



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: sac@cnpab.embrapa.br

COMUNICADO TÉCNICO

Nº 46, Dez/2000, p. 1-7



Ocorrência de Bactérias do Gênero *Azospirillum* spp. associadas à Gramíneas Forrageiras no Pantanal da Nhecolândia

Marivaine da Silva Brasil¹
Fernando Antonio Fernandes²
Vera L. Divan Baldani³

Estudos feitos com bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* spp. revelaram a importância destes microrganismos, notadamente quando associados à gramíneas, porque podem fornecer parte do nitrogênio necessário ao desenvolvimento da planta, através da fixação biológica de nitrogênio (FBN). Outro efeito é a produção de fitohormônios que estimulam o crescimento das raízes, favorecendo assim a absorção de nutrientes. Dessa maneira, os efeitos proporcionados pelas bactérias diazotróficas às plantas, poderiam aumentar a produtividade das espécies forrageiras utilizadas como pastagem (OKON & LABANDERA - GONZALES, 1994).

Atualmente há seis espécies descritas para o gênero *Azospirillum*: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, *A. irakense*, *A. largomobilis*. O descobrimento dessas espécies deveu-se principalmente à introdução de meios semi-sólidos sem nitrogênio, pois o *Azospirillum* spp. pode se deslocar para a região onde a taxa de difusão de O₂ está em equilíbrio com a taxa de respiração da bactéria, favorecendo a fixação de N₂ para seu crescimento e multiplicação (DÖBEREINER et al, 1995). Duas destas espécies são as mais estudadas *A. brasilense* e *A. lipoferum* (DÖBEREINER & DAY, 1976). Ocorrem em grande abundância nas regiões tropicais, em associações com gramíneas forrageiras, milho, trigo, arroz e sorgo. A espécie *A. amazonense* foi isolada inicialmente de gramíneas forrageiras da região Amazônica (MAGALHÃES, 1983), e posteriormente relatada em solo da rizosfera e raízes de arroz, milho e sorgo na região Centro-Sul do Brasil (BALDANI, 1984). As espécies *A. halopraeferans*, *A. largomobilis* e *A. irakense*, segundo DOBEREINER et al. (1995), ainda não foram isoladas em solos brasileiros.

No Pantanal da Nhecolândia, situado no Estado do Mato Grosso do Sul, a principal atividade sócio-econômica é a pecuária de corte que está sujeita a inundações sazonais provocadas por oscilações do nível da água do rio, distribuições das chuvas locais e altura do lençol freático. Segundo JUNK & DA SILVA (1995) a fonte de

¹ Mestranda em Ciência do Solo- UFRRJ

² PhD, Embrapa Pantanal, Corumbá, MS.

³ PhD, Embrapa Agrobiologia, km 7 BR 465, Seropédica 23.890-000, Rio de Janeiro.

inundação é muito importante para muitos aspectos ecológicos nas áreas sob alagamento, tais como diversidade de organismos e estado nutricional do solo. Uma das características que definem a composição das comunidades de organismos que colonizam áreas inundadas e os processos biológicos no solo seria o estresse causado ora pela falta de água (seca), ora pelo encharcamento devido a cheia dos rios (JUNK & DA SILVA, 1999).

As plantas e os animais são adaptados às enchentes e secas anuais do Pantanal, e quando as mesmas se manifestam de maneira extrema, representam um estresse adicional aos organismos. A falta de dados sobre o impacto desses períodos sobre a comunidade de plantas, animais e microrganismos nativos não permite uma avaliação detalhada do ecossistema (JUNO & DA SILVA, 1999).

Como mencionado anteriormente, a associação de bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* com as pastagens (naturais e exóticas) é de considerável importância, visto que esses organismos podem aumentar o valor nutritivo das forrageiras, fornecendo parte do nitrogênio requerido para o seu desenvolvimento. Estudos sobre a ocorrência desse grupo de microrganismos, bem como sua possível contribuição à incorporação de nitrogênio no ecossistema da região pantaneira, além do impacto dos ciclos sazonais de inundação sobre sua população, ainda são inexistentes. Por esta razão foi feito um estudo, visando estimar a população de *Azospirillum* spp. associadas às espécies forrageiras *Elyonurus muticus*, *Axonopus purpusii*, que são nativas, e à *Brachiaria humidicola*, cultivada na região, além do isolamento de *Azospirillum* spp. para utilização em estudos futuros.

