

BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO EM
CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum sp.*) EM
FOLHAS, CAULES E RAÍZES

LUIZ ANTÔNIO GRACIOLLI

Orientadora: ALAIDES PUPPIN RUSCHEL

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Solos e Nutrição de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
1982

*À minha querida mamãe, que nunca mediu
esforços para que mais essa etapa fosse
concretizada , e*

*ã Etelca, minha amada esposa e eterna
incentivadora*

D E D I C O

A G R A D E C I M E N T O S

À Profa. Dra. Alaides Puppín Ruschel pela orientação e estímulo dispensados neste trabalho.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, pelas facilidades oferecidas no Laboratório da Seção de Microbiologia do Solo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Aos amigos da Seção de Microbiologia do Solo (CENA): Francisco Montrazi, Paulo Silva e Iraci Castilho pelas colaborações prestadas.

Ao PLANALSUCAR (Araras-SP) e Usina Modelo (Estrada Piracicaba--Rio Claro) pelo fornecimento de plantas.

Ao Dr. D.G. Patriquim (Universidade de Dalhousie, Halifax, Canadá) por sugestões na condução do presente trabalho.

À Dra. Siu Mui Tsai Saito e ao Eng^o Ftal. José Renato de Freitas pela amizade e estímulo.

Í N D I C E

	Página
R E S U M O	vi
S U M M A R Y	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1. Experimento A	7
3.1.1. Estudo da filosfera	7
3.1.1.1. Folhas de "seedling"	7
3.1.1.2. Folhas de plantas adultas (fotos_	
sintetizantes)	9
3.1.1.3 Folhas de plantas adultas secas	9
3.1.1.4 Purificação e identificação dos	
microrganismos fixadores de N ₂ .	10
3.1.2. Estudo da rizosfera	13
3.1.2.1. Obtenção das plantas e trata-	
mento dos colmos	13
3.1.2.2. Atividade da nitrogenase (ARA) e	
diluições decimais.....	14
3.1.2.3 Incubação das raízes em 2, 3, 5	
trifeniltetrazoliodocloreto (TTC)	15
3.2. Experimento B	15
3.2.1. Estudo da filosfera	16

3.2.1.1. Folhas de plantas adultas (fotossintetizantes ou secas	16
3.2.2. Estudo da rizosfera	17
3.2.2.1. Raízes	17
3.2.3. Estudo do caule	17
3.2.4. Enumeração das bactérias	18
3.2.5. Identificação dos microrganismos fixadores de nitrogênio	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1. Experimento A	19
4.1.1. Filosfera	19
4.1.2. Rizosfera	22
4.2. Experimento B	34
4.2.1. Bactérias fixadoras de N ₂ nas folhas	34
4.2.2. Bactérias fixadoras de N ₂ nas raízes	34
4.2.3. Bactérias fixadoras de N ₂ no caule .	37
5. CONCLUSÕES	40
6. LITERATURA CITADA	42

BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO EM
CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* sp.)
EM FOLHAS, CAULES E RAÍZES

LUIZ ANTÔNIO GRACIOLLI

ALAIDES PUPPIN RUSCHEL
Orientadora

RESUMO

Bactérias fixadoras de nitrogênio (N_2), foram isoladas de raízes, folhas e caule de cana-de-açúcar e identificadas através de 27 testes bioquímicos (API 20E) englobados em um programa de computador. *Enterobacter cloacae*, *Bacillus polymyxa*, *Erwinia herbicola*, *Azotobacter vinelandii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Derxia gummosa* foram encontradas associadas à parte externa das raízes. Com o uso do trifeniltetrazoliodocloreto (TTC) e pela atividade de nitrogenase, foi possível mostrar que as raízes grossas de cana-de-açúcar são preferidas que as finas pelas bactérias fixadoras de N_2 . *Azospirillum brasilense*, foi isolado de folhas jovens (fotossintetizantes) com superfície esterilizada. *B. polymyxa*, *K. pneumoniae*, *E. herbicola*, *A. vinelandii* e *D. gummosa* foram isoladas de folhas secas. A população de bactérias no interior dos colmos variou quantitativa e qualitativamente. Colmos intermediários (aproximadamente ao meio do caule), parecem con

ter mais bactérias que os basais e ou apicais. *E. herbicola* foi encontrada nos colmos intermediários e apicais, enquanto *A. vinelandii* somente nos apicais, indicando que num plantio de cana-de-açúcar a distribuição das bactérias é aleatória, sugerindo que pesquisas devem ser feitas para inoculação prévia deste sistema. A adição de extrato de levedura no meio de cultura, foi favorável ao crescimento das bactérias fixadoras de N_2 , tanto dos isolados das folhas como das raízes da cana-de-açúcar.

NITROGEN FIXING BACTERIA
IN THE SUGARCANE (*Saccharum* sp.)
AT LEAVES, STEMS AND ROOTS

Author: LUIZ ANTONIO GRACIOLLI

Adviser: ALAIDES PUPPIN RUSCHEL

SUMMARY

Nitrogen fixing bacteria were isolated from roots, leaves and stems of sugarcane and identified by using 27 biochemical tests (API 20E) assisted by a computer program. *Enterobacter cloacae*, *Bacillus polymyxa*, *Erwinia herbicola*, *Azotobacter vinelandii*, *Klebsiella pneumoniae* and *Derxia gummosa* were found associated to the surface of the roots. Using thripheniltetrazolium chloride (TTC) and nitrogenase activity (ARA), it was possible to show that the thicker roots of sugarcane are more colonized by the N_2 -fixing bacteria than the thin ones. *Azospirillum brasilense* was isolated from surface sterilized young leaves. *B. polymyxa*, *K. pneumoniae*, *E. herbicola*, *A. vinelandii* and *D. gummosa* were isolated from dry old leaves. The bacteria populating the inner part of stem varied quantitative and qualitatively. Intermediate stems had

more bacteria than the basals and or apex ones. *E. herbicola* was found in the intermediate and apex stems, *A. vinelandii* only in the apex stems this shows that in a sugarcane field the bacteria distribution occurs at random suggesting that further studies have to be done for a previous inoculation of this system. The addition of yeast to the culture medium was favorable to the growth of N_2 -fixing bacteria both isolated from leaves and roots of sugarcane.

1 - INTRODUÇÃO

Recentemente vários pesquisadores (RINAUDO, 1971; DÖBEREINER *et alii*, 1972a; DÖBEREINER e DAY, 1975; von BULOW e DÖBEREINER, 1975) têm relatado a existência de associações de gramíneas tropicais com bactérias fixadoras de nitrogênio (N_2) as quais sob condições favoráveis podem contribuir significativamente para a economia de N dessas plantas.

O primeiro trabalho que indicou o potencial da cana-de-açúcar de obter benefício da fixação biológica de N_2 foi de DÖBEREINER (1959). Hoje sabe-se que há um sistema fixador de N_2 na rizosfera desta planta, constituído de bactérias aeróbicas, anaeróbicas facultativas e anaeróbicas (RUSCHEL *et alii*, 1978a; RUSCHEL *et alii*, 1978b). O sítio ativo da fixação está localizado na rizosfera (RUSCHEL *et alii*, (1975).

Um efeito entre variedades na atividade da nitrogenase (AN) expressa através da redução de acetileno (ARA) de microrganismos das raízes, foi observada por RUSCHEL e RUSCHEL

(1977), mostrando também ARA no interior e exterior de colmos germinados.

PATRIQUIM *et alii* (1980), observaram que as bactérias fixadoras de N_2 , concentram-se na região nodal e após a germinação colonizam o rizoplano e a rizosfera. Estes mesmos autores notaram, orifícios oblongos localizados na base das raízes, que poderiam constituir-se aberturas pelas quais as bactérias teriam acesso à rizosfera.

O presente trabalho tem por objetivo, localizar os sítios populacionais de bactérias fixadoras de N_2 em cana-de-açúcar e identificar os microrganismos responsáveis por esse fenômeno.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

Aumentos seletivos de bactérias do gênero *Beijerinckia* sob vegetação de cana-de-açúcar e especialmente na rizosfera desta planta foram demonstrados por DÖBEREINER (1959). Baseado no crescimento em placas de sílica-gel com glicose, DÖBEREINER (1961) encontrou *Beijerinckia* spp em 95% das amostras de solo da rizosfera e 62% em amostras de solo das entrelinhas da cana-de-açúcar. É provável que esta atração seja devida às substâncias lixiviadas, ou excretadas pelas folhas ou pela lavagem dos caules para o solo (DÖBEREINER e ALVAHYDO, 1959).

