

# IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *Azospirillum amazonense* ASSOCIADOS A *Brachiaria* spp., EM DIFERENTES ÉPOCAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO E PRODUÇÃO DE FITORMÔNIO PELA BACTÉRIA<sup>(1)</sup>

F. B. REIS JUNIOR<sup>(2)</sup>, M. F. SILVA<sup>(3)</sup>, K. R. S. TEIXEIRA<sup>(3)</sup>,  
S. URQUIAGA<sup>(3)</sup> & V. M. REIS<sup>(3)</sup>

## RESUMO

Existem evidências de que pastagens formadas por algumas espécies do gênero *Brachiaria* poderiam beneficiar-se com o processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN), garantindo a estas pastagens maior longevidade. Dentre as bactérias diazotróficas encontradas em associação com estas gramíneas forrageiras, destaca-se a espécie *Azospirillum amazonense*. Neste trabalho, objetivou-se verificar a influência da espécie de *Brachiaria*, manejo da pastagem e sazonalidade sobre as populações de *A. amazonense* associadas às raízes destas plantas. Diferentes pastagens (*B. humidicola*, *B. decumbense* e *B. brizantha*) foram introduzidas em regiões do ecossistema Cerrado e de Mata Atlântica. Foram avaliados dois sistemas de manejo com diferentes taxas de lotação, e as coletas foram realizadas em diferentes épocas do ano. As populações de *A. amazonense* foram quantificadas e a identidade dos isolados confirmada, assim como sua capacidade de produção de fitormônios tipo AIA (ácido 3-indol acético) em meio de cultivo. Isolados de *A. amazonense* foram obtidos a partir de amostras de raízes das três espécies de *Brachiaria* avaliadas. Estimativas das populações desta bactéria variaram de  $10^3$ - $10^7$  células  $g^{-1}$  de raízes. Em amostras do ecossistema Cerrado, a época de coleta apresentou efeito significativo sobre a população destas bactérias. Os dados da região de Mata Atlântica mostraram que plantas de *Brachiaria* de diferentes espécies e pastagens sob diferentes taxas de lotação podem apresentar números populacionais distintos associados às suas raízes. A técnica de análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) confirmou a identidade de todos os isolados avaliados. Estes isolados foram capazes de produzir fitormônios tipo AIA.

**Termos de indexação:** fixação biológica de nitrogênio, pastagens, bactérias diazotróficas, ácido indol acético.

---

<sup>(1)</sup> Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor, apresentada no Curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ. Recebido para publicação em setembro de 2002 e aprovado em outubro de 2003.

<sup>(2)</sup> Pesquisador da Embrapa Cerrados. CEP 73301-970 Planaltina (DF), E-mail: fabio@cpac.embrapa.br

<sup>(3)</sup> Pesquisador da Embrapa Agrobiologia. CEP 23851-970 Seropédica (RJ) E-mail: sac@cnpab.embrapa.br

**SUMMARY:** *IDENTIFICATION OF Azospirillum amazonense ISOLATES ASSOCIATED TO Brachiaria spp. AT DIFFERENT STAGES AND GROWTH CONDITIONS, AND BACTERIAL PLANT HORMONE PRODUCTION*

There is evidence that pastures formed by some species of the genus *Brachiaria* could be benefited by the biological nitrogen fixation process (BNF), which would give these pastures a higher longevity. Among the diazotrophic bacteria found in association with these forage grasses, the species *Azospirillum amazonense* is most outstanding. This study aimed to verify the influence of the *Brachiaria* species, pasture management, and seasonal variations on the *A. amazonense* populations associated to the plant roots. Different pastures (*B. humidicola*, *B. decumbens*, and *B. brizantha*) were implanted in Cerrado and Atlantic Forest ecosystem areas. Two management systems with different stocking rates were evaluated and samples collected at different times of the year. The *A. amazonense* populations were quantified, and the isolates' identity as well as the capacity to produce phyto-hormones like IAA in growth media tested. *A. amazonense* isolates were obtained from root samples of the three evaluated *Brachiaria* species. The estimates of bacterial populations varied from  $10^3$ – $10^7$  cells.  $g^{-1}$  of roots. In the Cerrado, the sampling time had a significant influence on the population of these bacteria. Data from the Atlantic forest showed that *Brachiaria* plants from different species and pastures under different stocking rates can present distinct population numbers of *A. amazonense* associated to their roots. The "análise de restrição do DNA ribossômico amplificado" amplified ribossômico DNA restriction analysis (ARDRA) technique confirmed the identity of all tested isolates. These isolates were able to produce phyto-hormones like IAA.

*Index terms:* biological nitrogen fixation, pasture degradation, diazotrophic bacteria, indol acetic acid.

## INTRODUÇÃO

Dentre os fatores que levam à degradação das pastagens, a limitação de N é considerada um dos mais importantes (Oliveira et al., 1997). Este nutriente pode ser removido do sistema solo-planta mediante a exportação por produto animal (carne, principalmente), lixiviação, denitrificação e volatilização dos depósitos na forma de excretas bovinas (Ferreira et al., 1995; 2000).

Mesmo com observações de perdas de nitrogênio nessas pastagens, relatos na literatura indicam que determinados genótipos de *Brachiaria* não apresentam reduções significativas em sua produtividade. As perdas de N poderiam estar sendo compensadas pela fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN), que seria responsável pela introdução de 30 a 40 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> de N no sistema solo-planta (Boddey & Victoria, 1986; Loureiro & Boddey, 1988). Em sistemas de manejo extensivo, nos quais as vias de perdas são menos expressivas, a quantidade de nitrogênio fixado pode ser suficiente para proporcionar um balanço nulo ou até positivo de N para o sistema solo-planta e, com isso, permitir maior longevidade da pastagem com uma produtividade aceitável.

