

BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIATIVAS DE RAÍZES E SOLO RIZOSFÉRICO DE ALPINIA

Alexandre José de Oliveira¹
Ana Beatriz Carvalho Terra²
Matheus Wendling Martins³
Ligiane Aparecida Florentino⁴
Paulo Roberto Correa Landgraf⁵

1

Sistemas de produção sustentável (Agricultura Orgânica, Permacultura, Biodinâmica, Agroecologia)

Resumo

Alpínia é uma planta ornamental que para seu desenvolvimento é feita adubação com NPK. A conversão de nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3), é realizado pela enzima nitrogenase, a forma de N que os vegetais conseguem utilizar para atender a demanda deste macronutriente. Objetivou-se com este trabalho isolar e caracterizar bactérias diazotróficas associativas de raízes e solo rizosférico de *Alpinia purpurata*. As bactérias diazotróficas associativas foram isoladas de amostras, raízes e solo rizosférico, de *Alpinia purpurata* situadas no setor de floricultura da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), em Alfenas-MG. O isolamento das bactérias diazotróficas foi realizado por meio da inoculação das amostras de solo e raízes em frascos contendo meios de cultura semissólidos e semi-seletivos: NFb, JNFb, LGI, JMV e FAM. Para o isolamento e purificação das estirpes bacterianas, as colônias dos meios semi-sólidos foram transferidas para o meio sólido YMA até obtenção de colônias isoladas. As colônias isoladas, foram inoculadas nos meios semi-sólidos de origem, para confirmação da capacidade de fixação de N_2 , evidenciada pela formação da película. O desenho experimental foi em DIC, delineamento inteiramente casualizado. Os isolados que apresentaram a capacidade de fixar N_2 , foram caracterizados morfológicamente. Foram isoladas 25 bactérias, sendo 23 bactérias provenientes das amostras de solo e 2 provenientes das amostras de raízes. As bactérias diazotróficas associativas habitam normalmente as raízes e solo rizosférico de *Alpinia purpurata*

Palavras-chave: *Alpinia purpurata*; Diversidade microbiana; Microbiologia do solo.

INTRODUÇÃO

O processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), apresenta importância econômica e ambiental. Essa conversão de N atmosférico (N_2) ocorre por meio da ação da enzima nitrogenase, enzima capaz de reduzir o N_2 , forma indisponível à maioria dos seres

¹ Doutorando: Alexandre José de Oliveira – UNIFENAS- Alfenas -MG, Departamento de agrárias. alexandreburns@gmail.com

vivos, à amônia (NH_3), forma de N que os vegetais conseguem utilizar para atender a demanda deste macronutriente (DOBEREINER, 1990). A inoculação desses microrganismos tem contribuído para a substituição parcial ou total do N no cultivo de milho (BREDA, ALVES e REIS, 2016), trigo (MUMBACH et al., 2017), arroz (BEUTLER et al., 2016) e a cana-de-açúcar (DONATO et al., 2004), contribuindo para uma produção mais sustentável, visto que a FBN é considerada uma medida mitigadora para emissão do óxido nitroso (N_2O), um dos gases do efeito estufa (XAVIER et al., 2017). O potencial da inoculação de bactérias diazotróficas em plantas ornamentais e flores de corte ainda não é bem descrito, pois são escassos os trabalhos envolvendo a fixação biológica do N na floricultura.

Alpinia purpurata (alpínia) é uma planta ornamental, monocotiledônea pertencente à família *Zingiberaceae*. Para um bom desenvolvimento desse vegetal a adubação é feita de três em três meses adicionando NPK. O custo elevado desses insumos agrícolas pode ser um fator limitante da produção, além destes serem contaminantes dos solos e lençóis freáticos. Buscando formas sustentáveis de se cultivar alpínia, o uso de bactérias diazotróficas podem ser benéficos para uma produção de qualidade. Objetivou-se com este trabalho isolar e caracterizar bactérias diazotróficas associativas de raízes e solos rizosférico de *Alpinia purpurata*.

METODOLOGIA

As bactérias diazotróficas associativas foram isoladas de raízes e solo rizosférico, de *Alpinia purpurata* cultivadas no setor de floricultura da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas-MG, localizada geograficamente a 21° 25' 46" Sul e 45° 56' 50" Oeste, a 880 metros de altitude.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições apresentando 4 unidades experimentais. Cada planta foi considerada uma unidade experimental e foram utilizadas oito amostras compostas (quatro de raízes e quatro de solo). O solo foi classificado como Latossolo Vermelho Distrófico (EMBRAPA, 2013). Uma amostra composta foi constituída de quatro amostras simples, que foram coletadas à 10 cm do caule da planta, na profundidade de 0-20 cm. O material coletado (solo e raízes)

foi conduzido ao Laboratório de Microbiologia do Solo da UNIFENAS.

