

# NOTA

## DETECÇÃO DE *Azospirillum amazonense* EM RAÍZES E RIZOSFERA DE ORCHIDACEAE E DE OUTRAS FAMÍLIAS VEGETAIS<sup>(1)</sup>

A. LANGE<sup>(2)</sup> & F. M. S. MOREIRA<sup>(3)</sup>

### RESUMO

*Azospirillum amazonense* é uma bactéria fixadora de N<sub>2</sub> atmosférico de ampla ocorrência, principalmente em associações radiculares com gramíneas e palmeiras. Para verificar sua presença em outras espécies vegetais, ainda não estudadas, e a eficiência de meios para sua detecção, foram testados os meios Fam e LGI para contagens em solo rizosférico ou em culturas de enriquecimento com solo rizosférico, ecto e endorrizosfera. *A. amazonense* foi detectada no solo rizosférico, ecto e endorrizosfera de várias espécies de monocotiledôneas, incluindo Orchidaceae e dicotiledôneas, sendo o meio Fam mais eficiente para sua detecção

**Termos de indexação:** diazotróficos, ecologia microbiana, fixação de nitrogênio.

**SUMMARY:** *DETECTION OF Azospirillum amazonense IN ROOTS AND RHIZOSPHERE OF ORCHIDACEAE AND OTHER PLANT FAMILIES*

*Azospirillum amazonense is a widespread N<sub>2</sub> fixing bacterium, occurring mainly in association with grasses and palm trees roots. Aiming to study its occurrence in species of other families not yet studied and the efficiency of media. Fam and LGI for its detection, these were used for rhizosphere soil counting or for enrichment cultures of rhizosphere soil, ecto and endorhizosphere. A. amazonense was detected in rhizosphere soil, ecto and endorhizosphere of many species belonging to monocotyledons, including Orchidaceae and dicotyledons with. Fam medium being the most efficient for its detection.*

*Index terms: diazotrophs, microbial ecology, nitrogen fixation.*

---

<sup>(1)</sup> Recebido para publicação em julho de 2000 e aprovado em dezembro de 2001.

<sup>(2)</sup> Mestrando em Solos e Nutrição de Plantas, Universidade Federal de Lavras – UFLA. Caixa Postal 37, CEP 37200-000 Lavras (MG). Bolsista da FAPEMIG. E-mail: paranalange@hotmail.com

<sup>(3)</sup> Professor do Departamento de Ciência do Solo, UFLA. Bolsista do CNPq. E-mail: fmoreira@ufla.br

## INTRODUÇÃO

Bactérias da espécie *Azospirillum amazonense* são capazes de fixar N<sub>2</sub> atmosférico em associação com diferentes espécies de plantas e são encontradas tanto na ectorrizosfera como na endorrizosfera de gramíneas, ciperáceas, palmeiras e algumas espécies de outras famílias em diversos ecossistemas na Amazônia (Magalhães, 1983; Magalhães et al., 1983; Magalhães & Döbereiner, 1984), assim como em gramíneas graníferas no sudeste brasileiro (Baldani, 1984).

A primeira estirpe isolada de *A. amazonense* (15M1) (Magalhães, 1981) foi obtida mediante cultivos de enriquecimento de raízes de *Brachiaria brizantha*, coletada na Amazônia, em meio NFB de Döbereiner (1980), modificado por meio da adição de 0,5 g de manitol e 0,5 g de sacarose. Nesse trabalho, foi verificada a capacidade desta estirpe em crescer em sacarose como única fonte de carbono, ao contrário das outras espécies então conhecidas de *Azospirillum* (*A. lipoferum* e *A. brasilense*).

Assim, esta característica e a comprovação do melhor crescimento em valores de pH entre 5,0 e 6,0 levaram ao aprimoramento do meio de enriquecimento (Magalhães, 1983), usado para avaliar a distribuição ecológica da espécie (Magalhães & Döbereiner, 1984). O isolamento de organismo similar por pesquisadores do PNPBS/EMBRAPA levou à publicação conjunta do trabalho de proposição da espécie (Magalhães et al., 1983).