Estudos de isolamento e identificação de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> em gramíneas forrageiras ocorreram,

em sua maioria, entre as décadas de 60 e 80, com destaque para algumas espécies do gênero *Azospirillum* (Neyra & Döbereiner, 1977). Bactérias pertencentes a este gênero têm sido encontradas em associação com grande número de espécies de cereais e gramíneas forrageiras, cultivadas tanto em clima tropical como em clima temperado. No entanto, nem todas as espécies têm sido encontradas colonizando plantas em diferentes localidades. *A. amazonense*, por exemplo, só foi isolado até hoje no Brasil, exceto por sua detecção em amostras de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no Havaí, Tailândia e Argentina (Döbereiner, 1992; Monzón de Asconegui & Siroli, 1985), sendo este o motivo de ser tão pouco estudado, quando comparado com *A. lipoferum* ou *A. brasilense*. *A. amazonense* apresenta alta incidência e altos números em associação com gramíneas forrageiras, dentre elas a *Brachiaria* (Souto, 1982; Baldani, 1984; Magalhães & Döbereiner, 1984), e adaptabilidade a pH ácido (Magalhães et al., 1983), característica comum à maioria dos solos brasileiros.

Embora alguns estudos pioneiros tenham demonstrado a presença de bactérias diazotróficas em *Brachiaria* spp., nenhum deles foi feito de forma regular e sequer por um intervalo de tempo de um ano com as plantas submetidas a pastejo. Não existe até o momento nenhum registro de avaliação das populações destes organismos inerente às áreas de

pastagens ou em relação aos genótipos de *Brachiaria*. Como a dinâmica de microrganismos do solo e daqueles encontrados no interior das plantas está condicionada à própria vegetação, é possível que diferentes genótipos de *Brachiaria* possam exercer um efeito seletivo sobre as populações destes, o que poderia resultar em diferentes respostas quanto à contribuição da FBN obtida por cada um destes genótipos.

Apesar de a fixação biológica de nitrogênio por *Azospirillum* ter sido foco de bastante atenção da comunidade científica por muitos anos, existem evidências crescentes de que parte da contribuição de bactérias deste gênero para as plantas deve-se à produção de hormônios. Bashan & Holguin (1997) relatam que é óbvio que fitormônios, principalmente o ácido indol-acético (AIA), excretados por *Azospirillum*, desempenham papel essencial na promoção do crescimento de plantas em geral.

Neste trabalho, objetivou-se estabelecer a influência da espécie de *Brachiaria*, manejo da pastagem e sazonalidade sobre a presença e número de bactérias da espécie *Azospirillum amazonense* associadas às raízes destas plantas, assim como confirmar a caracterização dos isolados e averiguar sua capacidade em produzir hormônios de crescimento de plantas do tipo ácido indol acético.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Localização e instalação dos experimentos

Diferentes pastagens foram estabelecidas em regiões do ecossistema Cerrado sob Latossolo Vermelho-Escuro (Santo Antônio de Goiás, GO) e de Mata Atlântica sob Argissolo Amarelo (Itabela, BA). Os tratamentos, introduzidos no ano de 1998, foram compostos de piquetes de *Bachiaria humidicola*, *B. decumbens* cv. Basilisk e *B. brizantha* cv. Marandu, nos quais foram feitas a calagem, com aplicação de 1,5 t ha<sup>-1</sup> de calcário dolomítico, e a adubação utilizando-se 50 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> na forma de

superfosfato simples no plantio. Estes piquetes foram divididos e distribuídos para manter duas taxas de lotação. Na primeira, menor taxa de lotação, a área era pastejada até as plantas chegarem a uma altura de 30 cm. Na segunda, maior taxa de lotação, a área era pastejada até as plantas chegarem a uma altura de 15 cm. Estas áreas foram pastejadas com gado anelorado em sistema de pastejo contínuo, cada piquete continha animais fixos, denominados "testers", e, conforme a lotação desejada, havia a inclusão de mais animais denominados "volantes" que ficavam em pasto reserva quando não utilizados. No experimento de Itabela, além dos diferentes sistemas de manejo, também foram avaliadas pastagens com diferentes idades, implantadas nos anos de 1990 (*B. decumbens*), 1988 (*B. humidicola*) e 1993 (*B. brizantha*). Nestas áreas, foram aplicados 50 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> na forma de superfosfato simples em cobertura. No quadro 1, são apresentados os resultados das análises químicas e classe textural dos solos das áreas experimentais.

### Isolamento, caracterização e quantificação de *Azospirillum amazonense*

As amostras (três repetições) de raízes de cada um dos tratamentos foram coletadas aleatoriamente dentro de cada piquete. Estas coletas foram realizadas em diversas épocas do ano, abrangendo diferentes estações climáticas. As amostras coletadas foram cuidadosamente lavadas em água corrente, para que fossem utilizadas as técnicas tradicionais descritas por Döbereiner et al. (1995). Dez gramas de raízes lavadas foram triturados em 90 mL de solução salina (NaCl 0,85 %) e diluídos serialmente até 10<sup>-7</sup>. De cada diluição foi retirado 0,1 mL e inoculado em frascos com 5 mL de meio de cultura LGI semi-sólido e sem nitrogênio, semi-seletivo para *Azospirillum amazonense*. Considerou-se, como crescimento positivo, a formação de uma película típica na superfície do meio após sete dias de incubação a 30 °C.

Os frascos com crescimento positivo na mais alta diluição foram utilizados na repicagem para novo meio semi-sólido. Após incubação, retiraram-se alíquotas

**Quadro 1. Características químicas e classe textural do Latossolo Vermelho-Escuro do sítio experimental de Goiás e do Argissolo Amarelo do sítio experimental da Bahia, na profundidade de 0-20 cm**

Sítio experimental	pH (H <sub>2</sub> O)	Al <sup>3+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	K	P	Textura
		— cmol. dm <sup>-3</sup> —			— mg kg <sup>-1</sup> —		
Goiás	5,3	0,1	3,0	1,7	104,0	2,0	Franco-argilosa
Bahia							
Pastagens com mais de 9 anos	5,8	0,2	2,6	1,5	78,0	2,0	Areia Franca
Pastagens estabelecidas em 1998	5,5	0,2	2,2	0,9	98,0	4,0	Franco-arenosa

Ca, Mg e Al extraídos em KCl 1 mol L<sup>-1</sup>; K, e P extraídos em solução de Mehlich-1.

para observação da morfologia celular ao microscópio de contraste de fase. Outra alíquota foi utilizada para riscagem em placas que continham meio LGI sólido. A observação da morfologia das células sob microscopia ótica de contraste de fase e a morfologia das colônias no meio semi-específico (LGI) foram utilizadas para caracterizar as bactérias isoladas como sendo *A. amazonense*.

