pastejo. Não existe até o momento nenhum registro de avaliação da população de diazotróficos inerente as áreas de pastagens em relação aos genótipos de *Brachiaria*. Como a população de microrganismos do solo e daqueles encontrados no interior das plantas está condicionada a própria vegetação, é possível que diferentes genótipos de *Brachiaria* possam exercer um efeito seletivo sobre esses, o que poderia resultar em diferentes respostas quanto à contribuição da FBN obtida por cada um desses genótipos.

Devido à importância da atividade agropecuária para a economia do país, é altamente justificável o estudo da sustentabilidade desse sistema, especialmente, no que se refere à contribuição da FBN, uma vez que se trata de uma característica adequada ao uso mínimo de insumo. Ainda sob o ponto de vista ambiental, a sustentabilidade do sistema de pastagem representará um melhor uso da terra com a conseqüente preservação dos ecossistemas ainda intactos. Neste trabalho objetivou-se estabelecer a influência da espécie de *Brachiaria*, manejo da pastagem e sazonalidade sobre as populações de bactérias do gênero *Azospirillum* associadas às raízes dessas plantas.

Material e Métodos

Locais de Implantação dos experimentos

Diferentes pastagens foram implantadas em regiões dos biomas Cerrado (Santo Antônio de Goiás, GO) e Mata Atlântica (Itabela, BA). Os experimentos foram compostos de piquetes de *Brachiaria humidicola*, *B. decumbens* cv. Basilisk e *B. brizantha* cv. Marandu, que foram divididos e conduzidos de forma a se manter duas taxas de lotação. Na primeira, menor taxa de lotação, a área era pastejada até as plantas chegarem a uma altura de 30 cm. Na segunda, maior taxa de lotação, a área era pastejada até as plantas chegarem a uma altura de 15 cm.

Sítio de Goiás

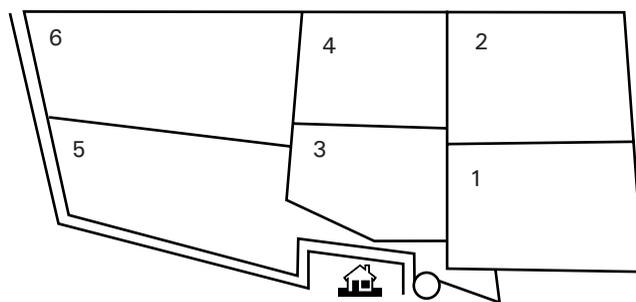
O experimento foi implantado no ano de 1998 na Fazenda Agropecuária Lopes, localizada ao lado da *Embrapa Arroz e Feijão*, no Km 12 da Rod. Goiânia – Nova Veneza, no município de Santo Antônio de Goiás – GO (16°28'S 49°17'W, Alt. 823 m). O sítio está situado em área do Cerrado brasileiro no Planalto Central. O solo da área foi classificado como um Latossolo Vermelho. A

vegetação nativa anterior à implantação das pastagens era composta de mata fechada (Cerradão), sendo desmatada mecanicamente entre 1989 e 1990, quando as pastagens foram implantadas.

Foi realizada a calagem via aplicação e incorporação de $1,5 \text{ t.ha}^{-1}$ de calcário dolomítico em toda a superfície do solo. Antes do plantio das forrageiras o solo foi adubado com cerca de 50 kg.ha^{-1} de P_2O_5 na forma de superfosfato simples.

A partir de 1990 os piquetes passaram a ser pastejados por gado mestiço anelado, para recria e engorda, em sistema de pastejo contínuo sem controle da pressão de pastejo nem da altura de corte das plantas forrageiras. O manejo dessas pastagens não incluiu o uso de fogo e nem de adubação de manutenção.

Com o início do projeto em 1998, cada piquete de espécie forrageira foi subdividido em dois. Em um deles a altura das plantas passou a ser mantida alta ($\sim 30 \text{ cm}$ de altura, menor taxa de lotação), e no outro, baixa ($\sim 15 \text{ cm}$, maior taxa de lotação). A área experimental constava de $24,06 \text{ ha}$, dividida em seis piquetes com sistema de cerca elétrica, com dois piquetes de *B. humidicola* de $4,25 \text{ ha}$, dois piquetes *B. brizantha* de $2,56 \text{ ha}$ e dois piquetes *B. decumbens* de $5,12 \text{ ha}$ (Figura 1).



Piquete	Espécie	Área(ha)
1 e 2	<i>Brachiaria humidicola</i>	4,25
3 e 4	<i>Brachiaria brizantha</i>	2,56
5 e 6	<i>Brachiaria decumbens</i>	5,12

Figura 1. Croqui da área experimental de pastagem, Fazenda Agropecuária Lopes – GO.

Essas áreas foram pastejadas com gado anelado em sistema de pastejo contínuo. Os animais foram divididos aleatoriamente pelos tratamentos sendo que cada piquete continha quatro animais fixos denominados “testers” e conforme a lotação desejada havia a inclusão de mais animais denominados de “volantes” que ficavam em pasto reserva quando não utilizados.

Na Tabela 3 são mostrados os resultados das análises químicas e granulométricas do solo deste experimento.

Tabela 3. Características químicas e classe textural do Latossolo Vermelho, na profundidade de 0-20 cm, utilizados no sítio experimental de Goiás.

pH/H ₂ O	Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	P	Textura
	cmol _c .dm ⁻³			mg.kg ⁻¹		
5,3	0,1	3,0	1,7	104,0	2,0	Franco Argiloso

Ca, Mg e Al extraídos em KCl 1N; K, e P extraídos em solução de Mehlich 1 (HCl 0,5 N + H₂SO₄ 0,025 N).

Sítio da Bahia

O experimento foi implantado na Estação de Zootecnia do Extremo Sul (ESSUL) do Centro de Pesquisa de Cacau (CEPEC/CEPLAC), localizado no município de Itabela – BA (16°39' S, 39°30' W), em região de Mata Atlântica. O solo foi classificado como um Podzólico Amarelo (Argissolo). Neste experimento, além dos diferentes sistemas de manejo, também foram avaliadas pastagens com diferentes idades, recém-implantadas (1998) e implantadas nos anos de 1990 (*B. decumbens*), 1988 (*B. humidicola*) e 1993 (*B. brizantha*).

Esse sítio experimental é uma propriedade do CEPLAC desde a década de 80, quando a área foi desmatada para a implantação de gramíneas forrageiras visando à pesquisa com gado bovino de corte como uma atividade alternativa ou complementar à lavoura cacauzeira na Região Sul da Bahia.

Por se tratar de uma área experimental, havia um bom controle da pressão de pastejo e da altura de corte das forrageiras. Adubações de cobertura e outras práticas de manejo eram aplicadas rotineiramente, quando necessário. O manejo das pastagens não incluía o uso do fogo. Para as pastagens implantadas em 1998 foi feita a calagem com aplicação de 1,5 t.ha⁻¹ de calcário dolomítico e adubação utilizando-se 50 kg P₂O₅.ha⁻¹ na forma de superfosfato simples no plantio.

Os tratamentos selecionados foram compostos de piquetes de 1,2 ha em média de *Brachiaria humidicola*, *B. decumbens* e *B. brizantha*, esses piquetes foram divididos ao meio, e, como no experimento de Goiás, na metade de cada área destinada a determinada espécie de *Brachiaria*, a altura das plantas passou a ser mantida alta (~ 30 cm de altura), e na outra metade a altura das plantas passou a ser mantida baixa (~ 15 cm). Essas áreas também foram pastejadas com gado anelorado em sistema de pastejo contínuo.

As características químicas e texturais dos solos deste experimento são mostradas na Tabela 4.

Tabela 4. Características químicas e classe textural do Podzólico Amarelo (Argissolo), na profundidade de 0-20 cm, utilizados no sítio experimental da Bahia. (Local e data do experimento)

Área	pH/H ₂ O	Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	P	Textura
		Cmol _c .dm ⁻³			mg.kg ⁻¹		
Antiga	5,8	0,2	2,6	1,5	78,0	2,0	Areia Franca
Recém implantada (1998)	5,5	0,2	2,2	0,9	98,0	4,0	Franco Arenoso

Ca, Mg e Al extraídos em KCl 1N; K, e P extraídos em solução de Mehlich 1 (HCl 0,5 N + H₂SO₄ 0,025 N).

Isolamento, caracterização e quantificação de bactérias diazotróficas

As amostras (três repetições) de raízes de cada um dos tratamentos experimentais foram coletadas aleatoriamente dentro de cada piquete. Essas coletas foram realizadas em diversas épocas do ano, abrangendo diferentes estações climáticas. As amostras de raízes coletadas foram lavadas e esterilizadas superficialmente para o experimento de Goiás e apenas lavadas para o experimento da Bahia. Nesses estudos foram utilizadas as técnicas tradicionais descritas por [Döbereiner et al. \(1995a\)](#).

