

Efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas em gramíneas forrageiras do Pantanal

M. da Silva Brasil*, V. L. Divan Baldani**, J. Ivo Baldani**, e S. Manhães Souto**

Introdução

A principal atividade sócioeconômica no Pantanal é a pecuária de corte, conduzida de maneira extensiva, com alimentação do rebanho constituída, principalmente de pastagens de gramíneas nativas ou exóticas. No entanto, no cultivo dessas pastagens, a utilização de insumos agrícolas, principalmente dos fertilizantes nitrogenados, é praticamente nula.

A região pantaneira é marcada por ciclos de seca e inundação bem definidos sendo por isso um ambiente que tem períodos de limitações de água e de outros nutrientes, ou seja, pode-se dizer que é um agroecossistema extremamente atípico, nessas condições. A inundação influencia o tipo de solo e conseqüentemente a vegetação local. Esta condição pode afetar diretamente a pecuária pantaneira, uma vez que são poucas as forrageiras de alto valor nutritivo adaptadas a condições de inundações periódicas do Pantanal e de solo pouco fértil. A pastagem exótica mais utilizada no pantanal é a braquiária (*Brachiaria* spp.) porque tem um alto valor nutritivo em comparação com as nativas e capacidade de se adaptar bem em diferentes agroecossistemas. Entretanto, muitas forrageiras nativas são também usadas para a alimentação do gado, dentre elas, se destacam o capim Carona (*Elyonurus muticus*) e o capim Mimoso (*Axonopus*

purpusii) que são plantas bem adaptadas às condições climáticas e por isso são bastante usadas nas formações de pastagens do Pantanal.

Em agroecossistema pastoril, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) associada às raízes das plantas forrageiras é uma etapa importante no ciclo do nitrogênio (N) e as bactéria diazotróficas podem representar um componente de papel relevante no suprimento de N para as plantas (Chalk, 1991). Uma possível entrada de N nos agroecossistemas do Pantanal pode ser via FBN feita por bactérias diazotróficas, como por exemplo, *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp, dentre outras, que se associam as raízes das gramíneas forrageiras nativas e exóticas.

Estudos sobre esse grupo de microrganismos fixadores, bem como sua possível contribuição à incorporação de nitrogênio no ecossistema para a região pantaneira, são ainda inexistentes. De uma maneira geral, a maioria dos experimentos de inoculação feito até então, em mais de 20 anos, se refere ao gênero *Azospirillum* e as espécies mais usadas foram *A. brasilense* e *A. lipoferum*, no entanto, poucos experimentos foram feitos com forrageiras. Fallik e Okon (1996) observaram aumento do crescimento panicular e matéria seca (MS) de *Setaria italica* cultivada em condições de vaso quando inoculada com *A. brasilense*. Outros experimentos de inoculação com *Azospirillum*, citados por Okon e Labandera-Gonzales (1994), também mostraram efeitos significativos sobre a matéria seca de gramíneas forrageiras, como em *Penisetum americanum*, *P. purpureum*, *Panicum maximum* e *Digitaria decumbens*, *Setaria italica*, *Brachiaria mutica*, e outras. Recentemente

* Bolsista de Pós-graduação da UFRRJ, em Seropédica-RJ.

** Pesquisadores da Embrapa Agrobiologia, Seropédica-RJ.

Itzigsohn et al. (2000) fizeram experimentos em duas regiões climáticas de Israel com pastagem natural, onde inocularam *A. brasilense* e verificaram aumento da MS da pastagem em relação ao controle não inoculado. Entretanto, os estudos de inoculação com *Azospirillum* ainda não apresentaram conclusões definitivas que indiquem com certeza se os efeitos observados decorrentes da inoculação são provenientes da FBN ou se são efeitos hormonais, os quais podem estimular o crescimento da raiz e esta com consequência, obter mais N do solo, ou ainda, se esses resultados são provenientes da atividade redutase do nitrato pelas bactérias (Bashan e Levanony, 1990).

Por outro lado, a FBN por bactérias diazotróficas associadas a raízes de gramíneas pode ser importante nas condições encontradas no Pantanal, uma vez que o fornecimento de nitrogênio via FBN pode melhorar a produtividade e o valor nutritivo das forrageiras, assim esta associação poderá, a médio prazo, contribuir para o desenvolvimento sócioeconômico da região, através da diminuição dos custos de produção, principalmente do cultivo das forrageiras exóticas e da manutenção do agroecossistema do Pantanal.

