

Caracterização Fenotípica de Bactérias Diazotróficas Endofíticas Isoladas de Cana de Açúcar

Phenotypic Characterization of Endophytic Diazotrophic Bacteria Isolated of Sugarcane

Robson Cavalcante de Lima¹; Dora Inés Kozusny-Andreani²;
Roberto Andreani Junior³ e Lucas da Fonseca⁴

Resumo. A utilização de inoculantes contendo microrganismos diazotróficos na cana-de-açúcar pode contribuir para a promoção do crescimento destas plantas e promover ganhos significativos na produtividade. Objetivou-se no presente trabalho caracterizar bactérias diazotróficas isoladas de colmos cana-de-açúcar. Foram utilizados os meios de cultivo semi-sólidos NFB e JNFB sem adição de nitrogênio. Foram isoladas cinco estirpes nativas de bactérias diazotróficas as quais foram avaliadas microscopicamente pela coloração de Gram e em relação à resistência intrínseca aos antibióticos; fungicida furadan (i.a. carbofuran) e inseticida regente (i.a. fipronil), e à capacidade de fixar o nitrogênio em condições de casa-de-vegetação e campo. Os resultados obtidos permitiram observar que todos os isolados apresentaram características de bacilos Gram-negativos, e ampla resistência aos antibióticos. A estirpe nativa UCCBc5 apresentou resistência ao fungicida furadan e ao inseticida regente. As bactérias isoladas UCCBc1 e UCCBc5 apresentam capacidade e eficiência de fixar o nitrogênio atmosférico em condições de casa-de-vegetação. Verificou-se que a estirpe UCCBc5, resistente ao furadan e ao regente apresentou capacidade fixadora do nitrogênio atmosférico, em condições de campo. Na avaliação de doses de inoculante observou-se que existe relação dose de inoculante/ eficiência de fixação de nitrogênio. Estes resultados permitiram afirmar que as bactérias diazotróficas endofíticas podem ser utilizadas, em alguns casos, como substituto da adubação nitrogenada, na cultura de cana-de-açúcar.

Palavras – chave: Bactérias diazotróficas, cana-de-açúcar, antibióticos, carbofuran, fipronil.

Abstract. The use of inoculants containing diazotrophic microorganism in sugarcane can contribute to promoting the growth of these plants and to promote significant gains in productivity. The objective of this study was to characterize diazotrophic bacteria isolated from stalks of sugarcane. We used the means of a semi-solid NFB and JNFB without added nitrogen. Five strains were isolated native diazotrophs which were evaluated microscopically by Gram stain, the intrinsic resistance to antibiotics, fungicide Furadan (i.a. carbofuran) and insecticide Regent (i.a. fipronil) and ability to fix nitrogen in greenhouse and field conditions. All isolates were characteristic of Gram-negative, and for the intrinsic resistance to antibiotics showed widespread resistance. A native UCCBc5 strain showed resistance to the fungicide Furadan and the insecticide Regente. Bacteria isolated UCCBc1 and UCCBc5 present capacity and efficiency of fixing atmospheric nitrogen under conditions of greenhouse. It was found that the strain UCCBc5 resistant to the fungicide Furadan and the insecticide Regente has capacity of fixing atmospheric nitrogen in field conditions. In the evaluation of doses of inoculation was observed that there is a dose of inoculant / efficiency of nitrogen fixation. These results indicate that endophytic bacteria can be used, in some cases as a substitute for nitrogen in sugarcane.

Key words: Diazotrophic bacteria, sugarcane, antibiotics, carbofuran, fipronil.

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas no panorama agrícola brasileiro. Nos últimos anos houve incentivo para uma maior produção desta cultura, o que trouxe como consequência um aumento na ocupação das áreas agrícolas. De acordo com a pesquisa realizada pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2011), a produção brasileira de cana-de-açúcar na (Safrá 2010-2011) foi de 623,905 milhões toneladas, em uma área de aproximadamente 8,5 milhões de

hectares. Do total da produção para a indústria, 333,101 milhões de toneladas foram utilizadas para produção de etanol. O Centro-Sul foi responsável por 87,9% da produção desta cultura no País, sendo o estado de São Paulo o maior produtor, com 340,5 milhões de toneladas de cana utilizada na fabricação de álcool e açúcar. A produção de material energético alternativo pelo uso de biomassa representa hoje um dos grandes desafios para a ciência, já que a

¹ Engenheiro Agrônomo, ex- aluno do Curso de Agronomia da Universidade Camilo Castelo Branco (Unicastelo) – Campus Fernandópolis, São Paulo Brasil. <rlima@yahoo.com.br>

² Professores Doutores do Curso de Agronomia da Universidade Camilo Castelo Branco (Unicastelo) – Campus Fernandópolis, Santa Rita CEP:15600-000. São Paulo, Brasil. <doraines@terra.com.br>

³ Professores Doutores do Curso de Agronomia da Universidade Camilo Castelo Branco (Unicastelo) – Campus Fernandópolis, Santa Rita CEP:15600-000. São Paulo Brasil. <robertoandreani@uol.com.br>

⁴ Aluno do Curso de Agronomia da Universidade Camilo Castelo Branco (Unicastelo) – Campus Fernandópolis, Santa Rita CEP:15600-000. São Paulo, Brasil <lucasfonseca@hotmail.com>

Recibido: Septiembre 15 de 2009; Aceptado: Mayo 26 de 2011

continuação da queima desenfreada de petróleo contribui para o efeito estufa que ameaça o equilíbrio do clima da terra. No entanto, qualquer biocombustível para ter uma produção economicamente viável, necessita de tecnologias que garantam a sua produção com balanços energéticos positivos, isto, é produzir pelo menos três vezes mais energia do que a gasta para a produção e processamento dos materiais vegetais a serem utilizados.