Um sistema fixador de N_2 na rizosfera da cana-de-açúcar, constituído de bactérias aeróbicas, anaeróbicas facultativas e anaeróbicas, foi demonstrado por RUSCHEL *et alii*, 1975; RUSCHEL *et alii*, 1978a; e RUSCHEL *et alii*, 1978b. Essas bactérias foram encontradas em profundidade do solo de 40, 80

e 120 cm (RUSCHEL *et alii*, 1978a). RUSCHEL *et alii*, (1978b) incubando segmentos de raízes em diferentes meios de cultura (com ou sem extrato de levedura), obtiveram colônias de bactérias, as quais foram identificadas com base na morfologia das células como *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Caulobacter*, *Derxia*, *Clostridium* e *Vibrio*. HEGAZI *et alii* (1979), baseado na identificação bioquímica e morfológica, encontraram associadas às raízes de cana-de-açúcar no Egito, *Azotobacter vinelandii*, *Klebsiella* spp., *Bacillus* spp., e *Spirillum* spp., mas não encontraram *Beijerinckia* spp. PURCHASE (1980), ROCHA *et alii* (1981) mostraram que *Azospirillum* spp. estão intimamente associadas às raízes de cana-de-açúcar. RENNIE (1980b), baseado em uma computação de resultados de 27 testes bioquímicos observou que solo da rizosfera de cana-de-açúcar contém equivalente população de *Derxia gummosa*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus polymyxa*, e *Azotobacter vinelandii*. Outro sítio ativo da fixação biológica de N₂ está ligado com os colmos (RUSCHEL e RUSCHEL, 1977; PATRIQUIM *et alii*, 1980). As bactérias foram encontradas (não foram feitos estudos de identificação) nos espaços intercelulares no parênquima do caule, xilema e protoxilema, mas nunca no floema, (PATRIQUIM *et alii*, 1980). As bactérias concentram-se na periferia dos nós, inativas (aparentemente), tornando-se ativas somente após a emergência das raízes, pela colonização da rizosfera e do rizopiano (PATRIQUIM *et alii*, 1980). Um dos métodos utilizados por esses autores para detectar a presença de microrganismos fixadores de nitrogênio foi a incubação de pequenos pedaços de ra

Íz ou caule em TTC (2,3,5 - trifeniltetrazoliodocloreto). A redução do TTC, tem sido muito usada para demonstração da atividade de desidrogenase em células e em preparação de enzimas (van Fleet, 1952). Apesar de não ser um método específico, tem sido de grande valia na demonstração de que bactérias se encontram no interior dos tecidos vegetais (PATRIQUIM e DÖBEREINER, 1978). FAY e KULASORRIVA (1972) mostraram que o TTC é reduzido mais rapidamente nos heterocistos (sitio da fixação de N_2) de algas verdes - azuladas, que por células vegetativas.

A cana-de-açúcar desenvolveu-se muito bem em solução nutritiva com baixas concentrações de amônio. Adição de 28 ppm de NH_4^+ , prejudicou o crescimento das raízes, parte aérea e inibiu a fixação biológica de N_2 (VOSE *et alii*, 1979).

Adições de diferentes níveis de N_2 no solo cultivado com cana-de-açúcar (60, 120, 240 e 480 kg/ha de sulfato de amônio) diminuíram a ARA constantada em raízes destacadas, seis meses após o plantio RUSCHEL *et alii* (1978). O mesmo efeito, foi observado no milho (PEREIRA *et alii*, 1978), sorgo e trigo (PEDERSEN *et alii*, 1978).

Com o uso de 15-dinitrogênio, foi possível evidenciar a fixação direta em cana-de-açúcar, chegando a 523 $\mu gN. g$ de raiz⁻¹ de plantula dia⁻¹ (RUSCHEL *et alii*, 1975). VOSE (1980), fazendo um balanço de N_2 no desenvolvimento da cana-de-açúcar, encontrou que 17% do nitrogênio da planta, provinha da fixação biológica, embora a variedade utilizada, comparati-

vamente, foi a que apresentou a mais baixa atividade da nitrificação das cinco testadas (RUSCHEL e VOSE, 1977). Estudos com soqueiras no Sul da África, tem sugerido que acima de 25 kgN. ha.ano deve-se à fixação biológica (PURCHASE, 1980).

A superfície foliar é o meio ambiente por excelência, para o crescimento microbiano em geral e especialmente para os organismos fixadores de N_2 (RUINEN, 1961; RUINEN, 1974; RUINEN, 1975). RUINEN (1956), detectou pela primeira vez *Beijerinckia* na filosfera de vegetação de floresta (Indonésia). Sendo que o mesmo autor identificou também *Azotobacter*, *Aerobacter*, *Beijerinckia*, *Klebsiella* e *Spirillum* em folhas de diversas plantas em Java (RUINEN, 1961). BESSEMS (1973), isolou *Klebsiella* sp das folhas de milho.

A ausência de métodos satisfatórios de isolamento e os problemas de identificação, têm dificultado as investigações da flora bacteriana da superfície das folhas (AUSTIN *et alii*, 1978). Em decorrência, os mesmos autores consideraram que as folhas podem sustentar uma grande quantidade de bactérias ainda não reconhecidas.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

Com a finalidade de localizar, isolar e ou identificar as bactérias fixadoras de N_2 em cana-de-açúcar, foram realizados 2 experimentos:

3.1 - EXPERIMENTO A

Utilizou-se folhas de plantas adultas coletadas no campo e de "seedlings" desenvolvidos em sementeiras para estudo da filosfera. No estudo do caule e raiz, foram utilizados toletes germinados no laboratório (em vermiculita ou solução nutritiva), obtidos de plantas adultas cultivadas no campo ou em casa de vegetação.

3.1,1 - ESTUDO DA FILOSFERA

3.1.1.1 - FOLHAS DE "SEEDLING"

"Seedlings" de cana-de-açúcar oriundos da Pla-

nalsucar - Araras - São Paulo, de três variedades: Co513, IAC 48-65 e CB50-41, com 30 dias de idade, tiveram suas folhas divididas em 2 porções de 0,50g cada uma. Uma porção foi esterilizada superficialmente com hipoclorito de sódio (Qboa) a 20% por 20 minutos e lavada por 4 vezes em água destilada esterilizada. A outra porção foi somente lavada com água destilada e esterilizada por 4 vezes. Em seguida, fez-se maceração com auxílio de pistilo e almofaris (previamente esterilizados) em 5 ml de tampão fosfato estéril (0,05 M. pH 7,0). Diluições decimais, normalmente até 10^{-6} foram realizados em frascos de 20 ml, contendo três diferentes meios de cultura (9 ml) esterilizados a 120°C , a 1 atm, por 15 min, com a seguinte composição:

A - Meio LG: K_2HPO_4 , 0,1g; KH_2PO_4 , 0,4g; FeCl_3 , 0,01g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2g; NaCl , 0,1g; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,002g; solução alcoólica de azul bromotimol a 5%, 5 ml; sacarose, 10g; agar, 12g; água destilada, 1.000 ml.

B - Meio LGY: idem ao LG acrescido de 0,5 g/l de extrato de levedura.

C - Meio malato semi-sólido: KH_2PO_4 , 0,4g; K_2HPO_4 , 0,1g; NaCl , 0,1g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2g; CaCl_2 , 0,02g; FeCl_3 , 0,01g; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,002g; solução alcólica de azul de bromotimol a 5%, 5 ml; malato, 5,0g; agar, 1,75 g/l; água destilada, 1.000 ml; pH ajustado para 6.8 a 7.0 com NaOH .

Após a inoculação, os tubos foram incubados por 4-5 dias a 30°C , quando a AN foi avaliada pelo método de redução do acetileno à etileno - ARA (HARDY *et alii*, 1968). Este método consiste

basicamente em incubar bactérias sob atmosfera de 10% de acetileno, que se consegue substituindo-se o algodão dos tubos por rolha de borracha previamente esterilizada, e retirando-se com auxílio de uma seringa 10% do ar e injetando-se volume idêntico de acetileno. Após 1 hora de incubação à mesma temperatura, - amostras de 0,5 ml são retiradas dos tubos para análise do etileno.

O cromatógrafo de gás utilizado foi o Bechman GC-65, com detector de ionização de chama de H_2 a $175^{\circ}C$, e coluna de vidro de 1/8" (diâmetro interno) X 1,60m, contendo Poropak N de 8-100 "mesh" a $110^{\circ}C$.

3.1.1.2 - FOLHAS DE PLANTAS ADULTAS (Fotossintetizantes)

Folhas das mesmas variedades, porém de plantas cultivadas no campo, com idade de 11 meses, foram coletadas quando erectas, de diferentes touceiras e levadas imediatamente para o laboratório. O tratamento e os meios de cultura foram os mesmos utilizados para folhas de "seedling". Porém, sem preferência, cortou-se ao longo das diferentes folhas, pequenos pedaços (1-3cm), amostrando-se 10g do material. A maceração foi realizada em tampão fosfato (90 ml) 0,05 M, - pH 7.0, utilizando-se um liquidificador com baixa rotação, por 1 minuto.

3.1.1.3 - FOLHAS DE PLANTAS ADULTAS (Secas)

Foram coletadas aquelas mais distantes do solo. Os tratamentos e meios de cultura foram os mesmos do item 3.1.1.2.

3.1.1.4 - PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS FIXADORES N₂

Com a finalidade de se obter colônias puras, dos tubos com cultura de enriquecimento e com ARA, foram feitos no meio original de isolamento, plaqueamento em estrias ou em profundidade. Colônias individuais obtidas foram novamente testadas para ARA. A confirmação de pureza foi realizada em meio agar nutriente (NA) da Difco (DIFCO, 1967), e por microscopia de contraste de fase.

Todos os isolados com ARA, foram identificados, utilizando os esquemas propostos por RENNIE (1980a), sendo utilizado o sistema de teste API 20E (Analytab Products Inc., Plainview, N.Y., - USA), designado para identificação de Enterobacteriaceae (Figura 1) e outras não pertencentes a essa família. Totalizando 17 gêneros de bactérias que fixam N₂ (RENNIE, 1980b).

Culturas de quatro bactérias conhecidas, foram usadas como controle. Esses organismos foram selecionados por suas diferenças em motilidade, capacidade de crescerem nos meios NA, carbono combinado (ver item 3.2.1.1); MacConkey's-MAC (DIFCO, 1967) e Mac Conkey's com carbenicilina-MCC (Rennie, 1980a) e de reduzir C₂H₂ (Tabela 1). O meio MCC foi usado para favorecer a identificação de *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* e por falta de crescimento, de *Erwinia herbicola*.

