

Quantificação das Comunidades Diazotróficas Endofíticas Associadas à Plantas Forrageiras no Semiárido Pernambucano

Quantification of the Diazotrophic Community Associated to Forage Plants in the Semi-arid Region of Pernambuco State

Gabiane dos Reis Antunes¹; Tadeu Vinhas Voltolini²; Gherman Garcia Leal de Araújo³; Indra Elena Costa Escobar⁴; Katherine Gomes Oliveira⁵; Tailane Ribeiro do Nascimento⁵; Paulo Ivan Fernandes Júnior⁶

Abstract

This study aimed to evaluate the density of isolated endophytic bacteria buffel grass for possible nitrogen-fixing. The buffel grass was collected at three different points of a caatinga area, the roots were sterilized and crushed with saline for subsequent serial dilution (10⁻¹-10⁻⁴), aliquots of 0.1 ml were inoculated in triplicate in glass bottle medium containing penicillin BMGM semisolid. The flasks were incubated for seven days and those that developed a close aerotaxis typical film surface of the medium were scratched in Petri dishes for assessing the growth. Those that developed a film were considered positive for population counts of nitrogen-fixing bacteria, using the Most Probable Number (MPN) technique. Of the three plant sampling areas a higher density of bacteria was observed in area 3 (4,838 x 10⁴ NMPg⁻¹) compared to area 1, which had 3,478 x 10⁴. Samples of the cactus roots, registered the highest population densities of bacteria (109.849 x 10⁻⁴ g⁻¹ fresh root) in relation to the other analyzed fodder.

Keywords: forage, NMP, nitrogen.

Introdução

O Nordeste ocupa uma área de 1.548.000 km², onde aproximadamente 70% da região está inserida no clima semiárido (SILVA; ANDRADE, 2008). Como limitação, essa região apresenta a baixa disponibilidade de alimentos para animais no período da seca, influenciado diretamente pelas condições climáticas (SILVA; SALIBA, 2007). Neste sentido, é essencial a adoção de novas tecnologias que objetivem o aumento na produção dos pastos e/ou reduzam os custos de produção em pastagens (GOMES JÚNIOR et al., 2002).

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

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

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

⁴Bolsista do Programa Nacional de Pós Doutorado, Univasf, Petrolina, PE.

⁵Graduandas em Ciências Biológicas, UPE, Petrolina, PE.

⁶Biólogo, D.Sc. em Agronomia, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, paulo.ivan@embrapa.br.

Muitas vezes, a produtividade dos pastos é comprometida principalmente pelas limitações nos teores do nitrogênio (N). De acordo com Silveira (2008), bactérias associadas a gramíneas forrageiras podem ser importantes para o aumento da produção de forragem com o aporte adicional de N.

Dentre as espécies forrageiras de maior importância para a região semiárida, pode-se destacar algumas como os capins buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) e tifton (*Cynodon dactylon*), o sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) e a palma-forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill). Estudos sobre a avaliação da infecção dessas espécies por bactérias diazotróficas são escassos para as regiões semiáridas. A quantificação das comunidades fixadoras de N é importante tanto para a determinação da efetividade da comunidade nativa, como para a realização dos isolamentos e a obtenção das culturas puras, em um processo de isolamento e caracterização de micro-organismos diazotróficos (DBBELAERE et al., 1995).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a densidade de bactérias endofíticas diazotróficas associadas a diferentes plantas forrageiras cultivadas no Semiárido pernambucano.

Material e Métodos

As espécies forrageiras foram coletadas em diferentes áreas da Embrapa Semiárido. O capim-buffel foi coletado no Sistema Caatinga, capim-buffel e leguminosa (CBL), e as demais coletadas na área experimental de Bebedouro e da Caatinga. As coletas ocorreram no mês de outubro de 2014. Foram coletadas, no campo, plantas saudáveis e adultas de capim-buffel, capim-tifton, sorgo-forrageiro e palma-forrageira.

As plantas forrageiras foram coletadas em duas áreas distintas, com exceção do capim-buffel, que foi coletado em apenas uma área. Em cada ponto de amostragem foi coletada uma amostra composta por, ao menos, três amostras simples (plantas adultas). Para cada área foram coletadas três amostras compostas, totalizando-se três repetições por coleta de cada espécie em cada área.

As plantas foram acondicionadas em sacos plásticos, 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, houve a separação da parte aérea e da raiz. As raízes foram lavadas em água corrente para a retirada do excesso de solo, desinfestadas superficialmente por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) por 10 minutos e, posteriormente, bem lavadas com água destilada e autoclavada. As amostras foram fragmentadas em alíquotas de 10 g e foram trituradas com 90 mL de NaCl 0,85% (p/v) em miniprocessador. Em seguida, foram realizadas as diluições seriadas de 10^1 a 10^4 , transferindo-se 1 mL da suspensão de cada diluição para tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina. 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 semissólido (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001).

Os frascos foram incubados a 26-28 °C, por 10 dias. Após esse período, aqueles que desenvolveram uma película microaerotáxica típica próxima da superfície do meio foram separadas em sua diluição menos concentrada. Aqueles que desenvolveram uma película foram considerados positivos para a determinação das populações de bactérias diazotróficas, que foi realizada pela técnica do número mais provável (NMP) (HUNGRIA; ARAUJO, 1995).

Resultados e Discussão

Por meio da técnica do NMP, o número de bactérias encontradas nas raízes do capim-buffel variou de $3,478 \times 10^4$ a $4,838 \times 10^4$ células por grama de raiz. (Tabela 1).