A cana-de-açúcar é uma cultura altamente extrativa em nitrogênio. A cana-planta, com produtividade de $100 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ de colmos, acumula entre 150 a $200 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de N, e no caso de cana soca este valor é de 120 a $160 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de N (Resende, 2000; Xavier, 2002). Se o nitrogênio contido no colmo é exportado para usina e, a palha da cana é queimada antes do corte para facilitar a colheita manual, seu cultivo contínuo, como é feito há centenas de anos, rapidamente esgota as reservas de nitrogênio do solo, uma vez que as quantidades deste nutriente adicionadas anualmente raramente ultrapassam $80 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ nas socarias. Observa-se, entretanto, que a lavoura de cana não reduz o nível de N do solo, evidenciando que a cultura possui um sistema natural de reposição de N exportado do solo anualmente. No nível de conhecimento atual, este sistema de reposição pode ser o processo de fixação biológica do nitrogênio (Urquiaga *et al.*, 2003).

A fixação biológica do N_2 (FBN) é um processo significativo que, segundo estimativas, fornece entre 139 e 170 milhões de toneladas de N por ano para a biosfera, valores superiores aos 65 milhões aplicados como fertilizantes. Diante do custo atual da energia fóssil e da necessidade de fertilizantes nitrogenados para a produção de alimentos, é grande o interesse pela FBN e o melhoramento da sua eficiência (Pimentel, 1998).

Importantes culturas agrícolas como a cana-de-açúcar, alguns cereais e gramíneas forrageiras podem obter nitrogênio da fixação biológica, por as associações com microrganismos diazotróficos (Sala *et al.*, 2007). Nos últimos anos, foram descobertas novas espécies de bactérias fixadoras de N_2 que vivem numa associação menos perfeita nas raízes das gramíneas, várias destas bactérias foram descobertas no Brasil (Moreira e Siqueira, 2006; Figueiredo *et al.*, 2008). Estas bactérias todas são Gram negativas e são microaeróbias quando dependentes da FBN, isto é, somente fixam N_2 quando não há acúmulo de oxigênio em torno delas. A chave para o descobrimento

deste grupo novo de bactérias foi o uso de meios de cultura semi-sólidos onde, atraídas pela quimiotaxia, as bactérias se movem para a região no meio onde a taxa de difusão de O_2 é menor ou igual à taxa de respiração das bactérias (Dobereiner, 1992). Estudos de isolamento e identificação de bactérias fixadoras de N_2 em gramíneas forrageiras se iniciaram na década de 60, com destaque para algumas espécies do gênero *Azospirillum* (Döbereiner, 1977a).

Entre as bactérias diazotróficas isoladas de colmo e raízes de cana-de-açúcar destacam-se as espécies *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Glucanacetobacter diazotrophicus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enerobacter* spp, e mais recentemente um isolado relacionado à *Pantoea* sp. (Dong *et al.*, 1994; Baldani *et al.*, 1996; Boddey *et al.*, 2003; Loiret *et al.*, 2004). Outros isolados da cana-de-açúcar foram caracterizados, através de métodos moleculares como pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Kluyera*, *Staphylococcus*, *Curtobacterium* e *Brevibacillus* (Magnani, 2005).

A FBN em plantas de cana-de-açúcar é um processo complexo que envolve uma gama de fatores relacionados com o genótipo das plantas e das bactérias associadas a estas. Em função de não terem sido observadas diferenças entre o número de bactérias presentes, algumas hipóteses podem ser sugeridas para explicar a variação entre os genótipos das plantas em relação às taxas de FBN por estes apresentadas. Verificou-se que mesmo apresentando números similares de diazotróficos, há a possibilidade de que a interação planta x microrganismos seja diferente entre os genótipos da planta (Salomone e Döbereiner, 1996). Deve-se ressaltar também que a eficiência fotossintética, as exigências nutricionais e a resistência às condições desfavoráveis, entre outras, são características ligadas ao genótipo das plantas que podem apresentar influência na eficiência de fixação de N_2 pelas bactérias associadas a estas. A diversidade genética de bactérias diazotróficas da mesma espécie relacionada com o genótipo da planta também deve ser considerada como um fator importante ao se analisarem as diferenças em relação à FBN na cultura da cana-de-açúcar (Combe *et al.*, 1994; Reis Junior *et al.*, 2000).

Estudos indicam que a FBN pode contribuir significativamente em até 60% de todo o N acumulado pelas plantas de cana-de-açúcar (Bodey *et al.*, 2001; Xavier, 2002). A possibilidade de se substituir o fertilizante nitrogenado pela fixação de nitrogênio

deve ser considerada, pois esta é econômica e ambientalmente vantajosa (Reis, 2003).

No presente trabalho objetivou-se isolar e caracterizar bactérias diazotróficas endofíticas na cultura de cana-de-açúcar.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nos Laboratórios de Microbiologia e Biotecnologia e em casa de vegetação da Universidade Camilo Castelo Branco (Unicastelo), Campus Fernandópolis, São Paulo, Brasil.

Isolamento de bactérias diazotróficas endofíticas.

Foram utilizadas amostras de colmo de cana-de-açúcar da variedade SP 81-3250, colhidas após a rebrota da cana-de-açúcar e os meios de cultivo semi-sólidos NFB e JNFB sem adição de nitrogênio, como descrito por Döbereiner *et al.* (1995). Para o isolamento foram utilizados 10 g de cada amostra de colmo (fitomassa fresca), os quais foram lavados com água corrente, triturados e misturados em 90 mL de solução salina (NaCl, 0,5%) e diluídos serialmente (101-107). De cada diluição foram retiradas alíquotas de 0,1 mL e inoculadas em frascos de vidro contendo os meios de cultura NFB e JNFB, estes foram incubados a 30 °C, o crescimento bacteriano foi avaliado aos 3, 5 e 7 d verificando-se o aparecimento ou não da película característica para as bactérias diazotróficas endofíticas.

Os frascos com crescimento positivo, na maior diluição de cada um dos meios, foram utilizados na repicagem para um novo meio semi-sólido. Após a incubação a 30 °C por 5 d, foram realizados esfregaços, sendo corados pela técnica de Gram e observados ao microscópio óptico, para a verificação da morfologia das células. Estes mesmos frascos foram utilizados para realizar inoculação em placas de Petri contendo meio NFB sólido, no qual foi acrescido de extrato de levedura. As colônias formadas nos meios sólidos foram repicadas para novo meio semi-sólido e, após o período de incubação, novamente riscadas em placas de Petri contendo meios sólidos batata e batata-P, para purificação final das estirpes (Döbereiner *et al.*, 1995).