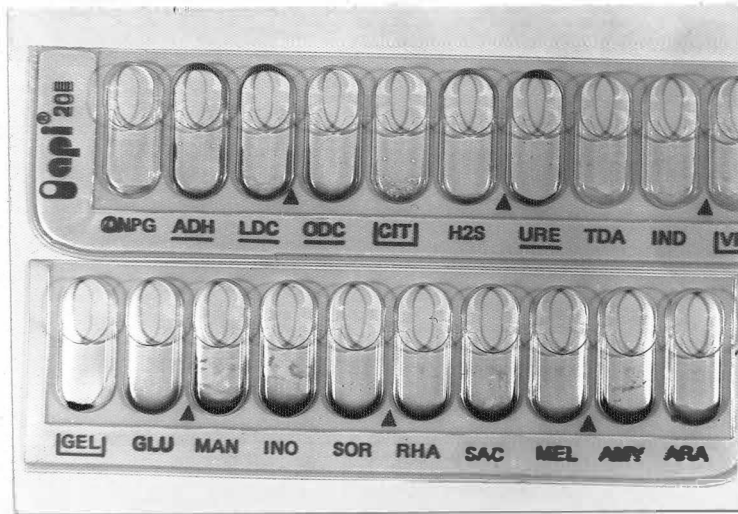


FIGURA 1 - Sistema API 20E, utilizado na identificação das bactérias fixadoras de nitrogênio.

TABELA 1 - Características das bactérias conhecidas que fixam N₂ usadas como controle.

Bactéria	Motilidade	crescimento em: ^a				Redução de acetileno ^b
		CC	NA	MAC	MCC	
<i>Klebsiella pneumoniae M5aL</i>	-	+	+	+	+	+
<i>K. pneumoniae 107</i>	-	-	+	+	+	- ^c
<i>Erwinia herbicola R1</i>	+	+	+	+	-	+
<i>Azotobacter vinelandii AVOP</i>	+	+	+	-	-	+

^aCC = carbono combinado; NA = agar nutriente; MAC = MacConkey's; e MCC = MacConkey's + carbenicilina

b = no meio CC

c = nif⁻ mutante

3.1.2 - ESTUDO DA RIZOSFERA

3.1.2.1 - OBTENÇÃO DAS PLANTAS E TRATAMENTO DOS COLMOS

Caules de cana-de-açúcar com 11 meses de idade, das variedades NA56-79 e CB41-76, cultivadas no campo (Planaisucar - Araras - São Paulo) e em casa de vegetação (CENA) foram cortados rente ao solo, e em pequenos pedaços contendo gemas individuais intactas (colmos), e numerados a partir da raiz. Cada colmo foi esterilizado superficialmente (álcool, 95% por 10 minutos, hipoclorito de sódio (Qboa) 20% por 20 minutos). Em seguida foram lavados por 4 vezes em água e 1 vez em tampão fosfato (0,05M, pH 7.0) estéreis e colocados para germinar em frascos de vidro de 500ml, fechados com algodão, contendo 250 ml de vermiculita úmida esterilizada. Os frascos assim preparados foram transportados à casa de vegetação. Quando necessário as plântulas eram molhadas com água esterilizada durante os primeiros 10 dias e a partir daí, com solução nutritiva de Hoagland esterilizada (HOAGLAND e ARNON, 1950) diluída 5 vezes, sem nitrogênio.

Colmos das mesmas variedades, oriundos de plantas cultivadas no campo receberam os mesmos tratamentos e foram germinados (casa de vegetação) em baldes plásticos com capacidade de 20 litros. Utilizou-se solução nutritiva de Hoagland, diluída 5 vezes com 3 doses de N: zero; 14 e 28 ppm na forma de NO_3^- .

3.1.2.2 - ATIVIDADE DA NITROGENASE (ARA) E DILUIÇÕES DECIMAIS

A ARA dos colmos plantados em vermiculita foi avaliada 25 dias após a germinação. O método utilizado foi o mesmo descrito no item 3.1.1.1. Dos frascos que não apresentaram ARA (com ou sem parte aérea) diluições decimais no meio LGP semi-sólido (PATRIQUIM *et alii*, 1980), foram realizadas com material do colmo, raiz e solo da rizosfera. O meio LGP é formado pela mistura de três partes: I. 1,4g KH_2PO_4 em 100ml de H_2O destilada, titulado com K_2HPO_4 até pH 7.0 e completado volume para 300 ml de água destilada. II. 5g de glicose em 100 ml de H_2O destilada. III. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2g; NaCl, 0,01g, CaCl_2 , 0,02g; FeCl_3 , 0,01g; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,005g; ácido málico, 3,0 g; KOH, 1,5g; extrato de levedura, 0,1g; H_2O destilada, 600 ml, ajustado para pH 7,0 com NaOH; ágar, 1,75g/l; as quais foram autoclavadas (120°C, a 1 atm, por 15 min) separadamente e após o resfriamento foram misturadas assépticamente, e em seguida distribuídos (9ml) em tubos previamente esterilizados, com capacidade total de 20ml.

Das plantas cultivadas em solução nutritiva (45 dias após a germinação), 1g de raiz foi coletado - dos diferentes tratamentos, para realização das diluições decimais nos meios de cultura LG e LGP. Dessas mesmas plantas (tratamento sem N) pedaços de raízes próximos aos colmos (raízes grossas) e das extremidades (raízes finas), foram coletadas e distribuídas em placas de Petri, contendo se

paradamente os meios de cultura LG e LGY. A ARA foi avaliada pelo mesmo método descrito no item 3.1.1.1, entretanto os pedaços de raízes, foram previamente transferidos individualmente, com o meio de cultura para frascos de 10ml.

3.1.2.3 - INCUBAÇÃO DAS RAÍZES EM 2,3,5 - TRIFENILTETRAZOLIOCLORETO (TTC)

Pedaços de raízes de plantas crescidas em vermiculita, e/ou em solução nutritiva foram incubadas em TTC por 24 horas na ausência de luz. A solução foi preparada dissolvendo-se 1,5g de TTC em um litro de tampão fosfato a 0,05 M, pH 7,0 esterilizado, mais 1% de glicose. Após o período de incubação, raízes inteiras ou pequenas seções transversais, preparadas com o micrótomo Hooker (Lab. Instrument Co), foram examinadas em microscópio e os possíveis sítios de bactérias fixadoras de N_2 foram determinados.

3.2 - EXPERIMENTO B

Utilizou-se raízes, caules e folhas de cana-de-açúcar, variedade NA56-79, cultivadas no campo (Usina-Modelo - Piracicaba - São Paulo) com 11 meses de idade.

3.2.1 - ESTUDO DA FILOSFERA

3.2.1.1 - FOLHAS DE PLANTAS ADULTAS (FOTOSSINTETIZANTES OU SECAS)

Folhas verdes ou secas com bainhas (as mais distantes do solo) de diferentes touceiras, foram coletadas. Cortando-se pequenos pedaços transversais (1-3 cm) das folhas verdes (incluindo bainha), obteve-se uma amostra (10g). O mesmo procedimento foi feito para obter amostra de folhas secas. As duas amostras, foram lavadas separadamente por 4 vezes em água destilada esteril, em seguida foram maceradas em 90 ml de tampão fosfato 0,05 M, pH 7 com auxílio de um liquidificador (baixa rotação) por 1 minuto. Diluições decimais foram realizadas comumente até 10^{-9} . De cada diluição, 0,1 ml foi plaqueado no meio carbono combinado-CC (RENNIE, 1980a) e incubado aerobicamente a 30°C . O meio CC consiste de duas partes: I. K_2HPO_4 , 0,8g; KH_2PO_4 , 0,2g; NaCl 0,1g; NaFeEDTA, 28,0mg; Na_2MoO_4 , 25,0mg; extrato de levedura 100,0mg; manitol. 5,0g; sacarose, 5,0g; lactato de sódio, 0,5 ml (60% v/v); água destilada, 900 ml. II. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2g; CaCl_2 ; 0,06g; água destilada, 100 ml. As soluções I e II foram autoclavadas, esfriadas e misturadas assepticamente, em seguida acrescida de biotina (5 $\mu\text{g}/\text{l}$) e ácido para-amino benzóico (10 $\mu\text{g}/\text{l}$) com filtro esterilizado (Millipore, Swinnex-25) e ajustado para pH 7,0. A contagem das colônias foi feita após 48 e 72 horas de incubação.

3.2.2 - ESTUDO DA RIZOSFERA

3.2.2.1 - RAÍZES

As raízes foram coletadas próximo às touceiras, a uma profundidade não superior a 20 cm, de três locais diferentes do canavial. Foram misturadas e divididas em duas amostras de 10g cada uma. A primeira não foi esterilizada, e a segunda superficialmente segundo a metodologia de VICENT (1970), que consiste em mergulhar as raízes em HgCl 1% por 3 minutos e 1 minuto em álcool 95%. Em seguida foram lavadas sucessivamente em água destilada esterilizada por três vezes.

Maceração, diluições, meios de cultura e incubação foram iguais ao estudo das folhas (item 3.2.1.1). As colônias também foram contadas após 48 e 72 horas de incubação.

3.2.3 - ESTUDO DO CAULE

Três caules foram cortados rente ao solo de diferentes touceiras do canavial. No laboratório foram divididos em três partes de acordo com sua posição: colmo basal (próximo ao solo), colmo intermediário (aproximadamente ao meio do caule) e colmo apical (próximo ao cartucho). Conseguiu-se assim três amostras de colmos com nós intactos. De cada amostra, foi removida a casca com auxílio de uma lâmina e pinça

esterilizadas em álcool. Após obter 10g da parte interna, procedeu-se a maceração seguida de diluições decimais e contagem das bactérias do mesmo modo que nas folhas (item 3.2.1.1).

