

OCORRÊNCIA E ATIVIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM FORRA- GEIRAS CULTIVADAS NA REGIÃO SEMIÁRIDA NO BRASIL

MÁRCIA CARNEIRO MONTEIRO DOS SANTOS¹, DIÉRCULES RODRIGUES DOS SANTOS², OLAF ANDREAS
BAKKE³; IVONETE ALVES BAKKE⁴

RESUMO - Bactérias diazotróficas não simbióticas (BDNS) desempenham papel relevante para a economia de fertilizantes nitrogenados em forrageiras e conservação ambiental. Com o objetivo de avaliar a ocorrência de bactérias diazotróficas nativas associadas a forrageiras em duas épocas distintas e identificar isolados com potencial para fixar N₂ em região semiárida. Foi conduzido no Laboratório de Solo do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, Paraíba. Foram utilizadas amostras de raízes de três gramíneas forrageiras: capim Andropogon (*Andropogon gayanus* Kunth), capim Tanzânia (*Panicum maximum* Jacq.cv. Tanzânia) capim Buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) em cultivo a campo. As bactérias foram isoladas, em meios de enriquecimento semi-sólido NFB sem nitrogênio, específico para *Azospirillum* spp. As populações de bactérias foram quantificadas, caracterizadas fenotípicamente e purificadas. A partir de isolados caracterizados avaliaram-se seus potenciais para fixação do N₂ pela atividade da enzima nitrogenase *in vitro*. Os resultados mostraram bactérias diazotróficas crescendo nas três forrageiras avaliadas. A ocorrência das bactérias é influenciada pelo genótipo da planta e pelas estações do ano. Observou-se maior diversidade de BDNS do gênero *Azospirillum* associadas às raízes das forrageiras no período mais seco do ano. As bactérias isoladas apresentam potencial de utilização em novos estudos, visando à caracterização genética e avaliação do potencial de inóculo dos isolados para fixação biológica do nitrogênio (FBN) em forrageiras em áreas da região semiárida.

Palavras-chave: Bactérias associativas. BDNS. Atividade da nitrogenase. Fixação biológica do nitrogênio.

OCORRENCE AND ATIVITY DIAZOTROPHIC BACTERIA NOT SIMBIOTIC IN GRASSES FOR- AGE CULTIVAED IN THE SEMIARID IN BRAZIL

ABSTRACT - Diazotrophic bacteria play important role on economy nitrogen fertilizer in forage glasses and environmental sustainability. With the objective of evaluate the occurrence of diazotrophic bacteria associated associated with native forage at two different times and identify isolates with potential for fixing N₂ in the semiarid region. Was conducted in the Soil Laboratory of the Centro de Saúde e Tecnologia Rural in Federal University of Campina Grande, Campus de Patos, Paraíba. A study was carried out at the Soil Laboratory of the Centro de Saúde e Tecnologia Rural of the Federal University of Campina Grande, in Patos, Paraíba. The objective this study was to verify in the native diazotrophic endophytic bacteria associated with forage glasses and to identify isolates in NBF hability, during the rainy and dry seasons in semiarid region. Root samples of three forage grasses [*Andropogon gayanus* Kunth (Andropogon), *Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzania (Tanzânia) and *Cenchrus ciliaris* L. (Buffel)] cultivated in the field experiment was utilized. The bacteria were isolated in NFB culture media free-N specific for *Azospirillum* spp., the isolates was quantified, phenotypically characterized, purified. From characterized after, was evaluated for their nitrogenase activity *in vitro*. The results show diazotrophics bacteria growth in the three forage grasses tested. The occurancy diazotrophics bacteria be influenced by genotypic plant and seasonal variation. A more density of NSDB of the genus *Azospirillum* associated in the root grasses were obtained in dry season. The NSDB isolates, show a high potencial for new studies on the genetic characteristics and avaliation the inoculo potential to (BNF) associated on grasses in semi-arid region.

Keywords: Associativy bacteria. NSDB. Nitrogenase activity. Biological nitrogen fixation.

^{*} Autor para correspondência.

Recebido para publicação em .18/04/2012; aceito em 01/12/2012.

