

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO - UNIFENAS
GILMARA APARECIDA SILVESTRE

CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS
ISOLADAS DE *Brachiaria brizantha* cv. Marandu

ALFENAS – MG
2017

GILMARA APARECIDA SILVESTRE

CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

ISOLADAS DE *Brachiaria brizantha* cv. Marandu

Dissertação apresentada à Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciências Animal, para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Ligiane Aparecida Florentino

Coorientador: Prof. Dr. Aداuton Vilela de Rezende

ALFENAS – MG

2017

Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Biblioteca Central da UNIFENAS

Silvestre, Gilmara Aparecida
Características fisiológicas de bactérias diazotróficas isoladas de
Brachiaria brizantha cv. *Marandu*. — Gilmara Aparecida Silvestre.—
Alfenas, 2017.
45 f.

Orientadora: Prof^a Ligiane Aparecida Florentino
Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-graduação
em Ciência Animal -Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas,
2017.

1. Fixação biológica de nitrogênio 2. Bactérias promotoras de
de crescimento vegetal 3. Seleção estirpes inoculantes I. I.
Universidade José do Rosário Vellano I. Título

CDU : 633.2(043)



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: "Características fisiológicas de bactérias diazotróficas isoladas de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu".

Autor: Gilmara Aparecida Silvestre

Orientador: Profa. Dra. Ligiane Aparecida Florentino

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM CIÊNCIA ANIMAL** pela Comissão Examinadora.

Profa. Dra. Ligiane Aparecida Florentino
orientadora

Prof. Dr. Adauton Vilela de Rezende

Profa. Dra. Amanda Azarias Guimarães

Alfenas, 27 de abril de 2017.

Prof. Dr. Mário Sérgio Oliveira Swerts
Diretor de Pesquisa e Pós-graduação
UNIFENAS

DEDICATÓRIA

Primeiramente, dedico este trabalho a Deus, que me deu forças e iluminou meu caminho. Aos meus pais Armando Domiciano Silvestre e Maria da Penha S. Silvestre aos meus irmãos que me apoiaram em todos os momentos da minha vida. Sou incapaz de imaginar o seria sem vocês! Aos meus amigos de mestrado professores que estiveram presentes durante estes dois anos. E a todos que de alguma maneira colaboraram com minha vida acadêmica – dedico um: muito obrigada!

Todos vocês são especiais e insubstituíveis. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pela oportunidade de estar realizando este trabalho, e por ter me abençoado durante todo esse tempo, me protegendo nos momentos em que tive vontade de desistir, e me dando força para seguir em frente.

À professora Ligiane Aparecida Florentino pela orientação, amizade e todo ensinamento e conselhos passados durante todo esse tempo.

Ao professor Aداuton Vilela de Rezende pela coorientação, amizade e atenção

A todos os Professores que me ajudaram nesta caminhada.

À Universidade Jose do Rosário Vellano – UNIFENAS, e funcionários.

Aos amigos que sempre estiveram presentes nos momentos de alegria nas horas tristes sempre com muito carinho e afeto.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho um muito obrigado a vocês!

*Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis.*
Bertolt Brecht

RESUMO

O processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) tem sido intensivamente pesquisado devido à contribuição no aporte de nitrogênio (N) nos agroecossistemas, contribuindo, assim, para a maior sustentabilidade destes, principalmente, nas regiões tropicais, onde os solos geralmente se encontram altamente intemperizados e com baixo nível de fertilidade natural. Diversas espécies bacterianas realizam o processo da FBN, no entanto, o grupo das bactérias diazotróficas associativas, que possuem potencial de inoculação em gramíneas, tem sido pouco explorada pela pesquisa. Dessa forma, este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a tolerância a diferentes condições de pH e salinidade e a capacidade de produzir ácido 3-indol acético (AIA) e solubilizar fosfato por diferentes estirpes de bactérias diazotróficas isoladas de solos rizosféricos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. Foi observada que as estirpes apresentaram comportamento variado em relação à tolerância a diferentes concentrações de salinidade e à capacidade de produzir AIA e solubilizar fosfato. Já em relação ao pH, foi verificado que estas cresceram nos valores de 4,0 a 7,0. Esses resultados constituem uma etapa importante do processo de seleção destas estirpes, visando inoculação em áreas de pastagens cultivadas com *Brachiaria* spp.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio, bactérias promotoras de crescimento vegetal, seleção estirpes inoculantes.

ABSTRACT

FBN has been intensively studied due to nitrogen (N) supply, thus contributing to the sustainability of agroecosystems, especially in tropical regions, where soils are generally highly weathered and have a low level of natural fertility. The BNF process is carried out by N₂-fixing bacteria, which can be found in free life, in association with several plant species or in symbiosis with legumes. Some species of associative bacteria, besides abundantly colonizing the rhizosphere, may also occur endofitically, that is, invade the cortex and colonize internal tissues in several plant species and contribute with part of the N necessary to the vegetal development. Therefore, this work was carried out with the objective of analyzing strains of bacteria tolerant to different salt concentrations and the production of the phytohormone 3-indole acetic acid. Diversity was observed in relation to tolerance to saline concentrations and in the production of AIA by strains isolated from *Brachiaria* spp. Or in different grasses. Some of these showed tolerance to high salt concentrations and produced AIA at concentrations that may contribute to plant growth. In the solubilization of reactive natural phosphate in culture medium, it was observed that the contents of P (g L⁻¹) present in the GL medium after the inoculation was superior to the control treatment, except the treatment inoculated with the strain Ab-V5, of the species *Azospirillum brasilense* the isolates differed among themselves, in the capacity of solubilization of the phosphate.

Keywords: Biological fixation of nitrogen, plant growth promoting bacteria, different saline concentrations

LISTA DE FIGURA

| | |
|---|----|
| Figura 1. Máximas concentrações toleradas (MCT) de NaCl (mM) em meio FAM por estirpes de bactérias diazotróficas isoladas de solos rizosféricos sob <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu. | 30 |
| Figura 2. Correlação entre o valor de pH e P solúvel..... | 36 |

LISTA DE TABELA

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Características morfológicas das estirpes isoladas de solos rizosféricos de <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu em meio FAM..... | 25 |
| Tabela 2. Produção de ácido indol acético (AIA) pelas estirpes bacterianas em meio Dygs contendo ou não triptofano..... | 33 |
| Tabela 3. Solubilização de fosfato in vitro em (g L ⁻¹)..... | 35 |

SUMÁRIO

| | |
|--|--------------------------------------|
| INTRODUÇÃO GERAL | 11 |
| REFERENCIAL TEÓRICO..... | 13 |
| Associação entre bactérias diazotróficas e gramíneas forrageiras..... | 13 |
| Bactérias diazotróficas e o potencial de atuar como promotoras do crescimento vegetal..... | 14 |
| Solubilização de fosfato..... | 16 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 17 |
| Artigo 1:..... | 21 |
| CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ISOLADAS DE <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu..... | 21 |
| INTRODUÇÃO..... | Erro! Indicador não definido. |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 25 |
| Caracterização morfológica das estirpes bacterianas | 25 |
| Crescimento em meios contendo diferentes valores de pH e concentrações salinas.. | 26 |
| Produção de Ácido-3-indol acético (AIA)..... | 27 |
| Solubilização de Fosfato Natural in vitro | 28 |
| Análises estatísticas | 29 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 29 |
| Crescimento em meios contendo diferentes concentrações salinas e valores de pH . | 29 |
| Produção de Ácido-3-indol acético (AIA)..... | 31 |
| Solubilização de Fosfato Natural in vitro | 34 |
| Conclusão | 37 |
| Agradecimentos..... | 37 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | Erro! Indicador não definido. |

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil ocupa posição de destaque na produção de pecuária de corte e no mercado internacional da produção e exportação de carne, firmando-se, nos últimos anos, como o maior exportador mundial deste produto. O principal sistema de produção utilizado é o extensivo, caracterizado pela necessidade de extensas áreas de pastagens. Entre as forrageiras utilizadas, destacam-se gramíneas do gênero *Brachiaria*.

