

## Quantificação de bactérias diazotróficas associadas às raízes e folhas de *Epidendrum secundum*<sup>(1)</sup>.

**Gracielle Vidal Silva Andrade**<sup>(2)</sup>; **Klever Cristiano Silveira**<sup>(3)</sup>; **Matheus Pereira Simões**<sup>(2)</sup>; **Júlia Brandão Gontijo**<sup>(4)</sup>; **Marihus Altoé Baldotto**<sup>(5)</sup>; **Lílian Estrela Borges Baldotto**<sup>(5)</sup>.

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

<sup>(2)</sup> Estudante, Campus de Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Rodovia LMG 818, Km 06, CEP 35690-000, Florestal, MG, Bolsista PIBIC/CNPq, [gracielle.andrade@ufv.br](mailto:gracielle.andrade@ufv.br); <sup>(3)</sup> Estudante, Campus de Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Rodovia LMG 818, Km 06, CEP 35690-000, Florestal, MG, Bolsista FUNARBIC/FUNARBE; <sup>(4)</sup> Estudante, Campus de Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Rodovia LMG 818, Km 06, CEP 35690-000, Florestal, MG, Bolsista PROBIC/FAPEMIG; <sup>(5)</sup> Professor (a), Campus de Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Rodovia LMG 818, Km 06, CEP 35690-000, Florestal, MG.

**RESUMO:** A intensificação do uso de inoculantes contendo bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico nos sistemas de cultivo contribui para o aumento da produção com menor encargo ambiental, no entanto, estudos prévios de isolamento de bactérias são necessários visando posterior seleção e formulação de inoculantes. O presente trabalho objetivou quantificar bactérias diazotróficas associadas às raízes e folhas de orquídea. Amostras de raízes e folhas foram coletadas de uma planta matriz de *Epidendrum secundum*, mantida no orquidário da UFV-CAF. O isolamento das bactérias diazotróficas associadas às raízes e folhas foi realizado por meio da técnica do Número Mais Provável usando os diferentes meios de cultura 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 depois 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. O meio JMVl nas raízes e nas folhas foi o que concedeu o crescimento de uma maior quantidade de bactérias. Nas raízes foi seguido pelos meios LGI-P, JNFb, JMV, NFb e LGI, porém nas folhas foi seguido pelos meios JNFb, LGI-P, NFb, JMV e LGI. O log do número mais provável de bactérias diazotróficas por grama de raiz de orquídea variou de 0 a 7 unidades e na folha variou de 0 a 5. Concluímos que bactérias diazotróficas habitam naturalmente as raízes e folhas de *Epidendrum secundum*, com potencial para formulação de inoculantes e biofertilizantes.

**Palavras-chave:** fixação biológica de nitrogênio, floricultura, bactérias endofíticas.

### INTRODUÇÃO

O cultivo comercial de *Epidendrum secundum* representa uma atividade de grande importância

econômica no agronegócio florístico mundial, devido a sua venda direta e principalmente ao seu uso na obtenção de híbridos de orquídeas (Faria et al., 2010). Para o cultivo de orquídeas propagadas *in vitro*, por exemplo, a formulação de inoculantes contendo bactérias promotoras de crescimento seria importante para acelerar o desenvolvimento das plântulas e diminuir o longo período necessário de aclimatização das mudas em casa-de-vegetação.

Com o crescente aumento dos custos e dos impactos ambientais gerados pela fabricação e uso de fertilizantes químicos a busca de métodos sustentáveis tem incentivado os estudos com bactérias diazotróficas, uma vez que, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) favorece o crescimento e desenvolvimento de plantas sendo usada em várias culturas (Hallmann et al., 1997; Baldotto et al., 2010).

As bactérias diazotróficas, podem colonizar a região rizosférica e filosférica, o interior (endofíticas) ou superfície (epifíticas) de tecidos vegetais como potenciais agentes do crescimento e proteção de plantas (BODDEY et al., 2003; FRANCHE et al., 2009). Estas bactérias são descritas por serem capazes de fixar nitrogênio atmosférico, produzir hormônios vegetais, solubilizar fosfato, sintetizar sideróforos, controle biológico e a indução de resistência sistêmica na planta hospedeira (Hallmann et al., 1997). Deste modo o isolamento, caracterização e seleção de bactérias promotoras de crescimento visando, portanto, a possibilidade de agregar valor em propágulos de orquídeas ao inoculá-los com estirpes selecionadas, supostamente dotará o setor de floricultura e plantas ornamentais de maior competitividade na produção e comercialização de seus produtos agrícolas. E conseqüentemente melhor conservação dos recursos ambientais.