Com o material obtido pela diluição seriada das amostras em solução salina ( $10^{-1}$  até  $10^{-7}$ ), a população de bactérias foi estimada pelo método do número mais provável (NMP), consultando a tabela de McCrady para três repetições por diluição.

### Análise estatística

Os resultados referentes às contagens do número de células pelo método do NMP foram analisados segundo o fatorial 3 (espécies) x 2 (sistemas de manejo), com o fator coletas como um "Split Plot". Os resultados foram analisados com a utilização do software MSTAT-C, versão 2.10 (MSTAT Director, Michigan State University).

### Confirmação da caracterização dos isolados de *A. amazonense* por meio da análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA)

• Extração do DNA – Método de extração alcalina adaptado de Audy et al. (1996).

As bactérias foram cultivadas por 48 h em meio líquido DYGS (Rodrigues Neto et al., 1986) e 1,0 mL dessa suspensão foi centrifugado a 10.000 rpm por 2 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 1,0 mL de água Milli-Q estéril (esse procedimento foi repetido por três vezes). Após a última lavagem, repetiu-se a centrifugação e, desta vez, o precipitado foi ressuspenso em 0,5 mL de NaOH ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ), ficando em repouso por 10 min à temperatura ambiente para a completa lise das células. Em seguida, 10  $\mu\text{L}$  do material lisado foram coletados e diluídos em 490  $\mu\text{L}$  de solução de Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Este material foi estocado a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  até ser utilizado nas reações de PCR.

• PCR (Reação em cadeia da polimerase) - Amplificação da região 16S DNAr

A reação de amplificação ocorreu em 50  $\mu\text{L}$  de uma mistura reacional de 1,25  $\mu\text{L}$  de tween 20; 5,0  $\mu\text{L}$  de Tampão (10 X); 4,0  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM); 1,0  $\mu\text{L}$  de dNTP (2,5 mM); 1,25  $\mu\text{L}$  (5,0 pmol) dos Primers Y1 e Y3 (Young et al., 1991); 0,40  $\mu\text{L}$  de Taq DNA Polimerase (5 U  $\mu\text{L}^{-1}$ ) (Promega, Madison, EUA) e 10,0  $\mu\text{L}$  de amostra de DNA molde. As condições de termociclagem foram: 1 ciclo inicial de desnaturação ( $93 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 min), seguido por 35 ciclos intermediários ( $93 \text{ }^\circ\text{C}$  por 45 seg;  $62 \text{ }^\circ\text{C}$  por 45 seg;  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 min), e 1 ciclo terminal de extensão ( $72 \text{ }^\circ\text{C}$  por 5 min), seguido por resfriamento ( $15 \text{ }^\circ\text{C}$  por 15 min), para parar a reação.

Os fragmentos amplificados foram observados com o uso de eletroforese em gel de agarose 1,2 % em TAE, 65 V, por 2,5 h. As bandas resolvidas no gel foram visualizadas após coloração com brometo de etídeo sob iluminação ultravioleta e fotografadas com filme Polaroid tipo 667.

• Restrição dos fragmentos amplificados

Os produtos de amplificação das reações de PCR foram incubados a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  em banho-maria por 3 h com as endonucleases de restrição *Hae III*, *Alu I*, *Rsa I* e *CfoI* (GibcoBRL, Gaithersburg, EUA). Para um volume final de 15  $\mu\text{L}$  de reação, cada sistema de restrição conteve 5 U da enzima de interesse, 2,0  $\mu\text{L}$  de tampão de reação 10 X e 8  $\mu\text{L}$  de material amplificado. Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose por eletroforese (3,0 % em tampão TAE, 50 V, 4 h), visualizados após coloração com brometo de etídeo sob iluminação ultravioleta e fotografados com filme Polaroid tipo 667.

• Análises de agrupamento

Os padrões de migração gerados foram comparados e suas semelhanças estimadas pelo coeficiente de Jaccard (Rohlf, 2000). Os isolados foram agrupados pelo método das médias das distâncias (Bussabe et al., 1990) e representados graficamente por um dendrograma (NTSYS-pc, versão 2.1, Exeter Software, USA).

### Produção de hormônio de crescimento (AIA - ácido indol acético) por isolados de *A. amazonense*

A capacidade de produção de AIA por isolados de *A. amazonense* escolhidas para este teste ao acaso e comparados com estirpes referência, foi analisada pela utilização do método descrito por Sarwar & Kremer (1995), com algumas modificações. Culturas de células crescidas por 24 h a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  em meio LGI líquido com 0,1 % de  $\text{KNO}_3$  tiveram sua densidade ótica ajustada para 0,5 a 500 nm. Foram adicionados 2 mL desta suspensão a 28 mL de meio LGI acrescido de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de L-triptofano. Foram utilizadas três repetições para cada isolado. Os erlenmeyers foram incubados no escuro por 72 h a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Após este período, as culturas foram ajustadas para  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Posteriormente, estas culturas foram filtradas com a utilização de filtros com malha de 0,2  $\mu\text{m}$ . Uma alíquota de 150  $\mu\text{L}$  do material filtrado foi aplicada em microplacas de poliestireno (capacidade para 300  $\mu\text{L}$ ), devendo reagir com 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Salkowisk (1 mL de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,5 M em 50 mL de  $\text{HClO}_4$  35 %). Após incubação à temperatura ambiente por 30 min, observou-se a formação de uma cor rósea, e as leituras de absorbância foram realizadas utilizando um espectrofotômetro Labsystem Multiskan Plus (Labsystems Oy, Helsinki, Finlândia) dotado de filtro de interferência de 492 nm. A concentração de AIA pôde ser estimada com uma curva-padrão preparada, utilizando-se 0; 25; 50; 100; 150; 200; 200  $\mu\text{M}$  de AIA puro.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Quantificação de *Azospirillum amazonense*

Tanto nas amostras provenientes de Goiás, quanto naquelas oriundas da Bahia, a quantidade de bactérias estimada pelo método do número mais provável variou de  $10^3$ – $10^7$  células  $g^{-1}$  de raízes (Quadros 4, 5 e 6).