Nas últimas décadas, tem-se observado uma redução na produtividade das pastagens, devido, principalmente, ao manejo animal inadequado e à falta de reposição de nutrientes, como o nitrogênio (N) e fósforo (P), refletindo diretamente na redução da produção animal (carne e leite) e na sustentabilidade do agroecossistema.

O Nitrogênio (N) é um macronutriente importante para todas as formas de vida. Tal elemento, na forma gasosa (N_2), compõe grande parte do ar atmosférico, aproximadamente 78%, entretanto, nessa forma, encontra-se indisponível para a maioria dos organismos. Para estar disponível, o N_2 deve ser transformado em NH_3 , o que pode acontecer através de descargas elétricas, processos industriais e, principalmente, pela fixação biológica por bactérias, que representa a maior parte do nitrogênio fixado mundialmente (Moreira & Siqueira, 2006).

Estes microrganismos, representados pelas bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) desempenham o processo denominado Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), o qual se apresenta como uma alternativa para aumentar a disponibilidade de N nos agroecossistemas. Além da contribuição com o N, essas bactérias podem, ainda, contribuir para o crescimento vegetal através da produção de hormônios (AIA), solubilização de fosfatos inorgânicos e controle de patógenos (Cavallet et al., 2000; Reis Júnior et al., 2004; Costa et al., 2012; Santos et al., 2012).

Diversos estudos mostram o benefício da inoculação destas bactérias em diferentes gramíneas forrageiras (Didonet et al., 1996; Okon & Vanderleyden 1997; Cavallet et al., 2000; Oliveira et al., 2007) e, também, em outras espécies vegetais, como a seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) (Diniz et al., 2012). Portanto, a inoculação com estas bactérias pode reduzir a utilização de fertilizantes nitrogenados, os quais, além de onerar o custo de produção, contribuem para maior sustentabilidade dos agroecossistemas, uma vez que o nitrogênio apresenta alta mobilidade no solo, podendo contaminar os cursos d'água.

Além da contribuição com o N, essas bactérias podem, ainda, contribuir para o crescimento vegetal através da produção de hormônios (AIA), solubilização de fosfatos inorgânicos e controle de patógenos (Cavallet et al., 2000; Reis Júnior et al., 2004; Costa et al., 2012; Santos et al., 2012).

Entretanto, nas áreas de pastagens, os estudos sobre os microrganismos do solo, principalmente, no que se refere às funções desempenhadas por estes, ainda são incipientes, necessitando de haver pesquisas visando identificar quais os grupos de bactérias presentes nestas áreas, suas funções e quais os fatores limitantes à ocorrência destas.

REFERENCIAL TEÓRICO

Associação entre bactérias diazotróficas e gramíneas forrageiras

O Brasil ocupa posição de destaque na produção e na exportação de carne, firmando-se, nos últimos anos, como o maior exportador mundial deste produto. O principal sistema de produção utilizado constitui-se no extensivo, caracterizado pela necessidade de extensas áreas de pastagens. Estima-se que são cultivadas aproximadamente 200 milhões de hectares de pastagens, das quais se tem o predomínio de gramíneas do gênero *Brachiaria* (Boddey *et al.*, 2006), em função de sua maior tolerância às condições de solos ácidos e de baixa fertilidade, aliada ao seu valor forrageiro, sendo que as espécies de maior importância são a *B. decumbens*, *B. brizantha*, *B. ruziziensis* e *B. humidicola* (Sobrinho *et al.*, 2005).

No entanto, segundo Macedo *et al.* (2014), mais da metade das áreas cultivadas com pastagens encontram-se degradadas, devido, principalmente, ao manejo animal inadequado e à falta de reposição de nutrientes, como o nitrogênio (N) e fósforo (P), refletindo diretamente na redução da produção animal (carne e leite) e na sustentabilidade do agroecossistema. Dados comprovam que o fornecimento de fertilizantes é muito baixo, cerca de 7,4 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de NPK, quantidade que não atende as exigências das pastagens cultivadas (Ferreira *et al.*, 1999).

Dos macronutrientes, o Nitrogênio (N) é o mais utilizado pela maioria das plantas e limitando o crescimento das plantas e à produtividade das culturas (Novais, 2007). Quando adicionado aos solos há perdas por volatilização e lixiviação, tornando essa prática bastante onerosa e de baixa eficiência (Souto, 1982). Este elemento, na forma gasosa (N₂), compõe grande parte do ar atmosférico, aproximadamente 78%, entretanto, nessa forma, encontra-se indisponível para a maioria dos organismos. Para

estar disponível, o N_2 deve ser transformado em NH_3 , o que pode acontecer através de descargas elétricas, processos industriais e, principalmente, pela fixação biológica por bactérias, que representa a maior parte do nitrogênio fixado mundialmente (Moreira & Siqueira, 2006).

Estes microrganismos, representados pelas bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) desempenham o processo denominado Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), o qual se apresenta como uma alternativa para aumentar a disponibilidade de N nos agroecossistemas. Diversos estudos mostram o benefício da inoculação destas bactérias em diferentes gramíneas forrageiras (Didonet et al., 1996; Okon & Vanderleyden 1997; Cavallet et al., 2000; Oliveira et al., 2007) e, também, em outras espécies vegetais, como a seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) (Diniz et al., 2012).

Nesse sentido, a inoculação com estas bactérias pode reduzir a utilização de fertilizantes nitrogenados, os quais, além de onerar o custo de produção, contribuem para uma maior sustentabilidade dos agroecossistemas, uma vez que o nitrogênio apresenta alta mobilidade no solo, podendo contaminar os cursos d'água. A FBN é considerada também uma das medidas a serem adotadas para mitigar a emissão de óxido nítrico, um dos gases do efeito estufa e que é considerado cerca de 300 vezes mais poluente que o CO_2 (Plano ABC, 2010).

Bactérias diazotróficas e o potencial de atuar como promotoras do crescimento vegetal

Algumas espécies de diazotróficos podem colonizar abundantemente a rizosfera e, também, colonizar endofiticamente, ou seja, invadir o córtex e se desenvolverem em tecidos internos de espécies vegetais sem ocorrer a formação de estruturas chamadas de

nódulos. Comumente encontradas em gramíneas e outras monocotiledôneas, resultados demonstram que essas podem ser encontradas, com menor frequência, em algumas dicotiledôneas (DIAS, 2015).

Espécies usualmente encontradas são: *Azospirillum* spp. (*A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, *A. irakense*), *Azotobacter paspali*, *Bacilluspolimixa*, *B. azotofixans*, *Azoarcus indigens*, *A. communis*, *Acetobacter diazotrophicus* (syn. *Gluconobacter diazotrophicus*), *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *Burkholderia* spp. Visto que a ocorrência é praticamente restrita aos tecidos internos vegetais, espécies dos gêneros *Azoarcus*, *Acetobacter* e *Herbaspirillum* são consideradas obrigatoriamente ou predominantemente endofíticas (MOREIRA *et al.*, 2010).

Experimentos conduzidos através do método de incorporação do $^{15}\text{N}_2$ admitem que várias gramíneas tropicais se beneficiem de nitrogênio fixado biologicamente (DE-POLLI, 1975; RUSCHEL, 1975; DE-POLLI *et al.*, 1977).

Esses microrganismos possuem potencial de atuar como promotoras do crescimento vegetal de forma direta, em que, principalmente, sintetizam um composto ou facilitam a absorção de certos nutrientes do meio ambiente, fornecendo para a planta nitrogênio fixado, fósforo solubilizado do solo e fitormônios como as auxinas e, também, indireta em que diminui ou previne os efeitos deletérios de organismos patogênicos (GLICK e BASHAN, 1997), pela síntese de sideróforos (LEONG, 1986) e antibióticos.