3.2.4 - ENUMERAÇÃO DAS BACTÉRIAS

Após a contagem das colônias (48 e 72 horas) colônias individuais foram transferidas para frascos de 35 ml contendo 20 ml do meio CC líquido (sem agar). Decorridas 24 horas de incubação a 30°C, os frascos foram fechados com tampa de borracha e a ARA foi avaliada da mesma maneira descrita no item 3.1.1.1. As culturas positivas para redução do acetileno foram separadas para posterior identificação.

3.2.5 - IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS FIXADORES DE NITROGÊNIO

Após a confirmação da pureza no meio NA, as colônias que reduziram C_2H_2 , foram identificadas, utilizando-se o mesmo sistema descrito no item 3.1.1.4.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - EXPERIMENTO A

4.1.1 - FILOSFERA

Não há dúvida que as folhas de cana-de-açúcar são habitadas por um grande número de microrganismos fixadores de nitrogênio (Tabela 2). Existe possibilidade de algumas espécies estarem no interior das folhas (tecido vascular) pois, *Azospirillum brasilense* não forma cisto e foi isolado de folhas com superfície esterilizada (variedade Co513, folhas verdes), sendo portanto, pouco provável que se encontrasse na superfície da mesma. No interior dos colmos e raízes de cana-de-açúcar, PATRIQUIM *et alii* (1980), encontraram bactérias (não identificadas) fixadoras de nitrogênio. É perfeitamente viável que a transpiração tenha contribuído na locomoção das bactérias até às folhas, pelos tecidos vasculares. Há também possibilidade,

TABELA 2 - Atividade da nitrogenase (n moles $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot frasco^{-1}$) das culturas de enriquecimento (diluições decimais), das folhas de "seedlings", verdes e secas de plantas adultas de cana-de-açúcar, em diferentes meios de cultura (LG, LGY e LGM), das variedades Co513, IAC48-65 e CB50-41, após 96 horas de incubação a 30°C.

Variedade	Tratamento	Diluição	FOLHAS								
			Seedlings			Verdes			Secas		
			LG	LGY	LGM	LG	LGY	LGM	LG	LGY	LGM
Co513	Superfície esterilizada	10 ¹	0	148,2	0	90,7	336,6	43,2	86,4	268,8	89,7
		10 ²	0	95,8	0	16,8	84,9	0	139,2	92,6	0
		10 ³	0	9,8	0	0	8,4	0	0	0	0
		10 ⁴	-	-	-	0	0	0	0	0	0
		10 ⁵	-	-	-	0	0	0	0	0	-
		10 ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Superfície não esterilizada	10 ¹	4,9	256,8	70,5	345,6	441,6	61,4	1075,0	468,4	0
		10 ²	4,1	331,9	152,1	113,9	104,2	0	622,0	128,6	122,8
		10 ³	0	5,6	0	30,5	96,0	0	214,0	142,0	51,3
		10 ⁴	-	-	-	0	0	0	28,8	263,0	60,4
		10 ⁵	-	-	-	0	0	0	12,8	0	164,1
		10 ⁶	-	-	-	-	-	-	0	-	-
IAC48-65	Superfície esterilizada	10 ¹	0	169,9	0	19,8	0	0	0	0	0
		10 ²	0	65,7	0	0	0	0	136,8	313,9	0
		10 ³	0	262,8	0	0	0	0	0	0	0
		10 ⁴	-	-	-	0	0	0	0	0	0
		10 ⁵	-	-	-	0	0	0	0	0	-
		10 ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB50-41	Superfície esterilizada	10 ¹	98,8	133,3	182,7	61,9	10,8	80,6	72,0	20,5	12,9
		10 ²	0	163,0	3,7	14,4	3,6	25,9	187,2	216,0	0
		10 ³	0	108,6	0	18,0	0	0	27,0	201,6	0
		10 ⁴	-	-	-	0	0	0	20,0	239,0	0
		10 ⁵	-	-	-	0	0	0	0	127,0	0
		10 ⁶	-	-	-	-	-	-	0	0	-
CB50-41	Superfície esterilizada	10 ¹	0	0	0	59,2	253,4	0	25,9	40,8	76,8
		10 ²	0	29,8	0	3,6	126,7	0	2,4	0	0
		10 ³	0	138,3	0	0	74,4	0	7,0	0	0
		10 ⁴	-	-	-	-	0	0	0	0	0
		10 ⁵	-	-	-	-	0	0	0	-	-
		10 ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB50-41	Superfície não esterilizada	10 ¹	0	339,8	0	103,0	556,8	0	135,3	576,0	34,0
		10 ²	0	4,4	0	106,0	0	0	133,1	288,0	20,1
		10 ³	0	4,6	0	0	0	0	154,5	12,7	44,4
		10 ⁴	-	-	-	0	58,0	0	10,8	0	66,7
		10 ⁵	-	-	-	0	0	0	0	0	0
		10 ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- não analisada.

das folhas possuírem "microhabitats" que protegeriam as bactérias, similares àqueles encontrados nas raízes por Diem *et alii*, 1978a. Pela Tabela 2, principalmente nas folhas de "seedlings", percebe-se que as maiores diluições com atividade da nitrogenase (ARA) concentraram-se no meio LGY, indicando que as bactérias requerem para seu bom desenvolvimento fatores crescimento, fornecidos pelo extrato de levedura. Este resultado vem de encontro aos obtidos por WATANABE e BARRAQUIO (1979), onde bons resultados de isolamento de raízes de arroz foram obtidos em meios de cultura com adição de extrato de levedura. Neste experimento, como por exemplo, em folhas de "seedlings" (variedade Co513 e IAC48-65 superfície esterilizada e CB50-41 superfície não esterilizada) só foi possível detectar a presença de bactérias fixadoras de N_2 no meio em que foi adicionado extrato de levedura. Percebe-se também pela Tabela 2 que, nas três variedades estudadas, as mais altas diluições positivas para ARA foram obtidas com folhas secas não esterilizadas. Este fato deverá pelo menos contribuir para manter populações de bactérias no solo, quer pela queda das folhas ou pela lavagem de sua superfície pela água da chuva.

RUSCHEL (1978), observou aumentos acentuados do teor de nitrogênio da planta, quando folhas de cana picadas foram adicionadas ao solo. É certo que a relação C/N irá aumentar, o que determinará um aumento na fixação biológica de N_2 . Agora, tudo indica que ao mesmo tempo foram inoculados mi

erorganismos fixadores de nitrogênio e não fixadores, que num contexto geral, esses últimos, poderão ajudar na estabilização mais rápida de microhabitats ideais para fixação biológica do N_2 (GRACIOLLI e RUSCHEL, 1977).

Diversos gêneros de bactérias fixadoras de N_2 foram isolados das folhas secas e identificados: *Bacillus polymyxa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Beijerinckia* sp (esta última identificada microscopicamente).

Fungos, leveduras e outras bactérias foram tam isolados quer das folhas verdes, secas ou de "seedlings".

4.1.2 - RIZOSFERA

Analisando a Figura 2, observa-se que plantas o riundas de colmos de cana desenvolvida em casa de vegetação, das duas variedades NA56-79 e CB41-46, apresentaram ARA na rizosfera quando germinados dos colmos basais (colmo nº 3 e 4 respectivamente) e nos apicais (colmo nº 16). Já em plantas oriundas de colmos colhidos no campo (Figura 3) houve uma distribuição de ARA praticamente por todos os colmos. No primeiro caso, é bem verdade que os colmos pesavam praticamente a metade, (10g) daqueles que foram colhidos no campo, o que poderia influenciar no desenvolvimento das bactérias, pela quantidade de substratos contidos no interior dos mesmos necessários para suportar a fixação de N_2 . Pode-se pensar que somente os colmos positivos para ARA é que contém os microrganismos fixadores de N_2 , porém, observa-se na Tabela 3

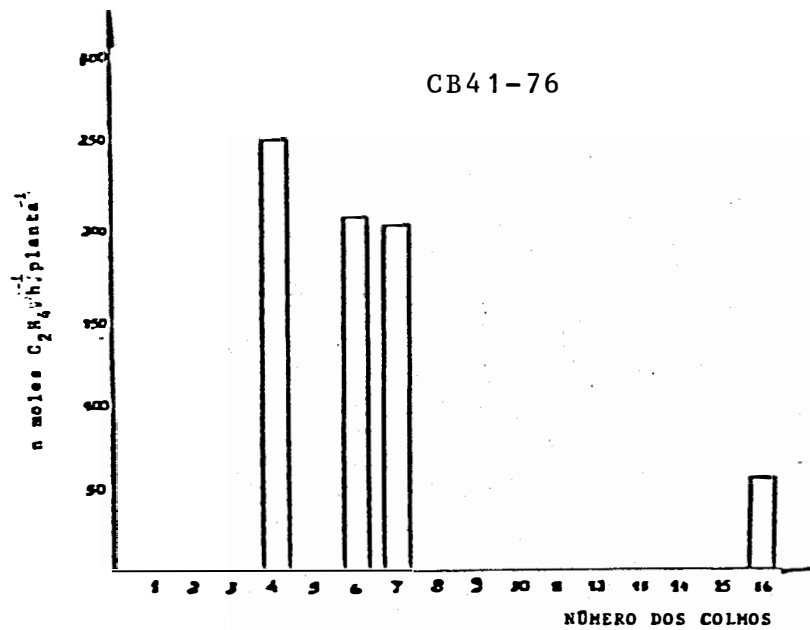
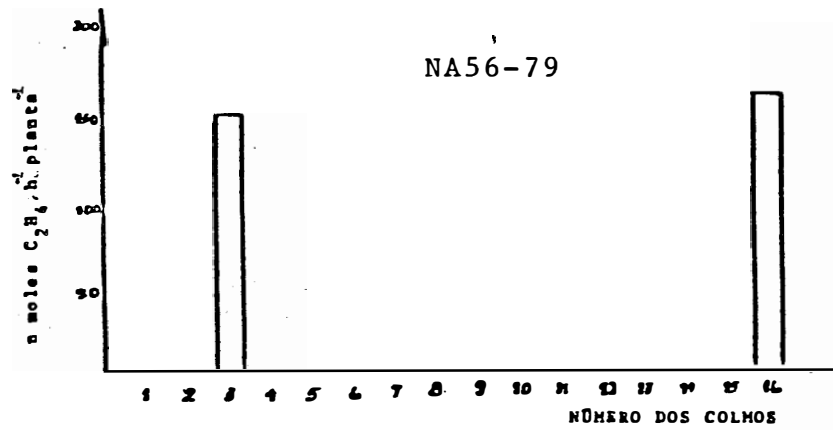


FIGURA 2 - Atividade de nitrogenase ($n \text{ mol } C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot planta^{-1}$) de colmos com superfície esterilizada das variedades NA56-79 e CB41-76, desenvolvidas em casa de vegetação e plantados assépticamente em vermiculita. Os colmos foram numerados a partir da base do caule. Após 3 1/2 semanas do plantio.