Devido aos fatos mencionados, objetivou-se com o presente trabalho avaliar os efeitos da inoculação de *Azospirillum* spp. no número de bactérias nas raízes e parte aérea das plantas, bem como, a produção de MS e N total acumulado na parte aérea e produção de MS nas raízes, em três espécies de gramíneas forrageiras do Pantanal.

Material e métodos

O experimento foi conduzido em vasos em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia em Seropédica-RJ, Brasil, utilizando vasos sob condições permanente de alagamento durante o período experimental. O solo e mudas das três gramíneas forrageiras usadas no experimento, foram coletadas na fazenda Nhumirim, subregião da Nhecolândia, pertencente à Embrapa Pantanal, situada a 18° 59' S e 56° 39' W.

As espécies de gramíneas usadas

foram duas nativas, o capim Carona (*Elyonurus muticus*) e o capim Mimoso (*Axonopus purpusii*) e uma exótica, o capim Braquiaria também chamado de kikuio da Amazonia (*Brachiaria humidicola*). O solo tipo Podzol Hidromórfico, contendo em média 0.5% de matéria orgânica e 2% de argila, apresentou a seguinte composição química nos 20 cm superficiais: pH = 4.5, Ca + Mg = 0.6 cmol_c/dm³, Al = 0.3, P = 18 mg/kg e K = 27 mg/kg. O solo foi peneirado em peneira de 2 mm e colocado 3 kg de solo em cada vaso com capacidade para 5 kg, onde as mudas dos capins foram plantadas 15 dias após sua aclimação.

Antes do plantio foram feitas contagens de bactérias diazotróficas nesse solo com todos os meios de cultivos pelo método NMP (Dobereiner et al., 1995) e foram encontradas em torno de 10³ células/g de solo. O solo foi adubado com 2 g/vaso do composto Fosfomag (15% P e 20% Mg) macerado.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com os vasos arranjados num fatorial 3 x 3 x 3, de três tratamentos (controle sem inoculação, inoculação de uma mistura de *Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum* e inoculação de *A. amazonense*) três espécies de capins: Braquiaria, Carona e Mimoso e três épocas de coleta (30, 60 e 90 dias após a inoculação) e quatro repetições.

As bactérias do gênero *Azospirillum*, isoladas das próprias plantas, foram inoculadas nas forrageiras a fim de se avaliar o efeito das mesmas sobre a produção de MS aérea e acúmulo de N. Para a inoculação, as bactérias foram crescidas em meio DYGS por 24 h e 2 ml dessa suspensão contendo 10⁸ células/ml foram inoculadas em cada vaso. Três dias após a inoculação os vasos foram inundados com uma lâmina d'água de 3 a 4 cm. A contagem de bactérias diazotróficas na raiz lavada, esterelizada e na parte aérea da planta foi feita pelo método do NMP nas placas com meio NFb semisólido e sólido para *Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum*, e nas placas com meio LGI semisólido e sólido para *A. amazonense*. A avaliação da produção de MS e do N acumulado na parte aérea de plantas dos capins foi feita nas três

coletas, ao passo que, a produção de MS das raízes foi feita na segunda e terceira coletas. O N foi avaliado pelo método de Kjeldahl modificado por Alves et al. (1989). As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa estatístico MSTATC e o teste Tukey a 5% de probabilidade foi aplicado, na separação das médias. Foi também usado o Programa SAEG Versão 9.0, para análise de regressão e correlações de Pearson.

Resultados e discussão

Resultados do número de bactérias crescidas das raízes lavadas, esterelizadas e da parte aérea das plantas dos três capins são mostrados nas Tabelas 1, 2 e 3 para o meio LGI e Tabelas 4, 5 e 6 para o meio NFB. Apesar de não ter sido observada diferenças significativas entre os tratamentos com inoculação e entre as coletas, na população de bactérias diazotróficas nas amostras de raízes lavadas e raízes esterilizadas (Tabela 1) de capim Braquiaria (*B. humidicola*) inoculadas em meio LGI houve efeito da inoculação na população de bactérias dentro da primeira coleta nas raízes lavadas e na segunda coleta nas raízes esterelizadas. Isso sugere

que houve um incremento de um número maior de bactérias advindo da inoculação que pode ter produzido um efeito sinérgico sobre a população préexistente nas mudas das plantas, estimulando o crescimento desses microrganismos.