Caracterização morfológica dos isolados de bactérias diazotróficas endofíticas. Inicialmente os isolados foram avaliados quanto à coloração de Gram, que se baseia na capacidade que certas bactérias possuem em reter a coloração de cristal

violeta após descoloração com álcool. Estas são denominadas de Gram-positivas. As bactérias que perdem a coloração após o tratamento com álcool são denominadas Gram-negativas e são contrastadas com corante de cor diferente, geralmente safranina ou fucsina.

Uma única colônia isolada em placa foi retirada com o auxílio de um palito e espalhada numa lâmina de vidro. Em seguida foi adicionada solução cristal de violeta sobre a lâmina por um minuto, e enxaguado com água. Em seguida a lâmina foi tratada com solução de iodo por mais um minuto. Posteriormente foi realizada a descoloração com álcool, e enxaguado com água e, por último, tratado com fucsina. As lâminas assim preparadas foram observadas em microscópio óptico, utilizando-se a objetiva de 100 ou lente de imersão.

Avaliação da resistência intrínseca aos antibióticos.

Todos os isolados bacterianos foram avaliados quanto à susceptibilidade e resistência intrínseca aos agentes antimicrobianos pelo método de difusão em placa, utilizando-se meio agar Muller Hinton (MH, Oxoid®) e discos impregnados de antibióticos (Oxoid®). Os símbolos e as concentrações dos respectivos antibióticos estão descritos entre parêntese: clindamicina (cli, 2 µg), enrofloxacilina (eno, 5 µg), ampicilina (amp, 10 µg), norfloxacilina (nor, 10 µg) sulfazotrim, (sut, 25 µg), gentamicina (gen, 10 µg) eritromicina (eri, 15 µg), oxacilina (oxa, 1 µg), ciprofloxacilina (cip, 5 µg), cefalotina (cfl, 30 µg). As placas de Petri contendo meio MH foram inoculadas com 0,1 mL de cultura de cada microrganismo, os discos de antibióticos foram depositados na superfície do meio, incubadas a 37 + 0,5 °C por 24 h. A susceptibilidade das bactérias isoladas ao antibiótico foi determinada pelo halo de inibição ao redor do disco, utilizando-se o critério descrito pelo fabricante para cada antibiótico.

Avaliação da resistência intrínseca ao fungicida furadan (i.a. carbofuran) e ao inseticida regente (i.a. fipronil).

Ante a possibilidade dos isolados de bactérias diazotróficas endofíticas serem utilizados para avaliação em condições de campo, e como o emprego de inseticidas e fungicidas no momento de plantio da cana é uma prática comum na região, estes isolados foram avaliados quanto ao crescimento em meio batata líquido contendo diferentes concentrações do fungicida furadan (i.a. carbofuran, BASF®) e inseticida regente (i.a. fipronil BASF®), as contrações variaram de 0,0 mL, até a

concentração utilizada a campo equivalente a 60 mL·L⁻¹ e 2,5 g·L⁻¹, respectivamente. As culturas foram incubadas a 30 °C, sob agitação orbital (250 rpm), e as leituras para verificação da sobrevivência bacteriana foram realizadas aos 15, 30, 60 minutos e as 24 h, para tal fim foram retiradas alíquotas de 0,1 mL de solução e semeadas em meio agar batata e em meio semi sólido e incubadas a 30 °C até o aparecimento das colônias. Foram consideradas resistentes aquelas estirpes que sobreviveram em concentrações equivalentes as empregadas em condições de campo.

Avaliação da capacidade de fixar nitrogênio atmosférico

Experimento 1 (casa de vegetação). Para avaliar a capacidade fixadora de N atmosférico pelos isolados bacterianos foram utilizados vasos de PVC com capacidade de 30 L. Os vasos foram providos de drenos e preenchidos com solo argiloso vermelho-amarelo cutrófico abrupto e de textura moderada areno/média (Oliveira *et al.*, 1999), onde foram plantados os toletes de cana-de-açúcar, variedade SP 81-3250. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com sete tratamentos e seis repetições. Os tratamentos constituíram-se de duas testemunhas sem inoculação: 1) sem fornecimento de nitrogênio mineral e 2) sem inoculação com fornecimento de nitrogênio mineral; e tratamentos que receberam inoculação com as estirpes de bactérias endofíticas isoladas de colmos de cana-de-açúcar; 3 a 7) com inoculação com as estirpes UCCBc1, UCCBc2, UCCBc3, UCCBc4 e UCCBc5, respectivamente, utilizadas individualmente.

Para preparação do inoculante foi empregado o meio de cultura batata-P líquido (sem adição de agar). Os diferentes isolados foram inoculados neste meio e incubados a 30 °C, sob agitação (140 rpm), por 7 d. O inoculante foi ajustado para uma concentração bacteriana de 10⁹ UFC (unidades formadoras de colônias) e os toletes foram inoculados com 20 mL de inoculante no momento do plantio.

Os nutrientes foram fornecidos às plantas semanalmente, na forma de solução nutritiva Norris e Dobereiner: KCl 2 mM; K₂HPO₄ 0,3 mM; KH₂PO₄ 0,7 mM; CaSO₄·5H₂O 0,3 μM; ZnSO₄·7H₂O 0,7 μM; MnSO₄ 1 μM; (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 0,002 μM; H₃BO₃ 11,5 μM; Fe SO₄·7H₂O 17,9 μM; ácido cítrico 26 μM (Zilli *et al.*, 2000). Foi aplicado um volume semanal de 200 mL por vaso de solução nutritiva livre de nitrogênio

sendo que, para a testemunha com nitrogênio, este foi adicionado na forma de nitrato de potássio (0,8% m/v) na solução. Os vasos foram mantidos em casa-de-vegetação, irrigados quando necessário até o momento da colheita do material.