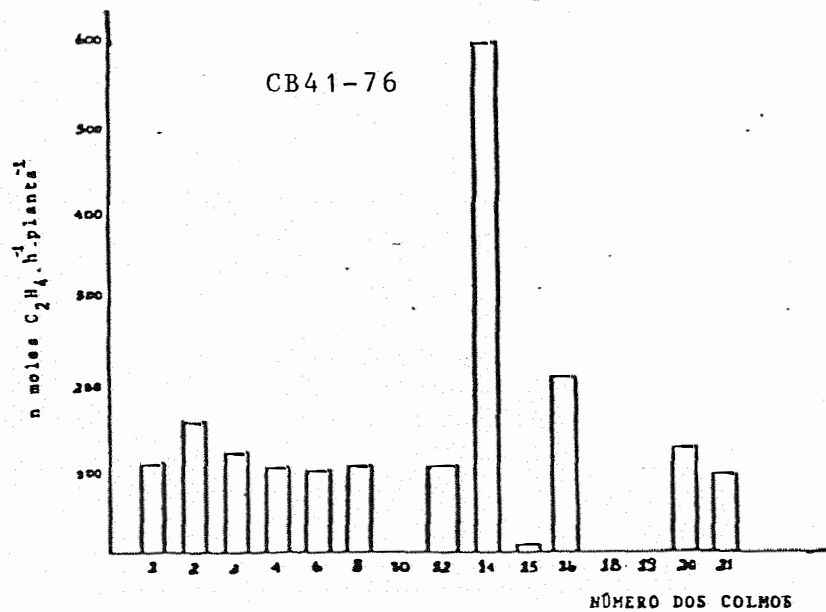
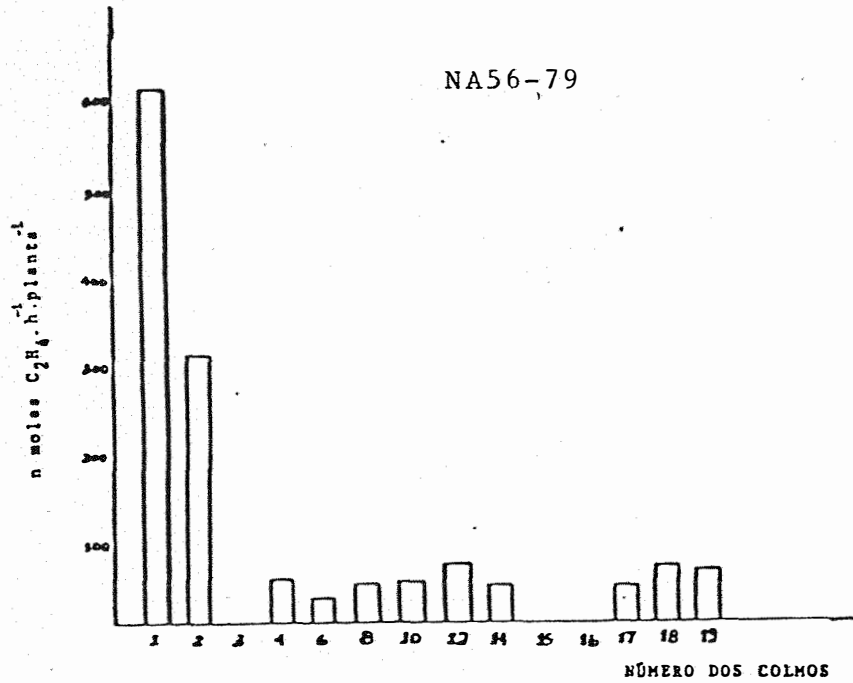


FIGURA 3 - Atividade da nitrogenase ($n \text{ mol } C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot pl^{-1}$) de colmos das variedades NA56-79 e CB41-76, colhidos no campo, com superfície esterilizada e plantado asépticamente em vermiculita estéril. Os colmos foram numerados a partir da base do caule. Após 3 1/2 semanas do plantio.

TABELA 3 - Atividade da nitrogenase (ARA) de diluições decimais, em meio LGP, de colmos do campo, que não reduziram C_2H_2 em sistema intacto e não apresentavam parte aérea. Após 3 dias de incubação a 30°C.

COLMO	VARIIDADE	PARTE ANALISADA	MÁXIMA DILUIÇÃO POSITIVA ARA	N MOLES DE ETILENO FRASCO.h ⁻¹ DA MAIS ALTA DILUIÇÃO POSITIVA
3	NA 56-79	COLMO	10 ³	374
		RAIZ	0	0
		RIZOSFERA	10 ³	78
15	NA 56-79	COLMO	10 ³	409
		RAIZ	10 ¹	22
		RIZOSFERA	10 ¹	398
10	CB 41-76	COLMO	10 ¹	346
		RAIZ	10 ¹	100
		RIZOSFERA	10 ¹	292
18	CB 41-76	COLMO	0	0
		RAIZ	0	0
		RIZOSFERA	0	0

e Figura 4, tanto de plantas oriundas de colmos colhidos no campo como de casa de vegetação, diluições decimais positivas para atividade de nitrogenase em diferentes partes do vegetal e do solo da rizosfera, de plantas que em sistema intacto (Figura 2 e Figura 3) não apresentaram ARA. Isto indica que os microrganismos responsáveis por esse fenômeno estavam presentes, mas, por motivo que não sabemos, estavam inativos. É provável, que pelo fato dessas plantas (Figura 2) apresentarem um sistema foliar pouco desenvolvido e amarelado, ter havido influência nos exudados das raízes (pela menor taxa fotossintética) que por sua vez influenciariam na fixação biológica do N_2 . Muitos trabalhos são a favor dessa hipótese (BROWN, 1976; RINAUDO, 1971; BALANDREAU *et alii*, 1974; DÖBEREINER e DAY, 1975), no entanto substâncias excretadas pelas raízes (ex.: polifenóis) podem inibir os microrganismos fixadores de N_2 (BROWN, 1974; ELROY, 1965). Em cana-de-açúcar isto é viável pois não se conseguiu até agora avaliar a ARA em colmos não germinados (RUSCHEL - comunicação pessoal).

Na Tabela 3, percebe-se também que as bactérias, inicialmente no interior dos colmos, passaram a colonizar a rizosfera, deixando claro que tal colonização independe do sistema foliar.

Muitos experimentos têm demonstrado, que altos níveis de nitrogênio, oriundos de fertilizantes, podem chegar a inibir por completo a atividade da nitrogenase em raízes de diferentes gramíneas (PEREIRA *et alii*, 1978; PEDERSEN *et alii*,

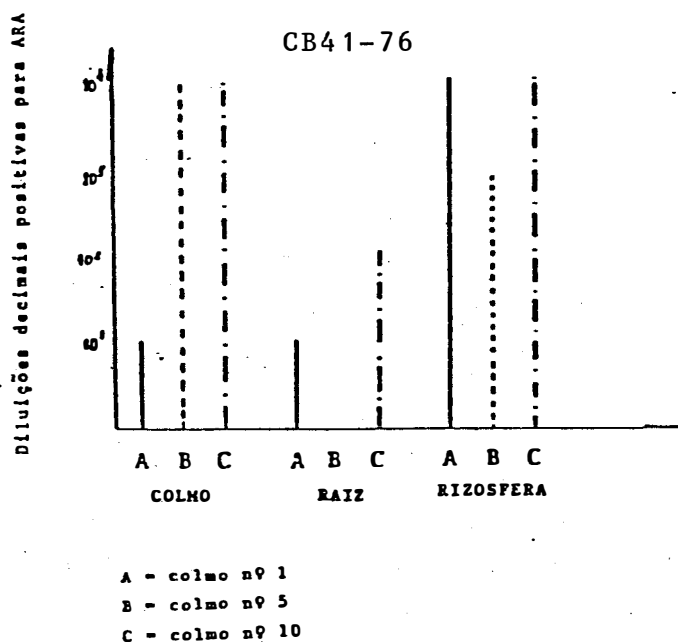
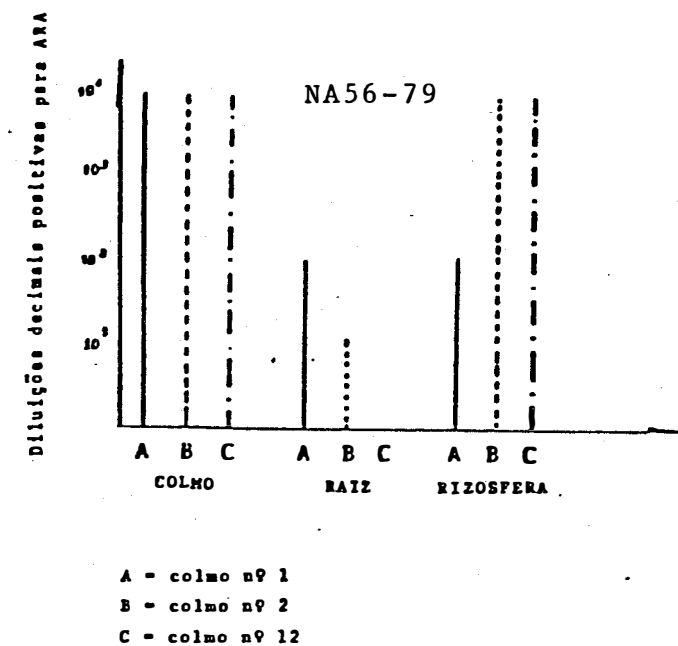


FIGURA 4 - Diluições positivas para ARA, no meio LGP, de diferentes partes da planta, das variedades NA56-79 e CB41-76, desenvolvidas em casa de vegetação que em sistema intacto não exibiu ARA.

