



Universidade Federal Rural de Pernambuco
Departamento de Agronomia - Microbiologia do Solo

Diversidade e potencial fixador de nitrogênio por bactérias endofíticas em capim pangolão (*Digitaria pentzii Stent*) nos diferentes ecossistemas de Pernambuco

Relatório de atividades realizadas até Março de 2020
Processo BIC-0280-5.01/19

Lucas Berenger Santana
Graduação: Agronomia – UFRPE - Sede
Programa: PIBIC/FACEPE

Orientador: Mario de Andrade Lira Junior

Recife, Pernambuco –Agosto, 2019 – Julho, 2020

Resumo

A associação de microorganismos promotores de crescimento com plantas é uma nova tecnologia sustentável promissora para a produção vegetal. A utilização de bactérias fixadoras de nitrogênio é considerada como uma potencial estratégia para diminuição de custos e aumento da sustentabilidade, proporcionando aos produtores menor dependência das empresas de fertilizantes. A fim de descobrir novas bactérias fixadoras para o nordeste brasileiro, foram coletadas amostras de capim pangolão (*Digitaria pentzii Stent*), uma espécie introduzida e adaptada que se desenvolve e reproduz vegetativamente em diferentes condições de clima e fertilidade, sendo encontrada nas três mesorregiões de Pernambuco. Para avaliar o potencial fixador dos microrganismos que se associam ao pangolão, as bactérias das partes vegetativas desta planta e do solo foram submetidas a crescimento *in vitro* para purificação, caracterização e quanto aos mecanismos promotores de crescimento para uma futura experimentação em campo das capacidades fixadoras. O projeto está sendo desenvolvido na Universidade Federal Rural de Pernambuco, campus Recife, juntamente com o Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA).

Introdução

Percebendo a necessidade de tecnologias mais sustentáveis e de baixo custo para o aumento da produtividade agrícola, as pesquisas têm se focado em entender melhor as interações entre as plantas, o solo e sua fauna/flora. Por muitos anos o intenso uso e desenvolvimento de técnicas antrópicas para o suprimento de nutrientes, regulação da estrutura do solo e uso de pesticidas para controle de doenças em plantas ofuscou a importância da biologia do solo como elemento na produção agrícola (BARRIOS, 2007). Porém há um crescente destaque dos inoculantes que transformaram o método de produção de algumas espécies como a soja, que atualmente é cultivada sem ou com pouca adubação nitrogenada, pela sua grande viabilidade econômica.

O nordeste brasileiro é uma região que dentre os diversos cultivos têm base forte na produção de gramíneas, a fim de alimentar as criações de gado, caprinos e ovinos. Buscando espécies adaptadas e produtivas para a região alguns estudos analisam a viabilidade de algumas forrageiras promissoras, como o capim pangolão. De origem africana é uma gramínea perene e fortemente estolonífera, com colmos simples ou ramificados na base, em linha reta ou dobrado nos nós, considerada resistente a seca, ao fogo e ao pastejo (COOK et al., 2005). Há registro de uso do capim pangolão em pastagem na Estação Experimental de Araripina do IPA, com a ausência de calagem ou adubação de cobertura ao longo de pelo menos 30 anos(TAVARES, 2017).

Esta gramínea além de bastante produtiva em cultivo adequado surpreende pelo seu desenvolvimento em uma área que há anos carece de adubação. Ainda não se conhece as interações e estratégias que esta gramínea utiliza para suprir sua demanda nutricional, porém dentre várias hipóteses, a explorada neste projeto refere-se ao potencial simbiótico destas plantas com microorganismos capazes de disponibilizar nutrientes do ambiente que se encontram na forma não

absorvível pela planta. O solo é um dos principais compartimentos da biosfera em termos de reservatório biológico, além de funcionar como um importante reservatório de água, suporte essencial do sistema agrícola e atividades humanas (CARDOSO, 2016). Aliado a isso a descoberta e o uso de algumas espécies de microrganismos nos cultivos de leguminosas se mostrou-se efetivo na redução do uso de fertilizantes e pesticidas.