¹Mestrando de Zootecnia, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, UFCG, Patos, PB, e-mail: marciac.m_@hotmail.com

²Professor Doutor, Depto. de Engenharia Floresta, UAEF, UFCG, Patos, PB, e-mail: santos@cstr.ufcg.edu.br

³Professor Doutor, Depto. de Engenharia Floresta, UAEF, UFCG, Patos, PB, e-mail: obakke@cstr.ufcg.edu.br

⁴Professora Doutora, Depto. de Engenharia Floresta, UAEF, UFCG, Patos, PB, e-mail: ivonetebakke@cstr.ufcg.edu.br

INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é considerado o nutriente mais importante para o crescimento de plantas. Na natureza este elemento é encontrado na forma de N_2 , que é inacessível aos vegetais. Sendo, para tal, necessário sua transformação.

Apenas uma pequena parcela de microrganismos procariotos possuem a enzima nitrogenase que é capaz de reduzir o N_2 para a forma inorgânica combinada NH_4 , tornando-os acessíveis as plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Os organismos com esse conteúdo enzimático são denominados diazotróficos. Sendo o processo de incorporação de N à biomassa chamado fixação biológica de nitrogênio (FBN).

A simbiose rizóbio-leguminosa situa-se entre os sistemas biológicos mais especializados e eficientes. São capazes de suprir 94% do N requerido pela cultura da soja (HUNGRIA et al., 2006). Por ser estratégica para a economia nacional, desperta grande interesse dos pesquisadores no Brasil. Por outro lado, atualmente, vem aumentando a expectativa na maximização do uso da FBN, para outras culturas, como gramíneas e cereais, que são culturas de grande importância sócio-econômica (SALA et al., 2005), especialmente nas regiões mais pobres do Mundo.

As associações entre bactérias diazotróficas em não leguminosas são geralmente denominadas de simbiose associativa ou fixação de N_2 associativa (BALDANI et al., 1992).

Então as bactérias diazotróficas não simbióticas (BDNS), assim denominadas por Kennedy et al. (2004) as mais estudadas são as pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia* que já foram isolados em plantas de arroz (RODRIGUES et al., 2006), milho (PERIN et al., 2006), cana-de-açúcar (REIS JUNIOR et al., 2004). Outros estudos consideram bactérias do gênero *Azospirillum* com diazotrófica facultativas, capazes de colonizar plantas não leguminosas interna e externamente (BALDANI et al., 1997). Essas bactérias desempenham importante papel na nutrição das gramíneas e são as principais responsáveis pela fixação biológica do N_2 em gramíneas forrageiras (REIS JUNIOR et al., 2004).

As BDNS desempenham papel importante na sustentabilidade dos ecossistemas, pois são capazes de incorporar N_2 por meio da FBN, podendo ainda produzir substâncias reguladoras do crescimento vegetal (DOBBLAERE et al., 2003), como auxinas, giberilinas e citocininas que contribuem para a melhoria nutricional e utilização de água pela planta (BAZZICALUPO; OKUM, 2000; KUSS et al., 2007).

A ocorrência e a atividade de bactérias diazotróficas no solo e na planta podem ser fortemente influenciadas por estresses físicos (baixa umidade e alta temperatura) (BRASIL et al., 2005), químicos

(acidez e baixos teores de nutrientes) e biológicos (bactéria, espécie vegetal não hospedeira) (HAN; NEW, 1998; BALDANI et al., 1999; REIS JUNIOR et al., 2000; REIS JUNIOR, 2000).

O Município de Patos na Paraíba, caracterizada pelo clima semi-árido apresenta vocação pecuária. Tem grande parte de suas terras mais nobres cultivadas com bancos de gramíneas africanas. Destacam-se nessa região o cultivo dos capins *Andropogon*, *Tanzânia* e *Buffel*, por serem mais rústicos e produtivos do que os nativos (MOREIRA et al., 2006). Caracteriza-se também, por ser um ecossistema com baixo índice pluviométrico geralmente pobre em N e C. O estudo das BDNS nativas nessas condições é importante para a melhoria da incorporação do N ao solo e melhor aproveitamento de água pela planta. Essas informações, serão uma ótima ferramenta para melhoria do manejo destas pastagens, com benefícios econômicos e ambientais para as populações nessa região.

Este trabalho teve o objetivo de avaliar a ocorrência de bactérias diazotróficas nativas associadas a forrageiras em duas épocas distintas e identificar isolados com potencial para fixar N_2 em região semiárida.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Centro de Saúde e Tecnologia Rural na Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, situado na microregião de Patos no semi-árido paraibano, com coordenadas geográficas $07^{\circ} 04' 32''$ S e $37^{\circ} 16' 26''$ W e altitude 282 m. O solo da área é predominantemente Luvissoilo Crômico Órtico típico (EMBRAPA, 1999). Os dados pluviométricos e temperatura durante o período de estudo estão apresentados na figura 1.