TABELA 4 - Diluição decimal de raízes de cana-de-açúcar, cultivadas em solução nutritiva, com diferentes níveis de N(zero, 14 e 28 ppm) em diferentes meios de cultura.

VARIETADE	TRATAMENTO (ppm de N)	MÁXIMA DILUIÇÃO POSITIVA PARA ARA			MÁXIMA DILUIÇÃO COM CRESCIMENTO BACTERIANO		
		LG	LGY	LGP	LG	LGY	LGP
NA56-79	0	10 ³	10 ²	10 ²	10 ⁵	10 ⁸	10 ¹⁰
	14	10 ⁵	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ¹⁰	10 ¹⁰
	28	10 ³	10 ²	10 ²	10 ⁵	10 ⁹	10 ¹⁰
CB41-76	0	10 ²	10 ¹	10 ²	10 ⁵	10 ⁷	10 ¹⁰
	14	10 ³	10 ⁴	10 ²	10 ⁵	10 ⁹	10 ¹⁰
	28	10 ³	10 ¹	10 ²	10 ⁵	10 ⁷	10 ¹⁰

1978). Nas diluições decimais de raízes de cana-de-açúcar desenvolvidas em solução nutritiva com diferentes doses de N (zero, 14 e 28 ppm), verificou-se nas variedades NA56-79 e CB41-76, um maior número de bactérias fixadoras de N_2 , quando um pouco de N (14 ppm) era adicionado (Tabela 4). É possível que em condições normais de cultivo, doses moderadas de N, possam beneficiar simultaneamente a fixação biológica de N_2 e a assimilação de N mineral (já observado em milho; Pereira *et alii*, 1978).

Nota-se na Tabela 5, que ARA de pedaços de raízes incubados em meio de cultura, cujas plantas desenvolveram-se sem N, apresentaram uma grande diferença entre o meio utilizado (LG e LGY). Isto confirma mais uma vez, que algumas bactérias fixadoras de N_2 , presentes neste sistema exigem, para seu bom desenvolvimento, fatores de crescimento.

A morfologia das colônias, após 3 dias de incubação nos meios LG e LGY eram visivelmente diferentes. No meio LG apresentavam-se colônias de 0,3 a 1,2 cm de diâmetro, brancas, opacas, rugosas, sendo *Azotobacter vinelandii* a bactéria mais encontrada. No meio LGY, as colônias eram maiores (0,5 a 1,5 cm), amareladas, mucosas, opacas e com muitas bolhas de gases. Ao microscópio foram observadas *Beijerinckia*. Pelo sistema API 20E foi possível identificar: *Enterobacter cloacae*, *Bacillus polymyxa*, *Erwinia herbicola*, *Klebsiella pneumoniae* e *Derxia gummosa*.

TABELA 5 - Atividade da nitrogenase (n moles $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot pedaço\ de\ raiz^{-1}$) de pedaços de raízes (plantas cultivadas em solução nutritiva sem nitrogênio) incubadas por 72 hs no meio LG e LGY a 30°C. Cada valor é média de 3 repetições.

MEIO DE CULTURA	EXTREMIDADE	RAIZ PRÓXIMA DO CAULE
LG	586.5	1.350.0
LGY	3.175.1	6.355.2

KNOWLES (1977) tem considerado que a localização da bactéria na raiz, não só é influenciada pelas disponibilidades de compostos de carbono, mais também pela intensidade de competição dos microrganismos por esse carbono. Trigo inoculado com *Azotobacter*, em casa de vegetação e no campo, mostrou que no primeiro caso as bactérias estavam distribuídas continuamente ao longo das raízes jovens. No segundo caso todas as partes das raízes estavam infectadas, incluindo as adventícias, e o número diminuía nas partes mais afastadas do grão (JACKSON e BROWN, 1966). DIEM *et alii* (1978b) trabalhando com "seedlings" de arroz, observaram algumas colônias de *Beijerinchia* na superfície da raiz, na região dos pelos absorventes, enquanto que, nem todas as extremidades estavam infectadas. Em raízes de arroz (DIEM *et alii*, 1978a) parece haver uma preferência das bactérias por raízes mais grossas que as mais finas. Neste trabalho, esta preferência também ocorreu, pois, observa-se na Tabela 5, que aproximadamente o dobro da ARA, foi obtido nas raízes próximas ao caule (raízes grossas) oriundas de plantas cultivadas sem N, em solução nutritiva.

Com o uso de TTC, foi também possível detectar que raízes grossas são mais infectadas que as finas, incluindo uma grande quantidade de pêlos absorventes (Figura 5-A, B e C). Observa-se na Figura 5-D que essas colônias apresentam-se distintas no interior dos vasos condutores (xilema), semelhantemente àquelas encontradas por PATRIQUIM *et alii* (1980). Bactérias que reduzem o TTC em raízes finas, apareceram esporadicamente.

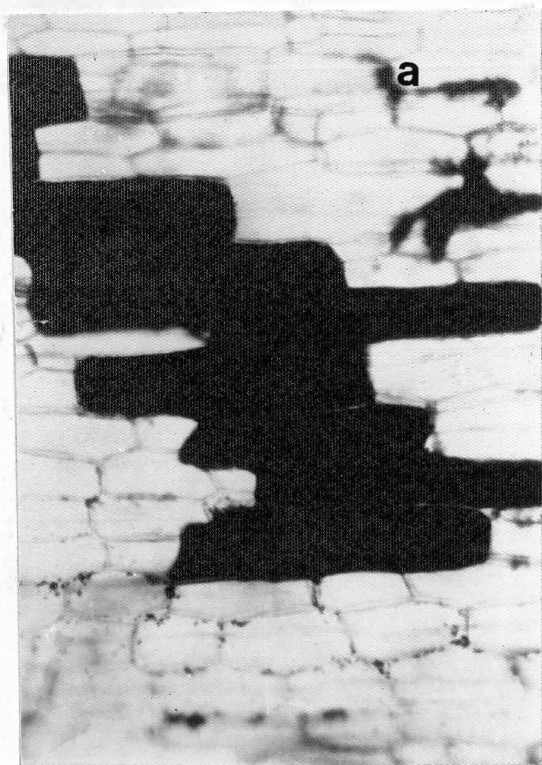


FIGURA 5 - A e B: vista superficial das células das raízes próximas do caule, mostrando colônias de bactérias que reduziram o TTC (aumento X80).

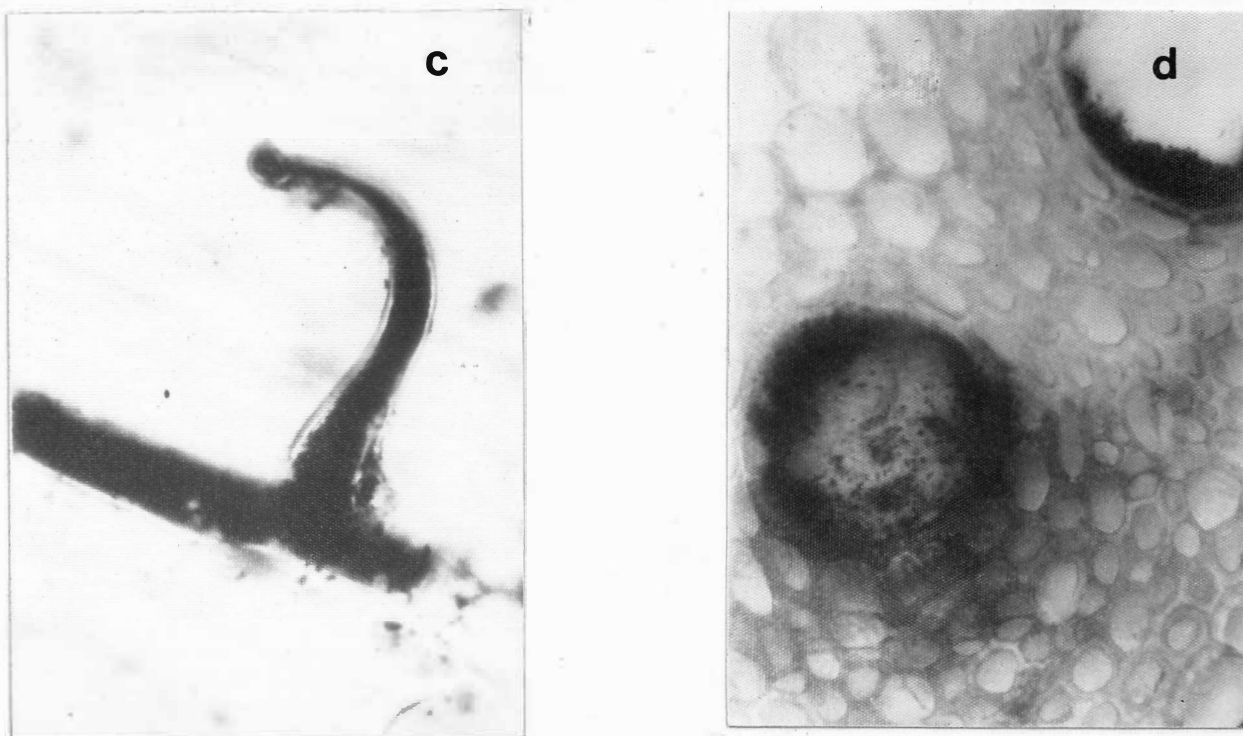


FIGURA 5 - C: detalhe do pelo absorvente (aumento X/60).