Dentro desse contexto, o presente trabalho objetivou quantificar bactérias diazotróficas associadas às raízes e folhas de *Epidendrum secundum* em diferentes meios de cultivo.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Setor de Floricultura pertencente à Universidade Federal de Viçosa *Campus Florestal* (UFV-CAF).

### Cultivo da planta matriz

A orquídea matriz usada no presente trabalho, pertencente à espécie *Epidendrum secundum* foi cultivada no Orquidário da UFV-CAF. A planta foi mantida em telado coberto por sombrite com percentuais de sombreamento (60%), cultivada em vasos de cerâmica arredondado com furos laterais e no fundo de modo a facilitar aeração e drenagem das raízes, contendo como substrato fibra de coco em pó. A planta foi manejada conforme descrito em Faria et al. (2010) e Paula & Silva (2011) considerando os diferentes aspectos de cultivo, como, por exemplo, adubação, controle fitossanitário, irrigação, poda, para o genótipo específico.

### Contagem de bactérias diazotróficas

O isolamento de bactérias diazotróficas foi realizado conforme descrito por Döbereiner et al. (1995). Amostras de 1 g de raízes e folhas foram imersas em 9 mL de solução salina (NaCl, 8,5 g L<sup>-1</sup>) separadamente. 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>-7</sup>. Alíquotas de 100 µL das diferentes diluições foram transferidas, em triplicata, para frascos de vidro contendo 5 mL dos meios de cultura JNFb, NFb, LGI, LGI-P, JMV e JMVl (Döbereiner et al., 1995; Santos, 2008), todos semi-sólidos e sem adição de nitrogênio. A formação de uma película aerotática 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 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 partir das observações pioneiras de Döbereiner e Day (1976) citado por Sala et al. (2007) de que o uso de meios semi-sólidos, sem N, é a condição ideal para o isolamento de diazotróficos *in vitro*, pois são microaerófilos quando não supridos com N mineral, esse método tem sido empregado extensivamente no isolamento e caracterização de microrganismos fixadores de nitrogênio associados a diferentes plantas e condições de clima e solo. A falta de estruturas visíveis durante o processo de infecção e colonização das plantas pelas bactérias diazotróficas endofíticas e epifíticas 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; Döbereiner et al., 1999; Santos, 2008).

Com o uso desses meios foi possível verificar que bactérias diazotróficas são encontradas nas raízes e folhas de *Epidendrum secundum*, como observado na **figura 1** (raízes) e na **figura 2** (folhas). Foi observado na **figura 1** uma maior ocorrência de bactérias nas raízes com o uso do meio JMVl, seguido pelos meios LGI-P, JNFb, JMV, NFb. No meio LGI não houve crescimento de bactérias. O número de bactérias diazotróficas por grama de raiz nos diferentes meios de cultura variou, em média, entre 0 a 7 unidades logarítmicas (**Figura 1**). Conforme verificado na **figura 2** não ocorreu crescimento de bactérias no meio LGI, porém, foi observado uma maior ocorrência de bactérias com o uso do meio JMVl, posteriormente os meios JNFb, LGI-P, NFb e JMV. O número de bactérias diazotróficas por grama de folhas nos diferentes meios de cultura variou, em média, entre 0 a 5 unidades logarítmicas (**Figura 2**).

Segundo Döbereiner et al. (1999) os meios de cultura semi-sólidos JNFb, NFb, LGI, LGI-P e JMV permitiram o isolamento das bactérias *Herbaspirillum* spp, *Azospirillum* spp, *Azospirillum amazonense*, *Acetobacter* spp, *Burkholderia* spp., respectivamente.