Foram utilizadas três espécies de plantas forrageiras da família Poaceae, também conhecidas como gramíneas. Foram selecionadas: o capim *Andropogon* (*Andropogon gayanus* Kunth), o capim *Tanzânia* (*Panicum maximum* Jacq.cv. tanzânia) e o capim *Buffel* (*Cenchrus ciliaris* L.), cultivadas na região semiárida sem adubação.

As amostras de raízes de três espécies forrageiras, esabelecidas a campo experimental, foram coletadas aleatoriamente, em dois períodos distintos do ano e em triplicata. As coletas foram feitas nas estações normalmente peculiares da região semiárida: época das chuvas (março) e da seca (agosto) no ano de 2008.

Imediatamente após a coleta e acondicionamento em sacos plásticos as amostras de raízes das três forrageiras foram encaminhadas e analisadas no Laboratório de Solos da Unidade Acadêmica de Engenharia Florestal da UFCG, Campus de Patos (PB).

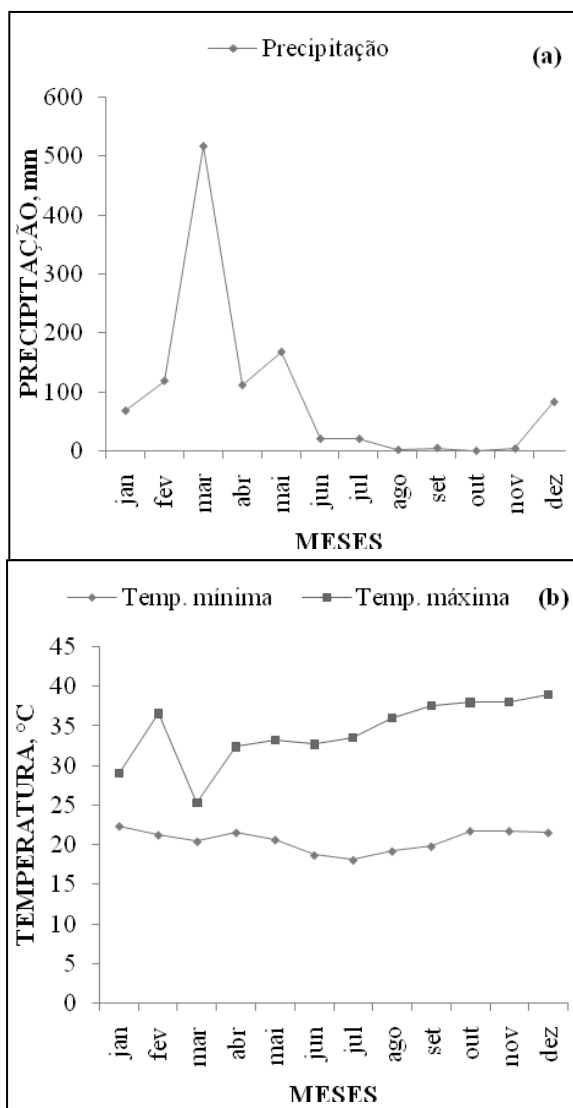


Figura 1. Distribuição de chuvas e temperaturas durante o período experimental. (Fonte: INMET/UFCG, 2008)

Para avaliação da população de BDNS foram utilizadas subamostras retiradas das amostras de raízes de cada espécie de forrageira. Parte das raízes foi lavada com água destilada (RL) e outra parte foi desinfestada superficialmente (RDS) com solução de hipoclorito de sódio (2%) por cinco minutos, para quantificação das populações na superfície e no interior da raiz, respectivamente.

O método utilizado para contagem dessas bactérias foi o Número Mais Provável (NMP), conforme descrito por Döbereiner et al., (1995). Para cada repetição foram utilizadas 10 g de raízes frescas cortadas em fagmentos de cerca de 2,0 cm e maceradas. Juntaram-se 90 mL de solução salina (sais do meio NFb) esterilizada contido em erlenmyer de 250 mL (10g de raiz fresca: 90 mL de solução salina), e diluídas seriadamente em tubos de ensaio com 9 mL de solução salina, homogenizadas em vortex.

