



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agrobiologia
Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Caixa Postal 74505 - CEP 23851-970 - Seropédica, RJ
Fone (021) 682-1500 Fax (021) 682-1230
E-mail: acn@cnpab.embrapa.br

COMUNICADO TÉCNICO

Nº 35, nov/99, p.1-5



UMA NOVA ESTRATÉGIA PARA ISOLAR *Gluconacetobacter diazotrophicus* DE PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

Veronica Massena Reis¹
Liamara Perin²
Fábio Bueno dos Reis Junior³

A contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN) associada à cultura da cana-de-açúcar foi quantificada nos estudos feitos por Urquiaga *et al.*, (1992), através do balanço de N e diluição isotópica de ¹⁵N. Estes resultados mostram que cerca de 70% do nitrogênio acumulado no vegetal era proveniente deste processo biológico de redução química do N₂ do ar em uma forma assimilável pela planta. Isto significa, que mesmo em solos pobres, a FBN pode ser suficiente para alcançar produções três vezes maiores que a média atual de produtividade no Brasil (54 ton/ha). Para tal deve-se fornecer todos os outros nutrientes essenciais, de acordo com a análise do solo, além da aplicação de molibdênio (que participa da síntese da enzima nitrogenase e está presente nas bactérias diazotróficas) e irrigação. A FBN é considerada como o principal fator responsável pelo balanço energético positivo na produção de combustíveis biológicos.

Dentre as várias bactérias diazotróficas isoladas da cultura da cana-de-açúcar podemos destacar a espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus*, hoje considerada um dos principais microrganismos que podem contribuir para a elevada taxa de FBN na cultura. Esta bactéria tolera condições de estresse como baixo pH e altas concentrações de sacarose, não possui nitrato redutase e a amônia causa apenas inibição

¹ Pesquisadores da Embrapa Agrobiologia, Caixa Postal 74505, CEP: 23851-970 Seropédica, RJ

² Bolsista do PIBIC, Estudante de Licenciatura em Ciências Agrárias, UFRRJ.

³ Engenheiro Agrônomo, estudante de doutorado da UFRRJ.

parcial da atividade da nitrogenase, especialmente quando a bactéria está crescendo sob altas concentrações de sacarose em meio de cultivo. É considerada uma bactéria endófito pois não foi isolada do solo mesmo entre as linhas de plantio de cana-de-açúcar. Está presente na rizosfera, raízes lavadas, raízes esterilizadas, colmo (basal até o apical), folhas e até no palhicho de cana-de-açúcar, além de estar presente em outras plantas como a batata-doce, capim elefante e café. Este caráter endófito é ecologicamente muito importante já que a bactéria recebe os nutrientes diretamente no interior do vegetal, não sofre estresses e nem competição com os organismos do solo e provavelmente permanece em sítios onde o acesso de O₂ é restrito, não tendo assim problemas de inibição da atividade da nitrogenase.

A técnica de isolamento descrita por Cavalcante & Döbereiner, (1988) foi modificada por Reis *et al.*, (1994), visando facilitar o isolamento e caracterização desta bactéria. Para tal foi modificada a concentração do caldo de cana presente no meio original tornando-o mais seletivo. Mesmo com a criação deste novo meio foram encontradas dificuldades para o isolamento desta bactéria em cana fresca, que é variável com a época do ano, distância do local de amostragem e variabilidade dentro da própria planta. Deve-se levar em consideração que uma cana adulta é um vegetal de aproximadamente 4 m de altura e tais bactérias distribuem-se de forma desuniforme e não apresentam nenhuma estrutura que indique a sua presença na planta. Foi buscando uma alternativa que minimizasse tais problemas é que se propõe uma nova estratégia de isolamento deste microrganismo.

No presente trabalho buscou-se isolar *A. diazotrophicus* de diversas variedades de cana-de-açúcar cultivadas em duas usinas localizadas no Estado de São Paulo. As plantas avaliadas eram oriundas do cultivo tradicional ou do cultivo de meristemas (micropropagadas). De cada variedade foram coletados parte da base do colmo e raízes para a avaliação da presença desta bactéria em amostras vindas diretamente do campo. Destas mesmas variedades foram colhidos toletes de cana-de-açúcar e divididos de forma a conterem apenas uma gema viável, as quais foram plantadas em bandejas com substrato (areia + vermiculita, 2:1) esterilizado. Aos trinta dias após o plantio as plantas germinadas foram divididas em raiz e parte aérea e efetuado o isolamento de *A. diazotrophicus* de acordo com Döbereiner *et al.*, (1995). Este mesmo procedimento de uso de toletes pré-germinados foi usado para analisar 45 variedades de cana-de-açúcar provenientes do Banco de Germoplasma pertencente à Estação Experimental de Campos da PESAGRO - Rio.

Como pode ser observado na tabela 1, as plantas coletadas na Usina São João em Araras - SP, oriundas de cultivo tradicional e pré-germinadas, mostraram que este procedimento facilita o isolamento desta bactéria. De forma geral, os isolados provenientes de amostras vindas direto do campo

possibilitaram a detecção da bactéria em apenas 3 das 24 amostras coletadas (13%), enquanto que o número de isolados subiu para 13 (54%) quando utilizou-se amostras de plantas pré-germinadas.

