

# Caracterização Fenotípica de Bactérias Diazotróficas Endofíticas Isoladas de Capim-buffel no Semiárido de Pernambuco

## Phenotypic Characterization of Diazotrophic Endophytic Bacteria Isolated from Buffel Grass in the Semi-Arid Region of Pernambuco State

*Gabiane dos Reis Antunes<sup>1</sup>; Tadeu Vinhas Voltolini<sup>2</sup>; Gherman Garcia Leal de Araújo<sup>3</sup>; Indra Elena Costa Escobar<sup>4</sup>; Maria Idaline Pessoa Cavalcanti<sup>5</sup>; Katherine Gomes Oliveira<sup>6</sup>; Tailane Ribeiro do Nascimento<sup>7</sup>; Sheila Rios Assis Santana<sup>7</sup>; Paulo Ivan Fernandes Júnior<sup>8</sup>*

### Abstract

Diazotrophic associations with forage grasses are important for the increase in forage production, improved fodder plant quality with additional source of N. The aim of this study was to phenotypically characterize bacteria that can fix nitrogen, isolated from buffel grass collected directly from a caatinga area, at three different points. Roots were sterilized and crushed with a saline solution for subsequent serial dilution. Aliquots were inoculated in triplicate in penicillin glass bottles containing semisolid medium BMGM. The flasks were incubated for seven days, and those who developed a close aerotaxis typical film surface of the medium were scratched in Petri dishes. The growth monitoring bacteria were purified amid Dyg's and reinoculated in the middle BMGM. After purification, the bacterial colonies were phenotypically characterized in terms for color, mucus, size, elevation, shape and transparency of the colonies. The variables comprise a dendrogram of similarity prepared with the UPGMA method (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), using the PAST program. After isolation of 24 bacteria, 13 showed the film after reinoculation. Of the 24 bacterial evaluated phenotypic eight groups were formed with 100% similarity.

**Keywords:** grass, microorganisms, animal production.

### Introdução

A pastagem é a principal fonte de alimentação de ruminantes, especialmente nas regiões tropicais, tornando imprescindível a sua utilização e otimização do consumo e da disponibilidade de seus nutrientes. No entanto, apesar de as pastagens apresentarem respostas positivas às adubações nitrogenadas, a sua deficiência ainda é apontada como a principal causa da redução da produtividade (VASCONCELOS, 2006).

<sup>1</sup>Mestranda em Ciência Animal, Universidade Federal do Vale do São Francisco (Univasf), bolsista Facepe, Petrolina, PE, gabianezeoot@gmail.com.

<sup>2</sup>Zootecnista, D.Sc. em Ciência Animal, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, tadeu.voltolini@embrapa.br.

<sup>3</sup>Zootecnista, D.Sc. , D.Sc. em Ciência Animal, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, gherman.araujo@embrapa.br.

<sup>4</sup>Bolsista do Programa Nacional de Pós Doutorado, Univasf, Petrolina, PE.

<sup>5</sup>Mestranda em Ciências Agrárias, UEPB, Campina Grande, PB.

<sup>6</sup>Graduandas em Ciências Biológicas, UPE, Petrolina, PE.

<sup>7</sup>Mestranda em Ciência Animal.

<sup>8</sup>Biólogo, D.Sc. em Agronomia, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, Paulo.ivan@embrapa.br.

Apesar da grande importância do nitrogênio (N), as fertilizações nitrogenadas tendem a elevar os custos da produção, além disso, parte do N é frequentemente perdida, reduzindo a sua eficácia e comprometendo a produtividade (PRIMAVESI et al., 2004).

A associação de bactérias diazotróficas com gramíneas forrageiras pode ser importante para o aumento na produção de forragem e melhoria da qualidade da planta, com aporte adicional de N (SILVEIRA, 2008). Dentre as gramíneas de maior importância, está o capim-buffel (*Cenchrus ciliaris* L.), espécie adaptada ao clima da região semiárida, que pode ser colonizada por bactérias fixadoras de nitrogênio, contribuindo assim para o crescimento desta e de outras espécies forrageiras.

Com este trabalho, objetivou-se caracterizar fenotipicamente bactérias capazes de fixar nitrogênio, isoladas a partir do capim-buffel.

