

## Quantificação de bactérias diazotróficas associadas às folhas e raízes de *Dendrobium nobile*<sup>(1)</sup>

**Klever Cristiano Silveira**<sup>(2)</sup>; **Júlia Brandão Gontijo**<sup>(3)</sup>; **Gracielle Vidal Silva Andrade**<sup>(4)</sup>;  
**Fernanda Miranda de Oliveira**<sup>(5)</sup>; **Marihus Altoé Baldotto**<sup>(6)</sup>;  
**Lílian Estrela Borges Baldotto**<sup>(7)</sup>

<sup>(1)</sup> Trabalho executado com recursos do CNPq, da FAPEMIG e da FUNARBE.

<sup>(2)</sup> Estudante, *Campus* Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Rodovia LMG 818, Km 06, CEP 35690-000, Florestal, MG, Bolsista FUNARBIC/FUNARBE, [klever.silveira@ufv.br](mailto:klever.silveira@ufv.br); <sup>(3)</sup> Estudante, *Campus* Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Bolsista PROBIC/FAPEMIG, [julia.gontijo@ufv.br](mailto:julia.gontijo@ufv.br); <sup>(4)</sup> Estudante, *Campus* Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Bolsista PIBIC/CNPq, [gracielle.andrade@ufv.br](mailto:gracielle.andrade@ufv.br); <sup>(5)</sup> Estudante, *Campus* Florestal, Universidade Federal de Viçosa, [fernanda.m.miranda@ufv.br](mailto:fernanda.m.miranda@ufv.br); <sup>(6)</sup> Professor, *Campus* Florestal, Universidade Federal de Viçosa, [marihus@ufv.br](mailto:marihus@ufv.br); <sup>(7)</sup> Professora, *Campus* Florestal, Universidade Federal de Viçosa, [lilian.estrela@ufv.br](mailto:lilian.estrela@ufv.br).

**RESUMO:** Bactérias endofíticas habitam o interior dos vegetais, muitas das vezes em simbiose sendo bactérias associativas. Este filogenético bacteriano tem a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico disponibilizando e promovendo o crescimento do vegetal com menor ônus econômico e ambiental. O objetivo do trabalho foi realizar a quantificação de bactérias diazotróficas associadas às folhas e raízes de *Dendrobium nobile*. Amostras de folhas e raízes foram coletadas de uma planta matriz de orquídea pertencente à espécie *Dendrobium nobile*, mantida no orquidário da Universidade Federal de Viçosa *Campus* Florestal. O isolamento das bactérias diazotróficas associadas às folhas e raízes foi realizado por meio da técnica do Número Mais Provável usando os diferentes meios de cultura semi-sólidos JNFb, NFb, LGI, LGI-P, JMV e JMVl e consultando a tabela McCrady para três repetições por diluição. Os resultados obtidos sofreram transformação logarítmica e posteriormente foram calculadas as médias e o erro padrão da média para cada tratamento. Diferenças no número mais provável de bactérias diazotróficas foram observadas entre os diferentes meios. Nas amostras radiculares os meios LGI-P e JNFb apresentaram os maiores valores de log do NMP sendo 6.12 e 4.20 de célula por gramas de raiz respectivamente. Nas amostras foliares os meios LGI-P e JMVl apresentaram os maiores valores de log do NMP de células por grama de folha de 2.80 e 2.91, respectivamente. Conclui-se que bactérias diazotróficas habitam naturalmente folhas e raízes de *Dendrobium nobile*, com potencial para uso na formulação de inoculantes e/ou biofertilizantes.

**Termos de indexação:** fixação biológica de nitrogênio, microbiologia agrícola, floricultura.

### INTRODUÇÃO

Diversos processos no solo são desempenhados por microrganismos e um desses processos é a

fixação biológica do nitrogênio atmosférico, realizado por meio de bactérias conhecidas como diazotróficas, apresentando vida livre, ou associadas aos tecidos de vegetais (Halmann et al., 1997; Baldotto et al., 2008).

A capacidade das bactérias diazotróficas de fixar biologicamente o nitrogênio atmosférico impulsiona estudos de isolamento, caracterização e seleção de estirpes eficientes em promover o crescimento e desenvolvimento das plantas com o intuito de reduzir a utilização de fertilizantes industrializados (Baldotto et al., 2010). Para orquídeas já foram isoladas bactérias diazotróficas de diferentes gêneros, incluindo *Coelogyne*, *Dendrobium*, *Epidendrum*, *Laelia*, *Miltonia*, *Oncidium* e *Vanda* (Lange & Moreira, 2002). No entanto, dados sobre o real uso desses isolados ainda são escassos.

