

SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS COM POTENCIAL PARA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO NA CULTURA DO ARROZ IRRIGADA POR INUNDAÇÃO

SCHMATZ, Raquel¹; NUNES, Rosângela S.G²; HICKMANN, Frederico¹; SALDANHA, José¹; GARLET, Cledir¹; GIACOMINI, Sandro³.

PALAVRAS-CHAVES: isolados; bactérias; meio de cultura.

INTRODUÇÃO

O arroz é considerado um produto de grande importância econômica em muitos países, constituindo-se alimento básico para cerca de três bilhões de pessoas (SOSBAI, 2012). Cultivado e consumido em todos os continentes, o arroz se destaca pela produção de cerca de 662 milhões de toneladas, ocupando uma área de cultivo de aproximadamente 158 milhões de hectares (SOSBAI, 2012). O Brasil possui uma produção anual entre 11 e 13 milhões de toneladas de arroz. A região sul do país concentra 50% da área cultivada e contribui com 77% da produção nacional de arroz (CONAB, 2013). O estado do Rio Grande do Sul (RS) possui a maior área plantada com 1066,6 mil hectares, com uma produção na safra 2011/2012 de 7.734 mil toneladas (CONAB, 2013).

Dentre as várias formas de aumentar a produção vegetal, destaca-se a importância do suprimento de nitrogênio (N), elemento importante na síntese de proteínas e enzimas que garantem a vida do vegetal. Os processos que se constituem fontes capazes de fornecer grandes quantidades de N às plantas são a decomposição da matéria orgânica do solo (MOS), a utilização de fertilizantes nitrogenados e a fixação biológica de nitrogênio (FBN) da atmosfera (CARVALHO, 2002).

A interação de bactérias diazotróficas com diversas culturas tem sido tema de pesquisas no mundo todo, devido ao seu potencial biotecnológico, evidenciado nos aumentos nas produtividades das culturas, possibilitando a redução dos custos de produção ao diminuir o volume de adubos nitrogenados que são aplicados e, conseqüentemente, melhorando a conservação dos recursos ambientais (BALDANI et al., 2002, PENG et al., 2002). A FBN representa um dos mais importantes mecanismos, pois através deste é possível disponibilizar N às plantas. Os microrganismos realizam a FBN através do complexo enzimático conhecido como nitrogenase, a qual é capaz de promover a reação de quebra dos átomos de N à temperatura ambiente e pressão normal, utilizando a energia produzida a partir de compostos orgânicos fornecidos pela planta e armazenadas sob forma de ATP (FIGUEIREDO et al., 2008).

Os microrganismos fixadores de N possuem uma grande diversidade morfológica, fisiológica, genética, bioquímica e filogenética. Essa diversidade garante a resiliência da FBN nos ecossistemas e a ocorrência deste processo nos mais diferentes habitats terrestres (MOREIRA&SIQUEIRA, 2006). Dessa forma, é necessário selecionar e conhecer a contribuição de alguns microrganismos para a FBN em cultivares de arroz irrigado, no intuito de conseguir se obter aumento de produtividade e diminuição da poluição do solo e dos recursos hídricos.

¹Acadêmicos do curso de agronomia; Deptº de solos/CCR; Universidade Federal de Santa Maria, (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil raquelschmatz@hotmail.com;

²Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia – Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil

³Prof. Dr. Do ; Deptº de solos/CCR; Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a quantidade de N total fixado por diferentes microrganismos diazotróficos isolados a partir de diferentes cultivares de arroz irrigado produzidas no RS, a fim de elucidar a contribuição destes isolados no fornecimento de N para a planta.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório de biotransformações do carbono (C) e N-LABCEN, localizado na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), durante o ano de 2012. Neste trabalho foi realizada a quantificação do N fixado por 35 isolados de microrganismos diazotróficos de diferentes cultivares de arroz irrigado produzidas no RS, cedidas pelo Instituto Rio Grandense do Arroz – IRGA e pela Embrapa Clima Temperado e pela estirpe de *Herbaspirillum seropedicae*, ZAE 94, estirpe padrão da Embrapa Agrobiologia (depositada na coleção de culturas de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia com o código BR11417).

Colônias puras de cada isolado foram inoculadas em meio de cultura líquido DYGS modificado e incubadas sob agitação por 24 horas.

Após a incubação, uma alíquota de 0,1mL (contendo $10^8 - 10^9$ células mL^{-1}) foi transferida para meios de cultura semi específicos livres de N: NFB para *Azospirillum* spp., JNFb para *Herbaspirillum* spp., contendo quatro repetições para cada tratamento. As amostras foram acondicionadas em incubadora tipo BOD regulada à 30°C por 72h. Como controle, utilizou-se uma prova em branco contendo apenas o meio de cultura semi-sólido não inoculado, e uma prova positiva, contendo no meio de cultura uma quantidade conhecida de N (100 µg de amônio (NH_4^+)). O N total foi quantificado após digestão sulfúrica e destilação com NaOH conforme descrito por Camargo et al. (1999). Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância, sendo as médias comparadas entre si pelo teste de Skott-Knot a 5% de probabilidade de erro através do software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 35 isolados avaliados realizaram a FBN, com quantidades de N fixadas que variaram de 43,5 a 96,0 µg mL^{-1} (Tabela 1). A maior quantidade de N fixada foi observada no isolado 13 que diferiu dos demais isolados avaliados. O isolado 13 apresentou quantidade de N fixada 30% superior daquela medida pela estirpe *Herbaspirillum seropedicae* (ZAE 94) utilizada neste estudo como padrão, sendo considerada uma estirpe bem caracterizada e com grande capacidade de realizar FBN. Esse resultado indica que o isolado 13 apresenta elevado potencial em fixar o N atmosférico.