Outra informação importante que a metodologia proporcionou foi o isolamento de *A. diazotrophicus* de plantas oriundas de cultivo de meristemas (micropropagação ou cultura de tecidos). Este é o primeiro relato da presença de *A. diazotrophicus* em plantas micropropagadas cultivadas no campo. A cultura de meristemas já provou ser eficiente na “limpeza” do mosaico, carvão, raquitismo das soqueiras e escaldadura das folhas, doenças mais importantes da cultura canvieira. No entanto, a hipótese de que esta técnica também elimina os microorganismos benéficos como as bactérias endófitas fixadoras de N é bastante plausível.

Na tabela 2 são apresentados os resultados do isolamento usando-se toletes pré germinados de 45 variedades coletadas no Banco de Germoplasma da Pesagro (Campos-RJ). A quantidade dos isolados positivos obtidos das 45 variedades testadas mostra a facilidade do método no isolamento de *A. diazotrophicus*. Somente em 9 das 45 variedades não foi possível obter isolados desta bactéria. Quando usou-se o colmo apical de plantas com idade adulta de corte verificou-se que o isolamento foi positivo em apenas 1 das 15 variedades testadas. Além disso, esse novo procedimento permitiu maior rapidez no processo de isolamento e purificação dos isolados, conforme observado pela presença de película alaranjada no meio LGI-P semi-sólido. Com esta metodologia não há a necessidade de se repicar para novo meio LGI-P sem caldo como descrito no método (Reis et al., 1994), já que a bactéria está praticamente pura. Basta repicar para placas contendo meio LGI-P sólido e selecionar as colônias típicas, pois é raro o crescimento de outras bactérias. Este procedimento reduz em até 7 dias o processo de purificação. Além disso, tem-se a certeza desde o início de que a bactéria está presente na amostra.

Os resultados mostram que existe uma condição propícia para o estímulo populacional de *A. diazotrophicus* na fase de germinação dos toletes de cana-de-açúcar. Esta mesma facilidade não foi observada para outra bactéria endófito, o *Herbaspirillum* spp. Este gênero também coloniza a cana-de-açúcar, mas nesta fase só foi possível isolar e caracterizar dois isoladas das 45 variedades testadas até o momento.

Mais estudos são necessários para se entender a relação destes resultados com a fisiologia da planta. A facilidade de se isolar a bactéria *A. diazotrophicus* com este procedimento viabiliza o estudo de material propagativo oriundo de qualquer localidade, sem que haja modificação das propriedades inerentes de cada isolado. Estudos sobre a biodiversidade desta população já estão sendo feitos a partir deste procedimento, mostrando a viabilidade do uso dos toletes germinados para tal fim.

Tabela 1: Diluição máxima de onde foi isolada a bactéria *A. diazotrophicus* em plantas adultas e pré-germinadas de diferentes variedades de cana-de-açúcar oriundas de cultivo tradicional e cultura de tecidos

Variedades	Usinas	Partes da planta	Origem das plantas			
			cultivo tradicional		cultura de tecidos	
			pré-germinadas	direto do campo	pré-germinadas	direto do campo
			plantas utilizadas para isolamento			
			nº de células / g de peso fresco			
SP 80-3280	1	Raiz	10 ⁵	N.D	N.D	N.D
		Parte aérea	N.D	N.D	N.D	N.D
SP 80-1842	1	Raiz	N.D	N.D	N.D	N.D
		Parte aérea	N.D	N.D	N.D	N.D
SP 80-4445	1	Raiz	10 ³	N.D	10 ³	N.D
		Parte aérea	N.D	N.D	10 ³	N.D
SP 80-1816	2	Raiz	10 ⁷	N.D	10 ³	10 ³
		Parte aérea	10 ³	N.D	N.D	N.D
SP 80-1842	2	Raiz	10 ³	N.D	N.D	10 ³
		Parte aérea	10 ³	N.D	N.D	N.D
RB 85-5563	2	Raiz	10 ⁵	N.D	10 ⁵	N.D
		Parte aérea	10 ³	N.D	10 ³	10 ³

1. Usina São José - Pirassununga (SP). 2. Usina São João - Araras (SP). N.D. Não detectado (abaixo do nível mínimo de detecção). Os dados são médias de duas repetições

Tabela 2: Número de isolados de *A. diazotrophicus* obtidos em diferentes diluições de amostras de raízes e parte aérea provenientes de toletes pré-germinados de cana-de-açúcar.

Nº de variedades com isolamento positivo (45 variedades testadas)	RAÍZES			PARTE AÉREA		
	diluição na qual foi isolada			diluição na qual foi isolada		
	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶
BRASILEIRAS (10)	5	6	1	4	1	0
CANAL POINT - USA (7)	1	4	3	4	2	0
COIMBATORE - ÍNDIA (4)	1	2	0	4	2	1
JAVA (3)	2	3	3	0	1	0
HAVAI - USA (2)	1	2	1	1	1	0
BARBADOS (3)	2	1	0	1	0	1
MÉXICO (1)	1	0	1	0	0	0
ARGENTINA (1)	1	0	0	1	1	0
PORTO RICO (2)	2	2	2	1	1	0
CUBA (1)	1	1	0	1	0	0
outras (2)	1	0	1	1	1	0

variedades testadas entre parênteses

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAVALCANTE, V.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugar-cane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.108, p.23-31, 1988.

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

REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; DÖBEREINER, J. Improved methodology for isolation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, London, v.10, p.401-404, 1994.

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