As raízes das plantas foram cuidadosamente colhidas e lavadas em água corrente. Pesou-se 1 g de raízes lavadas dos diferentes tratamentos, e, quando necessário, procedeu-se a desinfestação superficial utilizando uma solução

aquosa de Cloramina T a 1% por 5 minutos, seguida de lavagem em tampão fosfato 100 μ M pH 6,8 e água estéril. A seguir, as raízes foram trituradas em 9 mL de solução salina (NaCl 0,85%), e a partir dessa diluição (10^{-1}), procedeu-se à diluição seriada tomando-se 1 mL da diluição original adicionando-o em 9 mL de solução salina.

Os meios de cultura utilizados nessa etapa foram, o meio JNFb para isolamento e quantificação de espécies do gênero *Herbaspirillum*, o meio NFb para as espécies *Azospirillum lipoferum* e *A. brasilense* e o meio LGI para a espécie *Azospirillum amazonense*, todos semi-sólidos sem adição de nitrogênio. Considerou-se como crescimento positivo a formação de uma película aerotóxica típica na superfície do meio depois de sete dias de incubação do mesmo em câmara de crescimento a 30 °C.

Os frascos com crescimento positivo, na mais alta diluição de cada um dos meios, foram utilizados na repicagem para um novo meio semi-sólido. Depois da incubação retiraram-se alíquotas que foram observadas ao microscópio de contraste de fase para a verificação da morfologia das células. Outra alíquota foi utilizada para riscagem em placas contendo meio sólido, com a mesma composição do meio semi-sólido, acrescidos de extrato de levedura. As colônias formadas nos meios sólidos foram repicadas para novo meio semi-sólido e, depois da formação de película característica, foram riscadas em placas de meio-batata para purificação final. A observação da morfologia das células, sob microscopia ótica de contraste de fase, e a morfologia das colônias nos meios semi-específicos (LGI, NFb e JNFb) e no meio rico (batata) foram utilizadas para agrupar as bactérias isoladas a partir de cada um dos genótipos de *Brachiaria*.

Com o material obtido da diluição seriada das amostras em solução salina (10^{-1} até 10^{-7}), a população de bactérias foi estimada utilizando o método do número mais provável (NMP), consultando a tabela de McCrady para 3 repetições por diluição.

Obs.: Nas coletas pré-experimentais (exploratórias), foram utilizadas e avaliadas amostras da rizosfera, raízes e folhas das plantas.

Análise estatística

Os resultados referentes às contagens do número de células pelo método do NMP, foram analisados segundo o fatorial 3 (espécies) x 2 (sistemas de manejo), com o fator coletas como um "Split Plot". Os resultados foram analisados com a

utilização do software MSTAT-C, versão 2.10 (MSTAT Director, Michigan State University). A análise foi conduzida considerando-se três repetições para cada um dos tratamentos.

Atividade da nitrogenase

Foram investigadas as variações na habilidade de fixação biológica de nitrogênio entre membros de populações naturais isolados de diferentes espécies de *Brachiarria* e estirpes padrão de *A. lipoferum*, *A. brasilense* e *A. amazonense*. Esses estudos foram feitos com a utilização da metodologia de redução de acetileno em cultura pura ([Han & New, 1998](#)). 50µL de inóculo, crescidos em meio Dygs por 24 h a 30 °C e com densidade ótica ajustada para 1,0 a 436 nm, foram transferidos para frascos com volume total de 10 mL contendo 5 mL de meio de cultura semi-sólido sem adição de nitrogênio e indicador (azul de bromotimol). Foram utilizadas três repetições para cada isolado. Esses frascos foram incubados a 30 °C por 72 h, passado esse período, suas rolhas de algodão foram trocadas por tampas de borracha (tipo "suba seal") esterilizadas, e com a utilização de uma seringa, 10% de sua fase gasosa foi substituída por gás acetileno. Depois de 1 h de incubação a redução do acetileno a etileno, reação governada pela enzima nitrogenase, foi estimada pela injeção de 0,5mL de amostra gasosa dos frascos em um cromatógrafo de gás Perkin Elmer, utilizando uma coluna Porapak N (2 mm x 3 mm) a 110°C e detecção por meio de chama ionizante na presença dos gases hidrogênio e ar comprimido, com nitrogênio sendo utilizado como gás de arraste.

Depois do término dos trabalhos de redução de acetileno, as células bacterianas foram misturadas ao meio de cultura com a utilização de um vortex para que fosse feita a determinação da concentração de proteínas, utilizando-se o método descrito por [Lowry et al. \(1951\)](#), com algumas modificações. Depois da mistura das células ao meio de cultura, adicionou-se 5 mL de NaOH 1 M seguido de homogeneização. Para cada uma das amostras, 1 mL dessa mistura foi transferido para tubos de ensaio cobertos com papel alumínio. Esses tubos foram incubados em banho-maria fervente por 5min. para promover a desnaturação das proteínas. Depois do resfriamento, foram adicionados 2,5mL de uma solução composta por 100mL de 50g Na₂CO₃.L⁻¹ H₂O destilada + 1mL de 10g CuSO₄.L⁻¹ H₂O destilada + 1mL de 20g de Tartarato duplo de Sódio e Potássio. L⁻¹ de H₂O destilada, seguidos pela incubação no escuro por 10min. Para promover a reação de formação de um complexo corado foram adicionados 0,5mL da solução de Folin (2mL do reativo de Folin em 8mL de H₂O destilada) a todos os tubos, os quais

foram agitados imediatamente. Posteriormente a uma incubação no escuro por 30 minutos, foi realizada a leitura da absorbância em comprimento de onda de 750nm em um espectrofotômetro Perkin Elmer (UV/VIS Lambda 11). A concentração de proteínas foi estimada com uma curva preparada utilizando-se concentrações de 0,0 a 0,3mg (em progressão de 0,03mg) de albumina bovina como padrão.

Produção de hormônio de crescimento (AIA – ácido indol acético) por isolados de *A. amazonense*

A capacidade de produção de AIA por isolados de *A. amazonense* provenientes de diferentes espécies de *Brachiaria* foi analisada pela utilização da metodologia colorimétrica descrita por [Sarwar & Kremer \(1995\)](#), com algumas modificações.

Culturas de células crescidas por 24h a 30 °C em meio LGI contendo 0,1% de KNO₃ (sem extrato de levedura, biotina e azul de bromotimol), tiveram sua densidade ótica ajustada para 0,5 a 500nm. Foram adicionados 2mL dessa suspensão a 28mL de meio de crescimento, o mesmo LGI acrescido de 100mg.mL⁻¹ de triptofano filtrado em millipore (0,2mm), dispostos em erlenmeyers de 50mL. Foram utilizadas três repetições para cada isolado. Os erlenmeyers foram incubados no escuro por 72h a 30 °C. Depois desse período, para a análise de auxinas as culturas foram ajustadas para 10⁸ células.mL⁻¹ a 436nm de absorbância com água estéril. Posteriormente essas células foram filtradas com a utilização de filtros “millipore” com malha de 0,2mm. Uma alíquota de 150mL do material filtrado foi aplicada em placa de poliestireno (capacidade para 300µL) devendo reagir com 100mL do reagente de Salkowisk (1mL de FeCl₃. 6H₂O 0,5M em 50mL de HClO₄ 35%). Depois da incubação a temperatura ambiente por 30 minutos, observou-se a formação de uma cor rósea e as leituras de absorbância foram realizadas utilizando um espectrofotômetro Labsystem Multskan Plus (Labsystems Oy, Helsinki, Finlândia) dotado de um filtro de interferência de 492nm e os dados armazenados e processados pelo programa Labsystems Transmit Multskan Plus for Windows. A concentração de AIA pôde ser estimada com uma curva preparada utilizando-se 0; 25; 50; 100; 150; 200; 200µM de autêntico AIA (também foram utilizadas três repetições para cada concentração de AIA).

Nas Tabelas 5 e 6, isolados de *Brachiaria* spp. e estirpes referência, respectivamente, são apresentadas as origens e a identificação das diversas estirpes utilizadas nos trabalhos de avaliação da ARA e produção de AIA.

Tabela 5. Estirpes de *A. brasilense* (tipo) e *A. amazonense* (tipo) utilizadas neste trabalho.

<i>A. brasilense</i> (tipo)			<i>A. amazonense</i> (tipo)		
<i>B. decumbens</i>	<i>B. humidicola</i>	<i>B. brizantha</i>	<i>B. decumbens</i>	<i>B. humidicola</i>	<i>B. brizantha</i>
24 R – CNPAB	11 RE – Ce	23 R – Ma	15 R – Ce	21 RE – Ce	27 R – Ce
56 R – Ce	12 RE – Ce		17 R – Ce	34 R – Ce	30 R – Ce
57 R – Ce			18 RE – Ce	77 R – Ma	36 RE – Ce
			37 RE – Ce	79 R – Ma	47 RE AT – Ce
			50 R AT – Ce	84 RE – Ma	48 R BT – Ce
			73 RE – Ma	119 R AT – Ma	104 R BT – Ce
			140 R AT – Ma	135 R BT – Ce	124 R AT – Ce
			Ivo 1 R – CNPAB	136 R BT – Ce	125 RE BT – Ce
			Ivo 2 R – CNPAB		

R – raiz; RE – raiz esterilizada superficialmente; AT – alta taxa de lotação; BT – baixa taxa de lotação; Ce – Cerrados; Ma – Mata Atlântica.