Verificou-se também que dos 35 isolados testados, 19 apresentaram quantidade N fixada que não diferiram estatisticamente da estirpe ZAE 94, a qual fixou 65,63 µg mL^{-1} , sendo considerados valores também elevados de fixação de N.

Do total de isolados, 16 apresentaram uma menor eficiência na fixação, podendo ser resultado das diferentes estirpes bacterianas inoculadas. Roersch (2003), observou a capacidade de microrganismos diazotróficos isolados de plantas de milho fixarem N e também relatou diferenças entre a fixação de N entre os isolados, sendo que a liberação de N variou entre a 2,12 µg de N mL^{-1} dia-1 a 6,27 µg de N mL^{-1} dia-1.

Viana (2012) avaliou a capacidade de isolados de bactérias diazotróficas obtidas de cultivares de arroz de sequeiro realizar FBN por meio da atividade da enzima nitrogenase, medida pela técnica de redução de acetileno (ARA), e demonstrou que todos os isolados selecionados foram capazes de reduzir o acetileno a etileno, comprovando a eficiência destas bactérias quanto ao potencial de fixar o nitrogênio atmosférico em maior ou menor intensidade.

Este estudo, como os demais que veem sendo realizados no Brasil com bactérias diazotróficas, apontam para o fato de que as variadas espécies de bactérias, fixam N₂ da atmosfera para conseguir se manter e se desenvolver, e que alguns destes microrganismos podem ser responsáveis por suprir as plantas com o N necessário ou parte do nitrogênio necessário para o seu crescimento e manutenção.

Tabela 1 – Nitrogênio Total fixados pelos microrganismos diazotróficos isolados. Santa Maria, RS, 2012.

Tratamentos	N Fixado ug /ml
ISOLADO 13	96.05 a
ISOLADO 33	66.88 b
ISOLADO 27	65.73 b
ZAE 94	65.63 b
ISOLADO 25	63.60 b
ISOLADO 12	61.60 b
ISOLADO 34	60.57 b
ISOLADO 31	60.56 b
ISOLADO 32	60.37 b
ISOLADO 24	59.49 b
ISOLADO 1	59.27 b
ISOLADO 16	58.72 b
ISOLADO 22	56.81 b
ISOLADO 23	56.74 b
ISOLADO 35	56.00 b
ISOLADO 29	55.64 b
ISOLADO 28	55.64 b
ISOLADO 19	55.63 b
ISOLADO 4	55.15b
ISOLADO 30	53.83 b
ISOLADO 21	51.74c
ISOLADO 17	51.30c
ISOLADO 3	51.26 c
ISOLADO 18	50.89 c
ISOLADO 26	50.01 c
ISOLADO 10	49.45 c
ISOLADO 11	49.35 c
ISOLADO 15	49.20 c
ISOLADO 20	48.94 c
ISOLADO 14	46.59 c
ISOLADO 5	46.08 c
ISOLADO 2	45.56c
ISOLADO 7	44.39c
ISOLADO 9	43.47 c
ISOLADO 8	40.72 c
ISOLADO 6	40.53 c
CV (%) = 12.03	

Valores seguidos da mesma letra, dentro da coluna, não diferem entre si pelo teste Skott Knot, a 5% de probabilidade.

CONCLUSÃO

Dos 36 isolados utilizados no experimento o isolado 13 apresenta maior fixação de N total em meio de cultura semi seletivo livre de N, diferindo estatisticamente de todos os outros. O isolado 6 tem menor desempenho na fixação de N.

Alguns isolados testados apresentam potencial para o fornecimento do N requerido pelos vegetais via FBN, contudo outros experimentos serão necessários para analisar o comportamento destas bactérias na cultura do arroz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDANI, J. I.; REIS, V. R. S.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, V. L. D. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (org) **Biotechnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. EDUCS, Caxias do Sul, 2002, 433p.
- COJHO, E. H.; REIS, V. M.; SCHENBERG, A. C. G.; DÖBEREINER, J. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amyolytic yeast in nitrogen-free batch culture. **FEMS Microbiol. Letters**, Amsterdam, v.106,p.341-346, 1993.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO- CONAB. **Indicadores Agropecuários**. 2013. Disponível em <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 01/06/2013.
- CARVALHO, E. A. **Avaliação agrônômica da disponibilização de feijão sob sistema de semeadura direta**. 2002. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2002.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.
- FIGUEIREDO, M.V.B.; MARTINEZ, C.R.; BURITY, H.A.; CHANWAY, C.P. Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) world **Jmicrobiolbiotechnol** n.24, pag 1187-1193, 2008.
- KENNEDY, I.R.; CHODHURY, 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 Biology and Biochemistry** 36 (8): 1229-1244, 2004.
- JAMES, E.K.; GYANESHWAR, P.; BARRAQUIO, W.L.; MATHAN, N.; LADHA, J.K.; Entophytic diazotrophs associated with rice. In: LADHA, J.K; REDDY, P.M. (eds). **The quest for nitrogen fixation in rice**. Proceedings of a workshop, Philippines, 2000.
- SIQUEIRA F. M.S., SIQUEIRA J. O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. 2ª edição. Lavras, 2006.
- ROESCH, L.F. **Ocorrência e distribuição de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de milho**. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós- Graduação em Ciência do Solo, Porto Alegre, 2003.
- SOSBAI – SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO. **Recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil**. Gravata: SOSBAI, 2012. 176p.
- VIANA, T.O. **Isolamento e inoculação de bactérias diazotróficas em arroz (*Oryza sativa* L.) cultivado em Vitória da Conquista-BA**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Agronomia, Vitória da Conquista, 2012.