Para o isolamento das BDNS realizou-se a inoculação de 1,0 mL de cada diluição em recipientes de vidro com capacidade de 12 mL com 5 mL de

meio de cultura NFb semi-sólido, recomendado para isolamento e contagem de *Azospirillum* spp. com a seguinte composição por litro: 5,0 g - Ácido málico; 0,5 g - K_2HPO_4 ; 0,2 g - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1 g - NaCl; 0,02 g - $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 2 ml de solução de micronutrientes (0,04g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 1,2 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 1,4 g H_3BO_3 ; 1,0 g $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$; 1,175 g $MnSO_4 \cdot H_2O$); 2 ml de azul de bromotimol (solução 0,5% em KOH 0,2 N); 4 ml de Fe EDTA (solução 1,64%); 1,0 mL solução de vitamina (100 mg de biotina; 200 mg piridoxol-HCl). Em seguida, ajustou-se o pH para 6,5 com KOH e adicionou-se 1,8 g de Agar.

Utilizaram-se três frascos por diluição, contendo 5,0 mL de meio de cultivo. Estes, após repicagem, foram mantidos sob incubação em estufa bacteriológica (28-30 °C) por cinco dias. Após este período, foi feita a contagem das bactérias nas amostras, baseando-se na presença (+) e ausência (-) de película em forma de véu próximo a superfície do meio de cultura, características da presença ou não de crescimento bacteriano.

A tabela de McCrady (DÖBEREINER et al., 1995) foi usada para determinar, pelo método estatístico do NMP, a população de bactérias diazotróficas (por gramas de raiz fresca) presentes nas amostras.

A seleção das BDNS e a avaliação da diversidade fenotípica foram realizados após a contagem, utilizando-se os frascos com películas das maiores diluições seriadas. Os isolados foram então, repicados para novos meios semi-sólidos específico (NFb) com ajuda de alça de platina e incubadas por 72 horas em estufa bacteriológica (28 – 30 °C). As formações de novas películas foram riscadas em placa de Petri com meio NFb de consistência sólida (15 g L⁻¹ de agar e extrato de levedura).

Para purificação final das culturas de BDNS foi utilizado o meio de cultura batata (DÖBEREINER et al., 1995), segundo metodologia utilizada por Melloni et al., (2004). Nesta etapa, as características morfológicas fenotípicas culturais das colônias e agrupados segundo os valores descritos por Melloni et al. (2004), modificado (Tabela 1). Os isolados que apresentaram características fenotípicas idênticas foram separados em grupos fenotípicos culturais.

Em função do número de grupos fenotípicos de similaridade morfológicas obtidos, pôde-se calcular o índice de diversidade de Shannon e Weaver, que relaciona a riqueza e uniformidade de espécies (ODUM, 1983), nas diferentes épocas de coleta. Para comparação, tomou-se como referência as características fenotípicas obtidas por Silva e Melloni, (2011), para as estirpes-tipo *Azospirillum lipoferum* (BR11080), *A. brasiliense* (BR11001), *A. amazonense* (BR11040), *Herbaspirillum seropedicae* (BR11175) e *Burkholderia brasiliensis* (BR11340)

Tabela 1. Valores atribuídos as características fenotípicas para as épocas seca e chuvosa.

Características fenotípicas	Valores
Diâmetro ds colônias	1 (< 1 mm) 2 (1- 3 mm) 3 (> 3 mm)
Coloração das colônias	1 (creme) 2 (creme de centro escuro) 3 (rosa) 4 (branca)
Consistência da colônia	1 (consistente/gomosa) 2 (mole/baixa produção de goma) 3 (dura/seca)

Para o teste da capacidade de fixação de N₂ *in vitro* foram utilizados 25 isolados com crescimento mais vigoroso através do método da redução do acetileno (C₂H₂) a etileno (C₂H₄) (HARDY et al., 1973). Os isolados bacterianos foram repicados para o meio NFb semi-sólido em recipiente de vidro com capacidade de 12 mL com 5 mL de meio. Após o crescimento bacteriano caracterizado pela formação do véu, os vidros foram hermeticamente fechados com tampas de borracha. Em seguida, com auxílio de uma seringa, retirou-se 10% do volume de ar restante, injetando-se o mesmo volume de C₂H₂, incubando-se por 24 horas em estufa bacteriológica.