Os resultados relacionados com o sítio experimental de Goiás não apresentaram diferenças significativas entre os números de células de *A. amazonense* encontrados em associação com as diferentes espécies de *Brachiaria*, ao contrário do que ocorreu com os resultados relacionados com o sítio experimental da Bahia, mostrando que plantas de *Brachiaria* de diferentes espécies podem

apresentar números populacionais diferentes de *A. amazonense* associados às suas raízes. Neste sítio, maiores números de células foram encontrados nas raízes da espécie *B. humidicola*, seguida por *B. decumbense* e *B. brizantha* (Quadro 4).

Estas diferenças poderiam explicar, em parte, trabalhos como o de Alvim et al. (1990), que, comparando a produção forrageira de algumas espécies de *Brachiaria*, mostraram que, sem adubação nitrogenada, *B. brizantha* apresentou os menores valores de produtividade anual em massa da matéria seca, enquanto *B. decumbens* mostrou a maior produtividade dentre as espécies testadas. Porém, *B. brizantha* foi a espécie que mais respondeu a aplicações de N. Boddey & Victoria (1986) concluíram em seu trabalho que *B. humidicola* e *B. decumbens* receberam maiores contribuições da FBN associada a suas raízes, quando comparadas às espécies *B. ruziziensis* e *B. radicans*. Em outro estudo, Loureiro & Boddey (1988), utilizando a técnica de diluição isotópica de  $^{15}N$ , destacaram uma possível taxa de FBN superior em *B. humidicola*, quando comparada com *B. decumbens*, *B. ruziziensis* e *B. radicans*.

Um exemplo de que diferenças nas populações de determinada espécie de bactéria diazotrófica podem ter influência sobre variações nas taxas de FBN está descrito no trabalho de Döbereiner (1977), que, estudando genótipos de *Paspalum notatum* e a ocorrência de *Azotobacter paspali*, correlaciona as diferenças na atividade da nitrogenase com a população desses microrganismos.

Os resultados apresentados no quadro 5 apontam para um efeito da taxa de lotação animal sobre a população de *A. amazonense*, associada às raízes de *Brachiaria* oriundas dos experimentos da Bahia. As raízes das pastagens sob taxa de lotação animal mais alta parecem estar associadas a maiores populações destas bactérias. Mesmo com uma pequena diferença entre os números populacionais, estas foram significativas estatisticamente para bactérias associadas a pastagens com mais de nove anos.

**Quadro 2. Isolados de *Azospirillum amazonense* utilizados nos trabalhos de ARDRA e, ou, produção de AIA**

Espécie de <i>Brachiaria</i>		
<i>B. decumbens</i>	<i>B. humidicola</i>	<i>B. brizantha</i>
37 Ce <sup>(1)</sup>	64 Ce	27 Ce
38 Ce	77 Ma	36 Ce
53 Ce	79 Ma	48 Ce
72 Ma <sup>(2)</sup>	80 Ma	85 Ma
73 Ma	81 Ma	104 Ce
76 Ma	83 Ma	124 Ce
87 Ma	84 Ma	125 Ce
118 Ce	86 Ma	131 Ce
120 Ma	107 Ce	138 Ce
134 Ce	119 Ma	139 Ma
137 Ce	123 Ce	
140 Ma	127 Ce	
	132 Ce	
	135 Ce	
	136 Ce	

<sup>(1)</sup> Cerrados. <sup>(2)</sup> Mata Atlântica.

**Quadro 3. Origem das estirpes utilizadas nos trabalhos de ARDRA e, ou, produção de AIA**

Espécie/estirpe	Fonte <sup>(1)</sup>	Planta	Amostra	Referência
<i>A. lipoferum</i>				
Sp59	BR11008	Trigo	Raízes	Tarrand et al. (1978)
<i>A. brasilense</i>				
Sp7	BR11002	<i>Digitaria decumbens</i>	Rizosfera	Tarrand et al. (1978)
Cd	BR11001	<i>Cynodon dactylon</i>	Rizosfera	Tarrand et al. (1978)
<i>A. amazonense</i>				
CBAMC	BR11145	Cana-de-açúcar	Raízes	--
Y2	BR11140	<i>Hyparrhenia rufa</i>	Raízes	Magalhães et al. (1983)
<i>H. seropedicae</i>				
Z67	BR11175	Arroz	Raízes	Baldani et al. (1996)

<sup>(1)</sup> BR – Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia.

A herbivoria exerce papel importante na exsudação de compostos de C pelas raízes (Holland et al., 1996). Ruess & McNaughton (1987) mostraram, em um estudo com pastagens do Serengueti (África Central), que a biomassa microbiana do solo aumentou com o aumento da intensidade de pastejo, até decrescer com intensidades de pastejo mais altas. Este decréscimo pode estar relacionado com a redução de alocação de carbono para as raízes nestas condições. Em oposição a este relato, Davidson & Milthorpe (1966) mediram a troca de C entre raízes e parte aérea de *Dactylis glomerata* e concluíram que as raízes continuavam a ser um dreno de C, independentemente da severidade da desfoliação.

Krafczyk et al. (1984) notaram uma baixa relação N:C nos compostos exsudados pelas plantas. Espera-se que o crescimento neste tipo de fonte seja favorável aos organismos que conseguem utilizar o nitrogênio atmosférico. Estes mesmos autores também relataram o aumento da atividade da nitrogenase por adição de produtos do metabolismo radicular (Krafczyk et al., 1984).