O experimento foi conduzido por sete meses (fevereiro a agosto 2006) e ao final do período as plantas foram retiradas dos vasos, separadas em parte aérea e raízes, as quais foram lavadas, acondicionadas em sacos de papel e mantidas em estufa (56 °C) com circulação de ar, até atingirem peso constante. Após a pesagem a parte aérea foi moída e analisada com relação ao conteúdo de nitrogênio pelo método micro Kjeldahl, utilizou a metodologia descrita por Sarruge e Haag (1974).

Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com 5% de significância.

Experimento 2. Para a avaliação da capacidade de fixação do N₂ das bactérias diazotróficas endofíticas resistentes ao furadan e ao regente em condições de casa de vegetação foi utilizada a metodologia de preparação dos vasos, do inoculante e inoculação dos toletes, empregada no experimento 1. Após inoculação dos toletes foram aplicados o fungicida furadan (i.a. carbofuran) e ao inseticida regente (i.a. fipronil) diluídos em água na concentração de 60 mL·L⁻¹ e 2,5 g·L⁻¹, respectivamente.

O desenho experimental foi inteiramente casualizado com seis repetições e cinco tratamentos: 1) testemunha sem inoculação e sem aplicação de N; 2) testemunha sem inoculação e aplicação de N mineral; 3) com inoculação sem aplicação de N, furadan e regente; 4) com inoculação e aplicação de furadan e regente; 5) sem inoculação e com aplicação de N, furadan e regente). Aplicação de nutrientes e irrigação foi a mesma do experimento 1.

O experimento foi conduzido por sete meses (outubro 2005 a abril 2006) e ao final do período as plantas foram retiradas dos vasos, separadas em parte aérea e raízes, as quais foram lavadas com água destilada, acondicionadas em sacos de papel e mantidas em estufa (56 °C) com circulação de ar, até atingirem peso constante. Após a pesagem a parte aérea foi moída e analisada com relação ao conteúdo de nitrogênio pelo método micro Kjeldahl (Sarruge e Haag, 1974).

Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com 5% de significância.

Experimento 3 (condições de campo). O experimento foi conduzido no ano agrícola 2007-2008, em parceria com a Agrícola Arakaki, na Fazenda Ferrari, no distrito de Brasitania, SP, em uma área tradicionalmente cultivada com pastagem.

Após realização dos tratos culturais (aração, gradagem e aplicação de herbicida), com a utilização de um sulcador, foram abertos os sulcos, com espaçamento de 1,40 m entre eles, os quais foram utilizados para o plantio. Posteriormente, foram demarcadas as parcelas de 8,0 m x 10,0 m (cada parcela foi constituída por cinco sulcos), o espaçamento entre parcelas foi de 1,40 m. Com as parcelas devidamente demarcadas procedeu-se ao sorteio dos tratamentos de forma que o delineamento experimental fosse totalmente casualizado. Foram empregados cinco tratamentos com quatro repetições: 1) adubação química convencional (NPK, 05-25-25); 2) adubação química convencional + inoculante bacteriano; 3) uma dose de inoculante bacteriano + superfosfato triplo + cloreto de potássio; 4) duas doses de inoculante bacteriano + superfosfato triplo + cloreto de potássio; 5) três doses de inoculante + superfosfato triplo + cloreto de potássio.

Para o cálculo de adubação foi tido como referência a análise química do solo (Tabela 1), conforme recomendações para o Estado de São Paulo contidas no Boletim Técnico 100 (Raij *et al.*, 1997), sendo utilizados por sulco 840 g de adubo mineral (NPK, 05-25-25, nos tratamentos 1 e 2), enquanto que nos tratamentos com inoculação foram empregados 468 g de superfosfato triplo e 350 g de cloreto de potássio. Os diferentes adubos foram distribuídos manualmente nos sulcos no momento do plantio. Posteriormente, os toletes de cana, da variedade RB855453, foram depositados nos sulcos. Uma vez realizado o plantio, procedeu-se à inoculação, para tal fim o inoculante foi diluído em água destilada, mantendo-se a proporção de 106 UFC mL⁻¹. Cada dose correspondeu a 4,0 L, sendo distribuídos uniformemente sobre os toletes de cana. Após inoculação foram aplicados o fungicida furadan (i.a. carbofuran) e o inseticida regente (i.a. fipronil), utilizando-se doses de 60 mL·L⁻¹ e 2,5 g·L⁻¹, respectivamente, e finalmente os toletes foram cobertos com terra.

Sete meses após o plantio foram avaliados o diâmetro basal e o comprimento do colmo, a fitomassa fresca e seca, a altura das plantas e o nitrogênio total.

Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com 5% de significância.

Tabela 1. Resultados da análise química do solo utilizado no experimento em condições de campo Brasitania, SP, Brasil.

MO g/dm ³	P mg/dm ³	pH (CaCl ₂)	K	Ca	Mg	Al mmolc/dm ³	H+Al	SB	CTC	V %
9	4	4,6	0,9	10	2	–	18	12,9	30,9	41,75

V: % de Saturação de bases da CTC.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Da amostragem e cultivo do conteúdo de colmos de cana-de-açúcar em meio semi-sólido, foram isoladas cinco estirpes nativas de bactérias diazotróficas endofíticas. As estirpes foram denominadas como UCCB, indicando a Universidade Camilo Castelo Branco (local do isolamento), seguido letra c, indicando o vegetal do qual as bactérias foram isoladas, posteriormente foram utilizados números sequenciais (1, 2,), para diferenciação dos isolados (ex. UCCBc1,). Ao avaliar o crescimento em meio semi-sólido verificou-se que as estirpes UCCBc1 e

UCCBc5 apresentaram crescimento em microaerofilia, formando uma película característica no meio, onde a concentração de O₂ é relativamente baixa (< 21%), os demais isolados apresentaram crescimento na superfície do meio de cultura. Segundo Dobereiner (1977 a, b e 1992) as bactérias diazotróficas todas são microaeróbias quando dependentes da FBN, isto é, somente fixam N₂ quando não há acúmulo de oxigênio em torno delas e, nos meios de cultura semi-sólidos são atraídas pela quimotaxia, movimentando-se para a região do meio onde a taxa de difusão de O₂ é menor ou igual à taxa de respiração das bactérias. Após diversas repicagens dos isolados em meio sólido

batata e batata-P, para obtenção de culturas puras, verificou-se três tipos morfológicos de colônias: mucosas e translúcidas, mucosas e amarelas, secas e pequenas.