Tabela 1. População de bactérias presentes nas raízes de capim-buffel (*Cenchrus ciliaris* L.), capim-tifton (*Cynodon dactylon*), sorgo-forrageiro (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) e palma-forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) pela técnica de número mais provável (NMP), avaliados em meio de cultura BMGM.

Espécie	Área	Repetição	NMP	IC (Mínimo)	IC (Máximo)
Capim-buffel	AR1	A1	$3,47 \times 10^4$	1,57	8,59
		A2	$4,24 \times 10^4$	2,00	9,78
		A3	$4,83 \times 10^4$	2,43	10,48
Capim-tifton	AR1	A1	$7,48 \times 10^4$	2,77	28,08
		A2	$1,11 \times 10^4$	0,40	3,40
		A3	$14,93 \times 10^4$	5,56	50,58
	AR2	A1	$1,95 \times 10^4$	0,85	4,74
		A2	$9,32 \times 10^4$	3,33	38,55
		A3	$0,35 \times 10^4$	0,08	2,05
Sorgo-forrageiro	AR1	A1	$46,20 \times 10^4$	17,83	240,76
		A2	$2,77 \times 10^4$	1,26	7,17
		A3	$9,32 \times 10^4$	3,33	38,55
	AR2	A1	$9,32 \times 10^4$	3,33	38,55
		A2	$46,20 \times 10^4$	17,83	240,76
		A3	$7,48 \times 10^4$	2,77	28,08
Palma-forrageira	AR1	A1	$1,46 \times 10^4$	0,53	4,95
		A2	$109,84 \times 10^4$	38,22	478,76
		A3	$2,10 \times 10^4$	0,84	6,26
	AR2	A1	$9,32 \times 10^4$	3,33	38,55
		A2	$1,46 \times 10^4$	0,53	4,95
		A3	$2,76 \times 10^4$	1,19	7,42

Probabilidade 95%.

No estudo realizado por Moreira (2013), as amostras superficiais de raízes de capim-buffel apresentaram maiores densidades populacionais de 24×10^3 bactérias g^{-1} de raiz fresca em relação ao capim-tanzânia (*Panicum maximum*) e andropogon (*Andropogon gayanus* Kunth.). Os valores observados para o capim-tifton variaram de $1,95 \times 10^4$ a $14,938 \times 10^4 g^{-1}$ de raiz fresca e foi possível observar que as maiores populações de bactérias se concentraram na segunda área de coleta do capim.

Nas amostras das raízes da palma-forrageira, foram observadas as maiores densidades populacionais de bactérias ($109,849 \times 10^4 g^{-1}$ de raiz fresca) em relação às demais forrageiras analisadas. Observou-se, também, que as maiores densidades estão presentes na primeira área de coleta e isso pode estar relacionado à prática da irrigação na área. De acordo com Baldani et al. (1999), a ocorrência e atividade dessas bactérias no solo e na planta são fortemente influenciadas por estresses físicos e biológicos, alguns dos quais são comuns na região semiárida, razão pela qual podem influenciar a população dessas bactérias.



Figura 1. Formação de película em amostra de palma-forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) AR2 e formação de película em amostra de sorgo- forrageiro (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) AR1 (b).

Conclusões

A palma-forrageira apresenta alta densidade de bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio, o que representa alto potencial de uso dessas bactérias como futuros inoculantes.

Agradecimentos

À Facepe, pela bolsa concedida, e à Embrapa Semiárido, por conceder as instalações.

Referências

- BALDANI, J. L.; AZEVEDO, M. S.; REIS, V. M.; TEXEIRA, K. R. S.; OLIVARES, F. L.; GOIS, S. R.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; CARVALHO, J. G. (Ed.). **Interrelações fertilidade, biologia e nutrição de plantas**. Viçosa, MG: SBCS: UFLA, 1999. p. 621-666.
- DBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 22, n. 2, p. 107-149, 1995.
- 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, DC, v. 67, p. 2790-2798, 2001.
- GOMES JÚNIOR, P.; PAULINO, M. F.; DETMANN, E.; FILHO, S. C. V.; ZERVOUDAKIS, J. T.; LANA, R. P. Desempenho de novilhos mestiços na fase de crescimento suplementados durante a época seca. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 31, n. 1, p. 139-147, 2002.
- HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1995. 542 p.
- MOREIRA, F. T. A.; SANTOS, D. R.; SILVA, G. H.; ALENCAR, L. S. Ocorrência de bactérias do gênero *Azospirillum* spp. associadas a gramíneas forrageiras no Semiárido nordestino. **HOLOS**, Natal, v. 3, n. 29, p. 205-212, 2013.
- SILVA, J. J.; SALIBA, E. O. S. Pastagens consorciadas: uma alternativa para sistemas extensivos e orgânicos. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 8-18, 2007.

SILVA, D. S.; ANDRADE, A. P. *Tecnologia para o cultivo e uso de forrageiras nativas*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 18.; CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA, 10.; SIMPÓSIO PARAIBANO DE ZOOTECNIA, 6.; FORÚM DE COORDENADORES DE CURSOS DE ZOOTECNIA DAS UNIVERSIDADES BRASILEIRAS, 4.; FORÚM DE ESTUDANTES DE CURSOS DE ZOOTECNIA DAS UNIVERSIDADES BRASILEIRAS, 4.; REUNIÃO NACIONAL DE ENSINO DE ZOOTECNIA, 14.; FORÚM DE ENTIDADES DE ZOOTECNISTAS, 31.; MOSTRA DE RAÇAS DE CAPRINOS E OVINOS NATIVOS, 3.; SEMANA DA CAPRINOCULTURA E DA OVINOCULTURA BRASILEIRAS, 6., 2008, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: Associação Brasileira de Zootecnia, 2008. 1 CD-ROM.

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.