Dentre os nutrientes essenciais para as plantas, o Nitrogênio (N), absorvido na forma de amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-), é o constituinte de vários compostos em plantas, destacando-se aminoácidos, ácidos nucleicos e clorofila. As principais reações bioquímicas em plantas e microrganismos envolvem a presença do N, o que o torna um dos elementos absorvidos em maiores quantidades por plantas cultivadas (NOVAIS et al., 2007).

A falta de nitrogênio disponível no solo pode interromper o desenvolvimento e o ciclo de vida das plantas, sendo insubstituível sua presença. A maioria das regiões tropicais, tanto os cultivados quanto os sob vegetação nativa, é pobre em nitrogênio (FIGUEIREDO, 2008). Sua forma mais abundante é um gás (N_2) e não está prontamente absorvível pela planta, dependendo de processos naturais de fixação ou nitrificação (raios ou ação de microrganismos) para completar a sua absorção e nutrição básica para desenvolvimento e propagação.

O nitrogênio é o principal nutriente para a manutenção da produtividade das forrageiras, sendo o principal constituinte das proteínas (WERNER, 1986). Este é também um nutriente presente nos fertilizantes mais consumidos no Brasil devido ao ciclo do nitrogênio ser muito instável e sua produção muito limitada naturalmente.

A ciclagem dos nutrientes é uma atividade básica do ecossistema que faz a reposição natural dos nutrientes no solo. Grande parte do fornecimento natural de nitrogênio no solo é por meio de bactérias diazotróficas, que realizam a redução de N_2 atmosférico em amônio (NH_4^+), tornando este elemento prontamente absorvível pelas plantas. Diversas espécies de plantas disponibilizam a energia obtida através da fotossíntese para esses microrganismos criando assim uma relação de simbiose. A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é considerada a principal fonte de N em sistemas agrícolas e naturais (HUNGRIA; VARGAS, 2000, VITOUSEK et al., 2013).

O uso de fixadores de nitrogênio através de microrganismos vem se mostrando de grande importância econômica mundial. No Brasil, o cultivo de soja, principalmente nos cerrados brasileiros, ao trocar a adubação nitrogenada pelo uso de inoculantes diminuiu o custo de adubação nitrogenada em até 95%, além de potencialmente aumentar o ganho médio anual da cultura em 8% (EMBRAPA, 2019). Este projeto foi conduzido para explorar, identificar e avaliar o potencial fixador de bactérias presentes no capim pangolão.

Este projeto busca identificar e avaliar o potencial uso de inoculantes em gramíneas, mais especificamente o capim pangolão. A identificação e cultivo destes microrganismos muitas vezes simbióticos com a planta é interessante economicamente quanto ambientalmente, sendo uma alternativa de baixo custo e sustentável para os produtores.

Objetivo geral

Avaliar a diversidade de estirpes com capacidade FBN para inoculação em Poaceae, mais especificamente em capim pangolão.

Objetivo específico

Isolar bactérias endofíticas fixadoras de N em capim pangolão em diferentes ambientes de Pernambuco;

Avaliar os mecanismos de promoção de crescimento das bactérias endofíticas, além da fixação biológica de nitrogênio;

Quantificar o potencial de obtenção de nitrogênio oriundo de fixação biológica em capim pangolão em condições de casa-de-vegetação.

Materiais e Métodos

Foram feitas coletas de capim pangolão nas três mesorregiões de Pernambuco: Zona da Mata, Agreste e Sertão, nos municípios de Nazaré da Mata (7°44'31"S 35°13'40"W), Gravatá (08°12'04"S 35°33'53"W) e Araripina (7.5766° S, 40.4976° W), respectivamente. O material foi recebido em laboratório e as plantas foram desinfestadas através de lavagem em álcool etílico 70% por um minuto, seguida por hipoclorito de sódio 2,5% por cinco minutos, depois 10 lavagens com água destilada.