Tabela 6. Origem das estirpes referência utilizadas.

Espécie/Estirpe	Fonte	Planta	Amostra	Referência
<i>A. lipoferum</i> Sp242	BR11082	Milho	raízes	—
<i>A. brasilense</i> Sp7	BR11002	<i>Digitaria decumbens</i>	rizosfera	Tarrand et al. (1978)
CD	BR11001	<i>Cynodon dactylon</i>	rizosfera	Tarrand et al. (1978)
<i>A. amazonense</i> CBAMC	BR11145	Cana-de-açúcar	raízes	—
Y6	BR11141	<i>Pennisetum purpureum</i>	raízes	Magalhães et al. (1983)
Y2	BR11140	<i>Hypparrenia rufa</i>	raízes	Magalhães et al. (1983)

BR – Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia.

Resultados e Discussão

Isolamento, caracterização e quantificação de bactérias diazotróficas

Isolamento e caracterização

Coletas exploratórias (pré-experimentais)

As coletas exploratórias foram feitas antes da implantação dos experimentos, nos dois sítios experimentais, em áreas previamente plantadas com as mesmas espécies de *Brachiaria* (Tabela 7). Depois da análise desses resultados foi decidido que as coletas dos experimentos seriam feitas apenas com a utilização dos meios NFb e LGI, e seriam amostrados apenas as raízes das plantas, divididas em lavadas e esterilizadas.

Observando-se a Tabela 7 pode-se notar que com a utilização dos meios semi-sólidos e semi-específicos para isolamento de *Azospirillum* spp. (NFb), *A. amazonense* (LGI), *Herbaspirillum* spp. (JNFb) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (LGI-P) (Döbereiner et al., 1995a), detectou-se apenas a presença das bactérias do gênero *Azospirillum*, não sendo possível o isolamento das outras espécies. Apesar de ocorrer crescimento no meio JNFb, depois de estudos morfológicos, foi constatado que as bactérias que haviam crescido nesse meio também pertenciam ao gênero *Azospirillum* (*A. brasilense* ou *A. lipoferum*). Os poucos estudos sobre microrganismos diazotróficos em associação com plantas de *Brachiaria* já haviam demonstrado a presença dessas três espécies pertencentes ao gênero *Azospirillum* (Magalhães, 1983; Neyra & Döbereiner, 1977).

Em relação às partes da planta avaliadas, todos os isolados foram obtidos de raízes lavadas e esterilizadas, nenhuma estirpe foi isolada a partir de amostra oriunda da parte aérea. A presença de bactérias do gênero *Azospirillum* já foi detectada em todas as partes das plantas, sendo relatada por diversos autores, apesar desses microrganismos serem geralmente considerados como bactérias da rizosfera, colonizando principalmente as zonas de elongação e os pêlos radiculares (Döbereiner et al., 1995b; Vande Broek & Vanderleyden, 1995).

Tabela 7. Avaliação do crescimento de bactérias diazotróficas em quatro meios de cultura a partir de extratos de diferentes partes de três espécies de *Brachiaria*.

Meios de cultura	Sítios Experimentais																	
	Bahia									Goias								
	Espécies de <i>Brachiaria</i>																	
	<i>B. decumbens</i>			<i>B. brizantha</i>			<i>B. humidicola</i>			<i>B. decumbens</i>			<i>B. brizantha</i>			<i>B. humidicola</i>		
Parte da planta (1 = Rizosfera; 2 = Raiz esterilizada; 3 = Folhas)																		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
NFB (<i>A. brasilense</i>) e <i>A. lipoferum</i>)	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
JNFb (<i>Herbaspirillum</i> spp.)	*	*	-	*	*	-	*	*	-	*	*	-	*	*	-	*	*	-
LGI (<i>A. amazonense</i>)	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
LGI-P (<i>A. diazotrophicus</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ Detectada a presença de bactérias diazotróficas de acordo com o meio semi-específico.

* Detectada a presença de outras bactérias diazotróficas, que não a esperada neste meio semi-específico

- Bactérias não detectadas

Algumas estirpes podem também ser endofíticas e são encontradas no interior de raízes e parte aérea de diversas espécies ([Baldani et al., 1997](#)), [Reis Jr. et al. \(2000a\)](#), trabalhando com plantas de cana-de-açúcar, mostraram que a frequência de isolamento de *Azospirillum* spp. foi bastante superior nas amostras de raízes das plantas quando comparada a colmos e folhas. Relatos sobre a presença de *A. amazonense* colonizando a parte aérea de plantas são ainda menos frequentes. [Pereira \(1995\)](#), estudando a incidência de bactérias do gênero *Azospirillum* em diferentes genótipos de milho relatou a presença dessa bactéria no colmo de certas amostras. [Silva et al. \(1995\)](#), indicaram a presença de bactérias, que provavelmente seriam *A. amazonense*, em raízes e colmos de diferentes ecótipos de *Pennisetum purpureum* e [Ferreira et al. \(1995\)](#), confirmaram a presença dessa em sementes e frutos de duas espécies de palmeiras.

Na Figura 2 pode-se observar a distribuição desses isolados entre as espécies do gênero *Azospirillum*. Pode-se observar que a proporção de isolados de bactérias tipo *A. amazonense* foi bem superior às outras duas espécies, o que não está de acordo com os valores apresentados a cada coleta ([Tabelas 10 e 13](#)). Depois do crescimento das bactérias fixadoras de N₂, bactérias eficientes na captura de nitrogênio e/ou bactérias saprofíticas desenvolvem-se as expensas do N fixado pelas diazotróficas o que torna mais difícil o seu isolamento. Provavelmente as características do meio NFB, como pH mais alto (6,5) e fonte de carbono mais acessível (malato), favoreçam esse processo dificultando o isolamento das bactérias diazotróficas. Além disso, as colônias de *A. amazonense* em meio LGI (pH 6,0 e sacarose como fonte de carbono) são bastante características tornando seu isolamento um processo bastante simples.

[Baldani & Döbereiner \(1980\)](#), sugerem que *A. lipoferum* apresenta maior afinidade por plantas com via fotossintética C₄ que *A. brasilense*. No entanto, observando-se os dados apresentados na [Figura 2](#) vê-se que esses não atestam essa afirmação, mostrando uma porcentagem bem superior de isolados de *A. brasilense* em comparação a *A. lipoferum*. [Mascarua-Esparza et al. \(1988\)](#), trabalhando com cactáceas no México, esperavam obter um número superior de isolados de *A. lipoferum* em comparação a *A. brasilense*, já que o metabolismo ácido das crassuláceas (presente nas cactáceas), se assemelha muito a via fotossintética C₄, no entanto, ao contrário do que eles

esperavam o maior número de isolados obtidos foi de *A. brasilense*. Na verdade, nenhuma especificidade típica foi demonstrada entre *Azospirillum* spp. e alguma planta hospedeira específica ([Bashan & Holguin, 1997](#)).

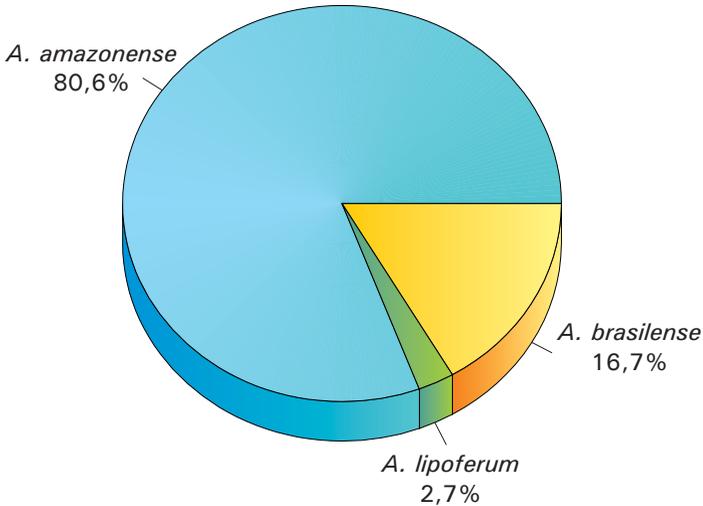


Figura 2. Porcentagem de isolados de três espécies de *Azospirillum* em associação com *Brachiaria* spp.

Quantificação de *Azospirillum* spp. associados as raízes de *Brachiaria* (NMP)

Sítio experimental de Goiás

A quantidade de bactérias, estimada pelo método do número mais provável, variou de $10^3 - 10^7$ células . g de raízes⁻¹. Nas [Tabelas 8, 9 e 10](#), são apresentadas as médias das estimativas do número de bactérias do gênero *Azospirillum* (NFb – *A. lipoferum* e/ou *A. brasilense*; LGI – *A. amazonense*) entre os fatores avaliados neste experimento.

Tabela 8. Logaritmo do número de células de *Azospirillum* spp.* associadas à três espécies de *Brachiaria* na Fazenda Agropecuária Lopes - GO.