Neste trabalho, o meio de isolamento descrito (LGI) foi o utilizado por Souto (1982) que constava de uma nova modificação do LG já modificado por Magalhães et al. (1979) e que apresentava certa similaridade com o meio de Magalhães (1983) e Magalhães & Döbereiner (1984), porém sem adição de vários micronutrientes e vitaminas. Com a supressão de micronutrientes essenciais, em estudos posteriores sobre *A. amazonense*, que utilizaram o meio LGI, foram encontrados, geralmente, números inferiores aos das espécies *A. lipoferum* e *A. brasilense* (Baldani, 1984; Baldani et al., 1999) e ocorrência regional mais restrita, ao contrário do observado por Magalhães (1983) e Magalhães & Döbereiner (1984). Recentemente, o LGI foi modificado por meio da adição de vitaminas e substituição de FeCl<sub>3</sub> por FeEDTA (Döbereiner et al., 1995).

O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de *Azospirillum amazonense* em amostras de solo e de raízes de diferentes famílias vegetais, incluindo Orchidaceae, comparando a eficiência dos meios LGI modificado e de Magalhães (1983), aqui denominado Fam, para detecção da espécie.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados no Setor de Microbiologia do Solo do DCS/UFLA dois experimentos, com vistas

em pesquisar a ocorrência de *A. amazonense* em amostras de solo e de raízes de diversas espécies vegetais no campo ou em vasos (Orchidaceae), coletadas no campus da UFLA, de outubro de 1999 a maio de 2000. Com exceção das Orchidaceae, cujas amostras foram escolhidas em vasos, em todas as espécies foram coletadas aleatoriamente cinco subamostras (de solo ou de raízes) no campo para formar uma amostra composta. Em mata nativa, raízes de várias espécies foram coletadas e misturadas.

No primeiro experimento, efetuou-se a contagem de *A. amazonense* pelo método das diluições decimais sucessivas (totalizando cinco diluições com três repetições cada) de solo rizosférico de 13 espécies vegetais e de mistura de espécies de mata nativa em solução aquosa de NaCl a 0,55 % (1ª diluição: 10 g de solo/90 mL de solução salina). Aliquotas (0,1 mL) de cada diluição foram transferidas para os meios Fam e LGI e as culturas incubadas a 28°C. O crescimento de *A. amazonense* nas culturas foi considerado positivo após formação de película próxima à superfície dos meios, típica do crescimento desta espécie, e observação das culturas ao microscópio. As contagens foram realizadas pelo método do Número Mais Provável (NMP), utilizando a tabela de Cochran (1950). As espécies estudadas foram: *Lycopersicon esculentum*, *Coelogyne massangeana*, *Paspalum notatum*, *Panicum* sp., *Bambusa vulgaris*, *Zea mays*, *Coffea arabica*, *Triticum aestivum*, *Brachiaria decumbens*, *Pennisetum purpureum*, *Pinus* sp., *Eucalyptus grandis*, e *Saccharum officinarum*.

No segundo experimento, pesquisou-se a ocorrência de *A. amazonense* no substrato de crescimento ou solo rizosférico (situado a 5 mm da superfície radicular), na ectorrizosfera e na endorrizosfera de 12 diferentes espécies vegetais, de 10 espécies de orquídeas e de mistura de diversas espécies coletadas em mata nativa. Para isto, inocularam-se em meios Fam e LGI pequenas amostras de solo rizosférico, pedaços de raízes ( $\pm 0,5$  cm), que foram apenas sacudidas para eliminação dos grânulos de solo (ecto + endorrizosfera), ou pedaços de raízes desinfestadas superficialmente por imersão durante 10 min em solução de Cloramina T (1 %) e lavadas em água estéril seis vezes, para remoção do produto químico (endorrizosfera). Foram feitas cinco repetições por tipo de amostra. As espécies estudadas foram *Brassica oleracea*, *Brachiaria decumbens*, *Pennisetum purpureum*, *Eucalyptus grandis*, *Zea mays*, *Saccharum officinarum*, *Elaeis guineensis*, *Panicum* sp., *Paspalum notatum*, *Coffea arabica*, *Pinus* sp., *Bambusa vulgaris* e Orchidaceae: *Laelia purpurata*, *Oncidium varicosum*, *Miltonia flavecens*, *Dendrobium moschatum*, *Vanda tricolor*; *Laelia flava* brasil, *Dendrobium fimbriatum*, *Epidendrum* sp., *Dendrobium nobilis* e *Coelogyne lawrenceana*. A comprovação da presença de *A. amazonense* nas amostras foi feita como no experimento anterior.