As associações naturais entre orquídeas e bactérias endofíticas e epifíticas foram também relatadas nas espécies de orquídeas *Laelia purpurata*, *Oncidium varicosum*, *Miltonia flavescens*, *Dendrobium moschatum*, *Vanda tricolor*, *Laelia flava brasil*, *Dendrobium fimbriatum*, *Cymbidium*, *Dendrobium nobilis* e *Coelogyne lawrenceana* (Lange e Moreira, 2002); *Acampe papillosa*, *Dendrobium moschatum* (Tsavkelova et al., 2003); *Cattleya walkeriana*, *Cyrtopodium paludicolum*, *Ionopsis utricularioides*, *Oeceoclades maculata*, *Phalaenopsis amabilis* e *Vanilla planifolia* (Galdiano



Júnior, 2009). Para *Epidendrum secundum*, também, são necessários estudos para quantificar, isolar e caracterizar bactérias com potencial de promoção de crescimento de plantas.

As bactérias que cresceram em os diferentes meios de cultura serão 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 *Epidendrum secundum*.

### CONCLUSÕES

1. Bactérias diazotróficas habitam naturalmente as raízes e folhas de *Epidendrum secundum*, com potencial para formulação de inoculantes e biofertilizantes.

2. Os meios JMV/L, JMV, LGI-P, JNFb e NFB, possibilitam o isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas às raízes e folhas de *Epidendrum secundum*.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, APQ 03929-10), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo 470567/2011-2) e à Fundação Arthur Bernardes (FUNARBE, Funarpeq 2011-12) pelos auxílios financeiros. Ao CNPq (Programa PIBIC/UFV) e FUNARBE (Programa FUNARBIC/UFV) pela bolsa de iniciação científica concedida.

### 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.; 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. R. Bras. Ci. 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.

DOBEREINER, J.; ANDRADE, V. O.; BALDANI, V. L. D. Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia. Seropédica, Rio de Janeiro. 1999. 39p.

BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R. & REIS, V. M. (2003) Endophytic nitrogen fixation in

sugarcane: present knowledge and future applications. Plant and Soil, 252: 139-149.

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

FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. Plant and Soil, The Hague, v. 321, p. 35-59, aug. 2009.

GALDIANO JÚNIOR, R.F. Isolamento, identificação e inoculação de bactérias produtoras de auxinas associadas às raízes de orquídeas. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP, Jaboticabal-SP, 2009. 67p. (Dissertação de Mestrado).

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. Can. J. Microbiol., 43: 895-914, 1997.

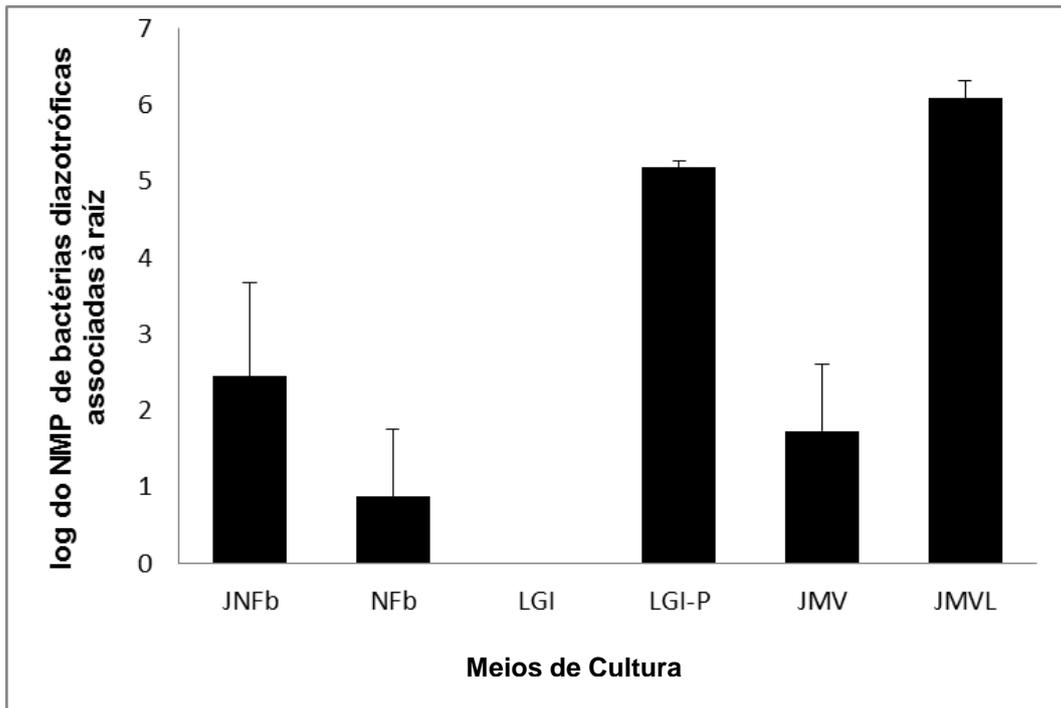
LANGE, A.; MOREIRA, F.M.A. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de Orchidaceae e de outras famílias vegetais. R. Bras. de Ci. Solo, 26: 535-543, 2002.