Todos os isolados, quando analisados microscopicamente e frente à coloração de Gram, apresentaram características de bacilos Gram-negativos, estas características

morfológicas das células das bactérias diazotróficas endofíticas foram descritas por Dobereiner (1977a, b). A resistência aos diferentes antibióticos foi uma característica comum dos isolados, exceto para o antibiótico sulfazotrim na presença do qual não houve inibição do crescimento de nenhum dos isolados (Tabela 2).

Tabela 2. Resistência intrínseca aos antibióticos de bactérias diazotróficas endofíticas, isoladas de colmo de cana-de-açúcar.

Bactérias Antibióticos	UCCBc1	UCCBc2	UCCBc3	UCCBc4	UCCBc5
Sulfazotrim	S	S	S	S	S
Cefalotina	S	R	S	R	R
Gentamicina	R	R	R	S	R
Ampicilina	S	R	R	R	R
Enrofloxacin	R	S	S	R	R
Clindamicina	R	R	R	S	R
Amicacina	S	S	R	R	S
Norfloxacin	S	S	S	R	R
Ácido Nalidixico	S	R	S	R	S
Oxacilina	S	S	R	R	S
Ciprofloxacina	R	R	R	S	S
Eritomicina	S	S	R	R	R

S – Suscetível; R – Resistente.

Ante a possibilidade de utilização da estirpe UCCBc5 para inoculação de cana-de-açúcar, cultivada em condições de campo, esta bactéria foi avaliada quanto a sua resistência intrínseca ao fungicida furadan (i.a. carbofuran) e ao inseticida regente (i.a. fipronil), em razão destes agrotóxicos serem utilizados no momento do plantio da cana. Verificou-se que quando esta estirpe foi cultivada em meios de cultura contendo diferentes concentrações de ambos os agrotóxicos o crescimento bacteriano não era inibido, nem mesmo quando foi utilizada a concentração empregada em condições de campo. A resistência intrínseca da estirpe UCCBc5, provavelmente seja consequência de uma mutação devido ao uso reiterado de furadan e de regente no plantio de cana-de-açúcar na região.

Os resultados obtidos para fitomassa seca da parte aérea no primeiro experimento em casa-de-vegetação não mostraram diferenças estatísticas entre os tratamentos que receberam inoculação com as bactérias diazotróficas endofíticas e, com adubação

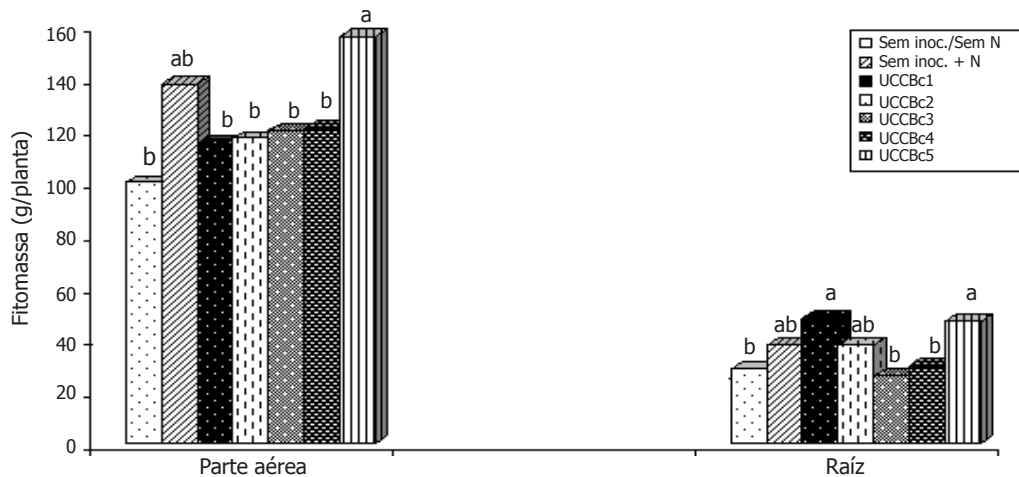
com N mineral e sem aplicação de inoculante (Figura 1), embora tenha sido observado número maior de perfilhos nas plantas de cana-de-açúcar (SP 81-3250), que receberam inoculação com a estirpe UCCBc5.

Quanto a fitomassa da raiz não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos UCCBc1, UCCBc2, UCCBc5 e o tratamento que recebeu nitrato de potássio como fonte de N (Figura 1). No entanto constatou-se menor desenvolvimento radicular nas plantas que receberam inoculação com as estirpes UCCBc3, UCCBc4 e as que não foram tratadas nem com inoculação e nem com N mineral (testemunha) quando comparadas com as inoculadas com UCCBc1 e UCCBc5.

Como o N está diretamente relacionado com o crescimento das plantas (Lainé *et al.*, 1995), o ganho de biomassa avalia, além da eficiência no processo de assimilação desse elemento, uma possível contribuição da fixação biológica em algumas variedades de cana-de-açúcar

(Donato *et al.*, 2003), o qual explicaria o fato do menor acúmulo de fitomassa seca das raízes no tratamento

que não recebeu inoculação nem N mineral e nos tratamentos inoculados com UCCBc3 e com UCCBc4.



As médias seguidas pela mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (5% de significância).