Espécie de <i>Brachiaria</i>	Log. do nº de bactérias crescidas no meio LGI		Log. do nº de bactérias crescidas no meio NFb	
	RL	RE	RL	RE
<i>B. brizantha</i>	4,78	4,26	4,52	4,09
<i>B. decumbens</i>	4,62	4,31	4,61	4,16
<i>B. humidicola</i>	4,72	4,33	4,76	4,36
CV %	17,04	19,38	18,16	18,09

RL – raízes lavadas; RE – raízes esterilizadas superficialmente; *Log do nº de células . g (massa fresca) de raízes¹.

Tabela 9. Log. do número de células de *Azospirillum* spp.* associadas à *Brachiaria* sob baixa e alta taxas de lotação na Fazenda Agropecuária Lopes - GO.

Taxas de Lotação	Log. do nº de bactérias crescidas no meio LGI		Log. do nº de bactérias crescidas no meio NFb	
	RL	RE	RL	RE
Baixa	4,70	4,13	4,51	4,18
Alta	4,72	4,47	4,76	4,22
CV %	17,04	19,38	18,16	18,09

RL – raízes lavadas; RE – raízes esterilizadas superficialmente; *Log do nº de células . g (massa fresca) de raízes¹.

Pode-se observar que não existiram diferenças significativas entre os números de *Azospirillum* spp. encontrados em associação com as diferentes espécies de *Brachiaria* (Tabela 8) ou em plantas sob diferentes taxas de lotação (Tabela 9).

Na [Tabela 10](#) pode-se observar que a época de coleta apresentou efeitos significativos sobre a população de bactérias associadas às raízes das plantas de *Brachiaria*. De maneira geral, as coletas coincidentes com o período de verão apresentaram números mais elevados desses microrganismos. Vários autores têm afirmado que esses efeitos podem ser explicados por fatores ambientais, nesse caso, principalmente pelas taxas de precipitação pluviométrica, já que o clima da área é caracterizado como Aw (tropical com estação seca no inverno) segundo Koeppe.

Tabela 10. Log. do número de células de *Azospirillum* spp.* associadas à *Brachiaria* em diferentes coletas na Fazenda Agropecuária Lopes - GO.

Coletas	Log. do n° de bactérias crescidas no meio LGI		Log. do n° de bactérias crescidas no meio NFb	
	RL	RE	RL	RE
Coleta 1 (agosto de 1998)	4,57 b	3,98 b	4,34 bc	3,79 bc
Coleta 2 (fevereiro de 1999)	4,88 b	4,19 ab	4,89 ab	4,40 abc
Coleta 3 (agosto de 1999)	3,67 c	3,74 b	3,57 c	3,70 c
Coleta 4 (dezembro de 1999)	5,81 a	4,75 a	5,28 a	4,62 a
Coleta 5 (março de 2000)	4,62 b	4,91 a	5,08 ab	4,51 ab
CV %	17,04	19,38	18,16	18,09

Os valores seguidos de mesma letra não se diferem pelo teste Tukey 5%.

RL – raízes lavadas; RE – raízes esterilizadas superficialmente; *Log do n° de células . g (massa fresca) de raízes¹.

A influência de fatores ambientais, principalmente estresse hídrico e variações sazonais, sobre as populações de microrganismos diazotróficos e o processo de fixação biológica de nitrogênio, foi demonstrada em diversos trabalhos. [Costa & Ruschel \(1981\)](#), trabalhando com plantas de cana-de-açúcar, sugerem que a distribuição de microrganismos fixadores de N₂ sofre influência em razão da época do ano, mostrando que a atividade de microrganismos no interior do colmo foi bastante irregular na primavera, sendo relativamente uniforme no verão e caindo bruscamente no outono. [Bellone et al. \(1996\)](#), mostraram que em solos com progressiva deficiência hídrica (mais de 20 dias), as plantas de cana-de-açúcar apresentaram baixos níveis de atividade de redução de acetileno (ARA) associados a um baixo número de microrganismos por grama de raiz. [Reis Jr. et al. \(2000b\)](#) também mostraram variações no número de bactérias diazotróficas associadas à cana-de-açúcar devido a diferenças nas taxas de precipitação pluviométrica. Em sua tese de doutorado [Souto \(1982\)](#), avaliou a variação estacional da atividade da nitrogenase em raízes de forrageiras tropicais, e observou uma correlação altamente significativa entre a precipitação pluviométrica e a atividade do complexo enzimático responsável pela FBN.

Nas [Tabelas 8, 9](#) e 10, observa-se pouca diferença entre os números de *Azospirillum* spp. em raízes lavadas e esterilizadas superficialmente. Esses resultados não estão de acordo com os observados por [Baldani \(1984\)](#), que fazendo contagens dessas bactérias em raízes de plantas de milho, sorgo e arroz

encontrou geralmente, números bem mais baixos em amostras de raízes previamente tratadas com Cloramina-T. Provavelmente, o curto período de exposição (5 min) à Cloramina-T adotado nessa etapa do trabalho tenha influenciado nesses resultados, não garantindo uma esterilização superficial eficaz das amostras de raízes.

Sítio experimental da Bahia

Como no experimento de Goiás, a quantidade de bactérias estimada pelo método do número mais provável variou de $10^3 - 10^7$ células . g de raízes⁻¹. Nas Tabelas 11, 12 e 13, são apresentadas as médias das estimativas do número de bactérias do gênero *Azospirillum* (NFb – *A. lipoferum* e/ou *A. brasilense*; LGI – *A. amazonense*) entre os fatores avaliados neste experimento.

Nos resultados apresentados na Tabela 11 nota-se que plantas de *Brachiaria* de diferentes espécies podem apresentar números populacionais diferentes de *Azospirillum* spp. associados à suas raízes. Maiores números foram encontrados na espécie *B. humidicola*, seguida por *B. decumbens* e *B. brizantha*. As diferenças entre *B. humidicola* e *B. brizantha* giram em torno de pelo menos uma unidade de log. Essas diferenças podem, provavelmente, estar ligadas em parte a diferenças entre as exigências quanto à fertilidade dos solos nessas espécies, *B. humidicola* e *B. decumbens* são pouco exigentes, enquanto *B. brizantha* é uma espécie considerada exigente (Macedo, 1997; Vilela et al., 1999).

Tabela 11. Logaritmo do número de células de *Azospirillum* spp. * associadas à três espécies de *Brachiaria* no experimento de Itabela -BA. (Data)

Espécies de <i>Brachiaria</i>	Log. do n° de bactérias crescidas no meio LGI		Log. do n° de bactérias crescidas no meio NFb	
	Recém implantadas (1998)	Pasto antigo	Recém implantadas (1998)	Pasto antigo
<i>B. brizantha</i>	4,84 b	4,91 b	4,56 b	4,61 b
<i>B. decumbens</i>	5,83 a	4,95 b	5,55 ab	5,06 ab
<i>B. humidicola</i>	6,42 a	5,80 a	5,73 a	5,44 a
CV %	14,16	18,17	13,77	15,39

Os valores seguidos de mesma letra não se diferem pelo teste Tukey 5%; *Log do n° de células . g (massa fresca) de raízes⁻¹.

[Alvim et al. \(1990\)](#), comparando a produção forrageira de algumas espécies de *Brachiaria*, mostraram que, sem adubação nitrogenada, *B. brizantha* apresentou os menores valores de produtividade anual em peso da matéria seca, enquanto *B. decumbens* mostrou a maior produtividade entre as espécies testadas. Porém, *B. brizantha* foi a espécie que mais respondeu a aplicações de N. [Pereira et al. \(1981\)](#) estudaram 4 diferentes espécies de *Brachiaria* e suas análises de redução de acetileno (atividade da nitrogenase), mostraram diferenças entre essas espécies, com *B. ruziziensis* apresentando maior atividade da nitrogenase quando comparada a *B. brizantha*, *B. radicans* e *B. mutica*. Nos trabalhos de [Macedo \(1997\)](#) e [Vilela et al. \(1999\)](#), *B. ruziziensis* também foi considerada espécie pouco exigente em relação à fertilidade do solo.

[Boddey & Victoria \(1986\)](#) concluíram em seu trabalho que, *B. humidicola* e *B. decumbens* receberam maiores contribuições da FBN associada a suas raízes, que *B. ruziziensis* e *B. radicans*. [Loureiro & Boddey \(1988\)](#), utilizando a técnica de diluição isotópica de ^{15}N para quantificação da FBN, destacaram uma possível taxa de FBN superior em *B. humidicola* comparando-a a *B. decumbens*, *B. ruziziensis* e *B. radicans*.

Além daqueles citados acima, exemplos da influência do genótipo da planta sobre a FBN são demonstrados para diversas outras gramíneas, como em milho ([Garcia de Salomone et al., 1996](#)), trigo ([Avivi & Feldman, 1982](#)), cana-de-açúcar ([Urquiaga et al., 1992](#)), entre outras. No entanto, não é comum o relato dessas diferenças estar correlacionado com diferenças na população de alguma bactéria diazotrófica. Um exemplo é o trabalho de [Döbereiner \(1977\)](#), que estudando genótipos de *Paspalum notatum* e a ocorrência de *Azotobacter paspali*, correlaciona as diferenças na atividade da nitrogenase com a população de bactérias diazotróficas.