Solubilização de fosfato

O Fósforo (P), assim como o nitrogênio, é um macronutriente, portanto, exigido em grandes quantidades pelos vegetais para seu desenvolvimento. Tal elemento é constituinte de biomoléculas como, ácidos nucleicos, coenzimas e outros. Porém, é um dos nutrientes que mais limita a produção agrícola devido ao seu comportamento no solo, onde são encontrados em formas altamente insolúveis devido ao processo de fixação. Quando disponível na solução do solo de forma solúvel, as plantas podem absorvê-lo como ânions de fosfato, predominantes nas formas de HPO_4^{2-} e H_2PO_4^- (WAKELIN *et al.*, 2004).

Essa baixa disponibilidade nos solos é devido a sua ligação a outros componentes químicos, chamada de fixação e adsorção. Geralmente, em solos ácidos, a maior parte deste elemento se encontra ligado a óxido de ferro e alumínio e em solos alcalinos ou neutros, este elemento se liga ao cálcio (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Estudo de Barroso e Nahas (2005) sobre as frações de fósforo encontradas em solos brasileiros sob pastagem, cultivo de milho, mata e florestas, demonstrou que a mais frequente foi a de fosfato de ferro, seguida de fosfato de alumínio e fosfato de cálcio.

Existem alguns processos realizados por microrganismos como, fungos e bactérias capazes de aumentar a disponibilidade do P na solução do solo. Através de estudo com diferentes espécies bacterianas, quanto a sua capacidade de solubilização mostram que espécies de *Rhizobium*, *Pseudomonas* e *Bacillus* apresentam o maior potencial de solubilização (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999).

Segundo a literatura, esses microrganismos solubilizam o fosfato inorgânico por dois mecanismos principais, pela produção de ácidos orgânicos ou pela secreção de prótons (H^+) (ILLMER; BARBATO; SCHINNER, 1995). A solubilização do fosfato, também, varia de acordo com a natureza do mineral de fosfato fornecido e a

composição meio que o microrganismo é inoculado (GYANESHWAR; KUMAR; PAREKH, 1998). Em campo, essa eficiência varia de acordo com o tipo de solo e a cultura (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999).

Inicialmente, Gerretsen (1948) observou que a quantidade de fósforo assimilado pelas plantas inoculadas com microrganismos rizosféricos foi maior do que o tratamento sem inoculação, demonstrando-se, portanto, a capacidade dos microrganismos em solubilizar fósforo inorgânico e, conseqüentemente, a contribuição para o desenvolvimento das plantas. Entre os microrganismos solubilizadores de fosfato, merecem destaque as bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, que, além de fornecerem o N para o desenvolvimento vegetal podem, também, contribuir com o fornecimento de P para as plantas (MARRA *et al.*, 2012).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROSO, C.B.; NAHAS, E. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam: Elsevier B.V., v. 29, n. 1, p. 73-83, 2005.

BODDEY, R.M.; VICTORIA, R.L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria and Paspalum* grasses using ¹⁵N labeled organic matter and fertilizer. **Plant and Soil**, v. 90, n. 53, p.256-292, feb.1986.

CAVALLET, L.E. et al. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p.129-132, ago. 2000.

DE-Polli, H. **Ocorrência de fixação de 15N₂ nas gramíneas tropicais *Digitaria decumbens e Paspalum notatum***. 1975. 95f. (Dissertação Mestrado) -Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1975.

DE-Polli, H. et al. Confirmation of nitrogen fixation in two tropical grasses by $^{15}\text{N}_2$ incorporation. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford-NY, v.9, n.2, p.119-123, dec. 1977.

DIAS, MÁRCIO DE SOUZA. **Diversidade e potencial de utilização de bactérias fixadoras de N_2 em Brachiariabrizantha**. 2015. 66 f. Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-graduação em Ciência animal-Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, 2015.

DIDONET, A.D.; RODRIGUES, O.; KENNER, M.H. Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em PLANTAS DE TRIGO INOCULADAS COM *Azospirillum brasiliense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.16, n.9, p.645-651, set.1996.

DINIZ, P.F.A. et al. Bactérias diazotróficas em solos sob seringueira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 36, n. 5, p. 1426-1433,2012.

DINIZ, P.F.A. et al. Bactérias diazotróficas em solos sob seringueira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 36, n. 5, p.1426-1433, 2012.

FERREIRA, C.R.R.P.T. et al. Caracterização da pecuária bovina no estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.29, n2, p. 7-30, fev. 1999.

GLICK, B. R.; BASHAN, Y. Genetic manipulation of plants grow-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnology Advances**, USA, v. 15, n. 2, p. 353- 378, apr.1997.

GYANESHWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L.J. Effect of buffering on the phosphate-solubilizing ability of microorganisms. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.14, p. 669-673, 1998.

ILLMER, P.; BARBATO, A.; SCHINNER, F. Solubilization of hardly-solubilization of hardly-soluble AIPO, with p-solubilizing microorganisms. **Soil Bid Biochenz.**, v.27, n. 3, p.265-270, Mar.1995.

LEONG, J. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. **Annu Rev Phytopathol**, Oxford, v. 24, n.1, p.187–208, sept. 1986.

MACEDO, M.C.M; et.al. Degradação de Pastagens, Alternativas de Recuperação e Renovação, e Formas de Mitigação. In: ENCONTRO DE ADUBAÇÃO DE PASTAGENS DA SCOT CONSULTORIA, 1., 2013, Ribeirão Preto, SP. **Anais...** Bebedouro: Scot Consultoria, 2013. p. 158-181.

MARRA, M.L. et al. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, The Hague, p. 1-19, 2012.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729p.

MOREIRA, F.M.S. et.al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v.2, n. 1, p. 74-99,2010.

NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J.; NUNES, F.N. Fósforo. In: NOVAIS, R.F.; et al. **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 471-537.

PLANO ABC (Agricultura de Baixa Emissão de Carbono). **Plano Setorial de Mitigação e de Adaptação às Mudanças Climáticas para a Consolidação de uma Economia de Baixa Emissão de Carbono na Agricultura**, Brasília, 2010.

OKON, Y ; VANDERLEYDEN , J . Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 63, n. 7, p. 366-370, 1997.

OLIVEIRA, P. P. A.; OLIVEIRA, W. S.; BARIONI, W. J. **Produção de forragem e qualidade de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu com *Azospirillum brasilense* e fertilizada com nitrogênio.** São Carlos : Embrapa pecuária sudeste, 2007

REIS, V.M. et al. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary **Microbiology**, São Paulo, v. 54, n. 6, p. 2155-2162, nov. 2004.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 319–339, 1999.

RUSCHEL, A.P. **Fixação biológica de nitrogênio.** 1975. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1975.

SOBRINHO, F.S. et al. Produtividade e qualidade da forragem de *Brachiaria* na região norte fluminense. In : REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia : SBZ, 2005.

SOUTO, S.M. **Variação estacional da fixação de N₂ e desnitrificação em gramíneas forrageiras tropicais.** 1982. 268 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro : Seropédica, 1982.

WAKELIN, S.A. et al. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. **Biology and Fertility of Soils**, v.40, p.36-43, 2004.

