

# Caracterização de bactérias diazotróficas isoladas de gramíneas nativas do Pantanal Sul Mato-Grossense

MAYARA SILVA TORRES DE SOUZA<sup>(1)</sup>, MARIVAINÉ DA SILVA BRASIL<sup>(2)</sup> & SANDRA APARECIDA SANTOS<sup>(3)</sup>

**RESUMO-** A fixação biológica de nitrogênio (FBN) por bactérias diazotróficas associadas a raízes de gramíneas forrageiras pode garantir o fornecimento de nitrogênio de forma adequada melhorando a produtividade e sustentabilidade das forrageiras, utilizadas como pastagem natural na pecuária de corte na região. Este trabalho teve como objetivos, verificar a população de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras nativas do Pantanal e caracterizá-las morfofisiologicamente. Foram isoladas e caracterizadas 44 bactérias sendo 33 caracterizadas como *Azospirillum amazonense* e 11 como do gênero *Azospirillum spp.* Foram avaliados nestes isolados a presença de película característica de diazotrófica, características morfológicas, atividades enzimáticas de solubilização de fosfato e amilase. Para o teste de solubilização de fosfato sete isolados apresentaram halo sendo a maioria com película para FBN. Quanto ao teste para a atividade amilolítica, 16 isolados apresentaram halo sendo que destes, 14 apresentaram característica diazotrófica. Apenas um dos isolados a AMM7 apresenta característica de diazotrófica, atividade amilolítica e fosfatase. Esses resultados possibilitaram identificar atividade amilolítica em isolados caracterizados como pertencentes à espécie *Azospirillum amazonense*.

**Palavras – Chave:** (Fixação Biológica de Nitrogênio, *Azospirillum*, morfofisiologia)

## Introdução

No Pantanal, uma das principais atividades socioeconômicas é a pecuária de corte, conduzida de maneira extensiva, com alimentação do rebanho constituída principalmente de pastagens nativas. O sistema de manejo mais utilizado dessas pastagens é o contínuo, com utilização praticamente inexistente de insumos agrícolas, principalmente dos fertilizantes nitrogenados.

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) por bactérias diazotróficas associadas às raízes de gramíneas forrageiras pode ser importante nas condições encontradas no Pantanal, uma vez que o fornecimento de nitrogênio de forma adequada pode melhorar a produtividade, a longevidade e o valor nutritivo das forrageiras,

utilizadas como pastagem natural na pecuária de corte na região. Esta associação poderá, em médio prazo, contribuir para a sustentabilidade da região.

A FBN realizada por bactérias diazotróficas constitui a principal via de incorporação de nitrogênio ao ecossistema, que constantemente é reciclado para a atmosfera principalmente pela ação de organismos decompositores de matéria orgânica do solo. Dessa forma, a ação desses microrganismos e denitrificadores garantem um reservatório inesgotável de nitrogênio na atmosfera [1].

Dados sobre a ecologia e da população de bactérias diazotróficas encontrada na rizosfera das gramíneas do Pantanal, bem como o tamanho, densidade e diversidade dessa população quase são inexistentes. Faltam também informações sobre a variabilidade e diversidade dessas bactérias em função das variações dos fatores ecológicos, climáticos e antrópicos que afetam o Pantanal. A escassez de informações em relação a este sistema torna-se preocupante à medida que as alterações imediatas, em nível de ecossistema, em geral estão sendo causadas por atividades antrópicas agressivas como as monoculturas intensivas no planalto, com o uso de agrotóxicos e aporte de sedimentos e a mineração, resultando efeitos danosos já reconhecidos como a contaminação, o desmatamento e as alterações morfológicas dos rios que formam esta planície [2]. Assim este trabalho tem como objetivos, verificar a população de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras nativas do Pantanal e caracterizá-las morfofisiologicamente.

## Material e Métodos

### Coleta das amostras

Este estudo foi realizado na fazenda Nhumirim, localizada na sub-região da Nhecolândia, pertencente à Embrapa Pantanal. Para o desenvolvimento deste trabalho, foram coletadas as gramíneas nativas *Axonopus purpusii*, *Mesosetum chaseae* e *Panicum laxum* e *Panicum repens* gramínea exótica na fazenda Nhumirim, sob sistema de manejo contínuo. Foram amostradas raízes e solo rizosférico. Em seguida, foram feitos os procedimentos para contagem e isolamento de bactérias diazotróficas.