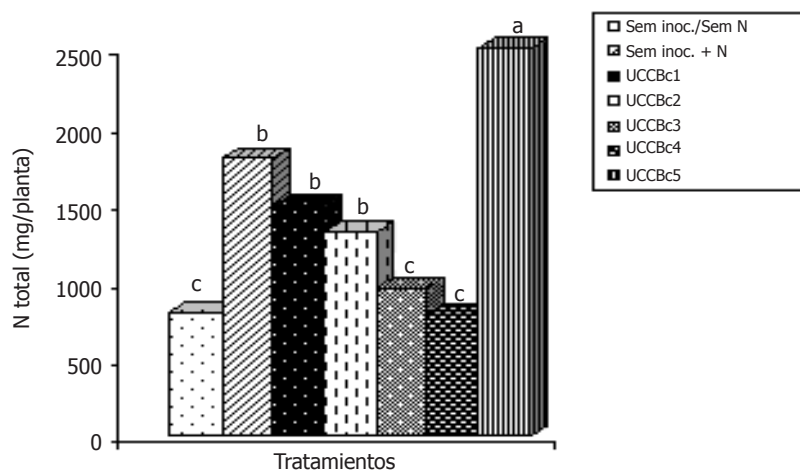
Figura 1. Fitomassa seca (g planta⁻¹) da parte aérea e da raiz de cana-de-açúcar (SP 81-3250), resultados de experimento em casa-de-vegetação (C.V.%: 8,5 e 5,9; parte aérea e raiz, respectivamente).

Na análise do teor de nitrogênio acumulado pelas plantas, verificou-se que, em aquelas que receberam inoculação com a estirpe UCCBc5, este nutriente encontrava-se em maior quantidade (Figura 2), inclusive superior ao tratamento que havia recebido N na forma de nitrato de potássio.

atmosférico. Estes resultados comprovaram a hipótese de que esta bactéria possuía maior capacidade de fixação do N₂.

Como os valores de fitomassa seca da parte aérea e o N total dos tratamentos inoculados foram superiores ao das sem inoculação, considerou-se que a maior parte do N era proveniente da fixação biológica do nitrogênio

Em relação aos demais isolados verificou-se que as plantas inoculadas com UCCBc1 e UCCBc2 não apresentaram diferenças com as plantas que receberam N, porém estes tratamentos apresentaram diferenças estatísticas em relação as plantas inoculadas com a estirpe UCCBc 3, UCCBc4, UCCBc5 e a testemunha (Figura 2).



As médias seguidas pela mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (5% de significância).

Figura 2. Acúmulo de nitrogênio em plantas de cana-de-açúcar (SP 81-3250), resultados de experimento em casa-de-vegetação (C.V. %: 6,8).

De acordo com Bergersen (1980), a FBN pode contribuir com um aumento de produção, que pode ser mensurado por meios diretos como a determinação do N total, proteína, além dos teores de amônio, aminoácidos livres e nitrato. Por meio da avaliação de N total (Figura 2), verificou-se que houve um incremento de 31,85% e 67,74% de N nas plantas inoculadas com o isolado UCCBc5, quando foram comparadas, respectivamente, com aquelas que receberam N na forma de nitrato de potássio e as que não receberam nenhum tratamento (testemunha sem inoculação e sem N), indicando o aporte de N proveniente da FBN. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Lima *et al.* (1987), quando avaliaram a variedade de cana-de-açúcar CB 47-89 em relação à FBN e verificaram que houve um acúmulo de 70% de

N por meio da fixação biológica. No entanto, Oliveira *et al.* (2003) verificaram acúmulo de N de 20 a 30% proveniente da fixação biológica em plantas de cana inoculadas em laboratório com uma mistura de *Gluconabacter diazotrophicus*.

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos para fitomassa fresca e seca e nitrogênio total de plantas cultivadas em condições da casa-de-vegetação, utilizando-se neste experimento a bactéria UCCBc5 resistente ao furadan e ao regente. Constatou-se que o rendimento da fitomassa fresca cana-de-açúcar (variedade RB 855453), que não houve diferença estatística entre os tratamentos, já ao avaliar a fitomassa seca verificou-se que a inoculação e a aplicação de N mineral promoveram acréscimos no peso das plantas quando comparadas com a testemunha.

Tabela 3. Valores médios de peso da fitomassa fresca e seca da parte aérea e nitrogênio total de plantas de cana-de-açúcar variedade RB 855453, cultivadas em condições de casa-de-vegetação.

Estirpes	Avaliações		
	Fitomassa fresca (mg.planta ⁻¹)	Fitomassa seca (mg.planta ⁻¹)	Nitrogênio total (mg.planta ⁻¹)
UCCBc5	219,30 a	157,74 a	787,7 b
UCCBc5+R+F	224,83 a	157,45 a	711,0 b
C/N S/I	222,83 a	157,37 a	806,3 a
C/N S/I+R+F	226,22 a	156,58 a	823,0 a
S/N S/I (Testemunha)	203,29 a	144,21 b	465,7 c
C.V. %	4,9	6,9	6,9

* As médias de cada coluna seguidas pela mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (5% de significância)

C/N: com adição de N mineral; S/N: sem adição de N mineral; S/I: Sem inoculação

R: Regente (i.a. fipronil); F: Furadan (i.a. carbofuran)

A Tabela 3 indica resultados contrastantes em relação ao N acumulado pelas plantas. A utilização de N na forma de nitrato de potássio promoveu maior acúmulo de N pelas plantas em relação aos tratamentos inoculados e a testemunha. No entanto, verificou-se resposta positiva à inoculação quando se comparam os resultados com a testemunha. Estes resultados mostraram comportamento diferente da estirpe UCCBc5 quanto à fixação biológica de nitrogênio na variedade RB 855453, o qual não foi equivalente ao obtido no experimento 1, com a variedade de cana SP 81-3250, onde verificou-se maior acúmulo de N nas plantas inoculadas com esta estirpe (Figura 2). Estes resultados estão relacionados, provavelmente, com a complexidade do processo de fixação biológica de N₂ em plantas de cana-de-açúcar, que envolve uma

gama de fatores, tais como as características genéticas das cultivares e das bactérias associadas a estas, (Salomone e Döbereiner, 1996). Por outro lado fatores intrínsecos à bactéria e ao ambiente poderiam ter interferido também na FBN, levando em consideração que ambos os experimentos foram conduzidos em épocas diferentes. A população de microrganismos diazotróficos sofre influência da época do ano, e é bem provável, também, que o estado fisiológico da cultura apresente influência sobre esses microrganismos (Reis Junior *et al.*, 2000; Moreira e Siqueira; 2006, Sala *et al.*, 2007; Figueiredo *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos em condições de campo estão apresentados na Tabela 4. Em relação ao diâmetro e comprimento dos colmos e a fitomassa fresca, não

foram observadas diferenças estatísticas significativas. No entanto, as plantas inoculadas com as três doses de inoculante contendo a estirpe UCCBc5 e que receberam aplicação de regente e furadan apresentaram maior acúmulo de fitomassa seca, diferindo estatisticamente de todos os tratamentos. O tratamento que recebeu

adubação química convencional e uma dose de inoculante UCCBc5 apresentou menor rendimento de fitomassa seca e N total. Estes resultados fazem supor que a utilização de N e bactérias diazotróficas em forma conjunta interferiram na absorção e/ou fixação de nitrogênio, e conseqüentemente na produção de fitomassa.