Artigo 1:

Características fisiológicas de bactérias diazotróficas isoladas de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu

Gilmara Aparecida Silvestre, Ligiane A. Florentino, Aداuton Vilela de Rezende

* Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS. Rodovia MG 179, Km 0 - Campus

Universitário, Alfenas - MG, 37130-000. E-mails: gihsilvestre25@gmail.com;

ligiane.florentino@unifenas.br; adauton.rezende@unifenas.br; . (*Autor para correspondência)

RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de analisar a tolerância a diferentes concentrações salinas e valores de pH, capacidade de produzir o fitormônio ácido 3-indol acético (AIA) e solubilizar fosfato por estirpes isoladas de solos rizosféricos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. Os testes de tolerância a diferentes concentrações salinas e valores de pH foram realizados em meio FAM sólido, modificado, contendo 1,71; 86; 171; 256; 342; 427; 513; 598; 684; 769 e 855 mM de NaCl e valores de pH de 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0, respectivamente. No teste de produção de AIA, as estirpes foram cultivadas em meio Dygs líquido, na ausência e presença de triptofano (100 µg L⁻¹) e para a solubilização de fósforo, foi utilizado o meio GL e o fosfato reativo de Bayóvar, como fonte de fósforo. Todas as estirpes foram capazes de crescer em todos os valores de pH analisados. Já em relação aos testes de diferentes concentrações salinas, produção de AIA e solubilização de fosfato, foi verificada alta diversidade, havendo estirpes que se destacaram. Em relação a tolerância a salinidade, as estirpes UNIFENAS 100-52; 100-51; 100-60; 100-63 e 100-65, foram as que apresentaram maior crescimento nas três maiores concentrações salinas. Na presença de triptofano, as estirpes UNIFENAS 100-63 e 100-69 foram as que apresentaram maior produção de

AIA, 45,16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 49,67 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Já em solubilização de Fosfato *in vitro*, a estirpe UNIFENAS 100-52 foi a que obteve melhor resposta, com valor de solubilização de 13,30 g L⁻¹. Essas estirpes podem contribuir para o crescimento vegetal, sendo, portanto, indicadas para testes futuros envolvendo a inoculação destas em *Brachiaria* spp. ou em diferentes gramíneas.

Palavras-chaves: Bactérias promotoras de crescimento; fixação biológica de nitrogênio; diversidade metabólica.

Abstract

This work was carried out with the objective of analyzing the tolerance to different saline concentrations and the production of 3-indole acetic acid phormonium (AIA) by strains isolated from *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. Salinity tolerance was performed on modified solid FAM medium with different salt concentrations (mM NaCl): 1.71; 86; 171; 256; 342; 427; 513; 598; 684; 769 and 855. In the AIA production test, the strains were cultivated in liquid Dygs medium, in the absence and presence of tryptophan (100 $\mu\text{g L}^{-1}$) and for the solubilization of phosphorus, the GL medium and the Bayóvar reactive phosphate were used as source of phosphorus. All strains could grow at all pH values analyzed. Regarding the tests of different saline concentrations, AIA production and phosphate solubilization, high diversity was observed, with strains that stood out. The trains UNIFENAS 100-52; 100-51; 100-60; 100-63 and 100-65, showed the highest growth and tolerance to salinity. In the presence of tryptophan, UNIFENAS 100-63 and 100-69 strains were the ones with the highest AIA production, 45.16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 49.67 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. In solubilization of phosphate *in vitro*, the strain UNIFENAS 100-52 was the one that obtained the best response, with a solubilization value of 13.30 g L⁻¹. These strains may contribute to plant growth and are

therefore suitable for future tests involving an inoculation in *Brachiaria* spp. or in different grasses

Key-words: Growth promoting bacteria; Biological nitrogen fixation; Metabolic diversity.

Introdução

No Brasil, cerca de 50% das áreas cultivadas são constituídas por pastagens, com o predomínio de gramíneas do gênero *Brachiaria*. No entanto, devido a fatores, como à lotação excessiva e à ausência de manejo adequado para o controle de plantas daninhas, pragas e reposição de nutrientes, estima-se que grande parte dos solos cultivados sob pastagens (mais de 50%) encontra-se em processos de degradação (Macedo et al., 2014), influenciando negativamente a capacidade produtiva e a competitividade do setor pecuário.

Nesse sentido, justifica-se a necessidade de utilizar técnicas e práticas de manejo visando recuperar estes solos, tornando-os mais produtivos, uma vez que, segundo Neves Neto et al (2013), degradação do solo e pastagem estão diretamente relacionados. De acordo com estes autores, a adubação constitui-se numa prática fundamental, com destaque para os fertilizantes nitrogenados, que promovem melhoria das características estruturais e morfológicas, índice de área foliar, densidade de perfilhos e, conseqüentemente, no maior acúmulo de massa seca da forragem (Lara et al., 2012; Silva et al., 2013). No entanto, é necessário avaliar a dimensão do impacto da adubação nitrogenada nas áreas pastagens devido às emissões de óxido nitroso (N₂O) (Nogueira et al., 2015). Ainda de acordo com esses autores, a adubação nitrogenada foi o fator que mais influenciou os fluxos de N₂O, sendo esse superior em pastagens manejadas quando comparado a áreas não manejadas. Dessa forma, baixas doses de fertilizantes

nitrogenados resultam em menores emissões de N_2O , podendo ser uma técnica de manejo eficaz.

A utilização de bactérias fixadoras de N_2 , também denominadas bactérias diazotróficas, constitui-se numa das alternativas à substituição parcial ou total dos fertilizantes nitrogenados. Estudos realizados por Reis Júnior et al (2004) e Brasil et al (2005) indicam que estas bactérias estão amplamente distribuídas em solos de pastagens. Além de contribuir com o N para a planta, essas bactérias podem atuar como promotoras do crescimento vegetal, produzindo fitohormônios, como o AIA e aumentando a disponibilidade de nutrientes, como o fósforo e potássio, por meio da solubilização desses nutrientes presentes em minerais ou rochas no solo (Moreira et al., 2010; Florentino et al., 2017).

No entanto, a densidade e a diversidade desses microrganismos no solo são influenciadas pelas condições edafoclimáticas e pelo tipo de vegetação (Vitorazi Filho et al., 2012). Estudos desenvolvidos por Guimarães et al (2011) e Bosa et al (2016) relatam o potencial de contribuição da inoculação de algumas estirpes bacterianas para o desenvolvimento de *Brachiaria* spp. No entanto, os estudos da inoculação com bactérias fixadoras de N_2 em gramíneas forrageiras, ainda, são incipientes, necessitando de pesquisas *in vitro* visando identificar propriedades fisiológicas de estirpes bacterianas que proporcionarão maior sucesso destas quando aplicadas no campo.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estudar a capacidade de estirpes isoladas pertencentes ao Laboratório de Microbiologia Agrícola da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS) de crescer em diferentes valores de pH e concentrações salinas, produzir ácido 3-indol-acético (AIA) e solubilizar fosfato.

Material e métodos

Caracterização morfológica das estirpes bacterianas

Foram selecionadas 18 estirpes de bactérias diazotróficas isoladas de solos rizosféricos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu (Dias, 2015), pertencentes ao Laboratório de Microbiologia Agrícola da UNIFENAS e uma estirpe da espécie *Azospirillum brasilense*, Ab-V5, pertencente à coleção da Embrapa Soja. A tabela 1 apresenta as principais características morfológicas destas estirpes quando cultivadas em meio FAM (MAGALHÃES; DÖBEREINER, 1984). Todas as estirpes apresentaram colônias isoladas entre 2 a 3 dias, sendo consideradas de crescimento rápido.