(1) Acadêmica do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campus do Pantanal, MS. Bolsista IC- Pibic- CNPq

(2) Professora da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul- Campus do Pantanal- Corumbá - MS

(3) Pesquisadora Produção Animal Sustentável, Embrapa Pantanal. Corumbá,MS.

### **Contagem e Isolamento.**

Dez gramas de raízes foram lavadas em água corrente, trituradas em 90 mL de solução salina e diluídas serialmente até  $10^{-6}$ . De cada diluição foi retirado 0,1 mL e inoculado em frascos contendo 5,0 mL dos meios semi-seletivos LGI e JNFB para a espécie *Azospirillum amazonense* e para o gênero *Azospirillum* spp., respectivamente seguindo a metodologia proposta por Dobereiner et. al [3]

Após a contagem foi feito o isolamento de bactérias diazotróficas, no qual os frascos das maiores diluições positivas, foram repicados para novos meios semi-sólidos semi-específicos (LGI e JNFB) e incubados por 3 dias a 30°C. Decorridos os três dias de incubação os frascos que apresentaram película, foram riscados em placas contendo meios sólidos semi-específicos (LGI e JNFB).

Para a purificação final, as colônias crescidas, após a riscagem nesses meios e incubação por cinco dias a 30 °C foram transferidas para novo meio LGI e JNFB semi-sólido, e após a formação do véu foram riscadas em placas de meio de batata.

### **Caracterização morfofisiológica**

Todos os isolados puros (44) foram caracterizados quanto às características morfológicas de suas colônias como: forma, tamanho, cor, elevação, tipo de superfície e consistência.

#### **Atividades enzimáticas**

##### **- Solubilização de Fosfato**

A capacidade de solubilização de fosfato insolúvel foi testada em meio de cultura GL sólido [4]. As bactérias foram previamente cultivadas em meio DYGS e uma alíquota de 20 µL foi inoculada na superfície da placa de Petri, em forma de pontuações. O diâmetro do halo de solubilização foi observado como uma área translúcida em torno da colônia após sete dias de incubação.

##### **- Atividade Amilolítica**

Para verificação da atividade de utilização do amido, todos os isolados foram inoculados em meio sólido CP, suplementado com amido 1%, sem corante, pH inicial 6,8. A identificação da atividade amilolítica foi realizada após 2-3 dias (ou mais quando necessário) de incubação a 30°C, através da observação do halo formado, que pode ser mais bem identificado através da utilização de solução de iodo 0,5%, que permite a visualização de uma zona mais clara e transparente ao redor da colônia, em contraste com o meio marrom escuro, que indica atividade amilolítica.

### **Resultados**

#### **Contagem de bactérias**

Foi obtido no meio de cultura JNFB maior número de bactérias ( $1,1 \times 10^7$  bactérias/g de

raiz) nas raízes do *A. purpusii*, já no meio LGI obteve-se maior número de bactérias ( $1,4 \times 10^7$  bactérias/g de raiz) nas raízes do *P. Laxum* (Figura 1).

#### **Isolamento e caracterização morfológica**

Foram isolados 44 bactérias sendo 33 identificadas como *Azospirillum amazonense* e 11 como do gênero *Azospirillum* spp.

Quanto às características morfológicas estudadas, observou-se no meio LGI que houve maior variabilidade das colônias isoladas de *A. purpusii*, seguida da *M. chaseae* e *P. repens*. Os isolados de *P. laxum* foram os que menos apresentaram colônias diferentes neste meio. Já no meio JNFB houve maior variabilidade morfológica das colônias de bactérias isoladas de *A. purpusii*, seguida de *P. Laxum* e *P. repens* (Figura 2).

Nos isolados obtidos da espécie *Azospirillum amazonense*, foi comum as colônias apresentarem elevação convexa, coloração amarela uniforme e amarela no centro, tamanho superior a 1 mm e serem granuladas, apenas dois isolados do *A. purpusii* apresentaram consistência viscosa e um do *P. repens* consistência pouco viscosa.

Nos isolados obtidos do gênero *Azospirillum* spp., foi comum as colônias apresentarem elevação plana, coloração branca no centro, tamanho superior a 1mm e serem pouco viscosas. Apenas *P. repens* teve consistência viscosa. Vale salientar que todos os isolados apresentaram forma circular. A maioria dos isolados deste gênero apresentaram superfície lisa e brilhante, com exceção de dois isolados, AZM9 e AZM11 que possuem superfície rugosa e brilhante e superfície seca, respectivamente (Figura 2).