O isolamento das bactérias diazotróficas foi realizado por meio da inoculação das amostras de solo e raiz em frascos contendo meios de cultura semissólidos e semi-seletivos: NFb (*Azospirillum* spp.), JNFb (*Herbaspirillum* spp.) e LGI (*A. amazonense*) (DÖBEREINER et al., 1995); JMV (*Burkholderia* spp.) (REIS et al., 2004) e FAM (*A. amazonense*) (MAGALHÃES e DÖBEREINER, 1984). As amostras de raiz, contendo cerca de 2 mm, foram superficialmente desinfestadas em hipoclorito de sódio (1 % v/v) durante 2 minutos e posteriormente lavadas por sucessivas vezes em água destilada e autoclavada, de acordo com a metodologia proposta por Diniz et al. (2010). As amostras de solo, cerca de 100 mg, foram inoculadas diretamente aos meios. Os frascos contendo os meios foram incubados por 12 dias segundo metodologia de Diniz et al., 2010, quando foi avaliado o crescimento das bactérias diazotróficas, caracterizado pelo surgimento de película aerotóxica na superfície do meio.

Para o isolamento e purificação das estirpes bacterianas, as colônias dos meios semi-sólidos foram transferidas para o meio sólido YMA até obtenção de colônias isoladas. As colônias isoladas, foram inoculadas nos meios semi-sólidos de origem, para confirmação da capacidade de fixação de N₂, evidenciada pela formação da película. Os isolados que apresentaram a capacidade de fixar N₂, foram caracterizados morfológicamente de acordo com Pires et al. (2008) e receberam a codificação UNIFENAS seguidos de números para sua identificação e conservação na coleção de bactérias diazotróficas.

As características morfológicas das bactérias diazotróficas encontradas foram agrupadas em um dendrograma a 80% de similaridade, utilizando o programa estatístico R.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas 25 bactérias, sendo 23 bactérias provenientes das amostras de solo e 2 provenientes das amostras de raízes. Esses resultados corroboram com a ampla distribuição das bactérias diazotróficas associativas, encontrada por Andrade et al (2013) em seu trabalho de isolamento de bactérias diazotróficas de *Epidentrum secundum*. Isto se

deve a capacidade das bactérias diazotróficas habitarem tanto as estruturas vegetais (simbiose) quanto a rizosfera.

Em todos os meios de cultura houve crescimento bacteriano, sendo o meio NFb (*Azospirillum spp.*) (Döbereiner et al., 1995) o meio com o maior número, 16 isolados, seguido pelo meio JMV (*Burkholderia spp.*) (Reis et al., 2004), quatro isolados, que por sua vez seguido pelos meios JNFb (*Herbaspirillum spp.*) e LGI (*A. amazonense*) (Döbereiner et al., 1995) com dois isolados cada e o meio FAM (*A. amazonense*) (Magalhães & Döbereiner, 1984). Resultados semelhantes foram encontrados por Silveira et al (2013) ao isolar bactérias diazotróficas de *Dendrobium nobile*, orquídea olhos de boneca, onde houve crescimento bacterianos nos cinco diferentes meios. O crescimento de microrganismos em todos os meios de cultura é resultado da diversidade de bactérias diazotróficas que podem ser encontradas nos solos e órgãos vegetais.

As bactérias diazotróficas encontradas formaram quatro grupos distintos quando represe

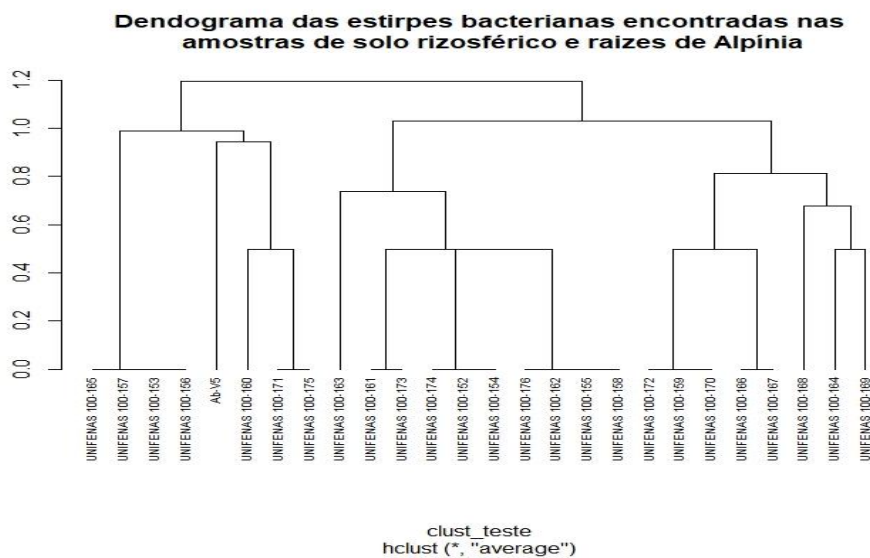


Figura 1. Dendrograma das características morfológicas das estirpes oriundas de solo rizosférico e raízes de *Alpinia purpurata*.