Com a amostra fresca, foram pesados 10g de raízes, colmo e folhas, triturados em 90ml de solução salina autoclavada, descrita por DOBEREINER (1995). O material foi então diluído em 5 concentrações (10^{-3} a 10^{-7}) em tubos de 9ml. A partir de então foram pipetados 0,10ml destes extratos em meio semissólido NFB (DOBEREINER et al., 1995) dentro de frascos de penicilina (5ml), onde cresceram em BOD à 28° C.

Entre 4-7 dias após o crescimento foi feito o isolamento das bactérias em placas de petri com meio YMA (levedura-manitol-ágar) sólido em pH 7. Depois que crescidas em placa, as bactérias foram purificadas e caracterizadas fenotipicamente com os seguintes parâmetros: alteração do pH (ácido, neutro e alcalino), cor da colônia (amarelo, creme-amarelo ou creme), presença de muco na colônia (presente e ausente), conforme SILVA (2012), transparência e forma da colônia.

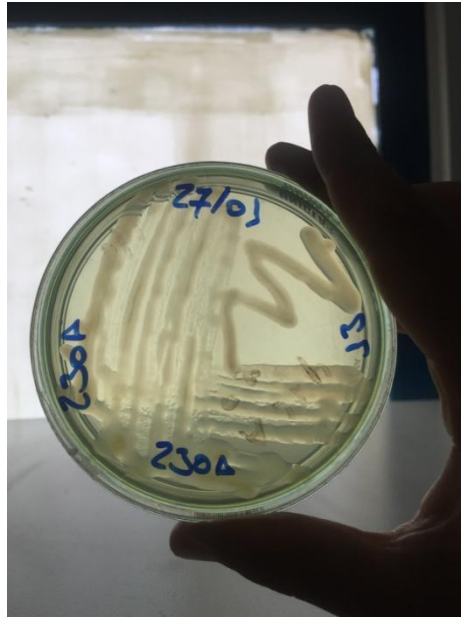


Figura 1 – Purificação de estirpes em placas de petri.

Para avaliação da alteração de pH, os meios de cultura foram preparados com azul de bromotimol, que em pH neutro tem a cor verde. A mudança de pH no meio de cultura causa uma alteração na cor das placas, amarelo quando se tornam ácido e azul quando alcaliniza. As demais características morfológicas foram avaliadas através da visualização colônia cultivada em microscópio.

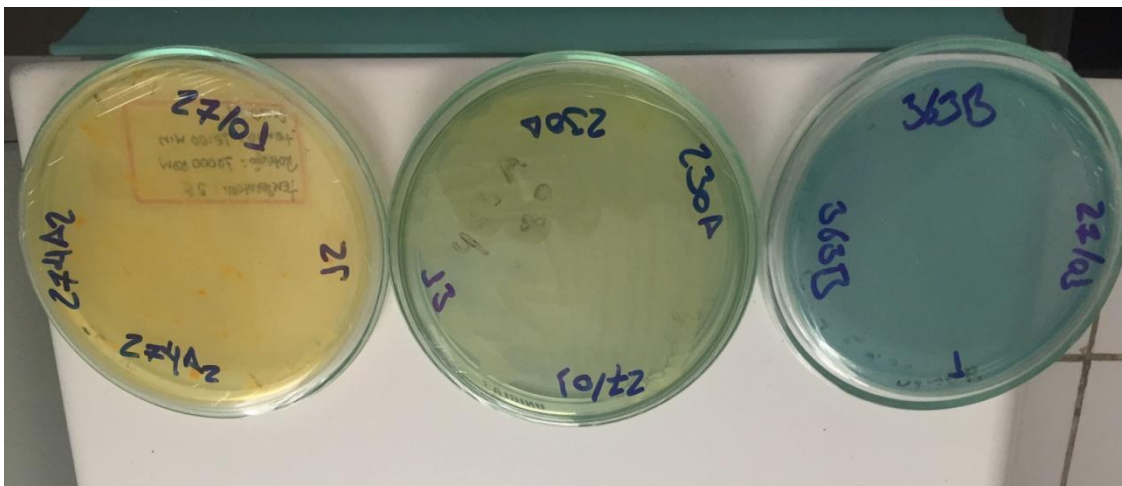


Figura 2 – Alteração de cor do meio de cultura de acordo com a mudança do pH provocada pelo crescimento das bactérias (ácido, neutro e alcalino, respectivamente)