#### **Atividade enzimática**

##### **- Solubilização de fosfato e atividade amilolítica**

De um total de 44 isolados testados, 34 (75%) apresentam película característica de diazotrófica. Para o teste de solubilização de fosfato, sete isolados apresentaram halo (16% do total) sendo que destes, quatro (57%) apresentaram película para FBN. Quanto ao teste para a atividade amilolítica, 16 isolados apresentaram halo (36% do total) sendo que destes, 14 (87,5%) apresentam característica diazotrófica. Apenas um dos isolados (AMM7) apresenta características diazotrófica, amilolítica e fosfatase. Esse resultado sugere que a bactéria AMM7 isolada do *Mesosetum chaseae* possui um complexo enzimático mais diverso em relação aos outros isolados bacterianos. Porém, vale salientar, que dos 44 isolados estudados, cinco não revelaram nenhuma atividade para nenhuma das enzimas avaliadas e 22 não revelaram atividade para

solubilização de fosfato e atividade amilolítica. Cabe ressaltar que dos isolados que apresentaram atividade amilolítica, dois, AZM13 e AMM31, não são muito eficientes para essa atividade (Tabela 1).

#### **Discussão**

##### **Contagem**

Em estudos já realizados com *A. purpusii* foram encontradas em meio JNFB  $10^5$  células/g de raiz e  $10^7$  células/g de raiz em meio LGI [5], ao contrário do encontrado nesse trabalho para a mesma época (seca). O número de bactérias pode variar dependendo das condições edafoclimáticas. Estudo realizado com cana-de-açúcar demonstrou que a distribuição de bactérias diazotróficas sofreu influência da época do ano [6]. Outro trabalho mostrou que em solos com progressiva deficiência hídrica (mais de 20 dias), as plantas de cana-de-açúcar apresentaram um baixo número de bactérias fixadoras de nitrogênio por grama de raiz [7]. A época de coleta apresentou efeitos significativos sobre a população de bactérias diazotróficas associadas a raízes de *Brachiaria*, apresentando um menor número na época de estação seca no inverno [8].

##### **Morfologia**

A coloração das colônias de *A. brasilense* e *A. lipoferum* formadas no meio sólido JNFB, são pequenas, secas e brancas. Em meio de batata as colônias dessas duas espécies são inicialmente, branco amareladas, tornando-se róseas, pequenas e estruturadas após uma semana de incubação [3]. Os resultados obtidos nesse trabalho foram semelhantes ao descrito para ambas as espécies, com algumas diferenças sutis observadas em alguns isolados (Figura 2).

Em relação à espécie *A. amazonense* as colônias formadas no meio sólido LGI, após cinco dias, são pequenas, brancas e estruturadas. Em meio de batata as colônias dessa espécie formam colônias grandes (até cinco mm) bem distintas, de coloração branca, achatadas e com bordas elevadas. A forma da colônia pode ser alterada de acordo com a fonte de C e N usada [3]. Os isolados provenientes do meio LGI apresentaram coloração de colônia diferente daquelas descritas para espécie, isso pode ser atribuído ao tempo de crescimento.

##### **Atividade enzimática**

###### **- Solubilização de fosfato**

Muitas bactérias apresentam a característica de solubilizar fosfato, insolúvel através de vários processos, porém poucos estudos relatam esta atividade em bactérias fixadoras de nitrogênio [9]. Porém para o gênero *Azospirillum* são relatados trabalhos para as espécies *A. halopraeferans* [9], *A. brasilense* (estirpe CD e CC322) [10,11] *A. lipoferum* (estirpe JA4) [10]. No presente trabalho, os

isolados que apresentaram halo de solubilização de fosfato foram caracterizados morfologicamente como pertencentes à espécie *A. amazonense*, porém não há trabalhos relatando a atividade fosfatase para essa espécie.

A sacarose é a fonte de carbono utilizada para isolamento e de preferência da espécie *A. amazonense*, esta é prontamente transformada em glicose. A glicose pode ativar o processo de solubilização, enquanto que outras fontes de carbono de degradação mais lenta, não promovem tal efeito rapidamente [12]. O trabalho de Deubel et. al [13] evidencia que o tipo de açúcar usado como fonte de carbono no meio de cultura influencia a solubilização de fosfato in vitro. E ainda o meio de cultura utilizado para verificar a atividade fosfatase é acrescido de glicose, o que pode favorecer os isolados que tem preferência por essa fonte de carbono.