D: Corte transversal da raiz, mostrando colônias de bactérias no interior do xilema. (aumento X/60).

4.2 - EXPERIMENTO B

4.2.1 - BACTÉRIAS FIXADORAS DE N_2 NAS FOLHAS

A superfície foliar é o meio ambiente por exce-
lência, para o crescimento microbiano e especialmente para os
fixadores de N_2 (RUINEN, 1961; RUINEN, 1974). O número de mi-
croorganismo na superfície da folha em milho, aumentou com a ida-
de da planta (BESSEMS, 1973). O mesmo autor, isolou das folhas
de milho e sorgo *Bacillus polymyxa* e *Klebsiella*.

Neste experimento, 43% (6/14) das bactérias i-
soladas das folhas secas reduziram C_2H_2 (Tabela 6), 33% foram
identificadas como sendo *Erwinia herbicola*, 17% *Azotobacter vi-*
nelandii, 17% *Derxia gummosa* e 33% não foram identificadas (Ta-
bela 6) e essas não pertenciam a família Enterobacteriaceae.
Derxia gummosa (17%) só foi encontrada nas folhas secas (Ta-
bela 7). Apenas uma dos 5 isolados das folhas jovens (verdes)
apresentou ARA e pressupostamente pertence a *Enterobacteriaceae*.
Estes resultados confirmam as observações feitas no experimento
anterior (Exp.A), demonstrando que não podemos descartar a pos-
sibilidade das folhas serem outro inóculo natural do sistema.

4.2.2 - BACTÉRIAS FIXADORAS DE N_2 NAS RAÍZES

A esterilização superficial das raízes diminuiu
o número total de bactéria (Tabela 6) e pode ter eliminado as
bactérias que reduzem C_2H_2 (Tabela 7). É bem possível que o

TABELA 6 - Número total e percentagem de bactérias fixadoras de N₂ isoladas de raízes, colmos e folhas de *Saccharum* sp. var. NA56-79, colhidas no campo com 11 meses de idade.

Fator	RAIZ		COLMO			FOLHAS	
	Esterilizada	Não esterilizada	basal	intermediário	apical	verdes	secas
Bactéria/g m.f. (X10 ⁵) ^a	1,7	1.100	0.4	10	0.5	10	86
% isolados positivos para ARA ^b	0	61	0	100	60	11	43

a. crescidas no meio CC sólido, m.f. = matéria fresca

b. crescidas no meio CC semi-sólido

TABELA 7 - Identificação e percentagem de bactérias que reduziram C₂H₂, isoladas de raízes, colmos e folhas de *Saccharum* sp var. NA56-79, colhidas no campo, com 11 meses de idade.

Bactérias	PARTE ANALISADA							
	RAIZ		COLMO			FOLHA		
	Não Esterilizada	Esterilizada	basal	intermediário	apical	verdes	secas	
	(-5) ^a	(-3)	(-3)	(-4)	(-3)	(-4)	(-4)	(-4)
<i>Enterobacter cloacae</i>	37	0	0	0	0	0	0	0
<i>Erwinia herbicola</i>	13	0	0	25	33	0	0	33
<i>Azotobacter vinelandii</i>	37	0	0	0	33	0	0	17
<i>Deixia gummosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	17
Desconhecidas	13 ^c	0	0	75 ^{b,c}	33 ^b	100 ^b	33 ^c	33

a - diluição na qual foi feito o isolamento

b - Enterobacteriaceae

c - não identificado

processo de esterilização tenha sido prejudicial às bactérias ou que a diluição utilizada não foi a ideal para a contagem. Contra a primeira hipótese, vários pesquisadores têm utilizado outros agentes esterilizantes, e não encontraram este efeito (DÖBEREINER e DAY, 1975; DÖBEREINER *et alii*, 1976; PEDERSEN *et alii*, 1978; PURCHASE, 1980; BALDANI e DÖBEREINER, 1980). Somente 1 dos 8 isolados obtidos de raízes não esterilizadas não foi identificado e este não pertencia à Enterobacteriaceae (Tabela 7), *Erwinia herbicola* e *Azotobacter vinelandii* foram também encontradas no interior dos colmos e nas folhas secas. Este fato vem a favor da ideia de que talvez, o colmo seja a fonte inicial do inóculo das bactérias fixadoras de N_2 (RUSCHEL e RUSCHEL, 1977), em cana-de-açúcar.

4.2.3 - BACTÉRIAS FIXADORAS DE N_2 NO CAULE

A atividade da nitrogenase (C_2H_2) dos colmos, difere de acordo com a variedade, estação do ano e posição de cada colmo no caule (FERRO COSTA e RUSCHEL, 1981). Ficou claro agora, que a população de bactérias fixadoras de N_2 , no interior dos colmos, difere quantitativa e qualitativamente (Tabela 6 e Tabela 7). Nenhuma bactéria que reduz C_2H_2 foi isolado de colmos basais, entretanto 100% (4 isolados) das bactérias presentes nos colmos intermediários e 60% (3/5) das presentes nos apicais apresentaram essa capacidade (Tabela 6). No primeiro caso, 25% foi classificada como sendo *Erwinia herbicola*, e o res

tante, não foi possível identificar pelo método utilizado. No entanto, dessas últimas, um isolado pelo bom crescimento no meio MC pode ser classificado pressupostamente, como sendo membro da família Enterobacteriaceae. Este fato também ocorreu nos isolados dos colmos apicais onde dos 60% com ARA, 33% era *Erwinia herbicola*, 33% *Azotobacter vinelandii* e 33% não foram identificados, no entanto eram pertencentes a família Enterobacteriaceae. Os colmos intermediários continham mais bactérias que os demais (Tabela 6).

Não foi obtido neste experimento nenhum isolado pertencente ao gênero *Azospirillum*, contrariamente a outros autores (PURCHASE, 1980; ROCHA *et alii*, 1981).

Dentre todos os isolados, 57% apresentaram atividade da nitrogenase, e foram identificados. O restante (43%) não identificado, na maioria, era proveniente da parte aérea na planta (Tabela 7).

Até agora o melhor exemplo de interação específica de bactéria fixadora de N_2 com gramínea, foi àquela descrita por DÖBEREINER e DAY (1975) entre *Paspalum* (cv batatais) com *Azotobacter paspali*. Outros sistemas têm sido investigados e apresentaram grande probabilidade de uma especificidade, dentre eles: trigo com *Bacillus* spp. (LARSON e NELL, 1978), arroz com *Achromobacter* (WATANABE e BARRAQUIO, 1979), *Spartina alterniflora* com *Campylobacter* (McCLUNG e PATRIQUIM, 1980). Em ca-

na-de-açúcar, apesar de *Beijerinckia* ser estimulada na sua rizosfera (DÖBEREINER, 1961), fica claro que vários microrganismos são responsáveis pela fixação de N_2 .

5 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos levaram a uma conclusão final assim resumida:

A população de bactérias fixadoras de N_2 nas raízes, folhas e no interior dos colmos de cana-de-açúcar, varia quantitativa e qualitativamente. Isto implica que, na propagação vegetativa dessas plantas, os colmos contribuem com uma população heterogênea de bactérias, para a cultura canavieira.

A queima das folhas e restolhos adotados como práticas respectivamente, na época da colheita e antes do plantio da cana-de-açúcar, além de destruir a matéria orgânica, e elimina também as bactérias que aí habitam, o que vem sugerir a utilização de outro manejo, o qual certamente poderá trazer benefícios para a cultura.

6 - LITERATURA CITADA

- AUSTIN, B., M. GOODFELLOW e C. H. DICKINSON, 1978. Numeral taxonomy of phyloplane bacteria isolated from *Lolium perenne*. J. of Gen. Microbiology, 104: 139-155.
- BALANDREAU, J.; G. R. MILLIER e Y. R. DOMMERGUES, 1974. Diurnal variations of nitrogenase activity in the field. Applied Microb. 27 (4): 662-665.
- BALDANI, B. L. D. e J. DOBEREINER, 1979. Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. Soil Biol. Biochem. 12: 433-439
- BESSEMS, E. P. M. 1973. Nitrogen fixation in the phyllosphere of Gramineae. Agric. Res. Repts (Versl. landbouwk, Onderz.) 786, 68 p.
- BROWN, M. E., 1974. Seed and root bacterization. Annu Rev. Phytopathol. 12: 181-197.
- BROWN, M. E., 1976. Role of *Azotobacter paspali* in association with *Paspalum notatum*. J. appl. Bact. 40: 341-348

- BÜLOW, J. F. W. von e J. DOBEREINER, 1975. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72: 2389-2393.
- DIEM, G., M. ROUGIER; I. HAMAD-PARES, J. P. BALANDREAU e Y. R. DOMMERGUES 1978a. Colonização of rice roots by diazotroph bacteria. IN: N. Granhall ed. Environmental Role of Nitrogen-Fixing Blue-Algae and Asymbiotic Bacteria. Ecol Bull (Stockholm) 26: 305-311.
- DIEM, G., E. L. SCHIMIDT e Y. R. DOMMERGUES, 1978b. The use of the fluorescent antibody technique to study the behaviour of a *Beijerinckia* isolate in the rhizosphere and spermosphere of rice. IN: N. Granhall ed. Enviromental Role of Nitrogen-Fixing Blue-Algae and Asymbiotic Bacteria. Ecol Bull (Stockholm) 26: .
- DIFCO. 1967. Difco manual, 9th Edition. Difco Laboratories , Detroit, Mich.
- DOBEREINER, J., 1959. Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* do solo. Rev. Bras. Biol. 19: 251-258.
- DOBEREINER, J. e R. ALVAHYDO, 1959. Sobre a influência da cana-de-açúcar na ocorrência de *Beijerinckia* no solo. II. Influência das diversas partes do vegetal. Rev. Bras. Biol. 19 : 401-412.
- DOBEREINER, J. 1961. Nitrogen fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. Plant and Soil. 14: 211-217.
- DOBEREINER, J., J. M. DAY e P. J. DART, 1972a. Nitrogen activity in the rhizosphere of sugar cane and some other tropical grasses. Plant and Soil. 37: 191-196.