Os meios testados apresentaram a seguinte

composição:

Fam - sacarose, 5 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,12 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,03 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g;  $\text{CaCl}_2$ , 0,02 g;  $\text{FeEDTA}$ , 0,066 g;  $\text{NaCl}$ , 0,1 g;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,002 g;  $\text{MnSO}_4$ , 0,00235 g;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,0028 g;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $8 \times 10^{-5}$  g;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,00024 g; biotina, 0,1 mg; piridoxina HCl 0,2 mg; ágar 1,75 g; pH 6,0, água q.s.p 1.000 mL.

LGI - composição original: sacarose, 5 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,6 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g;  $\text{CaCl}_2$ , 0,02 g;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,002 g;  $\text{FeCl}_3$ , 0,01 g; agar 1,75 g; pH 6,0, água q.s.p. 1.000 mL. Azul de bromotimol sol. 0,5 % em 0,2 N KOH (5 mL) também foi adicionado ao meio. O meio Döbereiner et al. (1995) modificado com 4 mL  $\text{FeEDTA}$  sol 1,64 % (0,066 g  $\text{FeEDTA}$ ) foi utilizado, substituindo o  $\text{FeCl}_3$  e adição de 0,1 mg de biotina e 0,2 mg de HCl-piridoxina por litro.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro experimento, *Azospirillum amazonense* foi detectada no solo rizosférico de oito das 13 espécies pesquisadas, em números de até  $3,3 \times 10^5$  (Quadro 1). No segundo experimento, foi detectada tanto na rizosfera como na ecto + endorrizosfera e endorrizosfera de 17 das 22 espécies vegetais estudadas, incluindo a maioria das Orchidaceae, sendo mais freqüente no solo e na ecto + endorrizosfera, com percentagens de ocorrência quase semelhantes entre estes tipos de amostras (Quadro 2). A percentagem de tubos positivos quanto à presença destes organismos variou de 0 a 100 %. Esta grande variação pode ser devida à distribuição aleatória deste organismo nas

amostras já comprovada para outras espécies (Rovira et al., 1974; Olivares et al., 1995; Bellone et al., 1995).

Além disso, o número relativamente baixo (5) de amostras analisadas para cada espécie contribuiu também para o aumento da variabilidade. Provavelmente por isso, em algumas espécies (no primeiro experimento: *Brachiaria decumbens*, *Pennisetum purpureum*, *Pinus* sp., *Eucalyptus grandis*, e *Saccharum officinarum*; no segundo experimento: *Pinus* sp., *Bambusa vulgaris*, *Coffea arabica* e *Coelogyne lawrenceana*), não foi detectada a presença de *A. amazonense*. A ausência de *A. amazonense* em mata nativa foi verificada nos dois experimentos e corrobora as observações de Magalhães & Döbereiner (1984) que também não encontraram esta espécie na floresta amazônica.

Números mais elevados de *A. amazonense* foram obtidos em solo rizosférico de sete das nove espécies estudadas pelo meio Fam (Quadro 1). Em vários tipos de amostras (14), *A. amazonense* foi detectada apenas pelo meio Fam e em número menor (5) apenas pelo meio LGI (Quadro 2). Considerando o número de amostras positivas em relação ao número total de amostras coletadas (Quadro 2), o meio Fam detectou *A. amazonense* em freqüências maiores que o meio LGI, excetuando apenas amostras da ecto + endorrizosfera de plantas não pertencentes às orquídeas. Portanto, a presença dos micronutrientes Mn, B, Cu e Zn, essenciais ao crescimento bacteriano (Madigan et al., 1996), deve estimular o crescimento destes organismos no meio Fam, pois estes nem sempre podem estar presentes nas amostras de solo e raízes amostradas, em concentrações adequadas, principalmente quando estes são diluídos para contagem.