## Material e Métodos

A espécie forrageira foi coletada na área experimental (Sistema Caatinga, capim-buffel e leucena – CBL), localizada na Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. A coleta foi realizada no mês de outubro de 2014. Foram coletadas no campo, plantas saudáveis e adultas de capim-buffel. Em cada ponto, foram coletadas ao menos três plantas, para formar uma amostra composta, totalizando-se três amostras. As amostras de capim foram acondicionadas em sacos plásticos e transportadas para o laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Semiárido e armazenadas em câmara fria até o processamento do material, 7 dias após a coleta.

Para o isolamento das bactérias, foi realizada a separação da parte aérea e da raiz. As raízes foram lavadas superficialmente em água corrente para a retirada do excesso de solo e desinfestadas superficialmente por imersão numa solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) por 10 minutos e posteriormente lavadas abundantemente com água destilada autoclavada. As amostras foram fragmentadas em alíquotas de 10 g e foram trituradas com 90 mL de NaCl 0,85% (p/v) em miniprocessador, a fim de se obter uma solução na concentração  $10^1$ . Posteriormente, foram realizadas as diluições seriadas de  $10^1$  a  $10^4$ . Para cada diluição, alíquotas de 0,1 mL, foram inoculadas em triplicata, em frascos de vidros contendo 7 mL do meio BMGM semissólido (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001). Os frascos foram incubados a 30 °C, por 7 dias e, após esse período, aqueles que desenvolveram uma película aerotóxica típica próxima da superfície do meio foram riscados em placas de Petri, onde permaneceram à 30 °C por 3 dias.

As bactérias foram purificadas em meio Dyg's e após a obtenção das culturas puras foram novamente reinoculadas em meio BMGM semissólido para a confirmação da capacidade de fixação do nitrogênio em condições microaerofílicas. Os frascos que continuaram a desenvolver a película foram novamente riscados em placas de Petri, para posterior caracterização fenotípica das colônias, avaliando-se a cor, presença de muco, tamanho, elevação, forma e transparência das colônias. As características avaliadas comporam uma planilha binária e um dendrograma de similaridade, utilizando-se o coeficiente de similaridade de Bray-Curtis, elaborado com o método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), utilizando-se o programa PaSt (HAMMER et al., 2001).

## Resultados e Discussão

Dentre as 24 bactérias caracterizadas, 13 formaram película aerotóxica. Os isolados foram agrupados com base na cor, presença de muco, tamanho, elevação, forma e transparência das colônias (Tabela 1).

**Tabela 1.** Caracterização fenotípica dos oito grupos fenotípicos obtidos por meio através do agrupamento das bactérias diazotróficas isoladas de raízes de capim-buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) – método de agrupamento UPGMA e Coeficiente de similaridade de Bray-Curtis.

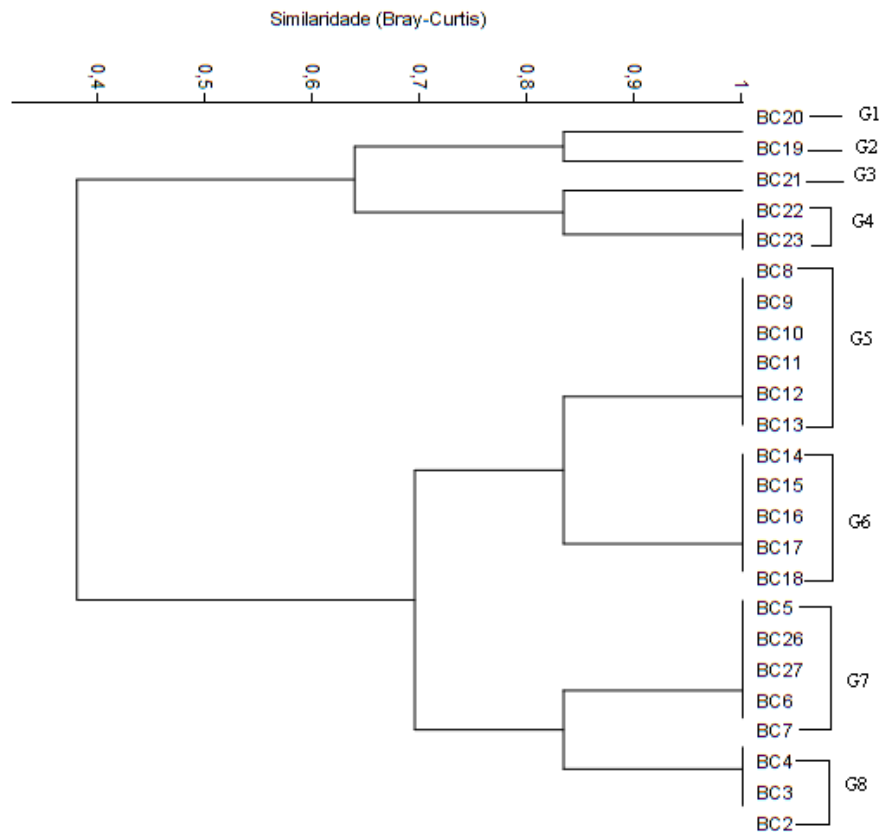
Grupos (n° de isolados)	TC	FC	AC	TC2	CC	QM
Grupo 1 (1)	<2	Ir	He	Tr	Br	PM
Grupo 2 (1)	<2	Ir	He	Tr	Br	MM
Grupo 3 (1)	<2	Ir	Ho	Tr	Br	PM
Grupo 4 (2)	<2	Ir	Ho	Tr	Cr	PM
Grupo 5 (6)	<2	Ci	He	Tr	Cr	PM
Grupo 6 (5)	<2	Ir	He	Tr	Cr	MM
Grupo 7 (5)	>2	Ci	He	Tr	Am	MM
Grupo 8 (3)	>2	Ci	He	Op	Am	MM