Tabela 1. Características morfológicas das estirpes isoladas de solos rizosféricos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em meio FAM.

| Caracterização morfológica das estirpes | Caracterização morfológica | | |
|---|----------------------------|-------------|------------------|
| | pH ¹ | Cor colônia | EPS ² |
| Estirpes da coleção UNIFENAS | | | |
| UNIFENAS 100-01 | N | Am | ++++ |
| UNIFENAS 100-02 | N | Cr | ++ |
| UNIFENAS 100-13 | N | Cr | +++ |
| UNIFENAS 100-16 | N | Cr | ++++ |
| UNIFENAS 100-21 | N | Cr | +++ |
| UNIFENAS 100-35 | N | Am | ++ |
| UNIFENAS 100-39 | Ac | Am | ++++ |
| UNIFENAS 100-40 | Ac | Am | ++ |
| UNIFENAS 100-45 | Ac | Am | +++ |

| | | | |
|-----------------|----|----|------|
| UNIFENAS 100-51 | Ac | Am | ++++ |
| UNIFENAS 100-52 | Al | Cr | + |
| UNIFENAS 100-60 | Al | Cr | ++ |
| UNIFENAS 100-63 | Al | Cr | +++ |
| UNIFENAS 100-65 | Al | Am | ++ |
| UNIFENAS 100-69 | Al | Am | +++ |
| UNIFENAS 100-71 | N | Am | + |
| UNIFENAS 100-78 | N | Am | +++ |
| UNIFENAS 100-94 | N | Am | +++ |

Estirpe da coleção Embrapa

| | | | |
|-------|----|----|----|
| Ab-V5 | Al | Cr | ++ |
|-------|----|----|----|

¹Reação do pH do meio após crescimento da estirpe avaliado pela mudança de cor do indicador (N – neutro; Ac – Ácido; Al – Alcalino); Cor da colônia (Am – amarela; Cr – creme); ³Produção de exopolissacarídeos (EPS: +++++ - Alta; +++ Intermediária; ++ - Baixa; + Escassa).

Crescimento em meios contendo diferentes valores de pH e concentrações salinas

As 18 estirpes foram cultivadas em meio FAM sólido para obtenção de colônia isolada e confirmação da pureza e, posteriormente, foram transferidas para o meio FAM líquido, sendo cultivadas por 3 dias, tempo necessário para atingir a fase de crescimento exponencial, contendo aproximadamente 10^8 células mL^{-1} . Após esse período, um mL de cada estirpe foi transferida para microtubos com capacidade de 1,5 mL esterilizados, para centrifugação a 10.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 1 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85%) e

centrifugadas novamente. Esse processo de lavagem das células foi repetido por três vezes e tem como objetivo a remoção de resíduos do meio de cultura do inóculo que poderiam resultar num falso crescimento positivo (Florentino et al., 2012).

Posteriormente, alíquotas de 100 μL de suspensões de células lavadas em solução salina foram inoculadas e espalhadas com a alça de Drigalsky em placas que continham o meio sólido FAM modificado com as seguintes concentrações de NaCl (mM): 1,71 (tratamento controle); 86; 171; 256; 342; 427; 513; 598; 684; 769 e 855.

Para verificar o crescimento em diferentes valores de pH, o meio FAM foi ajustado para os seguintes valores de pH: 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0 pela adição de HCl ou NaOH (Zerhari et al., 2000; Moschetti et al., 2005; Wei et al., 2008). Adotou-se o mesmo procedimento de lavagem das células citado anteriormente. Como tratamento-controle, foi usado o meio de cultura FAM com valor de pH igual a 6,8.

Para ambos testes (salinidade e pH), os tratamentos foram distribuídos inteiramente ao acaso, com quatro repetições. As placas foram incubadas a 28°C por 7 dias, nos quais foram avaliados a presença (+) ou ausência (-) de crescimento bacteriano.

Produção de Ácido-3-indol acético (AIA)

As estirpes bacterianas foram analisadas quanto ao potencial de produzir AIA em meio Dygs, na ausência e presença de triptofano (Trp) ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), conforme metodologia descrita por Florentino *et al* (2017). A concentração de AIA foi avaliada pelo método quantitativo colorimétrico (Gordon e Weber, 1951), durante a fase log de crescimento bacteriano, apresentando aproximadamente 10^8 UFC mL^{-1} . A estimativa da quantificação do AIA foi realizada com o auxílio de curva-padrão previamente obtida com o meio Dygs esterilizado e com as quantidades conhecidas de AIA (0, 25, 50, 75 e

100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A leitura de absorvância foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 535 nm.

Esse experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 19 x 2, sendo 19 estirpes bacterianas e presença ou ausência de triptofano (Trp) no meio de cultivo. A estirpe Ab-V5 foi utilizada como controle, devido à sua comprovada capacidade em produzir este fitormônio (Pedrinho et al., 2010).

Solubilização de Fosfato Natural *in vitro*

Neste experimento, além das 18 estirpes analisadas neste trabalho, foi utilizada também a estirpe Ab-V5, embora não tenha sido encontrado na literatura estudos sobre a capacidade de solubilizar P por esta bactéria.

As estirpes bacterianas foram cultivadas em placa de Petri contendo o meio FAM, por três dias, a 28°C. Posteriormente, colônias isoladas foram transferidas para frascos contendo meio FAM líquido e incubadas a 28°C por três dias. Após esse período, 15 μL da suspensão de cada estirpe bacteriana foram transferidos para 30 mL do meio líquido GL (glicose e extrato de levedura), com a seguinte composição (g L^{-1}): Glicose (10,0), extrato de levedura (0,5), fosfato natural reativo - Bayóvar (10,0), utilizado como fonte de fósforo (15,5% de P_2O_5 solúvel em Ácido Cítrico a 2%) e solução de micronutrientes (mL L^{-1}) e o pH final foi ajustado para 6,8. As estirpes foram incubadas por 7 dias a 28°C. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, sendo utilizados 19 tratamentos com quatro repetições.

Após esse período, o sobrenadante foi separado por centrifugação (10.000 rpm, 4°C e 10 min) e mensurou-se o valor do pH final em pHmetro. A concentração de P solúvel

foi analisada por espectrofotômetro (TEDESCO *et. al.*, 1995), no laboratório de solos da UNIFENAS.

Análises estatísticas

Os dados obtidos nos experimentos descritos anteriormente foram submetidos à análise de variância, e as médias das quatro repetições foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sisvar (FERREIRA, 2011).

Para o teste de solubilização de fosfato, foi realizada também a análise de correlação linear entre as concentrações de P e valor de pH para cada tratamento, em que se utilizou o programa AgroEstat – versão 1.0 (BARBOSA; MALDONADO JÚNIOR, 2011).

Resultados e Discussão

Crescimento em meios contendo diferentes concentrações salinas e valores de pH

As 18 estirpes isoladas de solos rizosféricos cultivados sob *B. brizantha* cv. Marandu apresentaram alta diversidade em relação à capacidade de crescer em diferentes concentrações de NaCl em meio FAM (Figura 1). De um modo geral, todas as estirpes de bactérias diazotróficas isoladas de solos rizosféricos cultivados sob *B. brizantha* apresentaram crescimento em todas as concentrações de NaCl testadas, destacando-se as estirpes UNIFENAS 100-52, 100-51; 100-60; 100-63 e 100-65, que cresceram nas três maiores concentrações salinas. A estirpe 100-69 apresentou menor crescimento quando comparada as demais, sendo observado crescimento somente no tratamento controle, contendo 1,71 mM de NaCl.