Cada isolado cresceu em tubos de penicilina em meio BDA (batata-dextrose-ágar) sua colônia estabilizada com vaselina e colocada em freezer para armazenamento. As futuras análises e multiplicações dos isolados foram feitos através da repicagem deste material.

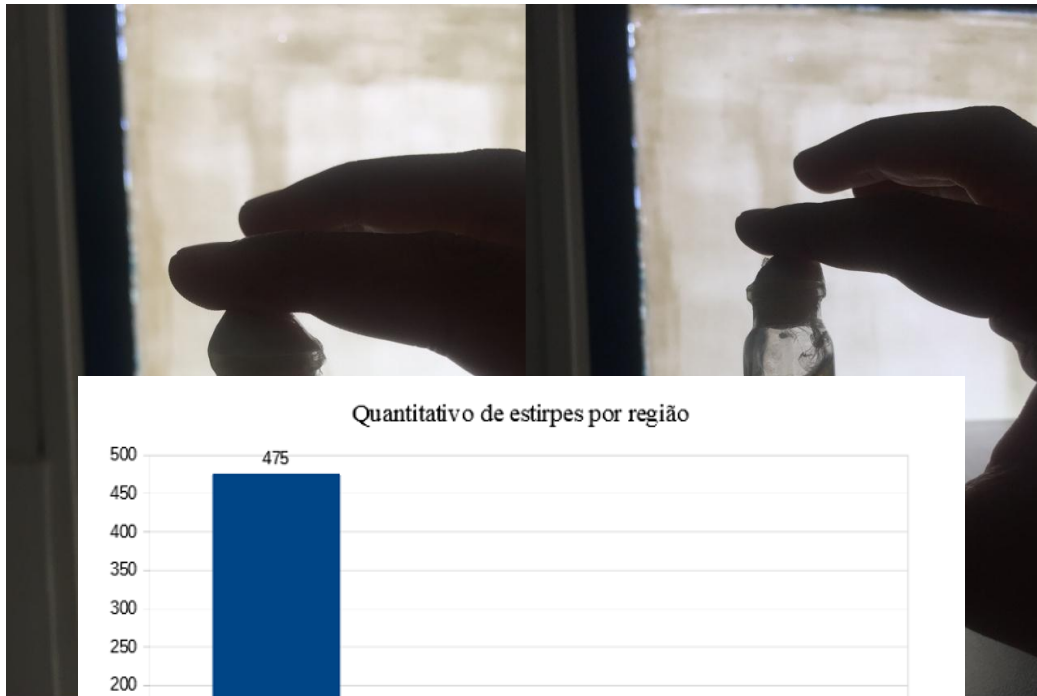


Figura 3 – estabilização tubos de armazenagem.

Crescimento e de colônias em penicilina para

Para avaliar a capacidade de fixação biológica de nitrogênio, os isolados foram submetidos a crescimento in vitro em tubos de penicilina com 10ml de meio NFB sem N. Foi feita uma análise qualitativa das culturas crescidas neste meio após 7 dias. A formação de uma película superficial indica a presença de microrganismos fixadores de nitrogênio (DOBEREINER et al., 1995)