Ao término desse período, amostras de 5 mL do gás do interior dos frascos foram colocadas em "Vacuteiner" e remetidos para análise em cromatógrafo de fase gasosa no Departamento de Química da Universidade Federal de Pernambuco.

Os resultados foram submetidos à análise da variância de acordo com o delineamento inteiramente casualizado e a comparação das médias foi feita pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Assistat, versão 7,5 beta (SILVA; AZEVEDO, 2002).

Tabela 2. Densidade (NMP-número mais provável) de bactérias diazotróficas não simbióticas (BDNS) de raízes lavadas (RL) e desinfestadas (RDS) de gramíneas forrageiras coletadas em duas épocas diferentes em Patos - PB.

Forrageiras	Épocas de coleta					
	março 2008		setembro 2008			
	RL	RDS	RL	RDS		
Limites*		Limites*		Limite*	Limite*	
(NMP x 10 ³) bactérias g ⁻¹ de raiz						
Andropogon	0,3	0,066-0,8	45,0	10-210	93,0	23-380
Tanzânia	2,5	0,66-8,1	0,9	0,2-3,7	>1100,0	-
Buffel	25,0	6,7-86	11,5	3,0-44,0	210,0	61-760

*95% de Probabilidade; RL (raízes lavadas); RDS (raízes desinfestadas); - (dados ausentes)

A maior densidade de BDNS foi obtida em RL no período seco, para todas as gramíneas estudadas, pode esta relacionado ao estresse provocado no solo pelo deficit hídrico, baixa disponibilidade de alimento (matéria orgânica) e alta competição microbiana, em contra ponto à melhores condições de proteção e sobrevivência na superfície das raízes das gramíneas.

Geralmente, na região sob influência da raiz há grande concentração/exudação de nutrientes. Vários fatores são citados na literatura como indutores

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na coleta realizada em março/2008 na superfície das raízes (SR) do capim Buffel registraram-se as maiores densidades de BDNS em relação as demais forrageiras no período chuvoso. Já para o capim tanzânia registraram-se maiores densidades do que as demais no período seco. Por outro lado, a população de bactérias endofíticas obtidas no interior das raízes (RDS) no período das chuvoso, apresentou-se, no adropogom cerca de 400 vezes maior que no Buffel e este 10 vezes maior que em Tanzânia (Tabela 2).

Notou-se que, para a coleta nas RDS no período seco a população de BDNS foi nula, sem a formação do véu característico do crescimento da bactéria. Embora tenha ocorrido mudança de pH no meio de cultura. Resultados também observados por Baldani et al., 2000, que sugeriram que estas bactérias podem estar em um estado viável, mas não cultivável (Tabela 2).

da migração destes microrganismos à superfície das raízes, dentre eles: aderência das bactérias, baixa competição com outros organismos, especificidade com a gramínea hospedeira, provavelmente devido a afinidade entre bactérias endofíticas e espécies de plantas hospedeiras são moduladas pela via fitossintética mais eficiente em situações ambientais específicas (BALDANNI et al., 1999) ou devido à plasticidade adaptativa das forrageiras sob às variações sazonais (ALLEM; VALLS (1987). É possível, que em

situação de estresse, como a seca, possa ter provocado ocorrência rara ou nula dessa bactéria não simbióticas nas raízes, por carência de fotoassimilados. Resultados similares foram observados em zona de menor influência das raízes (MELLONI et al., 2004).

De forma geral, a densidade de BDNS obtidos neste estudo apresentaram amplitude entre 10^3 e 10^6 . Estes resultados se assemelham ao observado por Reis Junior et al. (2000), em braquiárias cultivadas em solos de Goiás e Minas Gerais. Indicando um aspecto edafologicamente cosmopolita destes microrganismos, além de mostrar uma relação direta entre as gramíneas e estas bactérias, também observada em outro estudo (Baldani et al., 1999). Variações similares, foram observadas em outras gramíneas forrageiras como *Brachiaria humidicola* e *B. decumbens* (REIS JUNIOR, 2002) e *B. humidicola*, capim Mimoso (*Axonopus purpusii*) e capim Corona (*Esyonurus muticus*) no Pantanal Matogrossense (BRASIL et al., 2005), sugerindo afinidade destes isolados bacterianos por determinada espécie hospedeira.

O número total de BDNS por gramíneas forrageiras em diferentes períodos (chuvoso e seco) e formas de coleta nas raízes (lavadas e desinfestadas), encontra-se na figura 2.