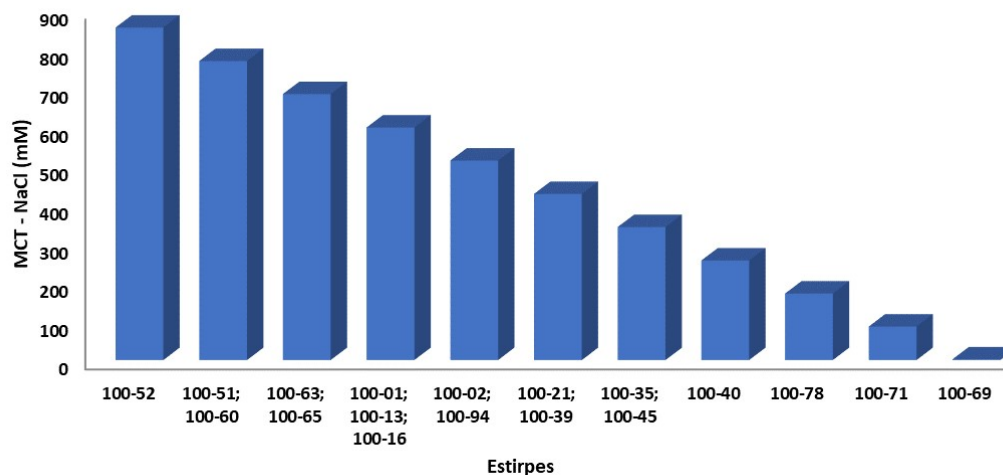


Figura 1. Máximas concentrações toleradas (MCT) de NaCl (mM) em meio FAM por estirpes de bactérias diazotróficas isoladas de solos rizosféricos sob *Brachiaria brizantha* cv. Marandu.

A maior produção de exopolissacarídeos (EPS) pela célula bacteriana é considerada um dos mecanismos que confere maior tolerância às estirpes, uma vez que os EPS conferem maior proteção celular e evita a perda d'água (EAGLESHAM et al., 1987; FREITAS et al., 2007; XAVIER et al., 2007). Analisando a produção de EPS das estirpes (tabela 1), observa-se que não foi possível estabelecer tal relação. O mesmo observa-se em estudos realizados por Nóbrega et al. (2004), nos quais não foi observado diferença entre as estirpes que produziam EPS (crescimento rápido) e aquelas de crescimento lento. De acordo com Santos et al. (2012), os microrganismos utilizam estratégias de osmoadação flexíveis o que lhes permite responder a flutuações de salinidade do meio exterior. Ainda segundo esses autores, bactérias isoladas da rizosfera apresentaram-se mais adaptadas a solos salinos quando comparadas a bactérias endofíticas.

Além dos EPS são citados ainda outros mecanismos responsáveis em proporcionar maior tolerância das bactérias às condições salinas, como o acúmulo de solutos

compatíveis, como a trealose (STREETER, 2003) e as alterações na composição da membrana celular (MEDEOT et al., 2007).

A alta diversidade das bactérias diazotróficas em relação à tolerância as diferentes concentrações salinas tem sido observada também por outros autores (ZERHARI et al., 2000; NÓBREGA et al., 2004; THRALL et al., 2009; FLORENTINO et al., 2010). A utilização de estirpes bacterianas tolerantes à salinidade pode garantir maior eficiência no processo simbiótico, nestas condições (SUBBARAO et al., 1990), justificando a importância desses estudos.

Já em relação aos diferentes valores de pH, foi verificado que todas as estirpes foram capazes de crescer em todos os valores de pH testados, concordando com os resultados obtidos por Florentino et al (2013), para estirpes de bactérias fixadoras de N₂ do gênero *Cupriavidus*, o que indica alta adaptabilidade destas bactérias no solo.

Produção de Ácido-3-indol acético (AIA)

Entre os benefícios da interação de bactérias com gramíneas forrageiras, destaca-se a síntese bacteriana de AIA (Figueredo et al., 2016). O AIA é um fitormônio que contribui para o crescimento vegetal, atuando diretamente no desenvolvimento radicular. Nesse trabalho, a maior produção dessa substância pela maioria das estirpes ocorreu quando cultivadas em meio contendo triptofano (Tabela 3), o que pode ser explicado pelo fato deste composto atuar como um importante precursor para a síntese de AIA. De acordo com Naveed et al., (2015), o L-triptofano pode promover um aumento na produtividade de Ácido indol acético pelas bactérias, uma vez que sua presença no meio de cultivo provoca um efeito estimulatório nas vias de ativação fisiológica, responsáveis pela assimilação desse aminoácido usado como precursor para biossíntese bacteriana de AIA.

Dessa forma, a produção de AIA pode ser dependente da concentração de triptofano utilizada no meio de cultivo (RADWAN et al. 2004; CHAGAS JR. et al. 2009; Florentino et al., 2017).

Nesse trabalho, a concentração de AIA produzida pelas bactérias foi similar aos resultados encontrados por outros autores (TSAVKELOVA et al. 2005; 2007). Das estirpes estudadas, destacam-se as estirpes UNIFENAS 100-63 e UNIFENAS 100-69, que produziram maior quantidade de AIA quando cultivadas em meio contendo Trp. Já a estirpe utilizada como controle, Ab-V5, os valores de AIA na presença de Trp estão de acordo com os encontrados por Pedrinho *et al* (2010). Machado et al., (2013), verificando a biossíntese de AIA por bactérias diazotróficas promotoras de crescimento em plantas em meio de cultura com e sem a presença de L-triptofano observaram que 90% das bactérias que produziram AIA na presença do aminoácido, também, foram capazes de produzir o ácido indol acético em sua ausência, porém em concentrações inferiores. O mesmo pode ser observado na tabela 3, onde as concentrações de AIA foram, de modo geral, superiores nos meios contendo triptofano.

O AIA, assim como outros fitormônios, estimula o crescimento de plantas apenas dentro de uma faixa estreita de concentração. Fora dessa faixa, concentrações mais baixas são ineficazes e as mais elevadas, são tóxicas (BISWAS et al., 2000). De um modo geral, os estudos mostram que as concentrações adequadas de AIA são variáveis de acordo com a espécie vegetal, encontrado valores na faixa entre 4,40 e 24,80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *Sesbania aculeata* e 4,40 e 14,36 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *Vigna radiata* (AHMAD et al., 2005). Nesse sentido, analisando os resultados da tabela 3, diversas estirpes apresentam potencial de contribuir para o desenvolvimento vegetal.

Tabela 2. Produção de ácido indol acético (AIA) pelas estirpes bacterianas em meio Dygs contendo ou não triptofano.

| Tratamentos | AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | |
|--|-------------------------------|-----------|
| | Triptofano | |
| | Com | Sem |
| UNIFENAS 100-01 | 7,30 F a | 6,14 D a |
| UNIFENAS 100-02 | 37,64 B a | 12,90 C b |
| UNIFENAS 100-13 | 8,32 F a | 8,91 C a |
| UNIFENAS 100-16 | 22,19 D a | 10,03 C b |
| UNIFENAS 100-21 | 12,89 E a | 11,89 C a |
| UNIFENAS 100-35 | 12,35 E a | 6,90 D b |
| UNIFENAS 100-39 | 13,86 E a | 5,66 D b |
| UNIFENAS 100-40 | 14,46 E a | 7,94 C b |
| UNIFENAS 100-45 | 6,19 F a | 7,05 C a |
| UNIFENAS 100-51 | 7,60 F a | 7,02 C a |
| UNIFENAS 100-52 | 13,06 E a | 12,04 C a |
| UNIFENAS 100-60 | 16,27 D a | 3,66 D b |
| UNIFENAS 100-63 | 45,16 A a | 33,29 A b |
| UNIFENAS 100-65 | 35,36 B a | 22,79 B b |
| UNIFENAS 100-69 | 49,67 A a | 37,04 A b |
| UNIFENAS 100-71 | 15,23 E a | 3,99 D b |
| UNIFENAS 100-78 | 5,85 F a | 2,39 D b |
| UNIFENAS 100-94 | 27,43 C a | 3,88 D b |
| Ab-V5 – <i>Azospirillum brasilense</i> | 49,03 A a | 22,05 B b |

⁽¹⁾Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Solubilização de Fosfato Natural *in vitro*

Na solubilização de fosfato natural reativo em meio de cultura, foi observado que os teores de P (g L^{-1}), presentes no meio GL após a inoculação, foram superiores ao tratamento controle, exceto o tratamento inoculado com a estirpe Ab-V5, da espécie *Azospirillum brasilense*. Observa-se, ainda, que as estirpes diferiram entre si, na capacidade de solubilização do fosfato (tabela 4).