As orquídeas são plantas pertencentes à família Orchidaceae, sendo esta uma das maiores famílias de plantas existentes, apresentam diversas formas, cores e tamanhos e são muito apreciadas pela população para ornamentação e paisagismo (Faria et al., 2010). O mercado de plantas ornamentais apresenta em constante crescimento movimentando bilhões de reais sendo a orquídea uma das principais plantas a serem comercializadas (Reis, 2011).

Dentre as orquídeas mais comercializadas, destaca-se a espécie *Dendrobium nobile*, conhecida popularmente como olho de boneca, uma orquídea epífita, nativa de Birmânia, Índia, Tailândia e Indochina. Nestes lugares estas espécies crescem em árvores, desde as planícies até as montanhas frias do Himalaia a elevações de 1.400 metros (Silva, 1986).

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou quantificar bactérias diazotróficas associadas às folhas e raízes de *Dendrobium nobile* em diferentes meios de cultura.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Setor de Floricultura da Universidade Federal de Viçosa, *Campus Florestal* (UFV-CAF), localizada no município de Florestal, MG.

### Cultivo da planta matriz

A planta matriz de orquídea usada no presente trabalho, pertencente à espécie *Dendrobium nobile*, foi mantida no Orquidário da UFV-CAF. A planta foi cultivada em vaso de plástico preto de 3.0 dm<sup>3</sup>, contendo como substrato uma mistura de solo, composto orgânico e argila expandida. A planta foi mantida em viveiro coberto por sombrite (60 % de sombreamento) e manejadas conforme descrito em Faria et al. (2010), considerando-se os diferentes aspectos de cultivo, como, por exemplo, irrigação e controle fitossanitário.

### Contagem de bactérias diazotróficas

O isolamento de bactérias diazotróficas foi realizado conforme descrito por Döbereiner et al. (1995). Amostras de 1 g de folhas e 1 g de raízes foram imersas em 9 mL de solução salina (NaCl, 8,5 g L<sup>-1</sup>). A partir destas diluições (10<sup>-1</sup>) foram realizadas diluições seriadas tomando-se 1 mL da solução original em 9 mL da solução salina, até a diluição 10<sup>-6</sup>. Aliquotas de 100 µL das diferentes diluições foram transferidas, em triplicata, para frascos de vidro contendo 5 mL dos meios de cultura semi-seletivos JNFb, NFb, LGI, LGI-P, JMV e JMVl (Döbereiner et al., 1995), todos semi-sólidos e sem adição de nitrogênio. A formação de uma película aerotáxica típica na superfície do meio após 7 dias de incubação em câmara de crescimento a 30°C, foi considerado como crescimento positivo.

Os resultados do crescimento das bactérias diazotróficas nos meios semi-sólidos foram utilizados para o cálculo do número mais provável (NMP) de bactérias de acordo com a tabela de McCrady para três repetições por diluição.

### Análise estatística

Os resultados do NMP de bactérias associadas às folhas e raízes de *Dendrobium nobile* obtidos na tabela McCrady foram submetidos à transformação logarítmica, em seguida, foram calculadas as médias e o erro padrão da média para cada tratamento.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A falta de estruturas visíveis durante o processo de infecção e colonização das plantas pelas bactérias diazotróficas endofíticas requereu o

desenvolvimento de meios específicos para o isolamento das mesmas, como por exemplo, os meios semi-sólidos JNFb, NFb, LGI, LGI-P, JMV e JMVl (Baldani et al., 1996).

Com o uso desses meios de cultura foi possível verificar que bactérias diazotróficas habitam naturalmente as folhas e raízes de *Dendrobium nobile* (Figuras 1 e 2). Foi observado o crescimento de bactérias fixadoras de nitrogênio com o uso dos meios JNFb, NFb, LGI, LGI-P, JMV e JMVl. O log do número mais provável de bactérias diazotróficas por grama de folha de *Dendrobium nobile* nesses meios de cultura foram de 0.87, 1.73, 0.95, 2.8, 1.73, 2.91 respectivamente (Figura 1). Observou-se para amostras radiculares que o log do número mais provável de bactérias diazotróficas por grama de raiz foram de 4.20, 1.93, 0.87, 6.12, 1.73, 3.18, respectivamente (Figura 2).

Segundo Baldani et al. (1996) o meio NFb e JNFb permitiu o isolamento das bactérias do gênero *Herbaspirillum* spp e *Azospirillum* spp, e o meio JMV, o isolamento de *Burkholderia* spp, o meio LGI-P o isolamento de *A. diazotrophicus*. De acordo com Santos (2008) o meio JMVl também possibilitou o isolamento de *Burkholderia* spp. Para orquídeas, por exemplo, Lange & Moreira (2002) isolaram, com o uso do meio LGI, a bactéria *Azospirillum amazonense* de raízes e rizosfera de diferentes espécies de orquídeas.