Este trabalho mostra, pela primeira vez, a ocor-

**Quadro 1. Densidade de *A. amazonense* (Número Mais Provável) no solo rizosférico de nove espécies vegetais, calculada pelo método das diluições sucessivas inoculadas nos meios Fam e LGI, utilizando a tabela de Cochran (1950)**

Espécie vegetal	LGI	Fam
	—— N° de bactérias/g solo ——	
Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ) <sup>(1)</sup>	0	3,0.10 <sup>2</sup>
Tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ) <sup>(2)</sup>	→ 1,2.10 <sup>3</sup>	2,0.10 <sup>2</sup>
Orquídea ( <i>Coelogyne massangeana</i> ) <sup>(2)</sup>	1,4.10 <sup>4</sup>	→ 2,3.10 <sup>4</sup>
Grama batatais irrigada <sup>(5)</sup> ( <i>Paspalum notatum</i> ) <sup>(2)</sup>	6,3.10 <sup>4</sup>	→ 1,3.10 <sup>5</sup>
Grama batatais não irrigada <sup>(5)</sup> ( <i>Paspalum notatum</i> ) <sup>(2)</sup>	1,9.10 <sup>2</sup>	→ 5,6.10 <sup>2</sup>
Capim-capituba ( <i>Panicum</i> sp.) <sup>(3)</sup>	1,6.10 <sup>4</sup>	→ 3,3.10 <sup>5</sup>
Bambu ( <i>Bambusa vulgaris</i> ) <sup>(3)</sup>	0	→ 9,8
Milho ( <i>Zea mays</i> ) <sup>(4)</sup>	→ 1,2.10 <sup>3</sup>	5,1.10 <sup>2</sup>
Café ( <i>Coffea arabica</i> ) <sup>(4)</sup>	1,9.10 <sup>2</sup>	→ 3,1.10 <sup>2</sup>

Amostras coletadas em: <sup>(1)</sup> setembro, <sup>(2)</sup> outubro e <sup>(3)</sup> novembro de 1999 e <sup>(4)</sup> fevereiro de 2000, <sup>(5)</sup> jardins irrigados ou não o ano todo.

**Quadro 2. Ocorrência de *A. amazonense* em solo rizosférico, ecto+endorrizosfera<sup>(1)</sup> e endorrizosfera<sup>(2)</sup> de várias espécies vegetais e de Orchidaceae em culturas de enriquecimento de amostras<sup>(3)</sup> em meios Fam e LGI (repetições positivas em um total de cinco por espécie vegetal)**

Espécie vegetal	Solo/substrato		Ecto + endo rizosfera		Endorrizosfera	
	LGI	Fam	LGI	Fam	LGI	Fam
Couve ( <i>Brassica oleraceae</i> )	3	2	4	0	1	0
Brachiaria ( <i>Brachiaria decumbens</i> )	1	0	0	1	0	0
Napier ( <i>Pennisetum purpureum</i> )	5	4	4	3	4	5
Eucalipto ( <i>Eucalyptus grandis</i> )	0	0	0	1	0	1
Milho ( <i>Zea mays</i> )	0	2	3	2	4	1
Cana-de-açúcar ( <i>Saccharum officinarum</i> )	4	1	2	1	0	0
Palmeira ( <i>Elaeis guineensis</i> )	0	1	0	0	0	0
Capim-capituba ( <i>Panicum</i> sp)	4	5	5	5	0	4
Gramma batatais irrigada <sup>(4)</sup> ( <i>Paspalum notatum</i> )	0	3	2	4	0	0
<i>Laelia purpurata</i>	2	1	2	0	0	0
<i>Oncidium varicosum</i>	1	3	4	3	1	2
<i>Miltonia flavecens</i>	0	4	0	0	0	0
<i>Dendrobium moschatum</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Vanda tricolor</i>	0	0	0	2	5	5
<i>Laelia flava Brasil</i>	0	2	0	0	0	0
<i>Dendrobium fimbriatum</i>	0	0	0	3	1	2
<i>Epidendrum</i>	0	1	0	0	0	0
<i>Dendrobium nobili</i>	0	0	0	2	0	1
Nº de amostras positivas/ total amostras	21/90	29/90	26/90	27/90	16/90	21/90
Percentuais	23	32	29	30	18	23