Tabela 4. Valores médios do diâmetro basal e comprimento do colmo, fitomassa fresca e seca da parte aérea e nitrogênio total de plantas de cana-de-açúcar variedade RB 855453, cultivadas em condições de campo, Brasitania, SP, Brasil.

Estirpes	Avaliações				
	Diâmetro basal do colmo (cm)	Comprimento do colmo (cm)	Fitomassa fresca (kg-planta ⁻¹)	Fitomassa seca (kg-planta ⁻¹)	N total (g-planta ⁻¹)
UCCBc5 (1) +R+F	3,00 a	49,00 a	2,32 a	1,54 b	6,74 c
UCCBc5 (2) +R+F	3,32 a	52,25 a	2,45 a	1,55 b	9,39 b
UCCBc5 (3) +R+F	3,35 a	60,25 a	2,90 a	1,74 a	12,79 a
ACQ + UCCBc5 (1)+R+F	3,52 a	53,75 a	3,11 a	1,48 c	6,62 c
ACQ +R + F	3,50 a	62,50 a	3,42 a	1,55 b	12,24 a

* As médias de cada coluna seguidas pela mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (5% de significância). UCCBc5 (1), (2), (3): 1, 2, 3 doses de inoculante respectivamente; ACQ: adubação química convencional;

R: Regente; F: Furadan.

Os dados de acúmulo de N na parte aérea, descritos na tabela 4, mostraram que plantas que receberam inoculação com as três doses de inoculante contendo a bactéria UCCBc5 e que foram tratados com uma mistura de furadan e regente não diferiram estatisticamente com o tratamento que recebeu adubação química convencional. Verificou-se, que a pesar destes tratamentos não terem diferido estatisticamente, houve incremento de 0,55 g de N nas plantas inoculadas com UCCBc5. Ao considerar as plantas inoculadas com 1 e 2 doses verificou-se que estas apresentaram 6,74 g (52,69%) e 3,40 g (26,58%) de N, respectivamente, a menos que as que receberam 3 doses de inoculante, estes resultados permitem afirmar que houve influência das doses de inoculante. Segundo Canuto *et al.* (2007), diferentes metodologias são utilizadas para inocular bactérias diazotróficas endofíticas em plantas de cana-de-açúcar e que os efeitos negativos da inoculação de bactérias diazotróficas em plantas de cana-de-açúcar podem estar associados à elevada carga bacteriana inoculada. Resultados obtidos por Silva *et al.* (2007) utilizando diferentes inoculantes proporcionaram a colonização das raízes, parte aérea e do tolete, mantendo populações superiores a 106 células por

g de tecido fresco, número que pode ser adequado para a promoção do crescimento das plantas podendo promover ganhos significativos de biomassa nesta fase de estabelecimento da cultura de cana-de-açúcar.

A utilização de inoculantes contendo microrganismos de interesse para a cana-de-açúcar poderá contribuir para a promoção do crescimento destas plantas e promover ganhos significativos de biomassa na fase de estabelecimento da cultura (Silva *et al.*, 2007). A fixação biológica do N₂ é um processo significativo que, segundo estimativas, fornece entre 139 milhões e 170 milhões de toneladas de N por ano para a biosfera, valores superiores aos 65 milhões aplicados como fertilizantes. Diante do custo atual da energia fóssil e da necessidade de fertilizantes nitrogenados para a produção de alimentos, é grande o interesse pela FBN e o melhoramento da sua eficiência (Pimentel, 1998). Evidências recentes indicam que a fixação biológica de nitrogênio pode contribuir significativamente em até 60% de todo o N acumulado pelas plantas de cana-de-açúcar (Bodey *et al.*, 2001; Xavier, 2002). A possibilidade de se substituir o fertilizante nitrogenado com a fixação de nitrogênio deve ser considerada, pois esta é econômica e ambientalmente vantajosa

(Reis, 2003). Portanto a eliminação da adubação nitrogenada na cultura da cana-de-açúcar, como já foi obtido para a soja, será decisiva para tornar esta cultura mais econômica e energeticamente mais positiva.

CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos e de acordo com a metodologia utilizada no presente trabalho pode concluir-se que:

As bactérias isoladas UCCBc1 e UCCBc5 apresentam capacidade e eficiência de fixar o nitrogênio atmosférico.

A estirpe UCCBc5 é resistente ao furadan e ao regente e possui capacidade fixadora em condições de campo.

Existe relação dose de inoculante/eficiência de fixação de nitrogênio.