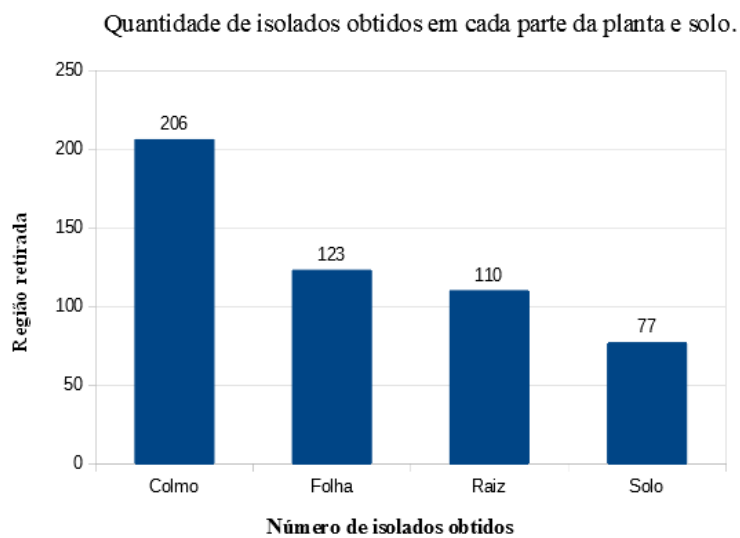
Resultados e Discussão

Obtiveram-se o total 516 estirpes de bactérias, sendo 92% de Araripina (475), 6,4% de Gravatá (33) e 1,6% de Nazaré da Mata (8). Destas, 206 foram obtidas pelo colmo, 123 da folha, 110 da raiz e 77 do solo.

Figura 4 – Divisão dos isolados obtidos de casa Mesorregião de Pernambuco.

Figura 5 – Divisão isolados obtidos em partes da planta e (Colmo, folha, raiz e

Na caracterização, os majoritariamente acidificar o meio, equilíbrio na cor das dos isolados e 69% isolados produziram



dos relação as solo solo).

isolados tenderam a houve um colônias dos muco.

A produção de muco geralmente é uma característica de bactérias de desenvolvimento rápido e presente em muitas estirpes de rizóbios que segundo Fuhrmann (1990) é um parâmetro positivo para previsão de associação simbiótica e nodulação. Isolados do Semiárido nordestino foram relacionados também com resistência a antibióticos de acordo com o tipo de muco produzido (MARTINS, 1997). Leguminosas que crescem em meio neutro tendem a se associar com bactérias de crescimento rápido, os quais geralmente acidificam o meio (NORRIS, 1965), dado que torna a maioria dos isolados promissores para fixação biológica de nitrogênio. Essa estratégia é interessante a planta e as bactérias provavelmente por uma questão de competitividade na rizosfera. Possivelmente esta característica seja correlata para relações associativas entre bactérias fixadoras em gramíneas.

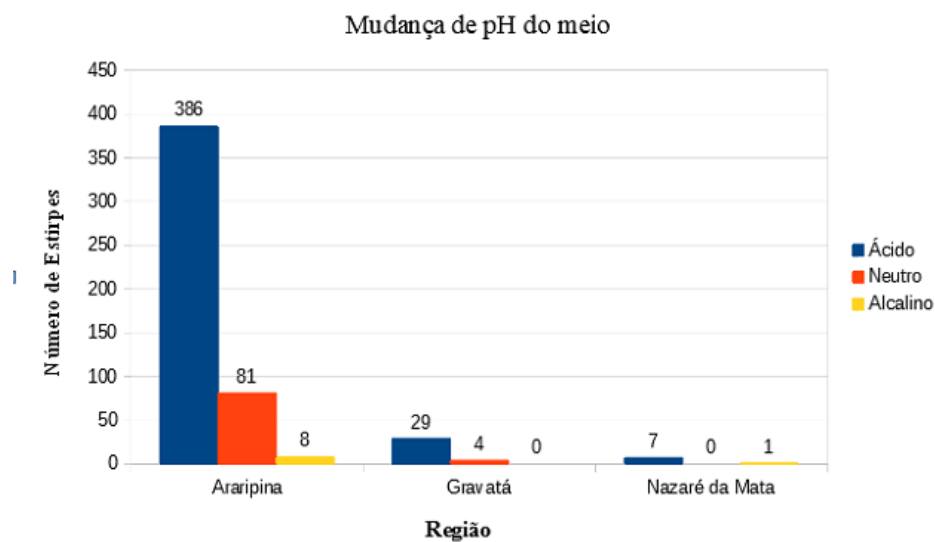


Figura 6 – Alteração de pH resultado da caracterização morfológica em meio YMA dividido entre as mesorregiões de Pernambuco.

