

FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO *IN VITRO* DE ISOLADOS DE GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS NO SEMIÁRIDO PERNAMBUCANO

Gabiane dos Reis Antunes¹, João Marcos Rodrigues dos Santos², Gherman Garcia Leal de Araújo³, Tadeu Vinhas Voltolini⁴, Paulo Ivan Fernandes Júnior⁵

¹Doutoranda em Zootecnia UFC, Bolsista CAPES/Embrapa Semiárido, Petrolina/PE, gabianeoot@gmail.com; ²Graduação em Ciências Biológicas UPE, Estagiário Embrapa Semiárido Petrolina/ PE, joaorodriguesestagio.embrapa@gmail.com; ^{3,4,5} Pesquisador Embrapa Semiárido, Petrolina/ PE, gherman.araujo@embrapa.br/ Tadeu.voltolini@embrapa.br/ Paulo.ivan@embrapa.br

RESUMO: O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade de fixação de nitrogênio *in vitro* de isolados de capim buffel e sorgo forrageiro, plantas naturalmente adaptadas às condições do Semiárido Brasileiro. Bactérias foram isoladas em meio BMGM semi-sólido, e depois da presença da película microaerotáxica, as colônias foram purificadas em meio sólido Dygs. Para avaliação da fixação de nitrogênio, foram inoculadas em frascos contendo 10 mL de meio BMGM semi-sólido em triplicatas e incubados a temperatura ambiente por cinco dias. Após o crescimento bacteriano com a formação da película característica, as amostras foram homogeneizadas manualmente e foram congeladas a (-20°C), por 24 horas. Após esse processo, os tubos foram aquecidos em micro-ondas. Da solução resultante (meio + conteúdo celular) foram utilizados 5 mL em tubos de ensaio para digestão pelo método semi-micro *Kjedahl*. As produções de N variaram de 10,93 (bactéria de referência) à 90g/mL de N no isolado B17 (*Bacillus*). O maior número de isolados e com maior produção de N, foram os isolados de capim buffel, com produção média de 66,87 g/mL. Comparando com a bactéria de referência (BR11417), a fixação de nitrogênio via FBN proporcionados pelos isolados do capim buffel e sorgo forrageiro podem chegar à seis vezes mais. Bactérias isoladas de gramíneas forrageiras nas condições do Semiárido são capazes de fixar nitrogênio *in vitro* via FBN, com incrementos de 600%.

PALAVRAS-CHAVE: Capim buffel; Sorgo forrageiro; FBN.

FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO *IN VITRO* DE ISOLADOS DE GRAMINEAS FORRAGEIRAS NO SEMIÁRIDO PERNAMBUCANO

ABSTRACT: The objective of the present study was to evaluate the *in vitro* nitrogen fixation capacity of buffel grass and forage sorghum isolates, plants naturally adapted to Brazilian semi - arid conditions. Bacteria were isolated in semi-solid BMGM medium, and after the presence of the microaerotactic film, the colonies were purified on Dygs solid media. To evaluate the nitrogen fixation, they were inoculated in flasks containing 10 mL of semi-solid BMGM medium in triplicates and incubated at room temperature for five days. After bacterial growth with characteristic film formation, the samples were homogenized manually and frozen at (-20 °C) for 24 hours. After this process, the tubes were heated in microwave. From the resulting solution (medium + cell contents) 5 mL were used in assay tubes for digestion by the *Kjedahl* semi-micro method. N yields ranged from 10.93 (reference bacteria) to 90g / mL N in isolate B17 (*Bacillus*). The largest number of isolates and with higher N production were buffel grass isolates, with

a mean production of 66.87 g / mL. Comparing with the reference bacterium (BR11417), the nitrogen fixation via BNF provided by buffel grass and forage sorghum isolates can reach six times as much. Bacteria isolated from forage grasses under semi-arid conditions are able to fix nitrogen *in vitro* via BNF, with 600% increments.

KEY-WORDS: Grass buffel; Forage sorghum; BNF.

INTRODUÇÃO

Na região Semiárida, a pecuária é praticada principalmente, de modo extensivo, sendo baseada na exploração das pastagens nativas e/ou introduzidas, resultando em baixo rendimento produtivo dos rebanhos caprinos, ovinos e bovinos (SOUSA e ARAÚJO FILHO, 2001). A produção agrícola nessas regiões caracteriza-se principalmente pela agricultura de sequeiro e pela pecuária extensiva, condição que acaba dificultando o desenvolvimento de pastagens nessa região (ALVES et al., 2014).