[Reis Jr. et al. \(2000a\)](#) demonstraram que genótipos de cana-de-açúcar contrastantes quanto ao ganho de N via fixação biológica de N_2 apresentaram-se associados com todas as bactérias estudadas e não havia diferença entre sua população estimada. Estudos feitos com plantas de arroz ([Campos et al., 1997](#)) e *Pennisetum purpureum* ([Silva et al., 1995](#)), apresentaram resultados parecidos, nos quais as bactérias estudadas estavam presentes em todos os genótipos avaliados e em números semelhantes. É fato que a fixação biológica de nitrogênio em gramíneas é um processo complexo e que envolve uma gama de fatores relacionados com o genótipo das plantas e das bactérias a eles associadas.

Em paralelo aos estudos apresentados neste trabalho, foram realizados estudos nos quais foi aplicada a técnica de quantificação da abundância natural de ^{15}N nos solos (Delta ^{15}N) das mesmas áreas experimentais, e provavelmente os resultados dessas pesquisas poderão garantir mais subsídios para essa discussão.

Os resultados apresentados na Tabela 12 apontam para um efeito da taxa de lotação animal sobre a população de *Azospirillum* spp. associada as raízes de *Brachiaria*. As raízes das pastagens sob taxa de lotação animal mais alta, parecem estar associadas a maiores populações dessas bactérias. Mesmo com uma pequena diferença entre os números populacionais, essas foram significativas estatisticamente para bactérias crescidas no meio LGI no pasto antigo e para bactérias crescidas no meio NFb para o pasto implantado em 1998.

Tabela 12. Logaritmo do número de células de *Azospirillum* spp.* associadas à *Brachiaria* sob baixa e alta taxas de lotação no experimento de Itabela -BA. (Data)

Taxa de Lotação	Log. do n° de bactérias crescidas no meio LGI		Log. do n° de bactérias crescidas no meio NFb	
	Recém implantadas (1998)	Pasto antigo	Recém implantadas (1998)	Pasto antigo
Baixa	5,59	4,93 b	4,99 b	4,84
Alta	5,80	5,51 a	5,57 a	5,23
CV %	14,16	18,17	13,77	15,39

Os valores seguidos de mesma letra não se diferem pelo teste Tukey 5%; *Log do n° de células . g (massa fresca) de raízes⁻¹.

Vários estudos têm demonstrado que a herbivoria tem papel importante sobre os microrganismos do solo. Esses efeitos podem estar relacionados com a alteração na quantidade de detritos no solo, como a liteira das plantas, fezes ou urina ([Bardgett et al., 1998](#)). No entanto, alguns estudos recentes sugerem que esses efeitos também podem ser resultado de uma influência sobre os exsudatos radiculares ([Holland et al., 1996](#)). [Bardgett et al. \(1998\)](#), discutem que os efeitos da herbivoria no fluxo de carbono radicular manifestam-se em curto prazo como mudanças na alocação de carbono e exsudação radicular, ou mudanças em longo prazo, como na biomassa das raízes e em sua morfologia.

Já na década de 70, [Bokhari & Singh \(1974\)](#) encontraram um aumento na quantidade de exsudatos radiculares em plantas desfolhadas comparadas com plantas não desfolhadas, no entanto esse estudo não examinou o possível efeito dessa maior exsudação sobre as populações microbianas. Estudos com pastagens de região temperada geraram fortes indícios de que a herbivoria pode influenciar positivamente as comunidades microbianas. [Bardgett et al. \(1997\)](#) mostraram que a biomassa microbiana do solo e sua atividade foram positivamente relacionadas com o pastejo de ovelhas, e que com o cessar do pastejo ocorreu uma significativa diminuição no número de microrganismos presentes no solo. [Ruess & McNaughton \(1987\)](#) encontraram resultados semelhantes em um estudo com pastagens do Serengeti. Eles mostraram que a biomassa microbiana do solo aumentou com o aumento da intensidade de pastejo, até decrescer com intensidades de pastejo mais altas. Esse decréscimo pode estar relacionado com a redução de alocação de carbono para as raízes nessas condições. Em oposição a esse relato, [Davidson & Milthorpe \(1966\)](#) mediram a troca de C entre raízes e parte aérea de *Dactylis glomerata* e concluíram que as raízes continuavam a ser um dreno de C, independente da severidade da desfoliação. [Northup et al. \(1999\)](#) citam que em pastagens de clima seco da Austrália, o pastejo pesado reduz a entrada de material orgânico no solo, limitando recursos para o crescimento microbiano.

[Krafczyk et al. \(1984\)](#), entre outros, têm notado uma baixa relação N:C nos compostos exsudados pelas plantas. É esperado que o crescimento nesse tipo de fonte seja favorável aos organismos que conseguem utilizar o nitrogênio atmosférico. Também existem relatos de aumento da atividade da nitrogenase por adição de produtos do metabolismo radicular ([Krafczyk et al., 1984](#)). Alguns trabalhos também relatam que a herbivoria pode promover acréscimos nos teores de nutrientes (N e P) dos tecidos das plantas ([Holland et al., 1992](#)). [Bardgett et al. \(1998\)](#) sugerem que esse efeito pode ser explicado em parte, por uma resposta positiva da comunidade microbiana do solo ao incremento da exsudação radicular por plantas desfolhadas, levando a um acréscimo da mineralização e conseqüentemente da absorção de N e P pelas plantas.

O desafio consiste, portanto, em encontrar uma taxa de lotação animal que influenciasse positivamente as bactérias diazotróficas, que não possibilite um decréscimo muito acentuado na deposição de liteira e conseqüentemente na reciclagem de N do sistema, e que as perdas, principalmente via excretas dos animais, sejam pelo menos contrabalançadas com os possíveis ganhos de nitrogênio de forma a manter estável o nível de N e de matéria orgânica do solo.

Provavelmente uma melhor distribuição de chuvas na região de Mata Atlântica, cujo clima é caracterizado como Af (tropical sem estação seca) segundo Koeppen, fez com que, neste experimento, não fossem observados efeitos da época de coleta sobre a população de *Azospirillum* spp. (Tabela 13).

Tabela 13. Logaritmo do número de células de *Azospirillum* spp.* associadas à *Brachiaria* em diferentes coletas no experimento de Itabela -BA. (Data)

Coletas	Log. do n° de bactérias crescidas no meio LGI		Log. do n° de bactérias crescidas no meio NFb	
	Recém implantadas (1998)	Pasto antigo	Recém implantadas (1998)	Pasto antigo
Coleta 1 (maio de 1999)	5,96	5,33	5,30	5,33
Coleta 2 (novembro de 1999)	5,62	4,99	5,34	4,76
Coleta 3 (agosto de 2000)	5,51	5,35	5,21	5,02
CV %	14,16	18,17	13,77	15,39

*Log do n° de células. g (massa fresca) de raízes⁻¹

Atividade da nitrogenase

Para confirmar a capacidade de fixação do nitrogênio atmosférico pelos isolados de raízes de *Brachiaria*, estirpes de *Azospirillum* spp., obtidas em coletas iniciais, tiveram sua atividade da nitrogenase averiguada pela metodologia de redução de acetileno. Foram testadas 6 estirpes “tipo” *A. brasilense* e 14 estirpes “tipo” *A. amazonense*. Esses isolados foram randomicamente escolhidos para esse teste e comparados com estirpes padrão de *Azospirillum* spp. Todos os isolados apresentaram capacidade de reduzir o acetileno. No entanto, foi constatada uma grande variação da atividade da nitrogenase entre os isolados capazes de crescer em NFb (65 à 250 nmol C₂H₄ . mg de proteína⁻¹ . hora⁻¹) ([Figura 3](#)) e principalmente daqueles capazes de crescer em LGI (12 à 205 nmol C₂H₄ . mg de proteína⁻¹ . hora⁻¹) ([Figura 4](#)). Essa magnitude de valores e a variação na capacidade de *Azospirillum* spp. fixar N atmosférico observada entre membros de populações naturais foi constatada também por [Han & New \(1998\)](#). Esses resultados também mostraram uma tendência dos isolados de *A. brasilense* apresentarem maior atividade da nitrogenase em comparação com isolados de *A. amazonense*. Na verdade, o sistema nitrogenase dessas duas espécies é distinto ([Song et al., 1985](#)), o que pode explicar a diferença entre os valores obtidos para as duas espécies. Alguns autores têm criticado a comparação de estirpes quanto a

atividade da nitrogenase em cultura pura, [Han & New \(1998\)](#) observaram que algumas estirpes que exibiram baixa atividade de redução de acetileno em associação com raízes de trigo, tiveram alta performance em cultura pura.