Entre as estirpes testadas, a UNIFENAS 100-52 obteve melhor resultado quando comparada as demais e ao tratamento controle, seguida pelas estirpes BR 2003 e UNIFENAS 100-51 que foram estatisticamente semelhantes entre si.

Das estirpes testadas, a única estirpe que não proporcionou aumento de P no meio foi a Ab-V5-*Azospirillum brasilense*, em que o resultado foi igual ao tratamento controle.

Estudos evidenciam que a capacidade das estirpes em solubilizar o fosfato está correlacionada com a diminuição do pH do meio, devido à síntese de ácidos orgânicos (MIKANOVÁ; NOVÁKOVÁ, 2002; HARA; OLIVEIRA, 2005). Os ácidos orgânicos secretados podem dissolver o fosfato mineral como resultado da troca de anions PO_4^{3-} ou podem quelatizar íons de $\text{Fe}^{2+/3+}$ e Al^{3+} associados com fosfatos.

Pode-se observar que as estirpes que solubilizaram quantidades significativas de P apresentaram maior acidificação do meio na tabela 04, o que é confirmado pela análise de correlação entre o pH e o teor de P na figura 02. Vários fatores podem ter afetado essa relação entre eles, como as quantidades de P imobilizadas pelos microrganismos durante o crescimento e o tipo de fosfato.

Todas as estirpes, exceto Ab-V5, diminuíram o pH do meio durante o cultivo. As menores alterações ocorreram com as estirpes: UNIFENAS 100-94, UNIFENAS 100-16 e BR 29, que, estatisticamente, não diferiram entre si.

Os menores valores de pH foram obtidos pelas estirpes UNIFENAS 100-13, UNIFENAS 100-52, UNIFENAS 100-1, UNIFENAS 100-39 e BR 2003.

Resultados semelhantes foram obtidos por Filho, Narloch e Scharf (2002) e por Abreu *et al.* (2014), que verificaram que o potencial de solubilização variou entre as estirpes.

Tabela 3. Solubilização de fosfato in vitro em (g L⁻¹)

| Tratamentos | P (g L ⁻¹) | pH |
|------------------------------|------------------------|--------|
| Controle | 0,36 k | 6,72 b |
| Estirpes da coleção Unifenas | | |
| UNIFENAS 100-01 | 6,58f | 3,37 i |
| UNIFENAS 100-02 | 6,27 f | 4,93 e |
| UNIFENAS 100-13 | 5,95 f | 3,52 i |
| UNIFENAS 100-16 | 1,97 i | 6,18 c |
| UNIFENAS 100-21 | 4,62g | 5,42 d |
| UNIFENAS 100-35 | 5,67 f | 4,12 g |
| UNIFENAS 100-39 | 8,20 d | 3,28 i |
| UNIFENAS 100-40 | 10,30 c | 4,29 g |
| UNIFENAS 100-45 | 7,57 e | 4,44f |
| UNIFENAS 100-51 | 11,60 b | 3,71 h |
| UNIFENAS 100-52 | 13,30 a | 3,43 i |
| UNIFENAS 100-60 | 5,72 f | 4,70 f |
| UNIFENAS 100-65 | 2,30 i | 5,34 d |
| UNIFENAS 100-63 | 2,90 h | 4,16 g |
| UNIFENAS 100-69 | 7,62 e | 4,22 g |

| | | |
|--|---------|--------|
| UNIFENAS 100-71 | 8,37 d | 3,75 h |
| UNIFENAS 100-78 | 10,45 c | 3,88 h |
| UNIFENAS 100-94 | 1,25 j | 6,19 c |
| Estirpes da coleção Embrapa | | |
| Ab-V5 – <i>Azospirillum brasilense</i> | 0,62 k | 7,03 a |
| BR 322 – <i>Rhizobium tropici</i> | 1,92 i | 5,65 d |
| BR 8802 – <i>Rhizobium</i> sp. | 2,95 h | 4,66 f |
| BR 29 – <i>Bradyrhizobium elkanii</i> | 1,37 j | 5,98 c |
| BR2003 – <i>Bradyrhizobium elkanii</i> | 11,95 b | 3,22 i |

* Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

A figura 01 apresenta a correlação entre o valor de pH e P solúvel, uma relação inversamente proporcional, em que os valores de P solúvel crescem a medida que os valores de pH decrescem.

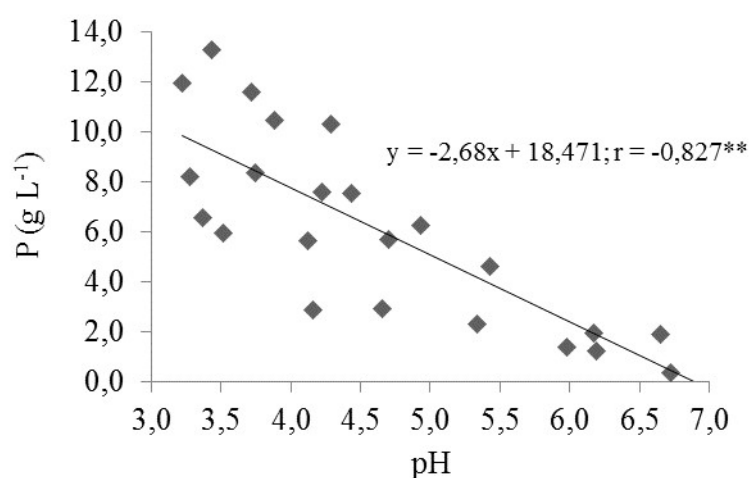


Figura 2. Correlação entre o valor de pH e P solúvel

Conclusão

Foi verificado que as estirpes de bactérias diazotróficas isoladas de solos rizosféricos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu apresentam comportamentos distintos em relação à capacidade de tolerar altas concentrações salinas e além de serem capazes de produzir ácido 3-indol acético (AIA) e solubilizar fosfato. Sendo a estirpe 100-52 aquela que apresentou melhor resposta nos testes de tolerância à salinidade e à solubilização de P, e em relação à produção de AIA, recomenda-se a utilização das estirpes UNIFENAS 100-63 e 100-69 que apresentaram maiores valores de produção.

Todas as estirpes foram capazes de crescer, nos diferentes valores de pH testados.

Agradecimentos

À Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa CAPES/PROSUP.

Referências

- ABREU, C.S DE; MARRIEL, I, E; OLIVEIRA, C. A DE et al. Biossolubilização de fósforo por bactérias endofíticas de milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 30., 2014, Salvador. **Anais...** Salvador, 2014. 4 p.
- AHMAD, F. et.al. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of Azotobacter and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. **Turkish Journal of Biology**, v.29, n.1, p.29-34, 2005
- BARBOSA, J. C.; MALDONADO JR., W. **AgroEstat** : sistema de Análises Estatísticas de Ensaio Agrônomicos. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, 2011.
- BISWAS, J.C. et al. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, Madison, v.92, n.5, p.880-886, 2000.

BOSA, C.K. et al. Características produtivas e nutricionais do capim-xaraés inoculado com bactérias diazotróficas associativas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** [online]. 2016, vol.68, n.5, pp.1360-1368. ISSN 1678-4162. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-8290>

BRASIL, M.S.; BALDANI, J.S.; BALDANI, V.L.D. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal sul-matogrossense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n.2, p.179-190, 2005.

CHAGAS JÚNIOR, A.F.; OLIVEIRA, L.A. E OLIVEIRA, A.N. (2009) - Produção de ácido indolacético por rizóbios isolados de caupi. **Revista Ceres**, v. 56, n. 6, p. 812-817.