As coletas das forrageiras (*E. muticus*, *A. purpusii* e *B. humidicola*) foram feitas aleatoriamente na área da fazenda Nhumirim (Embrapa Pantanal) nos períodos de janeiro de 98 e de 99 (época de alagamento) e setembro de 97 e de 98 (época de seca). Em cada coleta foram tomadas amostras de solo e raízes de 3 plantas distintas de cada espécie. No laboratório foram realizadas contagens do solo e raízes das três forrageiras pelo Método do Número mais Provável (NMP). As raízes (10g) foram lavadas em água corrente e destilada, cortadas em pedaços pequenos e em seguida maceradas, juntamente com 90 ml de solução salina, usada como diluente. Em seguida, a suspensão foi transferida para frascos de 125 ml e após homogeneização, foram efetuadas diluições em série de 10^{-2} até 10^{-6} em solução salina. O mesmo foi feito com o

solo, do qual retiraram-se 10 g que foram colocados em 90 ml de solução salina, agitada por mais ou menos 5 minutos, e em seguida a suspensão foi diluída de 10^{-2} até 10^{-6} .

Após serem efetuadas as diluições, inoculou-se 0,1 ml da suspensão em frascos contendo 5ml de meio NFb semi-sólido, para contagem de *A. lipoferum* e *A. brasilense*, e no meio LGI semi-sólido para contagem de *A. amazonense* (DÖBEREINER et al., 1995)

Decorridos cinco dias sob incubação à 30 °C, realizaram-se as contagens através de (NMP), usando-se a tabela de MacCraday, sendo considerados positivos os frascos das maiores diluições que apresentaram películas características. Três frascos por repetição da maior diluição, que apresentaram a película característica de *Azospirillum* spp., foram selecionados para efetuar o isolamento.

As culturas selecionadas, foram novamente repicadas para meio NFb ou LGI semi-sólido e incubadas à 30 °C por 2 dias. Novas culturas foram obtidas, as quais foram riscadas em placa de Petri contendo NFB ou LGI sólido e após 3 a 5 dias de incubação, uma colônia de cada placa foi transferida para meio NFb ou LGI semi-sólido e incubadas por 48 horas à 30°C , para a formação de película. Na purificação final, as culturas foram riscadas em placas contendo meio batata (BMS) e incubadas por 3 dias à 30°C. Uma colônia de cada placa foi repicada para novos meios semi-sólidos, NFb ou LGI, e depois da incubação por 30 horas à 30 °C, estocadas em meio batata inclinado (BMS) (DÖBEREINER et al., 1995). A identificação das espécies de *A. lipoferum*, *A. brasilense* e *A. amazonense*, foi feita através da morfologia das colônias em meio Batata (BMS), e também das células visualizadas em microscópio óptico (DÖBEREINER et al., 1995).

No primeiro levantamento da época seca, em 1997, (Tabela 1) nota-se que não houve quase nenhuma diferença do número de bactérias, em cada forrageira e para ambos os meios, mantendo-se sempre no patamar de 10^6 células/g de solo fresco.

Tabela 1. Número de bactérias no solo, no período de seca (setembro de 1997) utilizando-se dois diferentes meios de culturas (NFb para *Azospirillum* spp., e LGI para *A. amazonense*), expresso em números de células/g de solo fresco. Médias de três repetições.

Forrageira	Solo	
	NFb	LGI
<i>Axonopus purpusii</i>	4,68x10 ⁶	4,68x10 ⁶
<i>Brachiaria humidicola</i>	2,10x10 ⁶	2,25x10 ⁶
<i>Elyonurus muticus</i>	3,87x10 ⁶	5,08x10 ⁶

Na segunda contagem, realizada na época da cheia, em janeiro de 1998 (Tabela 2), a população do solo, em meio NFb, foi cerca de 10 vezes superior ao observado na raiz de *E. muticus*, sendo que para *A. purpusii* e *B. humidicola* os números de bactérias foram mais ou menos equivalentes. No meio LGI a população de *Azospirillum* no solo foi 10 vezes maior em *E. muticus*, mas nas outras gramíneas o número de bactérias foi 10 vezes maior na raiz.

Tabela 2. Número de bactérias no solo e nas raízes das forrageiras, no período das águas (janeiro de 1998) utilizando-se dois diferentes meios de culturas (NFb para *Azospirillum spp.*, e LGI para *A. amazonense*), expresso em números de células/g de solo, ou raiz, fresco. Médias de três repetições.