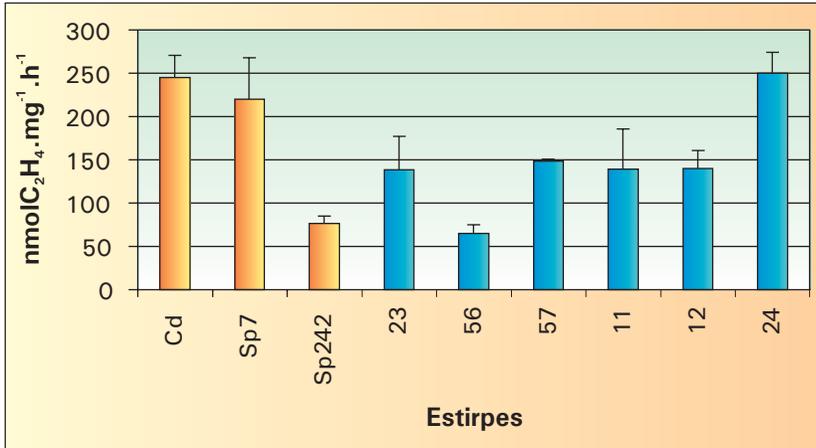


Figura 3. Atividade específica de redução de acetileno (atividade da nitrogenase) em estirpes referência de *A. brasilense* e *A. lipoferum* e em estirpes isoladas de raízes de *Brachiaria* spp. (*A. brasilense*-tipo). Os valores são médias de três repetições. As barras de erro representam o desvio-padrão das médias.

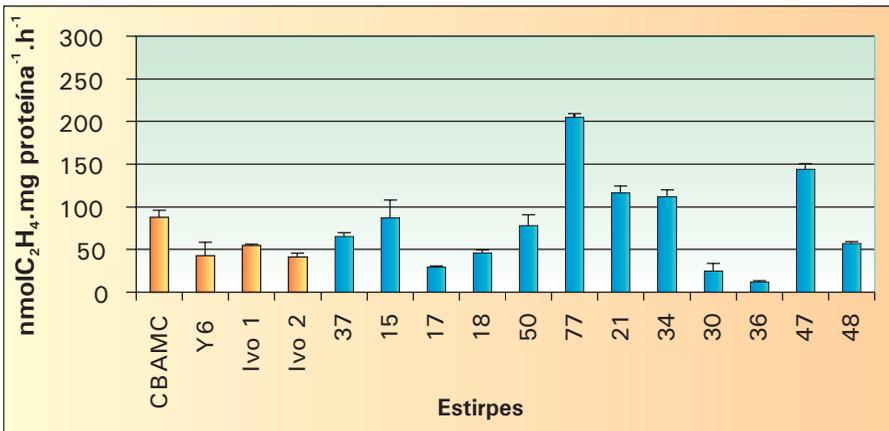


Figura 4. Atividade específica de redução de acetileno (atividade da nitrogenase) em estirpes referência de *A. amazonense* e em estirpes isoladas de raízes de *Brachiaria* spp. (*A. amazonense*-tipo). Os valores são médias de três repetições. As barras de erro representam o desvio-padrão das médias.

Produção de hormônio de crescimento (AIA – ácido indol acético) por isolados de *A. amazonense*

Apesar da fixação biológica de nitrogênio por *Azospirillum* ter sido foco de bastante atenção da comunidade científica por muitos anos, existem evidências crescentes de que a maior parte da contribuição de bactérias desse gênero para as plantas deve-se principalmente a produção de hormônios. Okon & Labandera-Gonzalez (1994) citam que a fixação de nitrogênio por *Azospirillum* apresenta importância agrônômica significativa reduzida em relação ao que se pensava no passado. [Bashan & Holguin \(1997\)](#) relatam que é óbvio que fitohormônios, principalmente o ácido indol-acético (AIA), excretados por *Azospirillum*, desempenham um papel essencial na promoção do crescimento de plantas em geral. No entanto, ao se atribuir à contribuição das bactérias desse gênero para o crescimento das plantas a produção de apenas uma substância, corremos um sério risco de estarmos simplificando demais o fenômeno da interação planta-bactéria.

Devido à importância da produção de AIA por bactérias do gênero *Azospirillum*, alguns isolados da espécie *Azospirillum amazonense* associados a raízes de *Brachiaria* tiveram sua capacidade de produção desse hormônio avaliada. Na [Figura 5](#) mostra-se que todos os isolados testados foram capazes de produzir AIA. A quantidade de AIA produzida variou de 35 μ M a 110 μ M. Esses valores são similares aos observados por [Mascarua-Esparza et al. \(1988\)](#), que variaram de 28,54 a 97,03 μ M em estirpes de *A. lipoferum* originárias de plantas cactáceas no México. [Crozier et al. \(1988\)](#), também trabalhando com estirpes de *A. lipoferum*, isoladas de raízes de milho, obtiveram uma produção variando de 0,0mM a 85,9 μ M de AIA. Quando Esses mesmos autores estudaram a produção de AIA por estirpes de *A. brasilense*, os valores apresentados foram maiores, variando de 7,99mM a 148,97mM ([Crozier et al., 1988](#)) e 205 μ M a 428 μ M ([Mascarua-Esparza et al., 1988](#)). [Radwan \(1999\)](#), também mostrou grande variabilidade entre espécies de *Azospirillum* quanto a produção de AIA, com valores variando de 19,2 – 432 μ M

Possivelmente as diferenças encontradas neste trabalho quanto as populações de *Azospirillum* spp. associadas a diferentes genótipos de *Brachiaria*, podem ser indicados como fatores de influência nas taxas de FBN associadas a essas plantas, assim como na sua adaptabilidade a solos de baixa fertilidade.

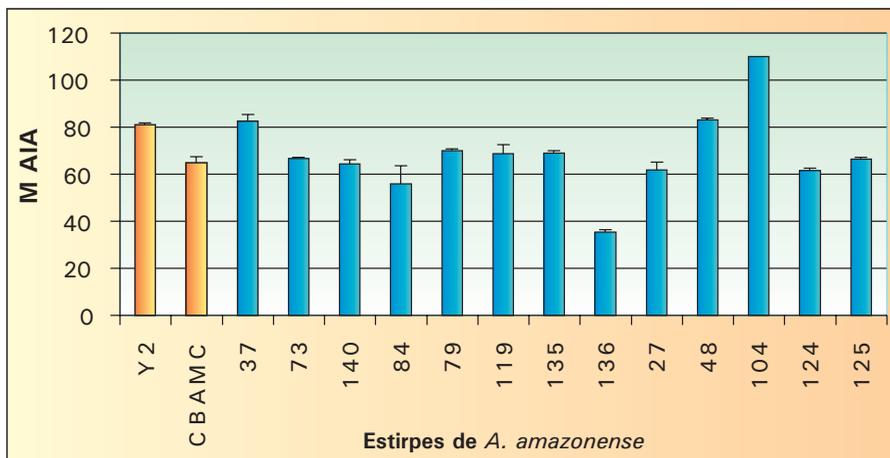


Figura 5. Produção de AIA (ácido indol-acético) por estirpes referência de *A. amazonense* e em estirpes isoladas de raízes de *Brachiaria* spp. (*A. amazonense*-tipo). Os valores são médias de três repetições. As barras de erro representam o desvio-padrão das médias.

A associação entre *Azospirillum* e *Brachiaria* pode nos fazer vislumbrar a possibilidade de inoculação de áreas de pastagens. [Zaady et al. \(1994\)](#) e [ltzigsohn et al. \(2000\)](#) mostraram que a inoculação de *Azospirillum* em pastagens tem grande potencial para tornar-se uma técnica aplicável a esses sistemas em condições de déficit hídrico e/ou baixa fertilidade. Apesar de existirem formulações de inoculantes de *Azospirillum* comercialmente disponíveis, estudos sobre sua utilização, ou de outras rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, em pastagens são muito escassos. Ainda não existem informações suficientes sobre os efeitos da inoculação de *Azospirillum* sobre essas áreas. No entanto, o uso desses microrganismos associado a um adequado manejo do solo, baseado em comparações com a aplicação de fertilizantes, parece ser mais vantajoso economicamente (Okon & Vanderleyden, 1997), e do ponto de vista ecológico e ambiental apresenta relativamente nenhum impacto ao meio-ambiente ([ltzigsohn et al., 2000](#)).

Conclusões

1. *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense* e *A. amazonense* encontraram-se associadas a *Brachiaria brizantha*, *B. decumbens* e *B. humidicola*, com números variando de $10^3 - 10^7$ células . g de raízes⁻¹. Populações desses

microrganismos associadas a pastagens de *Brachiaria* implantadas no ecossistema Cerrado foram reduzidas em coletas coincidentes com períodos de baixa precipitação pluviométrica. Em pastagens implantadas na região de Mata Atlântica, de maneira geral, maiores números de *Azospirillum* spp. foram encontrados na espécie *B. humidicola*, seguida por *B. decumbens* e *B. brizantha*.

2. Todos os isolados de *Azospirillum* spp. testados apresentaram capacidade de reduzir acetileno (ARA).
3. Todos os isolados de *A. amazonense* testados foram capazes de produzir AIA.

Referências Bibliográficas

ALVIM, M. J.; BOTREL, M. A.; VERNEQ, R. S.; SALVATI, J. A. Aplicação de nitrogênio em acessos de *Brachiaria*. 1: efeito sobre a produção de matéria seca. **Pasturas Tropicales**, Cali, v. 12, p. 2-6, 1990.

AVIVI, Y.; FELDMAN, N. The response of wheat to bacteria of the genus *Azospirillum*. **Israel Journal of Botany**, Jerusalem, v. 32, p. 237-241, 1982.

AYARZA, M.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Introdução de *S. guianensis* cv. Mineirão em pastagens de *Brachiaria ruziziensis*: influência na produção da pastagem e na reciclagem da liteira. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1997. (Embrapa Agrobiologia. Boletim Técnico, 1).

BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 12, p. 433-439, 1980.

BALDANI, J. I. **Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com outras espécies deste gênero, em raízes de milho, sorgo e arroz**. 1984. 110 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguai, 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 & Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 911-922, 1997.

BALDANI, J. I.; de AZEVEDO, M. S.; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. dos 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.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas** (Ed.). Viçosa: SBCS; Lavras: UFLA/DCS, 1999. p. 621-666.

BALL, P. R.; RYDEN, J. C. Nitrogen relationship in intensively managed temperate grasslands. **Plant & Soil**, Dordrecht, v. 76, p. 23-33, 1984.

BARDGETT, R. D.; LEEMANS, D. K.; COOK, R.; HOBBS, P. J. Seasonality in the soli biota of grazed and ungrazed hill grasslands. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 1285-1294, 1997.

BARDGETT, R. D.; WARDLE, D. A.; YEATS, G. W. Linking above-ground and below-ground interactions: How plant responses to foliar herbivory influence soil organisms. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 1867-1878, 1998.

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

BELLONE, C. H.; BELONE, S. C.; PEDRAZA, R. O. Hydric deficiency and acetylene reduction in sugar cane roots. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION WITH NON-LEGUMES, 7., 1996, Faisalabad, Pakistan. **Abstracts...** Faisalabad: National Institute for Biotechnology and Genetic Engineering (NIBGE), 1996. p. 125-126.

BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future research. **Plant & Soil**, Dordercht, v. 108, p. 53-65, 1988.

BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent progress and perspectives for the future. **Fertilizer Research**, Oxford, v. 42, p. 241-250, 1995.

BODDEY, R. M.; VICTORIA, R. L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using ¹⁵N labelled organic matter and fertilizer. **Plant & Soil**, Dordrecht, v. 90, p. 256-292, 1986.

BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S. A. degradação das pastagens e o ciclo do nitrogênio. In: WORKSHOP NITROGÊNIO

NA SUSTENTABILIDADE DE SISTEMAS INTENSIVOS DE PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA, 2000, Dourados. **Anais...** Seropédica: Embrapa Agrobiologia; Dourados: Embrapa Pecuária Oeste, 2000. p. 110-124. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 128; Embrapa Pecuária Oeste, Documentos, 26.).

BODDEY, R. M.; CHALK, P. M.; VICTORIA, R. L.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J. The use of the ^{15}N isotope dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of *Paspalum notatum* cv. Batatais. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, p. 1036-1045, 1983.

BODDEY, R. M.; RESENDE, C. P.; PEREIRA, J. M.; CANTARUTTI, R.; ALVES, B. J. R.; FERREIRA, E.; RICHTER, M.; CADISCH, G.; URQUIAGA, S. Nitrogen cycle in pure grass and grass/legume pastures. Evaluation of pasture sustainability. In: **Nuclear Techniques in Soil-Plant Studies for Sustainable Agriculture and Environmental Preservation**. Vienna: International Atomic Energy Agency, 1994. p. 309-319.

BODDEY, R. M.; RAO, I. M.; THOMAS, R. J. Nutrient cycling and environmental impact of *Brachiaria* pastures. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Cali: CIAT, 1996. p. 53-71. (CIAT, 259).

BODDEY, R. M.; RESENDE, C. de P.; SCHUNKE, R. M.; ALVES, B. J. R.; CADISH, G.; PEREIRA, J. M. Sustentabilidade de pastagens consorciadas e de gramínea em monocultura: O papel chave das transformações de nitrogênio. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 30., 1993, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1993. p. 141-173.

BOKHARI, U. G.; SINGH, J. S. Effects of temperature and clipping on growth, carbohydrate reserves and root exudation of western wheatgrass in hydroponic culture. **Crop Science**, Madison, v. 14, p. 790-794, 1974.

CADISH, G.; SHUNKE, R. M.; GILLER, K. E. Nitrogen cycling in a pure grass pasture and a grass legume mixture on a red latossol in Brazil. **Tropical Grassland**, Indooroopilly, Australia, v. 28, p. 43-52, 1994.

CAMPOS, D. V. B.; BERNADO, J. T.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Occurrence of diazotrophic bacteria in wetland

rice. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON NITROGEN FIXATION, 11., 1997, Paris. **Abstracts...** Paris: Institut Pasteur: INRA: CNRS: CEA: ORSTOM: CIRAD, 1997. p. 50.

COSTA, J. M. T. F.; RUSHEL, A. P. Seasonal variation in the microbial populations of sugar-cane plants. In: VOSE, P. B.; RUSHEL A. P. (Ed.). **Associative N₂ – fixation**. Boca Raton: CRC Press, 1981. v. 2. p. 109-118.

CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J. M.; MONTEIRO, A. M. Analysis of indole-3-acetic and related indoles in culture media from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, p. 2833-2837, 1988.

DAVIDSON, J. L.; MILTHORPE, F. L. Leaf growth of *Dactylis glomerata* L. following defoliation. **Annals of Botany**, Oxford, v. 30, p. 173-184, 1966.

DECKHIL, S. B.; CAHILL, M.; STACKBRANDT, E.; SLY, L. I. Transfer of *Conglomerans 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*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, München, v. 20, p. 72-77, 1997.

DÖBEREINER, J.; CAMPELO, A. B. Non-symbiotic nitrogen fixing bacteria in tropical soil. **Plant and Soil**, The Hague, special volume, p. 457-470, 1971.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of micro-organisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W. E.; NYMAN, C. J. (Ed.). **Nitrogen fixation**. Washington: National Academy Press, 1976. p. 518-538

DÖBEREINER, J. Plant genotype effects on nitrogen fixation in grasses. In: MUHAMMED, A.; AKSEL, R.; BORSTEL, R. C. (Ed.). **Genetic diversity in plants**. New York: Plenum Press, 1977. p. 325-334.

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

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.;

VANDERLEYDEN, J.; DE ZAMAROCZY, M. (Ed.). **Azospirillum VI and related microorganisms**. Berlin: Springer-Verlag, 1995b. p. 3-14.

ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C₄-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 51, p. 17-26, 2001.

FALK, E. C.; DÖBEREINER, J.; JOHNSON, J. L.; KRIEG, N. R. Deoxyribonucleic acid homology of *Azospirillum amazonense* Magalhães et al 1984 and emendation of the description of the genus *Azospirillum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 35, p. 117-118, 1985.

FERREIRA, A. C.; COZZOLINO, K.; CARVALHO, A. R. V.; DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in oil palm trees. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis. **Abstracts...** Angra dos Reis: Embrapa-CNPAB: UFRRJ, 1995. p. 210-211.

FERREIRA, E.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Destino do ¹⁵N-urina bovina aplicado na superfície de um solo Podzólico descoberto, ou sob cultura de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. In: CONGRESSO ANUAL DA SBZ, 32., 1995, Brasília. **Anais...** Brasília: SBZ, 1995. p. 109-110.

FERREIRA, E.; REZENDE, C de P.; GALINDO, L. L. G.; RESENDE, A. S.; TARRÉ, R. M.; MACEDO, R. O.; OLIVEIRA, O. C.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Recuperação do nitrogênio da urina bovina pela pastagem de *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweickdt cultivada no sul da Bahia. In: REUNIÓN LATINOAMERICANA DE PRODUCCION ANIMAL, 14.; CONGRESO URUGUAYO DE PRODUCCION ANIMAL, 3., 2000, Montevideo. **Anais...** Montevideo: [s.n.], 2000. 1 CD-ROM.

FISCHER, M. J.; KERRIDGE, P. C. The agronomy and physiology of *Brachiaria* species. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Cali: CIAT, 1996. p. 43-52. (CIAT. Publication 259).

GARCIA DE SALOMONE, I. E.; DÖBEREINER, J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype

associations as evaluated by ^{15}N isotope dilution technique. **Biology & Fertility of Soils**, Berlin, v. 23, p. 249-256, 1996.

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

HOLLAND, E. A.; PARTON, W. J.; DETLING, J. K.; COPPOCK, D. L. Physiological responses of plant populations to herbivory and their consequences for ecosystem nutrient flow. **American Naturalist**, Chicago, v. 140, p. 685-706, 1992.

HOLLAND, J. N.; CHENG, W.; CROSSLEY JR., D. A. Herbivore-induced changes in plant carbon allocation: assessment of bellow ground C fluxes using carbon-14. **Oecologia**, New York, v. 107, p. 87-94, 1996.

ITZIGSOHN, R.; BURDMAN, S.; OKON, Y.; ZAADY, E.; YONATAM, A.; PEREVOLOTSKY, A. Plant-growth promotion in natural pastures by inoculation with *Azospirillum brasilense* under suboptimal growth conditions. **Arid Soil Research and Rehabilitation**, Utah, v. 13, p. 151-158, 2000.

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 in Microbiology**, Paris, v. 140, p. 679-693, 1989.

KRAFFCZYK, I.; TROLLDENIER, G.; BERINGER, H. Soluble root exudates of maize: influence of potassium supply and rhizosphere micro-organisms. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 16, p. 315-322, 1984.