O isolamento realizado a partir da maior diluição confirmou a presença de bactéria diazotrófica do gênero *Azospirillum* spp. associadas às três forrageiras na região em estudo. Foram obtidos isolados dessas bactérias em todas as forrageiras nos períodos chuvoso e seco nas RL, mas não foram obtidos isolados no seco em RDS, conforme já mencionado.

Do total de isolados obtidos (72) nas forrageiras avaliadas, o maior percentual foi obtido em RL (72,28%) contra 27,72% em RDS, sendo 30,56% originários de *Andropogon*, 22,27% de *Tanzânia* e 19,45% de *Buffel* (Figura 2).

Os 50 isolados de bactérias obtidos nas forrageiras no ambiente semiárido, diferenciaram-se em oito grupos de acordo com as similaridades de caracte-

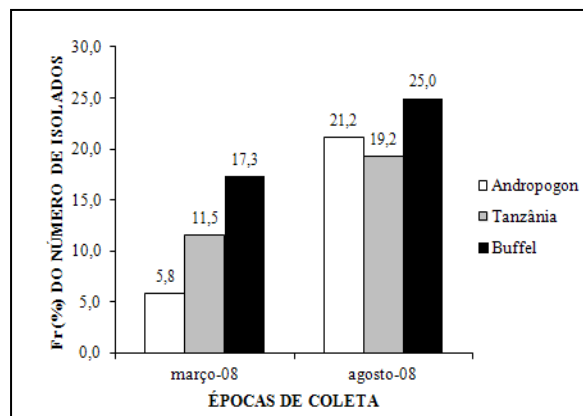


Figura 2. Frequência relativa (Fr) do número de isolados de bactérias diazotróficas não simbióticas em amostras de raízes de *Andropogon*, *Tanzânia* e *Buffel* por época de amostragem.

terísticas culturais das bactérias isoladas (diâmetro médio, cor e consistência da colônia) (Tabela 3). Sendo, três isolados no grupo I, três no grupo II, um no grupo III, dois no grupo IV, quatro no grupo V, onze no grupo VI, vinte e cinco no grupo VII e um no grupo VIII. Estes resultados mostram pequena diversidade fenotípica quando comparados com os obtidos por Melloni et al. (2004), que observaram 36 grupos (fenótipos) de isolados bacterianos em outras espécies de gramíneas, em campo e serra em áreas de mineração em recuperação no sudeste brasileiro. Isto sugere, uma pretensa estabilidade biológica dessas bactérias nas raízes neste ambiente ou devido a diferença entre as metodologias.

O índice de diversidade de Shanon-Weaver (H'), em relação as épocas de coleta das raízes, foi maior em agosto (0,67) do que em março-2008 (0,51), ratifica os resultados observado neste trabalho (Tabela 3). O que indica haver maior diversidade populacional de BDNS do gênero *Azospirillum* em raízes das forrageiras, no período mais seco do ano. Premissa, que possivelmente deve ser confirmada através de métodos moleculares.

Tabela 3. Descrição dos grupos fenótipos culturais de isolados de bactérias do gênero *Azospirillum* obtidas em raízes frescas das forrageiras em diferentes épocas de coleta.

Fenótipo cultural	Descrição ⁽¹⁾	Épocas de coleta	
		Março-2008	Agosto-2008
<i>Nº de identificação de Isolados de BDNS (Prefixo UFCG)</i>			
I	2-1-1		27,29,50
II	2-1-2	15	40,41
III	2-2-2		21
IV	2-1-3	20	22
V	2-2-1	18	43,45,48
VI	2-4-1	4,6,7,13,14,16,17,19	30,32,34
VII	2-4-2	1,2,3,5,8,9,10,11,12	23,24,26,28,31,33,35,36,37
VIII	2-4-3		38,39,41,42,44,46,47
			25

⁽¹⁾Descrição: 1º valor (diâmetro médio da colônia): 1 = < 1 mm, 2 = 1-3 mm, 3 = > 3 mm. 2º valor (cor das colônias): 1 = creme, 2 = creme de centro escuro, 3 = rosa, 4 = branco. 3º valor (consistência da colônia): 1 = mole, 2 = média, 3 = dura/quebradiça.