- DOBEREINER, J., J. M. DAY e P. J. DART, 1972b. Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the *Paspalum notatum* *Azotobacter paspali* association. J. Gen. Microbiol. 71: 103-116.
- DOBEREINER, J. e J. M. DAY., 1975. Dinitrogen fixation in the rhizosphere of tropical grasses. IN: Stewart, E. W., ed. I B P Conference Nitrogen Fixation and the Biosphere, Edinburgh. Cambridge University Press, 1: 39-59.
- DOBEREINER, J., I. E. MARRIEL e M. NERY, 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Can J. Microbiol. 22(10): 1464-1473.
- ERROY, R. L., 1965. Inhibition of nitrogen fixing and nitrifying bacteria by seed plants. Characterization and identification of inhibitor. Physiol. Plant. 18: 255-268.
- FAY, P. e S. A. KULASORRIYA, 1972. Tetrazolium reduction and nitrogenase activity in heterocystous blue-green algae. Arch. Microbiol. 87: 341-352.
- FERRO COSTA, J. M. T. e A. P. RUSCHEL, 1980. Seasonal variation in the microbial populations of sugar cane plants. IN: P. B. VOSE e A. P. RUSCHEL., eds., Associative N₂ Fixation, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- FLEET, D. S. van., 1952. Histochemical localization of enzymes in vascular plants. The Botanical Review. 18(5): 354-398.
- GRACIOLLI, L. A. e A. P. RUSCHEL, 1977. Atividade da nitrogenase de *Azospirillum* sp em culturas puras e em misturas com microrganismos não fixadores de nitrogênio. R. bras. Ci Solo, 2: 215-216.

- HARDY, R. W. F., R. D. HOLSTEN, E. K. JACKSON e R. C. BURNS, 1968. The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation. Pl. Physiol. 43: 1185-1207.
- HEGAZI, N. A., M. EID, R. S. FARAG e M. MONIB, 1979. Asymbiotic N_2 -fixation in the rhizosphere of sugar cane planted under semi-arid conditions of Egypt. Rev. Ecol. Biol. Sol. 16(1): 23-27.
- HOGLAND, D. R. e D. I. ARNON, 1950. The water-culture method for growing plants without soil. California Agr. Exp. Sta. Circ. 347.
- JACKON, R. M. e M. E. BROWN, 1966. Behaviour of *Azotobacter croococcum* introduced into the plant rhizosphere. Ann Inst. Pasteur Paris. 111(3): 103-112.
- KNOWLES, R., 1977. Free-living bacteria. IN: J. DOBEREINER, R. H. BURRIS e A. HOLLAENDER, eds., Limitations and potentiats for biological nitrogen fixation in the tropics. Plenum Press, N. York. p. 25-40.
- LARSON, R. I. e J. L. NEAL, 1978. Selective colonisation of the rhizosphere of wheat by nitrogen-fixing bacteria. IN: V. GRANHALL, ed. Environmental Role of Nitrogen-Fixing Blue-Green Algae and Asymbiotic Bacteria. Ecol. Bull. (Stockholm). 26: 331-342.
- MCCARLEY, E. e R. J. RENNIE, 1980. A computer program to interpret multiple biochemical tests to identify dinitrogen-fixing soil bacteria. Rev. Ecol. Biol. Sol. 17: 501-507.
- McCLUNG, C. R. e D. G. PATRIQUIN, 1980. Isolation of a nitrogen-fixing *Campylobacter* species from roots of *Spartina alterniflora* Loisel. Can J. Microbiol. 26:881-886.

- PATRIQUIN, D. G. e J. DOBEREINER, 1978. Light microscopy observation of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brasil. Can. J. Microbiol. 24(6): 734-742.
- PATRIQUIN, D. G., L. A. GRACIOLLI e A. P. RUSCHEL, 1980. Nitrogenase activity of sugar cane propagated from stem cutting in sterile vermiculite. Soil Biol. Biochem. 12: 413-417.
- PEDERSEN; W. L., K. CHAKRABARTY, R. V. KLUCAS e A. K. VIDA, VER, 1978. Nitrogen fixation (acetylene reduction) associated with roots of winter, wheat and sorghum in Nebraska. Applied and Environmental Microbiology. 35(1): 129-135.
- PEREIRA, P. A., J. F. W. van BULOW e C. A. NEYRA, 1978. Atividade da nitrogenase, nitrato reductase e acumulação de nitrogênio em milho Braquítico *Zea mays* L. (cv. Piranão) em dois níveis de adubação nitrogenada. R. bras. Ci Solo. 2: 28-33.
- PURCHASE, B. S., 1980. Nitrogen fixation associated with sugar cane. Proceedings of the South African Sugar Technologists Association. p. 173-176.
- RENNIE, R. J., 1980a. A single medium for the isolation of acetylene reducing (dinitrogen-fixing) bacterias from soils. Can. J. Microbiol. 27: 8-14.
- RENNIE, R. J., 1980b. Dinitrogen-fixing bacteria: Computer-assisted identification of soil isolated. Can J. Microbiol. 26: 1275-1283.
- RINAUDO, G., 1971. Algæ and bacterial non-symbiotic nitrogen fixation in paddy soils. Plant and soil, Special vol, p. 471-479.

- ROCHA, R. E. M., J. I. BALDANI e J. DOBEREINER, 1981. Host plant specificity in the infection of C₄ plants whit *Azospirillum* spp. In: P. B. VOSE e A. P. RUSCHEL, eds., Associative N₂ Fixation, CRC Press, Boca Raton, Flórida.
- RUINEN, J., 1956. Occurence of *Beijerinckia* species in the "phyllosphere". Nature. 177: 220-221.
- RUINEN, J., 1961. The phyllosphere. I. An ecologically neglected milieu. Plant and soil. 15(2): 8-10.
- RUINEN, J., 1974. Nitrogen fixation in the phyllosphere. IN: Quispel, A. ed. The biology of nitrogen fixation. North. Holland, Amsterdan, p. 121-169.
- RUINEN, J., 1975. Nitrogen fixation and the phyllosphere. IN: STEWART, W.D.P. The nitrogen fixation by bree-living microorganisms. Cambridge University Press, p.85-100.
- RUSCHEL, A. P., Y. HENIS e E. SALATI, 1975. Nitrogen-15 tracing of N-fixation with soil grown sugar cane seedling. Soil. Biol. Biochem. 7: 181-182.
- RUSCHEL, A. P. e P. B. VOSE, 1977. Present situation concerning studies in associative N-fixation sugar cane, *Saccharum officinarum* L. Boletim Científico. 045: 28 p.

RUSCHEL, A. P. e R. RUSCHEL, 1978. Varietal differences affecting nitrogenase activity in rhizosphere of sugarcane. Proc. Int. Soc. Sugarcane Tech. XVI Congress, São Paulo, Brasil, 2: 1941-1947.

RUSCHEL, A. P., 1978. Aerobic an anaerobic N-fixing microrganismo in soil grown sugar cane as affected by cane plant, N-fixing inoculation and soil-addition of cane leaves. Proc. Int. Soc. Sugarcane Tech. XVI Congress, São Paulo, Brasil. 2:

RUSCHEL, A. P., R. L. VITÓRIA, E. SALATI e Y. HENIS, 1978a. Nitrogen fixation in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) IN: N. GRANHALL ed. Environmental Role of Nitrogen - Fixing Blue-Algae and Asymbiotic Bacteria. Ecol. Bull.(Stockholm) 26: 297-303.

RUSCHEL, A. P., J. ORLANDO Fº, E. ZAMBELLO, Y. HENIS, 1978b. Aerobic and anaerobic nitrogen-fixing bacteria in sugarcane roots. Proc. Int. Soc. Sugarcane Tech. XVI Congress, São Paulo, Brasil, 2: 1903-1912.

VICENT, J. M., 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. Blackwele Scientific Pub., Oxford-164 p.

VOSE, P. B., A. P. RUSCHEL e R. L. VICTORIA, 1979. Potential N_2 -fixation by sugarcane (*Saccharum* sp) seedlings in solution culture. I. Efeito of NH_4^+ and NO_3^- , varieties and nitrogen level. IN: P. B. VOSE e A. P. RUSCHEL, eds. *Associative N_2 Fixation*, CRC Press, Boca Raton, Florida.

VOSE, P. B., 1980. Stable isotopes as tracers: Mainly the use of is ^{15}N -fixation. IN: *Introduction to Nuclear Techniques in Agronomy and Plant Biology*. London Pergamon International Library. Chap. 7: 151-176.

WATANABE, I. e L. BARRAQUIO, 1979. Low levels of fixed nitrogen required for isolation of free-living N_2 -fixing organisms from rice roots. *Nature*. 277: 565-566.