###### **- Atividade amilolítica**

São poucos os trabalhos disponíveis que associam *Azospirillum* à atividade amilolítica. No trabalho de Emtiazi et. al [14] os autores obtiveram isolados de planta de milho caracterizados como fixadores de nitrogênio e que apresentavam atividade celulolítica e amilolítica, sugerindo que os mesmos podem fazer a degradação de resíduos celulose e amido, para gerar energia. Em outro trabalho Emtiazi et al; [15] mostrou a atividade celulase em bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Paenibacillus*. Foi observada a atividade amilase nos isolados deste trabalho, bem como característica diazotrófica para alguns deles, isto sugere que os mesmos tem atividade de degradação de compostos orgânicos. Há relatos de atividade amilase em outras diazotróficas como o trabalho de Oliveira et al.[16] que observou a produção de amilase por rizóbios tendo a farinha da pupunha como substrato, registrou 19 isolados com atividade amilolítica em meio YMA modificado. Oliveira et al [16] sugerem uma possível participação de algumas glicosidasas, como as amilases, no estabelecimento intracelular da simbiose leguminosa versus rizóbio. Alguns microrganismos associativos podem lançar mão da enzima amilase para colonização da rizosfera de raízes.

##### **Conclusões**

1) O número de bactérias associadas às raízes de três espécies de gramíneas nativas (*A. purpusii*, *M. chauseae* e *P. laxum*) foi maior quando comparada com uma gramínea exótica (*P. repens*).

2) O isolamento e caracterização morfofisiológica propiciaram identificar, pela primeira vez, a solubilização de fosfato para a espécie *Azospirillum amazonense*.

## Agredimentos

Os autores agradecem a UFMS, Embrapa Pantanal, a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do estado de Mato Grosso do Sul - FUNDECT, chamada Fundect/CNPq N° 02/2007-PPP, pelo apoio financeiro.

## Referências

- [1] MARIN, V.A.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.R. DOS S.; BALDANI, J.I. 1999. Fixação Biológica de Nitrogênio: Bactérias Fixadoras de Nitrogênio de Importância para a Agricultura Tropical. **EMBRAPA Agrobiologia**. Disponível <<http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/doc091.pdf>>. Acesso em: 30/09/08.
- [2] EMBRAPA, Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal - CPAP. 1991. Ecologia de áreas alagáveis (atualização e discussão). **Boletim de Pesquisa**. Corumbá: EMBRAPA-CPAP, 17p.
- [3] DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. 1995. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 60p
- [4] SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASKAWA, N.; LATORRACA, S.; MAGALHÃES, F.M.M.; OLIVEIRA, L.A.; PEREIRA, R.M. 1982. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, Manaus. 12:12-22.
- [5] BRASIL, M.S.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. 2005. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal Sul Matogrossense. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**. 29: 179-190.
- [6] COSTA, J.M.T.F. & RUSHEL, A.P. 1981. Seasonal variation in the microbial populations of sugar-cane plants. In: VOSE, P.B. & RUSHEL, A.P., eds. **Associative N<sub>2</sub> - fixation**. São Paulo, University of São Paulo. 2:109-118.
- [7] BELLONE, C.H.; BELONE, S.C. & PEDRAZA, R.O. 1996. Hydric deficiency and acetylene reduction in sugar-cane roots. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION WITH NON-LEGUMES**, 7:125-126.
- [8] REIS Jr., F. B.; SILVA, M.F.; TEIXEIRA, K.R.S.; URQUIAGA, S. & REIS, V.M. 2004. Identification of *Azospirillum amazonense* isolates associated to *Brachiaria* spp. at different stages and growth conditions, and bacterial plant hormone production. **R Bras Ci Solo** 28:103-113.
- [9] SESHADRI, S., MUTHKUMARASAMY, R., LAKSHMINARASIMHAN, C., IGNACIMUTHU, S. 2000. Solubilization of inorganic phosphates by *Azospirillum halopraeferans*. **Curr. Sci**. 79: 565-567.
- [10] JANZEN, R.A., MCGILL, W.B. 1995. Community-level interactions control proliferation of *Azospirillum brasilense* Cd in microcosms. **Soil Biol. Biochem**. 27:189-196.
- [11] RODRIGEZ, H., FRAGA, R., GONZALEZ, T., and BASHAN, Y. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential application for improving plant growth-promoting bacteria. **First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization**. 15-21
- [12] CHANG, T.T., LI, C.Y. 1998 Weathering of limestone, marble, and calcium phosphate by ectomycorrhizal fungal and associated microorganisms. **J For Sci**. 13:85-90
- [13] DEUBEL, A., GRANSEE, A. and MERBACH, W. 2000 Trans-formation of organic rhizodepositions by rhizosphere bacteria and its influence on the availability of tertiary calcium phosphate. **J Plant Nutr Soil Sci** 163:387-392
- [14] EMTIAZI, G., Z. ETEMADIFAR and M. TAVASSOLI, 2003. Anovel nitrogen-fixing cellulytic bacterium associated with root of corn is a candidate for production of single cell protein. **Biomass Bioenergy**, 25: 423-426.
- [15] EMTIAZI, G., POOYAN, M. & SHAMALNAA-SAB, M. 2007. Cellulase Activities in Nitrogen Fixing *Paenibacillus* Isolated from Soil in N-free Media. **World J. Agric. Sci**. 3:602-608.