Parece que o desafio seria encontrar uma taxa de lotação animal que influenciasse positivamente as bactérias diazotróficas associadas a estas plantas

e que não possibilitasse um decréscimo muito acentuado na deposição da serapilheira e, conseqüentemente, na reciclagem de N do sistema, e que as perdas de N fossem pelo menos contrabalançadas com os possíveis ganhos de nitrogênio de forma a manter estável o nível de N e de matéria orgânica do solo.

O quadro 6 mostra que, em Goiás, a época de coleta apresentou efeitos significativos sobre a população de bactérias associadas às raízes das plantas de *Brachiaria*. Vários autores têm afirmado que estes efeitos podem ser explicados por fatores ambientais, neste caso, principalmente pelas taxas de precipitação pluvial. O clima desta área é caracterizado como Aw (tropical com estação seca no inverno), segundo Koeppen.

A influência de fatores ambientais, principalmente estresse hídrico sobre as populações de microrganismos diazotróficos e sobre o processo de fixação biológica de nitrogênio, foi demonstrada em diversos trabalhos. Costa & Ruschel (1981), trabalhando com plantas de cana-de-açúcar, verificaram que a distribuição de microrganismos fixadores de N<sub>2</sub> sofria influência de acordo com a época do ano, mostrando que a atividade de microrganismos no interior do

**Quadro 4. Número de células de *Azospirillum amazonense* associadas a três espécies de *Brachiaria* em experimentos na Fazenda Agropecuária Lopes (GO) e Itabela (BA)**

Espécie de <i>Brachiaria</i>	Bahia (n = 18)		Goiás (n = 30)
	Pastagem implantada em 1998	Pastagem com mais de 9 anos	
	Número <sup>(1)</sup> de células (x 10 <sup>4</sup> ) g <sup>-1</sup> de raízes frescas		
<i>B. brizantha</i>	6,92 b	8,13 b	6,02 a
<i>B. decumbens</i>	67,60 a	8,91 b	4,17 a
<i>B. humidicola</i>	263,03 a	63,10 a	5,25 a
C.V. (%)	14,16	18,17	17,04

<sup>(1)</sup> As análises estatísticas foram feitas com os dados transformados em log. Médias seguidas de mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 %.

**Quadro 5. Número de células de *Azospirillum amazonense* associadas a *Brachiaria* sob baixa e alta taxas de lotação em experimentos na Fazenda Agropecuária Lopes (GO) e Itabela (BA)**

Taxa de lotação	Bahia (n = 27)		Goiás (n = 45)
	Pastagem implantada em 1998	Pastagem com mais de 9 anos	
	Número <sup>(1)</sup> de células (x 10 <sup>4</sup> ) g <sup>-1</sup> de raízes frescas		
Baixa	38,90 a	8,51 b	6,02 a
Alta	63,10 a	32,36 a	4,17 a
C.V. (%)	14,16	18,17	17,04

<sup>(1)</sup> As análises estatísticas foram feitas com os dados transformados em log. Médias seguidas de mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 %.

colmo foi bastante irregular na primavera, relativamente uniforme no verão e caiu bruscamente no outono. Bellone et al. (1996) mostraram que, em solos com progressiva deficiência hídrica (mais de 20 dias), as plantas de cana-de-açúcar apresentaram baixos níveis de atividade de redução de acetileno (ARA) associados a um baixo número de microrganismos por grama de raiz. Reis Jr. et al. (2000) também encontraram variações no número de bactérias diazotróficas associadas à cana-de-açúcar em virtude das diferenças nas taxas de precipitação pluvial.

Provavelmente, uma melhor distribuição de chuvas na região de Mata Atlântica, cujo clima é caracterizado como Af, segundo Koeppen (tropical sem estação seca), fez com que, nos experimentos da Bahia, não fossem observados efeitos da época de coleta sobre a população de *Azospirillum amazonense* (Quadro 7).

#### Confirmação da caracterização dos isolados de *A. amazonense* por meio de ARDRA

##### • PCR

Amplificou-se por PCR a região 16S do DNAr de isolados de raízes provenientes das três espécies de

*Bracharia* coletadas nos dois sítios experimentais, assim como das estirpes de referência de *Azospirillum amazonense* (CBAMC, Y2), *A. brasilense* (Cd, Sp7), *A. lipoferum* (Sp59) e *Herbaspirillum seropedicae* (Z67). Todos os produtos de amplificação apresentaram uma única banda com tamanho de aproximadamente 1450 pb (Figura 1). Este tamanho do fragmento corresponde ao esperado, pois os primers utilizados flanqueiam quase todo o gene, que apresenta um tamanho médio de 1.500 pb (Young et al., 1991).

##### • ARDRA e análises de agrupamento

O dendrograma construído a partir do perfil de fragmentos de restrição da região 16S DNAr agrupou os 33 isolados de raízes de *Bracharia* pré-caracterizados morfológicamente como *A. amazonense* (Figura 2). Foram formados dois grupos muito similares ( $\cong 95\%$  de similaridade) nos quais foram colocadas as duas estirpes de referência de *A. amazonense* (CBAMC, Y2). As outras estirpes de

**Quadro 6. Número de células de *Azospirillum amazonense* associadas a *Bracharia* em diferentes coletas nos experimentos da Fazenda Agropecuária Lopes (GO)**

Coleta (n = 18)	Número de célula (x 10 <sup>4</sup> ) g <sup>-1</sup> raízes frescas
Coleta 1 (agosto de 1998)	3,71 b
Coleta 2 (fevereiro de 1999)	6,02 b
Coleta 3 (agosto de 1999)	0,47 c
Coleta 4 (dezembro de 1999)	64,56 a
Coleta 5 (março de 2000)	4,17 b
C.V. (%)	17,04

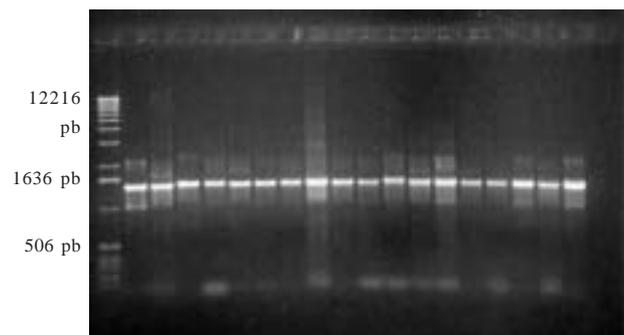
As análises estatísticas foram feitas com os dados transformados em log. Médias seguidas de mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 %.