Forrageira	Raiz		Solo	
	NFb	LGI	NFb	LGI
<i>Axonopus purpusii</i>	1,48x10 ⁶	1,26x10 ⁷	1,78x10 ⁶	8,25x10 ⁶
<i>Brachiaria humidicola</i>	3,39x10 ⁵	1,45x10 ⁶	0,81x10 ⁵	1,32x10 ⁵
<i>Elyonurus muticus</i>	0,87x10 ⁵	1,29x10 ⁵	2,75x10 ⁶	6,64x10 ⁶

No terceiro levantamento, realizado novamente no período da seca de setembro de 1998 (Tabela 3), é possível verificar que para *A. purpusii* e *B. humidicola* a população de *Azospirillum* em NFb foi aproximadamente 100 vezes menor no solo em comparação ao observado nas raízes. Em *E. muticus* a situação foi semelhante, mas o número observado no solo foi somente 10 vezes menor do que na raiz. No meio LGI estas diferenças foram ainda maiores. Em *B. humidicola* o número de bactérias nas raízes foi 1000 vezes maior do que o observado no solo (10⁷ na raiz e 10⁴ no solo).

Tabela 3. Número de bactérias no solo e nas raízes das forrageiras, no período da seca (setembro de 1998) utilizando-se dois diferentes meios de culturas (NFb para *Azospirillum spp.*, e LGI para *A. amazonense*), expresso em números de células/g de solo, ou raiz, fresco. Médias de três repetições.

Forrageira	Raiz		Solo	
	NFb	LGI	NFb	LGI
<i>Axonopus purpusii</i>	$7,34 \times 10^6$	$7,9 \times 10^6$	$5,3 \times 10^4$	$\leq 10^2$
<i>Brachiaria humidicola</i>	$7,34 \times 10^6$	$1,26 \times 10^7$	$3,6 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$
<i>Elyonurus muticus</i>	$1,17 \times 10^7$	$1,17 \times 10^7$	$3,17 \times 10^6$	$1,13 \times 10^5$

Na última contagem, que ocorreu no período das águas, em janeiro de 1999 (Tabela 4), encontrou-se uma população de bactérias 10.000 vezes maior nas raízes do que no solo, quando se utilizou o meio NFb, e 100 vezes maior quando se utilizou o meio LGI. A forrageira que apresentou o maior número de bactérias, tanto na raiz quanto no solo, foi *A. purpusii*.

Tabela 4. Número de bactérias no solo e nas raízes das forrageiras, no período das águas (janeiro de 1999) utilizando-se dois diferentes meios de culturas (NFb para *Azospirillum spp.*, e LGI para *A. amazonense*), expresso em números de células/g de solo, ou raiz, fresco. Médias de três repetições.

Forrageira	Raiz		Solo	
	NFb	LGI	NFb	LGI
<i>Axonopus purpusii</i>	$1,17 \times 10^7$	$1,26 \times 10^7$	$6,00 \times 10^4$	$2,22 \times 10^5$
<i>Brachiaria humidicola</i>	$9,14 \times 10^6$	$6,91 \times 10^6$	$\leq 10^2$	$7,5 \times 10^4$
<i>Elyonurus muticus</i>	$9,75 \times 10^6$	$9,75 \times 10^6$	$6,50 \times 10^4$	$6,50 \times 10^4$

A percentagem de ocorrência das espécies *A. lipoferum*, *A. brasilense* e *A. amazonense* no solo e nas raízes das gramíneas amostradas está na Tabela 5. Independente da espécie forrageira amostrada, as bactérias que predominaram nas raízes das plantas foram identificadas como *A. amazonense* e *A. brasilense*.

Tabela 5- Percentagem de isolados de *A. lipoferum*, *A. brasilense* e *A. amazonense* encontrados no solo ou nas raízes de *A. purpusii*, *B. humidicola* e *E. muticus*.

Tipo de planta	Parte da Planta	nº total de estirpes isoladas	% de isolados identificados como		
			<i>A. lipoferum</i>	<i>A. brasilense</i>	<i>A. amazonense</i>
<i>A. purpusii</i>	Solo	10	40,0	30,0	30,0
	Raiz	11	-	45,4	34,5
<i>B. humidicola</i>	Solo	9	11,1	44,4	44,4
	Raiz	14	-	28,6	71,4