Além da capacidade de fixar nitrogênio atmosférico é de interesse que essas bactérias possuam outras características importantes para o desenvolvimento vegetal, como solubilizar fosfatos inorgânicos, sintetizar compostos que promovam o crescimento radicular ou que apresentem efeito antagonico aos fitopatógenos (Lange & Moreira, 2002).

Para orquídeas, Tsavlekova et al. (2001; 2003; 2004; 2007) isolaram das espécies *Acampe papillosa* e *Dendrobium moschatum* bactérias dos gêneros *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Flavobacterium*, *Gluconobacter*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*. No entanto, dados sobre o uso dessas bactérias como inoculantes e/ou biofertilizantes ainda são escassos.

As bactérias que cresceram em os diferentes meios de cultura foram isoladas e futuramente caracterizadas para compor a coleção de bactérias diazotróficas da UFV-CAF com a perspectiva de selecionar as estirpes promotoras de crescimento de plantas de *Dendrobium nobile*.



### CONCLUSÕES

Bactérias diazotróficas são encontradas naturalmente nas folhas e em maior quantidade nas raízes de *Dendrobium nobile*.

Todos os meios de cultura permitiram o crescimento de bactérias diazotróficas associadas a *Dendrobium nobile*.

As bactérias presentes nos tecidos foliares cresceram em maior quantidade nos meios LGI-P e JMVl e nas raízes nos meios LGI-P e JNFb.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação Arthur Bernardes (FUNARBE, Funarpeq 2011-2012), à Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, APQ 03929-10) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo 470567/2011-2) pelos auxílios financeiros e bolsas concedidas.

### REFERÊNCIAS

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. & DÖBEREINER, J. Meios de cultura específicos para o isolamento de bactérias endofíticas que fixam o N<sub>2</sub> atmosférico. Comunicado Técnico, Embrapa Agrobiologia, n.12, 1996. 4p.

BALDOTTO, L. E. B. & OLIVARES, F. L. Phyllo epiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system. Canadian Journal of Microbiology, 54:918-931, 2008.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; OLIVARES, F. L.; VIANA, A. P. & BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) cultivar Vitória durante a aclimatização. Revista Brasileira de Ciência do Solo, 34:349-360, 2010.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D. & BALDANI, J. I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa Agrobiologia, Seropédica, 1995, 66p.

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M. & CARVALHO, J. F. R. P. Cultivo de orquídeas. Londrina, PR: Editora Mecenaz, 2010. 208p.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F. & KLOPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology, 43:895-914, 1997.

LANGE, A. & MOREIRA, F. M. S. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de orchidaceae e de outras famílias vegetais. Revista Brasileira de Ciência do Solo, 26:529-533, 2002.

REIS, J. N. P. Cultivo de orquídeas: uma opção à agricultura familiar? Encontro da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica, n.9, Brasília, 4-8p., 2011.

SANTOS, S.T. Biogeografia de bactérias culturáveis associadas a fruteiras tropicais. 92 f. Tese (Doutorado em biociências e Biotecnologias) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos do Goytacazes, 2008.

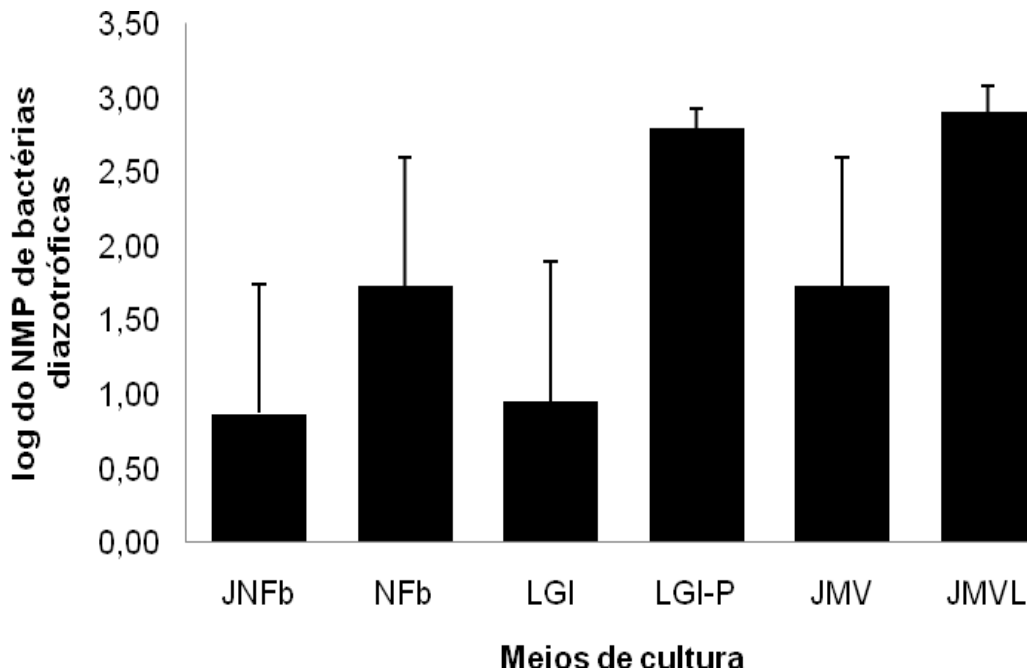
SILVA, W. Cultivo de orquídeas no Brasil. São Paulo: Nobel, 1986.