**Quadro 7. Número de células de *Azospirillum amazonense* associadas a *Bracharia* em diferentes coletas nos experimentos em Itabela (BA)**

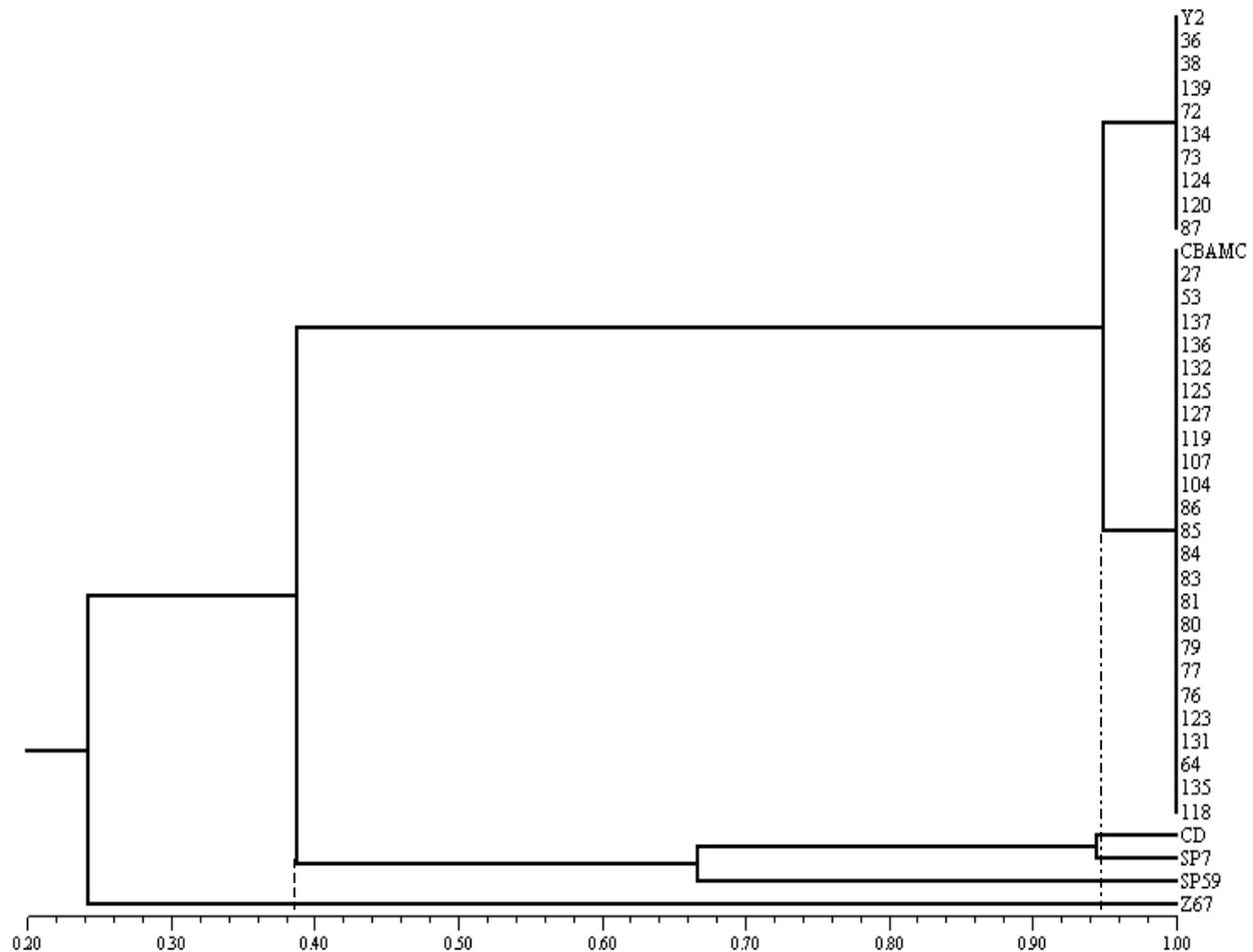
Coleta (n = 18)	Pastagem implantada em 1998	Pastagem com mais de 9 anos
	Número <sup>(1)</sup> de células (x 10 <sup>4</sup> ) g <sup>-1</sup> de raízes frescas	
Coleta 1 (maio de 1999)	91,20 a	21,38 a
Coleta 2 (novembro de 1999)	41,69 a	9,77 a
Coleta 3 (agosto de 2000)	32,36 a	22,39 a
C.V. (%)	14,16	18,17

<sup>(1)</sup> As análises estatísticas foram feitas com os dados transformados em log. Médias seguidas de mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 %.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



**Figura 1. Produtos de amplificação da região 16S DNAr de estirpes de referência de diferentes diazotróficos e novos isolados de *Azospirillum amazonense* provenientes de três espécies de *Bracharia*. M (marcador 1Kb Ladder), 1 (Y2), 2 (CBAMC), 3 (Z67), 4 (Sp7), 5 (Sp59), 6 (53), 7 (137), 8 (120), 9 (84), 10 (125), 11 (138), 12 (85), 13 (76), 14 (119), 15 (134), 16 (139), 17 (72), 18 (136).**



**Figura 2. Dendrograma de similaridade de 33 isolados de raízes provenientes das três espécies de *Brachiaria* estudadas e das estirpes de *Azospirillum amazonense* (CBAMC, Y2), *A. brasilense* (Cd, Sp7), *A. lipoferum* (Sp59) e *Herbaspirillum seropedicae* (Z67).**

referência formaram grupos distintos, para *A. brasilense* (Cd, Sp7), *A. lipoferum* (Sp59) e *Herbaspirillum seropedicae* (Z67), todos afastados pelo menos 60 % de *A. amazonense*. A análise deste dendrograma vai ao encontro das afirmações de Dekhil et al. (1997), que, após o seqüenciamento da 16S RNAr de espécies do gênero *Azospirillum*, mostraram a formação de dois subgrupos distintos, com *A. lipoferum* e *A. brasilense* fazendo parte do primeiro, e *A. amazonense*, mais afastado, do segundo subgrupo.