<i>E. muticus</i>	Solo	15	26,6	40,0	33,3
	Raiz	13	-	46,1	53,8

As épocas de cheia e de seca influenciaram as populações de bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Azospirillum*, notando-se que as populações diferiram entre as forrageiras nativas. Esse fato, provavelmente, está relacionado às características adaptativas das forrageiras que sempre se desenvolveram sob as variações sazonais de umidade nos solos da região. Pode-se observar que *E. muticus* teve uma densidade de bactérias maior tanto no solo como na raiz, quando comparado com *A. purpusii*, no período de seca (set/97 e set/98), ocorrendo o inverso na cheia (jan/98 e jan/99). Assim, pode-se supor que a primeira espécie pode estar adaptada às condições de seca e a outra às condições de inundação. ALLEN & VALLS (1987), confirmam estes resultados quando descreve que *A. purpusii* aparece em formações compactas no solo arenoso, suportando bem a submersão, e quando o nível de água torna-se baixo regenera a cobertura vegetal por ter uma reprodução muito eficiente. Já *E. muticus* não suporta o alagamento prolongado do solo e na seca adapta-se bem por possuir raízes que alcançam o lençol freático.

Em *Brachiaria humidicola* foram observados números de bactérias relativamente menores que em pastagens nativas, demonstrando que a associação entre a bactéria e essa gramínea é menos adaptada aos ciclos de seca e enchente, comuns neste ambiente.

No presente trabalho nota-se ainda que existem variações nas populações de *Azospirillum* do solo quando comparadas com a superfície da raiz, o que provavelmente ocorre porque na região sob influência da raiz há uma grande circulação de nutrientes o que favorece a proliferação de microrganismos. O maior número de bactérias do gênero *Azospirillum* nas raízes, quando compara-se ao solo (10^5 - 10^7 , Tabelas 2, 3, 4), possivelmente deve-se a inúmeros fatores como: aderência das bactérias, baixa competição com outros microrganismos, menor predação favorecida pela proteção das raízes, especificidade com a gramínea hospedeira, entre outros. BALDANI (1984), também observou maiores densidades deste gênero na raiz em comparação ao solo. BALANDREAU (1986) detectou em seu estudo que pedaços de raízes inoculadas dentro de condições microaerofílicas, apresentaram populações dez vezes maiores do que as observadas em solo.

Sugere-se a continuação desse estudo, visando a quantificação, em condições de campo, da entrada de nitrogênio por FBN nesse ecossistema e um melhor conhecimento das interações dessas gramíneas com os microrganismos, a fim de que através de práticas de manejo da pastagem, a FBN associativa seja favorecida.

Referências Bibliográficas

- ALLEM, A.C.; VALLS, J.F.M. **Recursos forrageiros nativos do Pantanal Mato-Grossense**. Brasília: Embrapa-CENARGEN, 1987. 339p.(Embrapa-CENARGEN, Documentos, 8).
- BALANDREAU, J. Ecological factors and adaptive processes in N₂-fixing bacterial populations of the plant environment. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.90, p.73-92, 1986.
- BALDANI, J.I. **Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com outras espécies deste gênero, em raízes de milho, sorgo e arroz**. Rio de Janeiro, UFRJ. 110p.(Dissertação de Mestrado), 1984.
- DOBEREINER, J.; DAY, S.M. Associative symbiosis in tropical grasses : characterization of microorganisms and dinitrogen-fixation sites. In: NEWTON, W.E.; NYMON, C.J.(eds), **Proceedings on de 1st Int Symp on Nitrogen Fixation**. Washington State Universidade Press, Pullman. 2, 1976. pp. 518-538
- DOBEREINER, 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.
- JUNK, W.J.; DA SILVA, C.J. **O Conceito de Pulso de Pulso de Inundação e suas implicações para o Pantanal do Mato Grosso**. Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal, 2., 1996, Corumbá, MS. Manejo e Conservação. Anais ...Corumbá : Embrapa Pantanal, 1999, 535p.
- JUNK, W.J.; DA SILVA, C.J. Neotropical floodplains: A comparison between the Pantanal of Mato Grosso and the large Amazonian river floodplains. In: TUNDISI, J.G., BUCUDU, C.E., TUNDISI, T.M., eds. **Limnology in Brazil**. Rio de Janeiro: Brazilian Academy of Sciences Brazilian Limnological Society, 1995. p.195-217
- MAGALHÃES, F.M.M. **Caracterização e distribuição de uma nova espécie de bactéria fixadora de nitrogênio**. INPA/UFA, Manaus/AM, 1983. Tese de Mestrado.
- OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C.A. Agronomic Applications of *Azospirillum* : An evaluation of 20 years Wordwilde field Inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.26, p.1591-1601, 1994.