Outra limitação que agrava ainda mais esse problema, é a deficiência no manejo, principalmente no que diz respeito à fertilização das pastagens. O nitrogênio (N) é o nutriente mais importante para o crescimento produtividade. Embora, haja cerca de 78% de N₂ na atmosfera, ele está disponível para as plantas em crescimento. A FBN representa 2/3 de todo o nitrogênio fixado no mundo, enquanto que o restante é sintetizado industrialmente pelo processo de Haber-Bosch (RUBIO; LUDDEN, 2008).

A FBN representa além de um benefício econômico, uma alternativa ambientalmente saudável e sustentável para o uso dos fertilizantes químicos. Diante disso, objetivou-se com esse estudo, a avaliação da capacidade de fixação de nitrogênio *in vitro* de isolados de hospedeiros naturalmente adaptados às condições do Semiárido Brasileiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas do campo, plantas adultas e saudáveis de Capim Buffel e Sorgo Forrageiro. As amostras foram coletadas de dois pontos distintos, em cada ponto de amostragem foram obtidas amostras compostas da planta inteira (parte aérea + raiz), cada amostra composta era formada por três amostras simples (uma planta), totalizando três repetições por área para cada espécie forrageira. As amostras 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.

Para o isolamento das bactérias, somente as raízes foram avaliadas, estas foram lavadas superficialmente em água corrente, secas com papel toalha e, desinfestadas superficialmente por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) por 10 minutos. Posteriormente foram lavadas abundantemente com água destilada e autoclavada. As amostras foram fragmentadas e em seguida alíquotas de 10 g foram trituradas com 90 mL de NaCl 0,85% (p/v) em um miniprocessador previamente desinfestado. Posteriormente, foram realizadas as diluições seriadas de 10⁻¹ a 10⁻⁴. Para cada uma das diluições, alíquotas de 0,1 mL, foram inoculadas em triplicata, em frascos de vidros de penicilina contendo 7 mL do meio BMGM (glicose, manitol e ácido málico) semissólido (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001). Os frascos foram incubados a 28 °C, por dez dias, após esse período, aqueles que desenvolveram uma película microaerotáxica típica (próxima da superfície do meio de cultura) foram separadas em sua diluição menos concentrada, reinoculados no mesmo meio de cultura e incubados por dez dias. Aqueles que desenvolveram película após esta segunda

incubação, foram purificadas em placas de Petri contendo meio Dyg's (RODRIGUES NETO et al., 1986). Após a obtenção das culturas puras as bactérias foram reinoculadas em meio BMGM semissólido para a confirmação da capacidade de fixação do nitrogênio em condições assimbióticas. Os frascos que continuaram a desenvolver a película foram reinoculados em placas de Petri contendo meio Dyg's sólido.

Para avaliação o potencial para a FBN as bactérias foram crescidas em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio Dyg's líquido por 48 h em mesa agitadora a 10.000 RPM. Após o crescimento a DO_{600} foi ajustada para 0,5 em espectrofotômetro (aproximadamente 10^8 UFC mL⁻¹), Uma alíquota de 100 µL de cada caldo de cultivo com a DO ajustada para os isolados e duas bactérias de referência conhecido (Ab-V5 e BR11417), foram inoculadas em frascos contendo 10 mL de meio BMGM semissólido em triplicatas e incubados a temperatura ambiente por cinco dias. Após o crescimento bacteriano com a formação da película característica da fixação do N *in vitro* em condições microaerofílicas, as amostras foram homogeneizadas manualmente e foram congeladas a (-20°C), por 24 horas. Após esse processo, os tubos foram aquecidos em micro-ondas por 1 minuto. Da solução resultante (meio + conteúdo celular) foram utilizados 5 mL em tubos de ensaio para digestão pelo método semi-micro *Kjedahl* (TEDESCO et al., 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferença estatística entre os isolados, as produções de N *in vitro* variaram de 10,93 (bactéria de referência) à 90g/mL de N no isolado B17 (*Bacillus*). A capacidade da incorporação de N no meio de cultura via FBN, predominaram os gêneros *Bacillus* e *Stenotrophomonas*, como maiores fixadores de N (Tabela 1). Comparando entre espécies vegetais, os com maior produção de N, foram os isolados de capim buffel, com produção média de 66,87 g/mL. Comparando com a bactéria de referência (BR11417), a fixação de nitrogênio via FBN proporcionados pelos isolados do capim buffel e sorgo forrageiro podem chegar à seis vezes mais.