#### **Produção de hormônio de crescimento (AIA - ácido indol acético) por isolados de *A. amazonense***

Todos os isolados testados foram capazes de produzir AIA (Figura 3). A quantidade de AIA produzida variou de 35 a 110  $\mu\text{M}$ . Estes valores são similares aos observados por Mascarua-Esparza et al. (1988), que variaram de 28,54 a 97,03  $\mu\text{M}$  em isolados de *A. lipoferum* originários de plantas cactáceas no México. Crozier et al. (1988), também trabalhando com isolados de *A. lipoferum*, oriundos

de raízes de milho, obtiveram uma produção variando de 0,0 a 85,9  $\mu\text{M}$  de AIA. Quando estes mesmos autores estudaram a produção de AIA por isolados de *A. brasilense*, os valores apresentados foram maiores, variando de 7,99 a 148,97  $\mu\text{M}$  (Crozier et al., 1988) e 205 a 428  $\mu\text{M}$  (Mascarua-Esparza et al., 1988). Radwan (1999) também mostrou grande variabilidade entre espécies de *Azospirillum* quanto à produção de AIA, com valores variando de 19,2-432  $\mu\text{M}$ .

As diferenças encontradas neste trabalho quanto às populações de *Azospirillum amazonense* associadas a diferentes genótipos de *Brachiaria* podem ser indicadas como possíveis fatores de influência nas taxas de FBN associadas a estas plantas, assim como na sua adaptabilidade a solos de baixa fertilidade. Um manejo adequado, associado à escolha de plantas (genótipos), que, além de serem adaptadas a condições edafoclimáticas vigentes, sejam também eficientes na captação do  $\text{N}_2$  atmosférico, seria um importante passo para se alcançar sustentabilidade nos sistemas de pastagem.



**Figura 3. Produção de AIA por estirpes de referência de *Azospirillum amazonense* e por isolados de raízes de *Brachiaria* spp.**

A associação entre *Azospirillum* e *Brachiaria* também pode vislumbrar a possibilidade de inoculação de pastagens. Itzigsohn et al. (2000) mostraram que a inoculação de *Azospirillum* em pastagens tem grande potencial para tornar-se uma técnica aplicável a estes sistemas em condições de déficit hídrico e/ou baixa fertilidade. Apesar de existirem, em outros países, formulações de inoculantes de *Azospirillum* comercialmente disponíveis, estudos sobre sua utilização, assim como de outras rizobactérias promotoras do crescimento de plantas em pastagens, são muito escassos. No entanto, o uso destes microrganismos associado a um adequado manejo do solo, baseado em comparações com a aplicação de fertilizantes, parece ser mais vantajoso economicamente (Okon & Vanderleyden, 1997) e não apresenta, do ponto de vista ecológico e ambiental, impacto negativo ao meio ambiente (Itzigsohn et al., 2000).

## CONCLUSÕES

1. *A. amazonense* encontra-se associado a *Brachiaria brizantha*, *B. decumbense* e *B. humidicola*, com números variando de  $10^3$ – $10^7$  células  $g^{-1}$  de raízes frescas.

2. Populações destes microrganismos associadas a pastagens de *Brachiaria* implantadas no ecossistema Cerrados foram influenciadas pelo período do ano.

3. Em pastagens instaladas na região de Mata Atlântica, de maneira geral, maiores números de *Azospirillum amazonense* foram encontrados na espécie *B. humidicola*, seguida por *B. decumbens* e *B. brizantha*.

4. O perfil de fragmentos de restrição da região 16S DNAr confirmou a identidade dos isolados de *A. amazonense* que anteriormente haviam sido caracterizados fenotipicamente.

5. Todos os isolados de *A. amazonense* testados foram capazes de produzir AIA.

## AGRADECIMENTOS

Ao programa PADCT III/CIAMB, pelo financiamento parcial do projeto, e ao CNPq.

## LITERATURA CITADA

- ALVIM, M.J.; BOTREL, M.A.; VERNEQ, R.S. & SALVATI, J.A. Aplicação de nitrogênio em acessos de *Brachiaria*. 1. Efeito sobre a produção de matéria seca. *Past. Trop.*, 12:2-6, 1990.
- AUDY, P.; BRAAT, C.A.; SAIDON, G.; HUANG, H.C. & LATOCHE, A. A rapid and sensitive PCR-Based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. *Phytopathology*, 86:361-366, 1996.
- BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M. & DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans* a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF Group1) as *Herbaspirillum* Species 3. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46:802-810, 1996.
- BALDANI, J.I. Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com outras espécies deste gênero, em raízes de milho, sorgo e arroz. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1984. 110p. (Tese de Mestrado)
- BASHAN, Y. & HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian J. Microbiol.*, 43:103-121, 1997.
- BELLONE, C.H.; BELONE, S.C. & PEDRAZA, R.O. Hydric deficiency and acetylene reduction in sugar-cane roots. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION WITH NON-LEGUMES, 7., Faisalabad, 1996. Abstracts. Faisalabad, 1996. p125-126.
- BODDEY, R.M. & VICTORIA, R.L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using  $^{15}N$  labelled organic matter and fertilizer. *Plant Soil*, 90:256-292, 1986.
- BUSSABE, W.O.; MIAZAKI, E.S. & ANDRADE, D.F. Introdução à análise de agrupamentos. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE PROBABILIDADE E ESTATÍSTICA, 9., São Paulo, 1990. Anais. São Paulo, Associação Brasileira de Estatística, 1990. 105p.
- COSTA, J.M.T.F. & RUSHEL, A.P. Seasonal variation in the microbial populations of sugar-cane plants. In: VOSE, P.B. & RUSHEL, A.P., eds. Associative  $N_2$  - fixation. Vol II. São Paulo, University of São Paulo, 1981. p109-118.
- CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J.M. & MONTEIRO, A.M. Analysis of indole-3-acetic and related indoles in culture media from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:2833-2837, 1988.