CHAVES, V.A; SANTOS, S.G; SCHULTZ, N. et al. Desenvolvimento Inicial de Duas Variedades de Cana-de-Açúcar Inoculadas com Bactérias Diazotróficas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo [on line]** 2015. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180243243008>> Acesso em: 26 setembro. 2017

DIAS, M. DE S. **Diversidade e potencial de utilização de bactérias fixadoras de N₂ em Brachiariabrizantha.** 2015. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência animal- Universidade José do Rosário Vellano, 2015.

EAGLESHAM, A.R.J.; STOWERS, M.D.; MAINA, M.L et al. Physiological and biochemical aspects of diversity of Bradyrhizobium sp. (Vigna) from three West African soils. **Soil Biol. Biochem.**, v.19, p.575-581, 1987.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência & Agrotecnologia**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FILHO, G. N. S.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de Pinus e Eucalyptus de Santa Catarina. **Pesq. agropec. bras.**, v. 37, n.6, p. 847-854, 2002

FREITAS, A.D.S.; SAMPAIO, E.; SANTOS, C. et al. Fixação biológica de nitrogênio no Semiárido Brasileiro. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 8, n.1, p. 585-597, 2015.

GEREMIAS, E. V.; SEGAT, J. C.; FACHINI, I. A. et al. Fauna edáfica em pastagem perene sob diferentes fontes de nutrientes. **Revista Scientia Agraria**, v.16, n.4, p.17-30, 2015.

GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indole-acetic acid. **Plant Physiology**, v.26, n.3, p.192-197, 1951.

GUIMARÃES, S. L.; BOMFIM-SILVA, E. M.; POLIZEL, A. C. et al. Produção de capim-marandu inoculado com *Azospirillum* spp. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, v.7, n.13, p. 819-825, 2011.

HAMEED, S.; YASMIN, S.; MALIK, K. A. et al. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strain isolated from cultivated legumes. **Biology and Fertility of Soils**, v. 39, n. 3, p. 179-185, 2004.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n.7, p. 667-672, 2004.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, ZA. Screening plant growthpromoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.473-480, 2004.

LOURENTE, E.R.P.; SILVA, R.F. da; SILVA, D.A. da et al. Macrofauna edáfica e sua interação com atributos químicos e físicos do solo sob diferentes sistemas de manejo. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.29, p.17-22, 2007.

FORENTINO, L.A et. al. Diversity and efficiency of Bradyrhizobium strains isolated from soil samples collected from around. *Sesbania virgata* roots using cowpeas as species. **Revista Brasileira Ciência Solo**, v.34, n.4, p. 1113-1123, 2010.

MAGALHÃES, F.M.M.; DÖBEREINER, J. Occurrence of *Azospirillum* amazonense in some Amazonian (Brazil) ecosystems. **Revista de Microbiologia**, v. 15, p. 246-252, 1984.

MATSUDA, A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n.3, p. 343-355, 2002

MEDEOT, D.B.; BUENO, M.A.; DARDANELLI, M.S. et al. Adaptational changes in lipids of *Bradyrhizobium SEMIA 6144* nodulating peanut as a response to growth temperature and salinity. **Curr. Microbiol.**, v.54, p.31-35, 2007.

MELONI DA, G. M.R. ; MARTÍNEZ C.A. Salinity tolerance in *Schinopsis quebracho colorado*: seed germination, growth, ion relations and metabolic responses. **J. Arid Environ.** , v. 72, p.1785-1792, 2008.

MIKANOVÁ, O.; NOVÁKOVÁ, J. Evaluation of the P-solubilizing activity of soil microorganisms and its sensitivity to soluble phosphate. **Rostlinná Výroba**, v. 48, n.9, p. 397-400, 2002.

MOREIRA, F.M.S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R.S.A et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n.2, p. 74-99, 2010.

MOSCHETTI, G.; PELUSOA, A.; PROTOPAPA, A.; et al. Use of nodulation pattern, stress tolerance, nodC gene amplification, RAPD-PCR and RFLP-16S rDNA analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. **Syst. Appl Microbiol.**, v.28, p.619-631, 2005.

NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. et al. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, n.2, p. 269-279, 2004.

NUNES et al. Caracterização da fauna edáfica em sistemas de manejo para produção de forragens no Estado do Piauí. *Rev. Cienc. Agron.*, v. 43, n.1, p.30-37, 2012

OLIVEIRA IA, et al . Use of Scaled Semivariograms in the Planning Sample of Soil Physical Properties in Southern Amazonas, Brazil. *R Bras Ci Solo*, v.39, p.31-39, 2015.

PEDRINHO, E.A.N.; GALDIANO JÚNIOR, R.F.; CAMPANHARO, J.C. et al. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. *Bragantia*, v.69, p.905-911, 2010

RADWAN T EL-S EL-D; MOHAMED ZK; REIS VM. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* v.39, n.10, p. 987-994,2004.

REIS, V.M.; et. al
Burkholderia tropica sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, n. 6, 2004, p. 2155-2162, 2004.

RODRIGUES, MARIA JUCINEIDE AGUIAR et al. Fauna edáfica em pastagens de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em sistema silvipastoril com coqueiros. *Cadernos de Agroecologia*, [S.l.], v. 11, n. 2, jan. 2017. ISSN 2236-7934. Disponível em: <<http://aba-agroecologia.org.br/revistas/index.php/cad/article/view/20991>>. Acesso em: 25 set. 2017.

SOTTERO, A.N. et al. Rizobactérias e alfaca: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.30, n.2, p.225-234, 2006.

STREETER, J. G effect ,of survival of *Bradyrhizobim japonicum* ducing. Desiccotion. *Jornal of Applied Microbiology*, v.95, p.484-491, 2003.

STEWART, W.M.; HAMMOND, L.L.; VAN KAUWENBERGH, S.J. Phosphorus as a natural resource. In: **Phosphorus: agriculture and the environment**. Madison: ASA-CSSA-SSSS, 2005.

TSAVKELOVA, E.A.; KLIMOVA, S.Y.; CHERDYNTSEVA, T.A et al. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.42, n.2, p.117–126, 2006.

TRANNIN, I. C. B.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. et al. Tolerância de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* a zinco, cádmio e cobre *in vitro*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, n. 25, p. 305-316, 2001.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A. et al. Análises de solo, plantas e outros materiais. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 174p. (Boletim Técnico, 5)

URQUIAGA, S. ; XAVIER , R.; MORAIS, R. F. et al. Evidence From field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data of the contribution of biological N₂fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant Soil**, v.356, p.5-21, 2012.

VEZZANI, F.M. ; MIELNICZUK, J. Uma visão sobre qualidade do solo. **R. Bras. Ci. Solo**, v.33, p.743-755, 2009.

VITORAZI FILHO, J. A.; LIMA, K. B.; FREITAS, M. S. M. et al. Growth of sweet passion fruit seedlings inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria under different levels of phosphorus. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.34, n.2, 442-450, 2012.

XAVIER, G.R.; MARTINS, L.M.; RUMJANEK, N.G. et al. Tolerância de rizóbio de feijão-caupi à salinidade e temperatura em condições *in vitro*. **Caatinga**, Mossoró, v.20, n.4, p.01-09, 2007/2009.

WAKELIN, S. A. et al. Phosphatesolubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. **BiolFertil Soils**, v. 40, p. 36–43, 2004.

WEI, G.H.; ZHANG, Z.X.; CHEN, C. et al. Phenotypic and genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of the legume genera *Astragalus*, *Lespedeza* and *Hedysarum* in northwestern China. **Microbiol. Res.**, v. 163, p.651-662, 2008

ZERHARI, K.; AURAG, J.; KHBAYA, B. et al. Phenotypic characteristics of rhizobia isolates nodulating *Acacia* species in the arid and Saharan regions of Morocco. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.30, p.351-357, 2000.

SUBBARAO et al. **Advances in Agronomy**, v.63, p. 1-357, 2000.