TSAVKELOVA, E. A.; CHERDYNTSEVA, T. A.; LOBAKOVA, E. S.; KOLOMEITSEVA, G. & NETRUSOV, A. I. Microbiota of the orchid rhizoplane, Mikrobiology, 70:567-573, 2001.

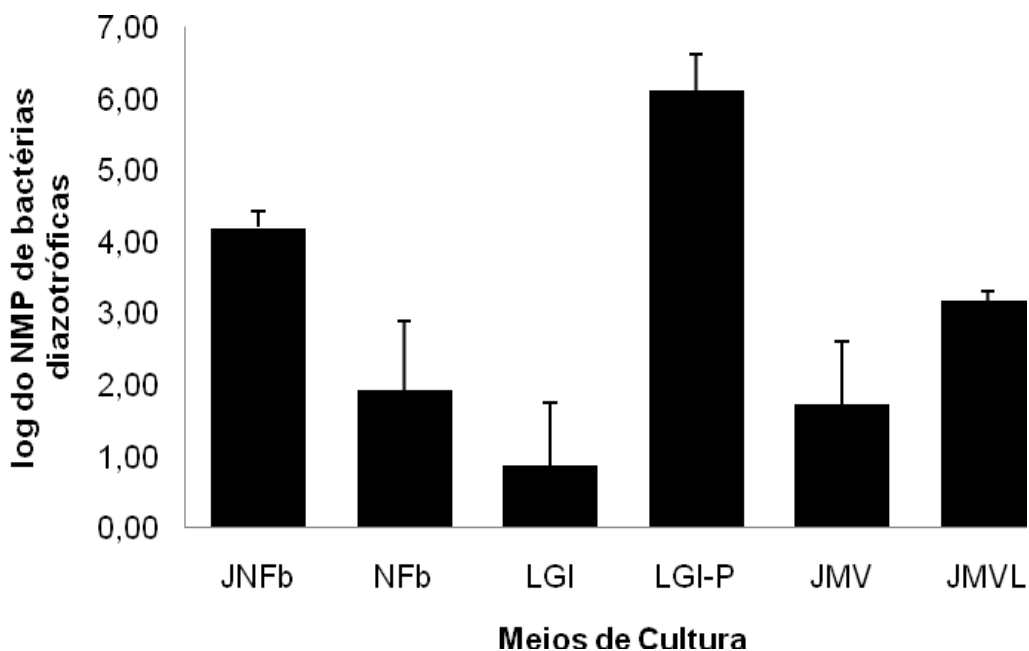
TSAVKELOVA, E. A.; LOBAKOVA, E. S.; KOLOMEITSEVA, G. L.; CHERDYNTSEVA, T. A. & NETRUSOV, A. I. Localization of associative cyanobacteria on the roots of epiphytic orchids, Mikrobiology, 72:99-104, 2003.

TSAVKELOVA, E. A.; CHERDYNTSEVA, T. A. & NETRUSOV, A. I. Bacteria associate with the roots of epiphytic orchids, Mikrobiology, 73:825-831, 2004.

TSAVKELOVA, E. A.; CHERDYNTSEVA, T. A.; BOTINA, S. G. & NETRUSOV, A. I. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. Microbiological Research, 162:69-76, 2007.



**Figura 1** – Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas associadas às folhas de *Dendrobium nobile* nos diferentes meios de cultura (log do número de células por grama de folha).



**Figura 2** – Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas associadas às raízes de *Dendrobium nobile* nos diferentes meios de cultura (log do número de células por grama de raiz).