- DAVIDSON, J.L. & MILTHORPE, F.L. Leaf growth of *Dactylis glomerata* L. following defoliation. *Ann. Bot.*, 30:173-184, 1966.
- DECKHIL, S.B.; CAHILL, M.; STACKBRANDT, E. & SLY, L.I. Transfer of *Conglomerans largomobilis* subs. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov. and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, 20:72-77, 1997.
- DÖBEREINER, J. History and new perspective of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis*, 13:1-13, 1992.
- DÖBEREINER, J. Plant genotype effects on nitrogen fixation in grasses. In: MUHAMMED, A.; AKSEL, R. & BORSTEL, R.C., eds. Genetic diversity in plants, Itaguaí, EMBRAPA UEPAE, 1977. p.325-334.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D. & BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Brasília, EMBRAPA-SPI, Itaguaí, EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60p.
- FERREIRA, E.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. & URQUIAGA, S. Destino do <sup>15</sup>N-urina bovina aplicado na superfície de um solo Podzólico descoberto, ou sob cultura de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. In: CONGRESSO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 32., Brasília, 1995. Anais. Brasília, Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1995. p.109-110.
- FERREIRA, E.; REZENDE, C.P.; GALINDO, L.L.G.; RESENDE, A.S.; TARRÉ, R.M.; MACEDO, R.O.; OLIVEIRA, O.C.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. & BODDEY, R.M. Recuperação do nitrogênio da urina bovina pela pastagem de *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweickt cultivada no sul da Bahia. In: REUNIÓN LATINOAMERICANA DE PRODUCCION ANIMAL, 17; CONGRESO URUGUAYO DE PRODUCCION ANIMAL, 3., Montevideo, 2000. Anais. Montevideo, 2000. CD-ROM
- HOLLAND, J.N.; CHENG, W. & CROSSLEY JR., D.A. Herbivore-induced changes in plant carbon allocation: assessment of bellow-ground C fluxes using carbon-14. *Oecologia*, 107:87-94, 1996.
- ITZIGSOHN, R.; BURDMAN, S.; OKON, Y.; ZAADY, E.; YONATAN, R. & PEREVOLOTSKY, A. Plant-growth promotion in natural pastures by inoculation with *Azospirillum brasilense* under suboptimal growth conditions. *Arid Soil Res. Rehab.*, 13:151-158, 2000.
- KRAFFCZYK, I.; TROLLDENIER, G. & BERINGER, H. Soluble root exudates of maize: influence of potassium supply and rhizosphere micro-organisms. *Soil Biol. Biochem.*, 16:315-322, 1984.
- LOUREIRO, M.F. & BODDEY, R.M. Balanço de nitrogênio em quatro gramíneas do gênero *Brachiaria*. *Pesq. Agropec. Bras.*, 23:1343-1353, 1988.
- MAGALHÃES, F.M.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *An. Academia Bras. Ci.*, 55:417-430, 1983.
- MAGALHÃES, F.M.M. & DÖBEREINER, J. Occurrence of *Azospirillum amazonense* in some Amazonian (Brazil) ecosystems. *R. Microbiol.*, 15:246-252, 1984.
- 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.
- MASCARUA-ESPARZA, M.A.; VILLA-GONZALEZ, R. & CABALLERO-MELADO, J. Acetylene reduction and indolacetic acid production by *Azospirillum* isolates from Cactaceous plants. *Plant Soil*, 106:91-95, 1988.
- MONZÓN DE ASCONEGUI, M.A. & SIROLI, N.S. Presencia de *Azospirillum amazonense* y micorrizas vesiculoribusculares en rizósfera de gramíneas de Corrientes (Argentina). In: CONGRESO ARGENTINO DE MICROBIOLOGÍA, 4., Buenos Aires, 1985. (Resumen, A49)
- NEYRA, C.A. & DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation in grasses. *Adv. Agron.*, 29:1-38, 1977.
- OKON, Y. & VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *ASM News*, 63:364-370, 1997.
- OLIVEIRA, O.C.; OLIVEIRA, I.P.; FERREIRA, E.; ALVES, B.J.R.; CADISCH, G.; MIRANDA, C.H.B.; VILELA, L.; BODDEY, R.M. & URQUIAGA, S. A baixa disponibilidade de nutrientes do solo como uma causa potencial da degradação de pastagens no cerrado brasileiro. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 3., Ouro Preto, 1997. Anais. Ouro Preto, 1997. p.110-117.
- RADWAN, T. EL-SAYED EL-DESOK. Improvement of quality of some crop plants by applying new concepts in biotechnology with *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. Cairo, Cairo University, 1999. 201p. (Tese de Doutorado)
- REIS Jr., F.B.; REIS, V.M.; SILVA, L.G. & DÖBEREINER, J. Levantamento e quantificação de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). *Pesq. Agropec. Bras.*, 35:985-994, 2000.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA Jr., V.A. & VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. Citri Tipo B. *Summa Phytopatol.*, 12:16, 1986.
- ROHLF, F.J. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.1, User guide. New York, State University of New York, Stony Brook, 2000. 37p.
- RUESS, R.W. & MCNAUGHTON, S.J. Grazing and the dynamics of nutrient and energy regulated microbial process in the Serengeti. *Oikos*, 49:101-110, 1987.
- SARWAR, M. & KREMER, R.J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Lett. Appl. Microbiol.*, 20:282-285, 1995.
- SOUTO, S.M. Variação estacional da fixação de N<sub>2</sub> e desnitrificação em gramíneas forrageiras tropicais. Rio de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1982. 268p.

- TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen-nov and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Can. J. Microbiol., 24:967-980, 1978.
- YOUNG, J.P.W.; DOWNER, H.L. & EARDLY, B.D. Phylogeny of phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA segment. J. Bacteriol., 173:2271-2277, 1991.