Bactérias isoladas de mesma forrageira distribuíram-se em grupos de similaridades diferentes. Sendo, a maioria dos isolados de *Andropogon*, *Tanzânia* e *Buffel* distribuída principalmente nos grupos VI e VII, embora tenham sido observados isolados originários de vários grupos de similaridade como no *Andropogon* (seis grupos) e no *Buffel* (cinco grupos) (Figura 3).

Tais resultados podem estar relacionados com a composição química dos exudados liberados pela planta. Isto sugere preferência de alguns isolados por determinadas espécies de plantas, muito embora ainda não tenha sido demonstrada especificidade hospedeira típica entre as espécies de *Azospirillum* spp. e a planta hospedeira (BASHAN; HOLGUIN, 1997). Grayston et al., (1998) observaram que a variedade de compostos orgânicos liberados pela planta influencia a diversidade de microorganismos presentes na sua rizosfera.

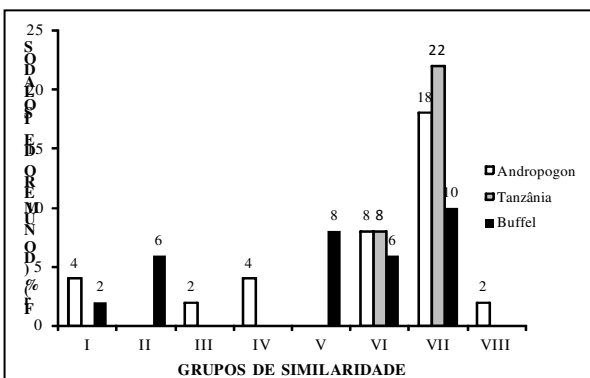


Figura 3. Frequência relativa (Fr) do número de bactérias *Azospirillum* obtidas em amostras de raízes de andropogon, tanzânia e buffel em cada grupo de similaridade das características morfológicas das colônias.

Todo os isolados de BDNS selecionados pelo crescimento mais característicos e vigorosos (*in vitro*), coincidentemente os obtidos na época mais seca (agosto/2008), apresentaram atividade enzimática. Observaram-se grande amplitude da atividade quando comparados os isolados obtidos entre as diferentes forrageiras 26 a 256 nmoles $C_2H_4 h^{-1}$.

Do total de isolados avaliados, 68% apresentaram atividade enzimática acima de 190 nmoles h^{-1} , 28% entre 110 e 160 e apenas 4% abaixo de 50 nmoles h^{-1} (Figura 4).

Do total de isolados avaliados, 68% apresentaram atividade enzimática acima de 190 nmoles h^{-1} , 28% entre 110 e 160 e apenas 4% menores de 50 nmoles h^{-1} .

Dessa forma, os resultados concordam com o obtidos por Han e New, (1998) que também avaliaram a habilidade em fixar N_2 de *Azospirillum* em cultura pura. Segundo estes autores estes isolados apresentavam alta atividade da nitrogenase (110 nmoles $C_2H_4 mg\ prote\acute{a}na^{-1}$) *in vitro*. O que tornam os isolados obtidos neste estudo promissores, para uso

em programa que visem uma produção sustentável e a economia no uso de fertilizantes nitrogenados.

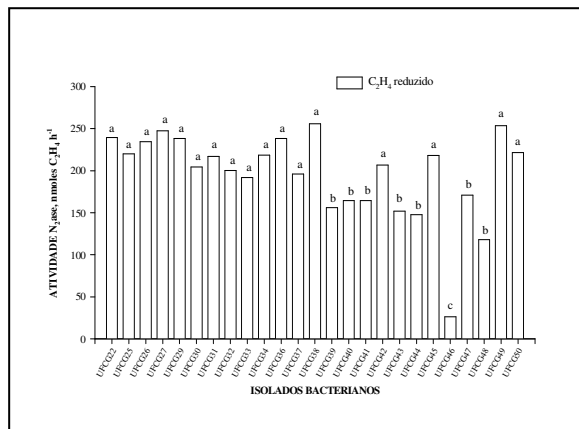


Figura 4. Fixação de nitrogênio (redução do acetileno) de bactérias do gênero *Azospirillum* selecionadas em culturas puras. Colunas seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si a 5% pelo teste de Scott- Knott.

Observou-se ainda, que os maiores valores da atividade da nitrogenase oscilaram entre 192 e 256 nmoles de $C_2H_4 h^{-1}$ e foram obtidos do capim *Andropogon*, sendo as mais altas atividades observadas nos isolados UFCG 22, 25, 26, 27 e 29. E no capim *Tanzânia* se destacaram os isolados UFCG 31, 32, 33, 34, 36, 37 e 38, cujas atividades não diferiram entre si.