Na parte aérea (Tabela 1) houve diferença no número de bactérias crescidas no meio LGI entre as épocas de coleta, com os maiores valores encontrados nas duas últimas coletas. Na segunda coleta a inoculação com a mistura de *Azospirillum* e o controle apresentaram maior número de bactérias do que o tratamento com *A. amazonense*, enquanto que este tratamento na terceira coleta foi superior a mistura. O número de bactérias crescidas no meio LGI proveniente da parte aérea do capim Braquiária foi altamente correlacionado ($R = 0.81$, $P < 0.0039$) com a produção de MS da parte aérea do capim.

A população de bactérias presentes nas raízes lavadas e parte aérea (Tabela 2) do capim Mimoso (*A. purpusii*) crescidas no meio LGI não foi diferente entre e dentro das coletas e entre tratamentos de inoculação. Isso pode indicar que a população das bactérias presentes nas mudas dessas plantas

Tabela 1. Logaritmo do número de bactérias/planta crescidas em meio LGI em raízes lavadas (A), raízes esterilizadas (B) e parte aérea (C) de capim braquiaria (*Brachiaria humidicola*) nos tratamentos, controle sem inoculação, inoculação da mistura de *Azospirillum. brasiliense* e *A. lipoferum* e inoculação de *A. amazonense*. Média de quatro repetições.

Tratamento	Coletas (meses após a inoculação)			Média
	1	2	3	
	(A) Raízes lavadas			
Controle	4.723 b*	6.143 a	5.715 a	5.520 A
Mistura	6.095 a	6.077 a	6.102 a	6.092 A
<i>A. amazonense</i>	5.980 a	5.867 a	6.590a	6.146 A
Média	5.59 A	6.029 A	6.136 A	
	(B) Raízes esterilizadas			
Controle	2.470 a	2.470 b	3.320 a	2.753 A
Mistura	3.200 a	3.920 a	4.410 a	3.843 A
<i>A. amazonense</i>	3.375 a	3.015 a	3.232 a	3.208 A
Média	3.015 A	3.135 A	3.654 A	
	(C) Parte aérea			
Controle	4.475 a	5.442 a	5.895 a	5.271 A
Mistura	3.732 a	5.442 a	5.132 b	4.769 A
<i>A. amazonense</i>	3.535 a	3.962 b	6.377 a	4.625 A
Média	3.914 B	4.949 A	5.802 A	

* Valores seguidos de mesma letra minúscula dentro de cada coluna para coletas e maiúscula na coluna para médias dos tratamentos de inoculação e médias de coletas não são diferentes significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Logaritmo do número de bactérias/planta crescidas em meio LGI em raízes lavadas (A), raízes esterilizadas (B) e parte aérea (C) de capim Mimoso (*Axonopus purpusii*) em diferentes épocas e nos tratamentos controle sem inoculação, inoculação da mistura de *Azospirillum brasilense* e *A.lipoferum* e inoculação de *A.amazonense*. Média de quatro repetições.

Tratamento	Coletas (meses após a inoculação)			Média
	1	2	3	
	(A) Raiz lavada			
Controle	5.980 a*	5.785 a	6.492 a	6.086 A
Mistura	5.765 a	5.827 a	6.450 a	6.014 A
<i>A.amazonense</i>	5.030 a	5.560 a	6.348 a	5.546 A
Média	5.592 A	5.724 A	6.430 A	
	(B) Raiz esterilizada			
Controle	3.420 b	3.890 a	5.915 a	4.408 A
Mistura	4.158 a	3.997 a	6.012 a	4.722 A
<i>A.amazonense</i>	2.563 b	4.450 a	5.487 a	4.167 A
Média	3.380 B	4.112 AB	5.805 A	
	(C) Parte aérea			
Controle	4.728 a	4.947 a	6.185 a	5.287 A
Mistura	5.242 a	5.575 a	5.762 a	5.527 A
<i>A.amazonense</i>	5.512 a	5.535 a	6.276 a	5.775 A
Média	5.165 A	5.352 A	6.075 A	

* Valores seguidos de mesma letra minúscula dentro de cada coluna para coletas e maiúscula na coluna para médias dos tratamentos de inoculação e médias de coletas não são diferentes significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

não sofreu qualquer mudança devido a uma inoculação de um número maior de bactérias diazotróficas.