Tabela 1. Capacidade de fixação de nitrogênio *in vitro* de isolados de raízes de Sorgo forrageiro e Capim Buffel

Isolados	Hospedeiro	Gênero	N (g/mL)
B13	C. Buffel	<i>Bacillus</i>	53,0 ^a
B17	C. Buffel	<i>Bacillus</i>	90,0 ^a
B10	C. Buffel	<i>Rhizobium</i>	83,0 ^a
B12	C. Buffel	<i>Stenotrophomonas</i>	63,0 ^a
B11	C. Buffel	<i>Rhizobium</i>	83,0 ^a
B14A	C. Buffel	<i>Cellulomonas</i>	40,0 ^b
B22	C. Buffel	<i>Stenotrophomonas</i>	60,0 ^a
B27	C. Buffel	<i>Stenotrophomonas</i>	63,0 ^a
S3	Sorgo	<i>Bacillus</i>	80,0 ^a
S31	Sorgo	<i>Bacillus</i>	50,0 ^a
S29	Sorgo	<i>Rhizobium</i>	83,0 ^a
S10	Sorgo	<i>Pseudomonas</i>	70,0 ^a
S23	Sorgo	<i>Stenotrophomonas</i>	76,0 ^a
S19	Sorgo	<i>Stenotrophomonas</i>	66,0 ^a
S8	Sorgo	<i>Rhizobium</i>	50,0 ^a
S14	Sorgo	<i>Bacillus</i>	70,0 ^a
Ab-V5	***	<i>Azospirillum</i>	66,0 ^a

Comprovando o potencial de *Bacillus* sp. sobre o crescimento vegetal, Rana et al. (2012) avaliaram o consórcio bacteriano de *Bacillus* sp. com o trigo, sobre a fixação de N, e observaram um aprimoramento de 14-34% nos parâmetros biométricos da planta e 28-60% no teor de micronutrientes em relação ao controle. Juntamente com os hormônios, o N é um importante modulador da arquitetura das raízes. Assim, o N poderia participar e, possivelmente, integrar diferentes etapas envolvidas na criação de uma associação benéfica e bem-sucedida desempenhando um papel fundamental na determinação da eficiência da interação planta-bactéria (CARVALHO et al. 2014).

Em razão de sua capacidade de sobreviver em ambientes deficientes em nitrogênio, as bactérias diazotróficas podem enriquecer seletivamente a rizosfera, local em que habitam como organismos de vida livre ou estão associadas assimbioticamente a plantas (Dobbelaere et al., 2003). O meio de cultura BMGM utilizado no presente estudo, foi elaborado com ausência de uma fonte nitrogenada, além disso, a condição de semi-sólido cria um ambiente com baixo nível de oxigênio, visto que a enzima nitrogenase é sensível, tornando o meio de cultura, um microambiente semelhante ao que ocorre no solo ou na planta, onde está localizada a maior densidade de bactérias diazotróficas microaerofílicas associadas a raízes.

A FBN pelas bactérias associadas a raízes de gramíneas pode ser importante nas condições encontradas no Semiárido, uma vez que o fornecimento de N via FBN pode melhorar a produtividade e o valor nutritivo dessas forrageiras, e assim, em longo prazo, contribuir para o desenvolvimento socioeconômico da região através da diminuição dos custos de produção.

CONCLUSÕES

Bactérias isoladas de gramíneas forrageiras nas condições do Semiárido são capazes de fixar nitrogênio *in vitro* via FBN, com incrementos de 600% em relação a isolados utilizados comercialmente.

REFERÊNCIAS

ALVES, F.G.S.; FELIX, B.A.; PEIXOTO, M.S.M.; SANTOS, P.M.; COSTA, R.B.; SALES, R.O. Considerações sobre manejo de pastagens na região semiárida do Brasil: Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. v. 08, n. 4, p. 259-284, out-dez, 2014.

CARVALHO, M.A.C.; YAMASHITA, O.M.; SILVA, A.F. Cultivares de alface em diferentes ambientes de cultivo e adubos orgânicos no norte mato-grossense. **Multítemas**, Campo Grande, v.45, n.1, p.47- 59, 2014.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.22, p.107-149, 2003.

ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; ABALLEROMELLADO, J. *Burkholderia* a genus rich in plant-associated nitrogen

fixers with wide environmental and geographic distribution. *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, p.2790-798, 2001.

RANA A, SAHARAN B, JOSHI M, PRASANNA R, KUMAR K, NAIN L. Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat. *Ann Microbiol.* 2012;4:893–900.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xantomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 12, p. 16, 1986.

RUBIO, L.M., LUDDEN, P.W., 2008. Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 93– 111.

SOUSA, F.B.; ARAÚJO FILHO, J.A. **Avaliação e seleção de forrageiras nativas e exóticas para o Semiárido brasileiro.** Sobral: Embrapa Caprinos, 2001. 12p.(Embrapa Caprinos. Circular Técnica, 23).

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análises de solo, plantas e outros materiais.** Boletim Técnico nº 5, Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, UFRGS. Porto Alegre, 1995. 174 p.