Já os isolados obtidos do capim *Buffel* apresentaram maior variação nos valores da atividade da nitrogenase do que as outras duas forrageiras. Assim sendo, UFCG 42, 45, 49 e 50 apresentaram valores de atividade significativamente iguais aos melhores valores observados no *Andropogon* e no *Tanzânia* e diferiram dos isolados UFCG 40, 41, 43, 44, 47 e 48 obtidos neste capim. Esta grande variação observada da atividade da nitrogenase observada para o capim *Buffel* também foram observadas por Han e New, (1998), em raízes coletadas de trigo em condições naturais. Parece provável que estas variações também sejam moduladas, por fatores ligados ao hospedeiro e microsimbionte, como ocorre com a associações simbióticas.

CONCLUSÕES

As maiores densidades de bactérias do gênero *Azospirillum* na região semiárida foram obtidas em raízes na época seca do ano;

Os isolados de bactérias diazotróficas não simbióticas gênero *Azospirillum* obtidos nas raízes das forrageiras apresentaram alto potencial para fixação biológica do nitrogênio;

AGRADEDIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

ALLEM, A. C.; VALLS, J. F. M. **Recursos forrageiros nativos do Pantanal Matro-Grossense**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1987, 339 p. (Documentos, 8).

BALDANI V.L.D, et al. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis** v. 13, p. 65-73. 1992.

BALDANI, J.L. et al. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J.O. et al (eds.) **Inter-relações fertilidade, biologia e nutrição de plantas**. Viçosa, SBCS/UFLA/DCS, 1999. p. 621-666.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, n. 5, p. 485-491, 2000.

BALDANI, V. L. D et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5-6, 911-922, 1997.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 103-121, 1997.

BAZZICALUPO, M.; OKON, Y. Associative and endophytic symbiosis. In: PEDROSA, F. et al. (eds.) **Nitrogen Fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 409-413.

BRASIL, M. S. da; BALDANI, J. I.; BALDANI, B. L. D. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal Sul Matogrossense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 29, n. 2, p. 179-190, 2005.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, p.107-149, 2003.

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

EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Brasília: Brasília Produção de Informação, Rio de Janeiro, Embrapa Solos, 1999, 412 p.

GRAYSTON, S.J.; WANG, S.; CAMPBELL, C.D.; EDWARDS, A.C. Delective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere, **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 3, p. 369-378, 1998.

HAN, S. O.; NEW, P. B. Variation in nitrogen fixing ability among natural isolates of *Azospirillum*. **Microbial Ecology**, v. 36, n. 2, p. 193-201, 1998.

HARDY, R. W. F.; BURNS, R. C.; HOLSTEN, R. D. Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 5, n. 1, p. 47-81, 1973.

HUNGRIA, M. et al Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N₂ fixation and of N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86, p. 927-939, 2006.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKÉS, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: Can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biol. Biochem.**, v. 36, p. 1229-1244, 2004.

KUSS, A.V.; KUSS, V.V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M.L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, out. 2007.

MELLONI, R., et al. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita, em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 28, n. 1, p. 85-93, 2004.

MOREIRA, J.N. et al Caracterização da vegetação de Caatinga e da dieta de novilhos no Sertão de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41. n. 11, p. 1643-1651, 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras:UFLA, 2º ed., p. 729, 2006.

ODUM, E. P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1983. 210 p.

PERIN, L. et al. Caballero-Mellado, J. *Burkholderia silvatlantica* sp nov., a novel diazotrophic bacterium associated with sugarane and maize. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1931-1937, 2006.

REIS JUNIOR., F.B. et al. N₂-fixing bacteria associated with *Bachiaria pastures*. In: PEDROSA, F et al. eds. **Nitrogen Fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 2000. 432 p.

REIS JUNIOR, F. B. et al. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 28, n. 1, p.103-113, 2004.

SALA, V. M. R. et al. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v.29,n. 4, p. 345-352, 2005.

RODRIGUES, L. da S. et al. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 3, p. 275-284, 2006.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, PB, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.

SILVA, T. F.; MELLONI, R. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas não simbióticas em solos da Reserva Biológica Serra dos Toledo, Itajubá (MG). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 35, n. 2, p. 359-371, 2011.