LIRA, M. A.; FARIAS, I.; FERNANDES, A. P. M.; SOARES, L. M.; DUBEUX JUNIOR, J. C. Estabilidade de resposta do capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*, STAPP.) sob níveis crescentes de nitrogênio e fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, p.1151-1157, 1994.

LOUREIRO, M. F.; BODDEY, R. M. Balanço de nitrogênio em quatro gramíneas do gênero *Brachiaria*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 1343-1353, 1988.

LOWRY, O. M.; ROSENBROUGH, N. J.; FAAR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biology and Chemistry**, Stanford, v. 193, p. 265- 275, 1951.

MACEDO, M. C. M. A integração lavoura e pecuária como alternativa de recuperação de pastagens degradadas. In: WORKSHOP NITROGÊNIO NA SUSTENTABILIDADE DE SISTEMAS INTENSIVOS DE PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA, 2000, Dourados. **Anais ...Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. p. 90-140. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 128; Embrapa Pecuária Oeste, Documentos, 26.).**

MACEDO, M. C. M. Adubação e calagem para implantação de pastagens cultivadas na região dos cerrados. In: CURSO DE PASTAGENS, 1997, Campo Grande. **Palestras apresentadas.** Campo Grande : Embrapa-CNPGC, 1997. não paginado.

MACEDO, M. C. M. Pastagens no ecossistema Cerrados: pesquisa para o desenvolvimento sustentável. In: SIMPÓSIO SOBRE PASTAGENS NOS ECOSSISTEMAS BRASILEIROS: PESQUISA PARA O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL, 1995, Brasília. **Anais...Brasília: SBZ, 1995. p. 28-62.**

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

MAGALHÃES, F. M. M. Nitrogen-fixing bacteria isolated from diverse soils and grass roots in Amazonia. In: VOSE, P. B.; RUSCHEL, A. P. (Ed.). **Associative N₂ fixation.** [S.l]: Franklin Book, 1981. p. 37-46.

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

MASCARUA-ESPARZA, M. A.; VILLA-GONZALLEZ, R.; CABALLERO-MELADO, J. Acetylene reduction and indolacetic acid production by *Azospirillum* isolates from Cactaceous plants. **Plant & Soil, Dordrecht, v. 106, p. 91-95, 1988.**

NEYRA, C. A.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation in grasses. **Advances in Agronomy, San Diego, v. 29, p. 1-38, 1977.**

NORTHUP, B. K.; BROWN, J. R.; HOLT, J. A. Grazing impacts on the spatial distribution of soil microbial biomass around tussock grasses in a tropical grassland. **Applied Soil Ecology, Amsterdam, v. 13, p. 250-270, 1999.**

OKON, Y.; KAPULNIK, Y.; SARIG, S. Field inoculation studies with *Azospirillum* in Israel. In: SUBBA RAO, N. S. (Ed.). **Biological nitrogen fixation recent developments**. New Delhi: Oxford and I.B.H. Publishing, 1988. p. 175-195.

OLIVEIRA, O. C.; OLIVEIRA, I. P.; FERREIRA, E.; ALVES, B. J. R.; CADISCH, G.; MIRANDA, C. H. B.; VILELA, L.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. A baixa disponibilidade de nutrientes do solo como uma causa potencial da degradação de pastagens no cerrado brasileiro. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 3., 1997, Ouro Preto. **Anais...** Ouro Preto: SOBRADE: UFV, 1997. p. 110-117.

PENOT, I.; BERGES, N.; GUIGUENÉ, C.; FAGES, J. Characterization of *Azospirillum* associated with maize (*Zea mays* L.) in France using biochemical tests and plasmid profiles. **Canadian Journal of microbiology**, Ottawa, v. 38, p. 798-803, 1992.

PEREIRA, J. A. R. **Bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares em diferentes genótipos de milho (*Zea mays* L.)**. 1995. 112 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, 1995.

PEREIRA, P. A. A.; DÖBEREINER, J.; NEYRA, C. A. Nitrogen assimilation and dissimilation in five genotypes of *Brachiaria* spp. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 59, p. 1475-1479, 1981.

RADWAN, T. EL-SAYED EL-DESOK. **Improvement of quality of some crop plants by applying new concepts in biotechnology with *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp.** 1999. Tese (Doutorado) - Cairo University. Cairo, 1999. (Pagina)

RAO, I. M.; KERRIDGE, P.C.; MACEDO, M. C. M. Nutritional requirements of *Brachiaria* and adaptations to acid soils. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. (Ed.) **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Cali: CIAT, 1996. P. 72-86. (CIAT.Publication, 259).

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

- REIS JR., F. B.; REIS, V. M.; SILVA, L. G.; DÖBEREINER, J. Levantamento e quantificação de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 985-994, 2000a.
- REIS JR., F. B.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J. Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* Spp.). **Plant & Soil**, Dordrecht, v. 219, p. 153-159, 2000b.
- RUESS, R. W.; MCNAUGHTON, S. J. Grazing and the dynamics of nutrient and energy regulated microbial process in the Serengeti. **Oikos**, Lund, v. 49, p. 101-110, 1987.
- SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, London, v. 20, p. 282-285, 1995.
- SILVA, M. M. P.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; XAVIER, D. F.; DÖBEREINER, J. Screening *Pennisetum* ecotypes (*Pennisetum purpureum*, Schum.) for biological nitrogen fixation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION. **Abstracts...** Angra dos Reis: Embrapa-CNPAB: UFRRJ, 1995. p. 236-237.
- SILVA, S. C.; SBRISSIA, A. F. A planta forrageira no sistema de produção. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 17., 2000, Piracicaba. **Anais: a planta forrageira no sistema de produção...** Piracicaba: FEALQ, 2000. p. 3-20.
- SONG, S. D.; HARTMANN, A.; BURRIS, R. H. Purification and properties of the nitrogenase of *Azospirillum amazonense*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 164, p. 1271-1277, 1985.
- SOUTO, S. M. Variação estacional da fixação de N₂ e denitrificação em gramíneas forrageiras tropicais. 1982. 268 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Itaguaí, 1982.
- TARRANT, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 24, p. 967-980, 1978.

THOMAS, R. J. The role of the legume in the nitrogen cycle in pastures. **Grass & Forrage Science**, Washington, v. 47, p. 133-142, 1992.

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 American Journal**, Madison, v. 56, p. 105-114, 1992.

VALLE, C. B.; EUCLIDES, V. P. B.; MACEDO, M. C. M. Características das plantas forrageiras do gênero *Brachiaria*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 17., 2000, Piracicaba. **Anais: a planta forrageira no sistema de produção...** Piracicaba: FEALQ, 2000. p. 65-108, 2000.

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

VILELA, L.; SOARES, W. V.; SOUSA, D. M. G.; MACEDO, M. C. M. **Calagem e adubação para pastagens na região do cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1999. 15 p. (Embrapa Cerrados. Circular Técnica, 37).

ZAADY, E.; OKON, Y.; PEREVOLOTSKY, A. Growth response of Mediterranean herbaceous swards to inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Journal of Range Management**, Colorado, v. 47, p. 12-15, 1994.

ZIMMER, A. H.; CORREA, E. S. A pecuária nacional, uma pecuária de pasto? In: ENCONTRO SOBRE RECUPERAÇÃO DE PASTAGENS, 1993, Nova Odessa. **Anais...** Nova Odessa: Instituto de Zootecnia: FAPESP: FUNDEPAG, 1993. p. 1-25.

Plant growth promoter bacteria from the *Azospirillum* genus associated with different *Brachiaria* species

Abstract - *The limitation of nitrogen is considered one of the most important factors to the pastures degradation. However there are evidences that pastures formed by some species of the genus Brachiaria could be benefit with the biological nitrogen fixation process (BNF), guaranteeing to these pastures higher longevity. The diazotrophic bacteria founded in association with these forage grasses were mainly species from the Azospirillum genus. The associations between these microorganisms and the plants are generally conditioned to the vegetation, therefore is possible that different genotypes of Brachiaria exercise a selective effect on the populations of these, what could result in different BNF contributions. It was objectified to establish the influence of the Brachiaria species, pasture management and seasonal variations on the bacteria populations from the Azospirillum genus associated with the roots of these plants. Different pastures (B. humidicola, B. decumbens and B. brizantha) were implanted in areas of the Cerrado ecosystem and of the Atlantic Forest. Two management systems with different stocking rates (higher and lower) were evaluated. The collects of plant samples from each experimental treatment were accomplished in different times of the year. For the isolation and quantification of the diazotrophic bacteria traditional techniques were utilised with the use of semi-specific and semi-solid culture media without nitrogen. A. lipoferum, A. brasilense and A. amazonense were isolated from root samples of the three analysed Brachiaria species. The estimates of the bacterial populations from these species varied from 10^3 - 10^7 cells. g of roots⁻¹. In the samples of the Cerrado ecosystem, the collect time presented significant effects on the population of these bacteria. The data from the Atlantic forest region experiment showed that plants of Brachiaria from different species and pastures under different stocking rates can present different populations numbers of Azospirillum spp. associated to its roots.*

Index terms: *Azospirillum amazonense, biological nitrogen fixation, pastures degradation.*