<sup>1</sup>Grupo fenotípico dos isolados <sup>2</sup>TC1 – tamanho da colônia (> 2 mm a <2 mm); FC- forma da colônia ( Ci: circular, Ir: irregular); AP- aparência da colônia (Ho: homogênea, He: heterogênea); TC2- transparência da colônia (Op: opaca, Tr: translúcida) CC - cor da colônia (Am: amarela, Br: branca, Cr: creme) QM - quantidade de muco (MM: muito, PM: pouco).

Dentre os 24 isolados, 66,6% apresentaram tamanho menor que 2 mm. No que diz respeito à forma e aparência da colônia, 41,6% foram irregulares, 87,5% colônias heterogêneas e 87,5% apresentaram colônias translúcidas. Avaliando a coloração, as bactérias diferenciaram-se em amarelas (33,3%), brancas (12,5%) e cremes (54,1%). Quanto à produção de muco, todos os isolados apresentaram essa característica, mas somente 37,5% produziram pouco muco.

No dendrograma de similaridade é possível observar a formação de oito grupos fenotípicos com 100% de similaridade, demonstrando uma grande diversificação da coleção (Figura 1). Pode-se observar, também, que todos os isolados apresentaram similaridade inferior a 40%.

O resultado corrobora com o estudo de Santos et al. (2013), em estudo realizado no Semiárido Paraibano, no qual foram observados cinco grupos similares no capim-buffel. Isso pode sugerir a preferência de alguns isolados por determinadas espécies de plantas, muito embora ainda não tenha sido demonstrada especificidade hospedeira típica entre as espécies de *Azospirillum* spp. e a planta hospedeira (BASHAN; HOLGUIN, 1997).



**Figura 1.** Dendrograma de similaridade baseado nas características fenotípicas de 24 isolados de bactérias diazotróficas oriundas de raízes de capim-buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) na Caatinga.

## Conclusão

Nas condições do Semiárido de Pernambuco, há elevada diversidade fenotípica das bactérias isoladas de capim-buffel.

## Agradecimentos

À Facepe, pela bolsa concedida e à Embrapa Semiárido pelas instalações concedidas.

## Referências

- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Azospirillum -plant relationships environmental and physiological advances. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 103-121, 1997.
- ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. Burkholderia a genus rich in plant associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2.790-2.798, 2001.
- HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, Boulder, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.

PRIMAVESI, A. C.; PRIMAVESI, O.; CORRÊA, L. de A.; CANTARELLA, H.; SILVA, A. G. da; FREITAS, A. R. de; VIVALDI, L. J. Adubação nitrogenada em capim Coast cross: efeitos na extração de nutrientes e recuperação aparente do nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 33, n. 1, p. 68-78, 2004.

SANTOS, M. C. M.; SANTOS, D. R.; BAKKE, O. A.; BAKKE, I. A. Ocorrência e atividade de bactérias diazotróficas em forrageiras cultivadas na região semiárida no Brasil. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 26, n. 1, p. 27-34, 2013.

SILVEIRA, E. L. **Inoculações de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva**. 2008. 83 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

VASCONCELOS, C. N. **Pastagens: implantação e manejo**. Salvador: EDIBA, 2006. 177 p.