BIBLIOGRAFIA

- Baldani, J.I., B. Pot, G. Kirchhof, E. Falsen, V. Baldani, F. Olivares, B. Hoste, K. Kersters, A. Hartmann, M. Gillis and J. Döbereiner. 1996. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of "*Pseudomonas*" *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen within the genus *Herbaspirillum*. International Journal of Systematic Bacteriology 46(3): 802-810.
- Bergersen, F.J. 1980. Measurement of nitrogen fixation by direct means. pp. 65-110. In: Bergersen, F.J. (ed.). Methods for evaluating biological nitrogen fixation. Wiley-Interscience, New York. 712 p.
- Boddey, R.M., J.C. Polidoro, A.S. Resende, B.J. Alves and S. Urquiaga. 2001. Use of ^{15}N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N_2 fixation to sugar cane and other grasses. Australian Journal of Plant Physiology 28(9): 889-895.
- Boddey, R.M., S. Urquiaga, B.J. Alves and V.M. Reis. 2003. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. Plant and Soil 252(1): 139-149.
- Canuto, E.L. W. Pereira, G.S. Hipólito, F.L. Olivares e V.M. Reis. 2007. Densidade de inóculo misto de bactérias endofíticas em toletes de cana-de-açúcar. In: Anais XXXI Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. Gramado.
- Conquistas e desafios da ciência do solo brasileira: anais. SBSC, Porto Alegre. 3 p. CD-ROM.
- CONAB. 2011. Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil, <http://www.Conab.gov.br/>; consulta: junho 2011.
- Combe, M.L., J.L. Pons, R. Sesboue and J.P. Martin. 1994. Electrophoretic transfer from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: a new method to characterize multilocus enzyme genotypes of *Klebsiella* strains. Applied and Environmental Microbiology 60(1): 26-30.
- Döbereiner, J. 1977a. Fixação de nitrogênio em gramíneas. Revista Brasileira de Ciência do Solo 1: 1-54.
- Döbereiner, J. 1977b. Plant genotype effects on nitrogen fixation in grasses. pp. 325-334. In: Muhammed, A., R. Aksel and R. Borstel. (eds.). Genetic diversity in plants. Plenum Publishing Corporation, New York. 506 p.
- Döbereiner, J. 1992. Recent changes in concept of plant bacteria interactions endophytic N_2 fixing bacteria. Ciência e Cultura 44(5): 310-313.
- Döbereiner, J., V.L. Baldani e J.I. Baldani. 1995. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa-SPI, Itaguaí. Embrapa-CNPAB, Brasília. 60 p.
- Donato, M.V.T., A.G. Andrade, E.S. Souza, e J.G. França. 2003. Metabolismo de plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de nitrogênio. Pesquisa Agropecuária Brasileira 38(12): 1373-1379.
- Dong, Z., M.J. Canny, M.E. McCully, R. Roboredo, C.F. Cabadilla, E. Ortega and R.A. Rodes. 1994. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems (A new role for the apoplast). Plant Physiology 105(4): 1139-1147.
- Figueiredo, M.V., H.A. Burity, N.P. Stamford, e C.E. Silva. 2008. Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura. Editora Agro livros, Brasil. 566 p.
- Lainé, P., A. Ourry and J. Boucaud. 1995. Shoot control uptake rates roots of *Brassica napus* L.: Effects of localized nitrate supply. Planta 196(1): 77-83.

- Lima, E., R. Boddey and J. Döbereiner. 1987. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using on ^{15}N aided nitrogen balance. *Soil Biology and Biochemistry* 19(2): 165-170.
- Loiret, F.G. 2004. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp from sugarcane. *Journal Applied Microbiology* 97(3): 504-511.
- Magnani, G.S. 2005. Diversidade de bactérias endofíticas em cana-de-açúcar. Curitiba- PR, 2005. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, 92 p.
- Moreira, F.M. e J.O. Siqueira. 2006. Microbiologia e bioquímica do solo. Segunda edição. Editora UFLA, Brasil. 729 p.
- Oliveira, A.L., E.L. Canuto, V.M. Reis and J.I. Baldani. 2003. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* 34(1): 59-61.
- Oliveira, J.B., M.N. Camargo, M. Rossi e B. Calderano. 1999. Mapa pedológico do Estado de São Paulo: legenda expandida. Instituto Agronômico EMBRAPA Solos, Campinas. 64 p.
- Pimentel, C. 1998. Metabolismo de carbono na agricultura tropical. Seropédica: Edur. Rio de Janeiro. 159 p.
- Raij, B.V., H. Cantarella, J.A. Quaggio e A.M. Furlani. 1997. Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. Instituto Agronômico/Fundação Campinas. Boletim Técnico 100. 285 p.
- Reis, V.M., J.I. Baldani, V.L. Baldani and J. Döbereiner. 2000. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. *Critical Reviews in Plant Science* 19(3): 227-247.
- Reis, F.B., L.G. Silva, V.M. Reis and J. Döbereiner. 2000. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35(5): 985-994.
- Resende, A.S. 2000. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) como suporte da fertilidade nitrogenada dos solos e da produtividade da cultura de cana-de-açúcar: uso de adubos verdes. Seropédica – RJ. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 101 p.
- Sala, V.M., A.P. Silveira e E.J. Cardoso. 2007. Capítulo 6: Bactérias diazotróficas associadas a plantas não-leguminosas. pp. 97-115. Em: Silveira, A.P. e S. Freitas. (ed.). Microbiota do solo e qualidade ambiental. Instituto Agronômico Campinas, São Paulo. 312 p.
- Silva, M.F., C.S. Antonio, J.B. Carneiro, N.G. Rumjanek, G.R. Xavier e V.M. Reis. 2007. Dinâmica populacional de microrganismos diazotróficos em toletes germinados de cana-de-açúcar var. RB 72-454 utilizando diferentes veículos inoculantes. In: Anais XXXI Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. Gramado. Conquistas e desafios da ciência do solo brasileira: anais. SBCS, Porto Alegre. 3 p. CD-ROM.
- Salomone, I.G. and J. Döbereiner. 1996. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biology and Fertility of Soils* 21(3): 193-196.
- Sarruge, J.R. e H.P. Haagg. 1974. Análises químicas em plantas. ESALQ, Universidade de São Paulo. Editora Livrocere, Piracicaba. 56 p.
- Urquiaga, S., R.M. Lima, R.P. Xavier, A.S. Resende, B.J. Alves e R. Bodey. 2003. Avaliação da eficiência do processo de fixação biológica do nitrogênio em diferentes variedades e cana-de-açúcar. *Agronomia* 37(1):55-58.
- Xavier, R.P. 2002. Adubação verde em cana-de-açúcar: influência na nutrição nitrogenada e na decomposição dos resíduos da colheita. Seropédica – RJ, 2002 Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 78 p.
- Zilli, J.E., N.G. Rumjanek, F.R. Freire, e M.C. Neves. 2000. Levantamento de rizóbios isolados de nódulos de caupi cultivado em amostras de solo do Cerrado do Estado Piauí. EMBRAPA Seropédica, RJ, Documento No 125. 25 p.