PAULA, C.C. & SILVA, H.M.P. Cultivo prático de orquídeas. 3 ed. Viçosa: UFV, 2011. 106p.

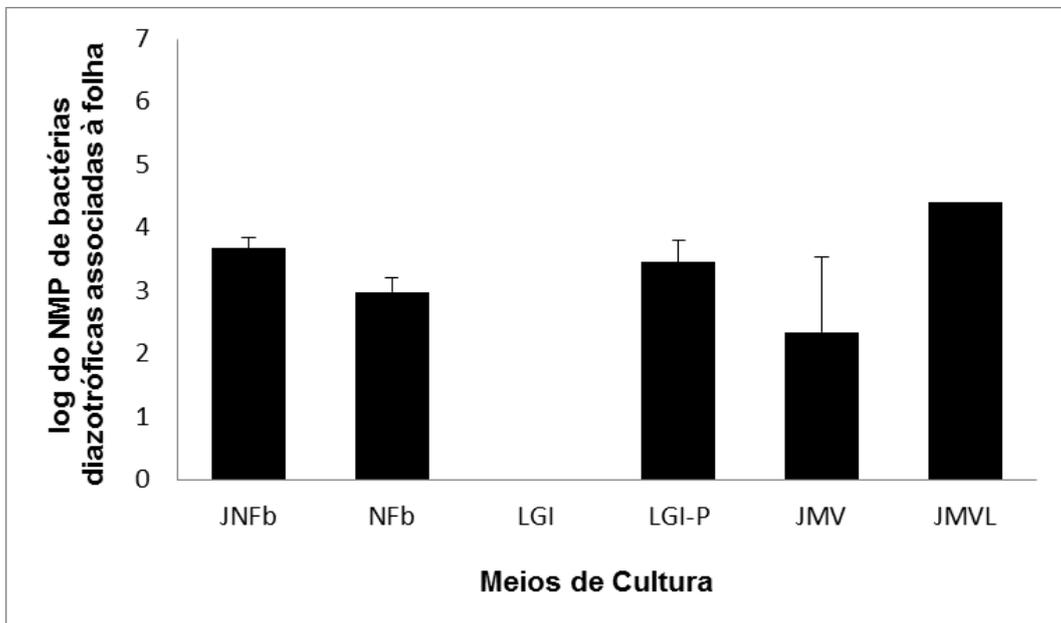
SALA, V.M.R.; SILVEIRA, A.P.D.; CARDOSO, E.J.B.N. Bactérias diazotróficas associadas a plantas não-leguminosas. In: SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S. Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental. Instituto Agronômico, Campinas. p. 97-116, 2007.

SANTOS, S.T. Biogeografia de bactérias culturáveis associadas às fruteiras tropicais. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, Campos dos Goytacazes, RJ, 2008. 105p. (Tese de Doutorado).

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, Mikrobiol., 72:99-104, 2003.



**Figura 1** – Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas associadas às raízes de *Epidendrum secundum* nos diferentes meios de cultivo (log do número de células  $g^{-1}$  de raízes).



**Figura 2** – Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas associadas às folhas de *Epidendrum secundum* nos diferentes meios de cultivo (log do número de células  $g^{-1}$  de folhas).