Em relação a forma e transparência das colônias, a maioria tende a ser opaca e de formato circular. Estas características são importantes na determinação dos grupos de similaridade.

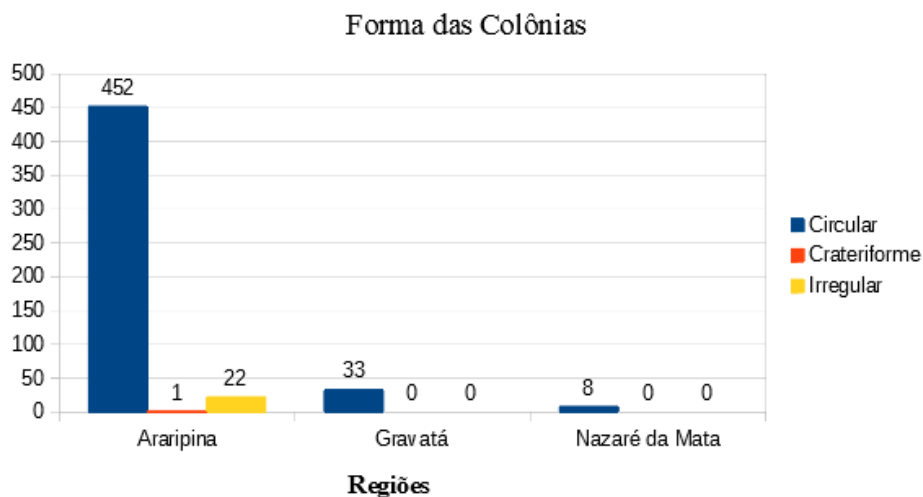


Figura 7
Caracterização morfológica da forma da colônia de bactérias de cada isolado dividido entre as mesorregiões de Pernambuco.

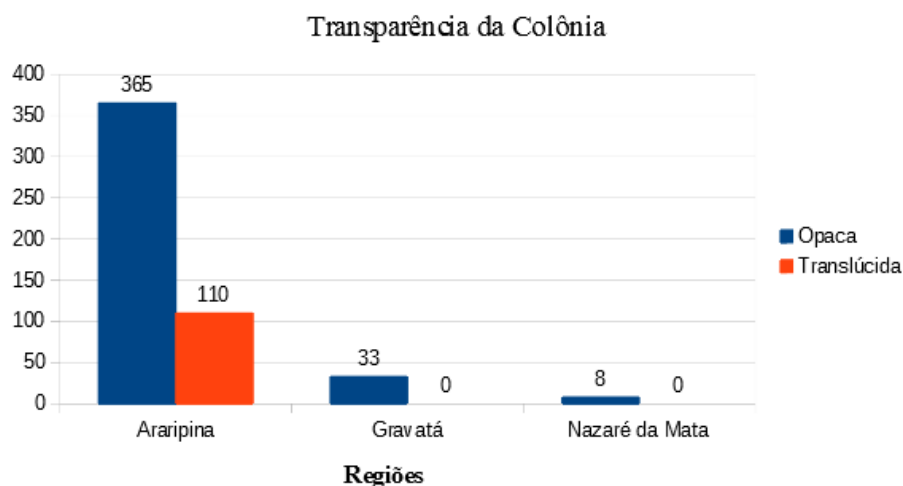


Figura 8 – Caracterização morfológica da transparência da colônia de bactérias de cada isolado dividido entre as mesorregiões de Pernambuco.