[16] OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. **Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato**. Campinas, SP, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101>>. Acesso em: 05/10/08

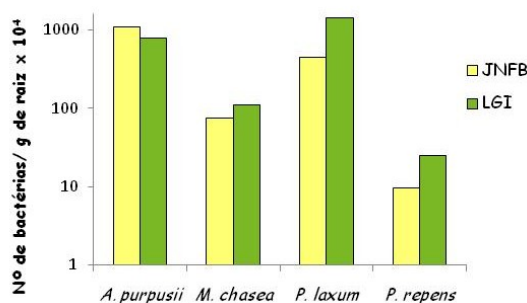


Figura 1 – Número de bactérias /g de raiz x10<sup>4</sup> associadas a gramíneas forrageiras nativas do Pantanal sul-mato-grossense em diferentes meios de cultura (JNFB e LGI).

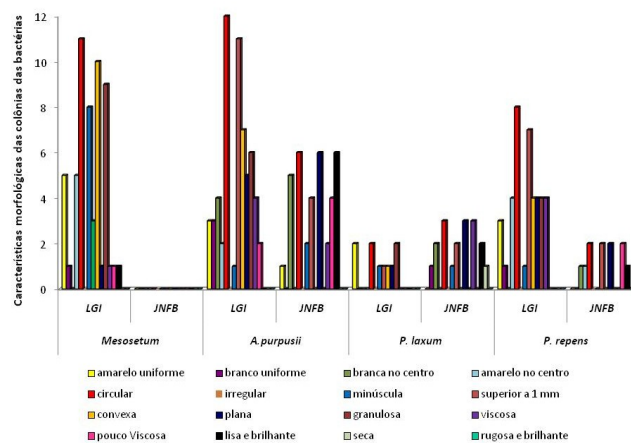


Figura 2 – Características morfológicas das colônias de bactérias isoladas de forrageiras nativas do Pantanal sul-mato-grossense. Obs: Não foram obtidos isolados do meio JNFB para *Mesosetum*.

Tabela 1 – Caracterização quanto á presença de película característica de diazotrófico e atividade enzimática de bactérias isoladas de gramíneas forrageiras do Pantanal sul-mato-grossense.

<b>Planta</b>	<b>Isolado</b>	<b>Presença de película</b>	<b>Solubilização de Fósforo</b>	<b>Atividade Amilase</b>
<i>Mesosetum</i>	AMM1	+	-	-
	AMM2	+	-	+
	AMM3	+	-	-
	AMM4	+	-	-
	AMM5	+	-	+
	AMM6	+	-	+
	AMM7	+	+	+
	AMM8	-	+	-
	AMM9	+	-	-
	AMM10	-	+	-
<i>A. purpussi</i>	AMM11	+	-	+
	AMM12	-	+	-
	AMM13	+	-	+
	AMM14	+	+	-
	AMM15	+	-	+
	AMM21	+	-	-
	AMM22	+	+	-
	AMM33	+	-	-
	AMM35	+	-	+
	AMM36	-	-	-
	AMM37	+	-	-
	AMM39	+	-	-
	AMM40	+	-	+
	AZM1	-	-	-
	AZM3	+	-	-
	AZM4	+	-	-
AZM5	+	+	-	
AZM6	+	-	+	
<i>P. Laxum</i>	AMM16	-	-	+
	AMM17	+	-	-
	AZM11	-	-	-
	AZM13	+	-	+/-
<i>P.repens</i>	AZM15	-	-	+
	AMM23	-	-	-
	AMM24	+	-	+
	AMM26	+	-	-
	AMM27	+	-	-
	AMM28	+	-	-
	AMM29	+	-	-
	AMM30	+	-	-
	AMM31	+	-	+/-
	AZM7	+	-	-
	AZM8	+	-	+
AZM9	-	-	-	

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.