<sup>(1)</sup> Partículas de solo eliminadas das raízes apenas por agitação. <sup>(2)</sup> Raízes desinfestadas superficialmente para detecção apenas dos microrganismos que habitam os tecidos radiculares internos. <sup>(3)</sup> Amostras coletadas em março de 2000. <sup>(4)</sup> Irrigada o ano todo.

rência de fixadores de N<sub>2</sub> no substrato de crescimento e na ecto e endorrizosfera de várias espécies de orquídeas e em números elevados. A eficiência destas espécies em utilizar nutrientes de substratos pobres ou de partículas em suspensão no ar é geralmente atribuída à sua simbiose com fungos micorrízicos (Smith & Read, 1997). Assim, a comprovação da presença de fixadores de N<sub>2</sub> indica que estes também podem estar contribuindo significativamente com nitrogênio para a nutrição destas espécies.

## CONCLUSÕES

1. *Azospirillum amazonense* pode ser encontrada em diversas espécies de monocotiledôneas, incluindo Orchidaceae, além de dicotiledôneas herbáceas, arbustivas e arbóreas.

2. O meio Fam foi mais eficiente para detecção de *Azospirillum amazonense* em relação ao meio LGI.

## LITERATURA CITADA

BALDANI, J.I. Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com as outras espécies deste gênero em raízes de milho, sorgo e arroz. Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1984. 110p. (Tese de Mestrado)

BALDANI, J.I.; AZEVEDO, M.S.; REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S.; OLIVARES, F.L.; GOI, S.R.; BALDANI, V.L.D. & DÖBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: Avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J.O. et al., eds. Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. Lavras, Universidade Federal de Lavras, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1999, p.621-666.

BELLONE, C.H.; BELLONE, S.D.V.C.; PEDRAZA, R.O. & MONZÓN, M.A. Cell colonization of sugar cane roots by *Acetobacter diazotrophicus*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS – The role of biological nitrogen fixation. Angra dos Reis, 1995. Programme and Abstracts. Angra dos Reis, 1995. p.204-205.

COCHRAN, W.G. Estimation of bacterial densities by means of the "most probable number", Biometrics, 6:105-116, 1950.

DÖBEREINER, J. Forage grasses and grain crops. In: BERGERSEN, F.J. ed. Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation. New York, John Wiley & Sons, 1980. p.535-555.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D. & BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1995. 60p.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M. & PARKER, J. Brock Biology of Microorganisms. 8.ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, 1996. 986p.

- MAGALHÃES, F.M.M. Nitrogen fixing bacteria isolated from diverse soils and grass roots in Amazônia. In: VOSE, P. & RUSCHEL, A.P., eds. Associative N<sub>2</sub>-Fixation. New York, CRC Press, 1981. p.39-48.
- MAGALHÃES, F.M.M. Caracterização e distribuição de uma nova espécie de bactéria fixadora de nitrogênio. Manaus, Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas/FUA, 1983. 89p. (Tese de Mestrado)
- MAGALHÃES, F.M.M. & DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. R. Microbiol., 15:246-252, 1984.
- MAGALHÃES, F.M.M.; PATRIQUIN, D. & DÖBEREINER, J. Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. R. Bras. Biol., 39:587-596, 1979.
- MAGALHÃES, F.M.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R. & DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. An. Acad. Bras. Ci., 55:417-430, 1983.
- OLIVARES, F.L.; REIS, F.B.; REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Infection of sugarcane roots by the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *H. rubrisubalbicans*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS – The role of biological nitrogen fixation. Angra dos Reis, 1995. Programme and Abstracts. Angra dos reis, 1995. p.65-66.
- ROVIRA, A.D.; NEWMAN, E.I.; BOWEN, H.J. & CAMPBELL, R. Quantitative assessment of the rizoplane microflora by direct microscopy. Soil. Biol. Biochem., 6:211-216, 1974.
- SMITH, S.E. & READ, D.J. Mycorrhizal symbiosis 2.ed. San Diego, Academic Press, 1997. 605p.
- SOUTO, S.M. Variação estacional da fixação de N<sub>2</sub> e denitrificação em gramíneas forrageiras tropicais. Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1982. 268p. (Tese de Doutorado)