Até o mês de Março 237 isolados cresceram *in vitro* para determinação qualitativa da fixação biológica de nitrogênio, onde destes 111 estirpes formaram película superficial no meio testando positivo para FBN e 126 sem formação.

Fixação Biológica de Nitrogênio (N) <i>in vitro</i>		
Total	Positivo	Negativo
	237	111
		126

Tabela 1 – Resultado do teste de fixação biológica *in vitro* de 237 estirpes em meio NFB sem nitrogênio.

Considerações parciais

Os isolados purificados e estocados estão sendo cultivados para avaliar capacidade de promoção de crescimento em plantas. Até então metade dos isolados já foram testados qualitativamente para fixação biológica de nitrogênio, onde *in vitro* 46% das estirpes foram capazes de fixar N² atmosférico para desenvolvimento da colônia.

A presença de muco e a mudança de pH para ácido pode ser uma característica positiva para FBN, uma vez que se mostra presente em outras estirpes para essa função, mesmo que sejam leguminosas.

Dificuldades encontradas

A suspensão de atividades da Universidade Federal Rural de Pernambuco e do Instituto Agrônomo de Pesquisa de Pernambuco devido aos riscos de infecção pelo COVID-19 paralisou as atividades laboratoriais, tornando limitada a pesquisa.

Atividades paralelas desenvolvidas pelo bolsista

Apresentação de e-pôster na XIX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão (JEPEX).

Curso “Extração de DNA, PCR e eletroforese aplicadas ao estudo de fungos fitopatogênicos” pelo Laboratório de Fungos de solo (LAFSOL) da UFRPE.

Cronograma de Execução

Atividades	2019.2	2020.1
Preparo de meios para isolamentos das bactérias	X	
Coleta de amostras e análise de solo para análise química, física e microbiológica.	X	
Coleta de amostras (raiz,colmo e folhas do capim pangolão) para análise química e microbiológica.		
Repicagem/ crescimento em meios semi-sólidos	X	
Caracterização morfológica das bactérias		X
Purificação das estirpes isoladas		X
Mecanismos de promoção de crescimento		X
Autenticação dos isolados e avaliação de eficiência em casa de vegetação		
Tabulação dos dados		
Elaboração de relatório final		

Referências Bibliográficas

ANTUNES, Joseani M. **Inoculação reduz custos com fertilizantes na soja**. EMBRAPA, 23 set. 2019. Disponível em:

<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/46716731/inoculacao-reduz-custos-com-fertilizantes-antes-na-soja>. Acesso em: 7 jul. 2020.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.: J. I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: Embrapa-SPI, 60 p., 1995.

FIGUEIREDO, Márcia do Vale Barreto; BURITY, Hélio e Almeida; STAMFORD, Newton Pereira; SANTOS, Carolina Etienne de Rosália e Silva. **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 2008. 568 p.

FUHRMANN, J. Symbiotic Effectiveness of Indigenous Soybean Bradyrhizobia as Related to Serological, Morphological, Rhizobitoxine, and Hydrogenase Phenotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.224-229, 1990.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, Amsterdam, v. 65, n.2, p.151- 164, 2000.

NORRIS, D.O. Acid production by *Rhizobium* a unifying concept. **Plant and Soil**, The Hague, v.22, n.2, p.146-166, 1965.

NOVAIS, Roberto Ferreira *et al*, (ed.). **Fertilidade do Solo**. 1. ed. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo (SBCS), 2007.

SILVA, M. O.; FREIRE, F. J.; LIRA JR, M. A.; KUKLINSKY-SOBRAI, J.; DA COSTA, D. P.; LIRA-CADETE, L. Isolamento e prospecção de bactérias endofíticas e epifíticas na cana-de-açúcar em áreas com e sem cupinicida. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 36, n. 4, p. 1113-1121, 2012.

WERNER, J. C. Adubação de pastagens. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 49 p. (Boletim Técnico, 18) 1986.