CONCLUSÕES

As amostras de raízes e solo rizosférico de *Alpinia purpurata* apresentaram um número

significativo de estirpes bacterianas (25 estirpes) , sendo a maioria delas oriundas do solo rizosférico, isso comprova que bactérias diazotróficas podem estar associadas com *Alpinia purpurata*, esta associação demonstra um potencial para a produção de inoculantes que beneficiam a produção de plantas ornamentais.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, G. V. S.; SILVEIRA, K. C.; SIMÕES, M. P.; GONTIJO, J. B.; BALDOTTO, M. A.; BALDOTTO, L. E. B. Quantificação de bactérias diazotróficas associadas às raízes e folhas de *Epidendrum secundum*. XXXIV Congresso Brasileiro de Ciências do Solo 2013.
- BEUTLER, A N. M., RAMÃO, J. D., GALON, C. J., DIAS, L., POZZEBON N. P., CANABARRO, B., RODRIGUES, L. A. T., MUNARETO, G. S., GIACOMELI, R., & RAMOS, P. V. Propriedades físicas do solo e produtividade de arroz irrigado em diferentes sistemas de manejo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. Vol.36, n. 5, p. 1601-1607. 2012.
- BREDA, F. D. F., ALVES, G. C., & REIS, V. M. Produtividade de milho na presença de doses de N e de inoculação de *Herbaspirillum seropedicae*. *Pesq. agropec. bras.* [online]. Vol. 51, n. 1, p. 45-52. 2016.
- DINIZ, P. F. A., OLIVEIRA, L. E. M., LOPES, N. A., FLORENTINO, L. A., CARVALHO, T. S., MOREIRA, F. M. S. Bactérias diazotróficas em solos sob seringueira. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. Vol.36, p. 1426-1433. 2010.
- DONATO, V.M.T.S., ANDRADE, A.G. de, SOUZA, E.S. de, FRANÇA, J.G.E., MACIEL, G.A. Atividade enzimática em variedades de cana-de-açúcar cultivadas in vitro sob diferentes níveis de nitrogênio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Vol. 39, p.1087-1093. 2004.
- EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. 3. ed. Brasília: Embrapa. pp.353. 2013.
- MAGALHÃES, F.M.M. & DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. *R. Microbiol.* Vol.15, p.246-252, 1984.
- MUMBACH, G. L., KOTOWSKI, I. E., SCHNEIDER, F. J. A., MALLMANN, M. S., BONFADA, E. B., PORTELA, V. O., KAISER, D. R. Resposta da inoculação com *Azospirillum brasilense* nas culturas de trigo e de milho safrinha. *Scientia Agraria*. Vol. 18, n. 2, p. 97-103. 2017.
- PIRES, I. C., FREIRE, N. B., FERNANDES, A. W. C., SOUZA, R. F. S., SILVA JUNIOR, F. A. G., OLIVEIRA, H. P., & COSTA, M. M. Influência do polipirrol e dos níveis de salinidade na formação de biofilme em *Aeromonas* spp.. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. Vol. 38, n. 8, p.1528-1536. 2018.
- REIS, V. M., ESTRADA-DE LOS SANTOS, P., TENORIO-SALGADO, S., VOGEL, J., STOFFELS, M., GUYON, S., BALANDREAU, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 54, n. 6, p. 2155-2162. 2004.
- SILVEIRA, K. C.; GONTIJO, J. B.; ANDRADE, G. V. S.; OLIVEIRA, F. M.; BALDOTO, M. A.; BALDOTO, L. E. B. Quantificação de bactérias diazotróficas associativas às folhas e raízes de *Dendrobium nobile*. XXXIV Congresso Brasileiro de Ciências do Solo. 2013.
- XAVIER, G. R.; ZILLI, J. E.; MARTINS, L. M.; RUMJANEK, N. G.; ALCANTARA, R. M. C. M. de. *Fixação Biológica de Nitrogênio*. Embrapa, 2017.