Já nas raízes esterilizadas houve um efeito da época de coleta (C) sobre o número de bactérias (NB) diazotróficas, mostrado na Tabela 2 e evidenciado pela equação de regressão ajustada: $NB = 2.04 + 0.0400C$ ($R^2 = 0.81$, $P < 0.0020$). Isto pode estar relacionado com as condições fisiológicas da planta que estaria nesse período já aclimatada às condições de vaso e alagamento, podendo liberar exsudatos que podem ter contribuído numa maior densidade de microrganismos. Dentro da primeira coleta o tratamento de inoculação com a mistura de *Azospirillum* pode ter beneficiado de alguma forma o aumento no número de bactérias diazotróficas ou a bactéria inoculada pode ter sido mais competitiva que as outras já existentes na planta.

O capim Carona (*E. muticus*) mostrou diferenças significativas no número de bactérias (NB) crescidas nas raízes lavadas e esterilizadas em meio LGI (Tabela 3) no decorrer das coletas (C), respectivamente expressas pelas equações ajustadas de regressão: $NB = 4.989 + 0.0183C$ ($R^2 = 0.63$,

$P < 0.0108$) e $NB = 6.367 - 0.1050C + 0.0012C^2$ ($R^2 = 0.89$, $P < 0.0013$). No entanto, não foi verificado o efeito de tratamento com inoculação nas coletas, bem como entre os tratamentos dentro das coletas. A maior densidade de bactérias na terceira coleta pode estar relacionada também às condições fisiológicas da planta, estando esta mais adaptada às condições do experimento nessa última fase. O número de bactérias crescidas no meio LGI, proveniente de raízes lavadas do capim Carona, correlacionou negativamente ($R = -0.81$, $P < 0.0255$) com a produção de raízes do capim. Também foi encontrado um maior número de bactérias (NB) diazotróficas na parte aérea dessa planta com o decorrer das coletas (C), expresso pela equação ajustada de regressão: $NB = 9.200 - 0.1950C + 0.001833C^2$ ($R^2 = 0.89$, $P < 0.0013$), porém, foi observado efeito da inoculação sobre a população dessas bactérias na segunda coleta, mostrando maior número dos microrganismos nos tratamentos mistura de *Azospirillum* e controle (Tabela 3). Isto pode ser devido a efeitos sinérgicos entre a população nativa e a inoculada na planta.

As raízes lavadas e esterilizadas (Tabela 4) do capim Braquiaria não apresentaram diferenças significativas na população de bactérias diazotróficas que

Tabela 3. Logaritmo do número de bactérias por planta crescidas em meio LGI em raízes lavadas (A), raízes esterilizadas (B) e parte aérea (C) de capim Carona (*Elyonurus muticus*) em diferentes épocas e nos tratamentos controle sem inoculação, inoculação da mistura de *Asozpirillum brasilense* e *A.lipoferum* e inoculação de *A.amazonense*. Média de quatro repetições.

Tratamento	Coletas (meses após a inoculação)			Média
	1	2	3	
	(A) Raiz lavada			
Controle	5.033 a*	6.490 a	6.615 a	6.046 A
Mistura	5.437 a	5.665 a	6.402 a	5.835 A
<i>A. amazonense</i>	5.980 a	6.480 a	6.742 a	6.401 A
Média	5.483 B	6.212 AB	6.587 A	
	(B) Raiz esterilizada			
Controle	4.553 a	4.617 a	6.517 a	5.229 A
Mistura	3.738 a	4.313 a	5.892 a	4.647 A
<i>A. amazonense</i>	4.538 a	3.872 a	6.700 a	5.037 A
Média	4.276 B	4.267 B	6.370 A	
	(C) Parte aérea			
Controle	5.472 a	4.050 a	7.140 a	5.554 A
Mistura	4.530 a	4.725 a	6.015 a	5.090 A
<i>A. amazonense</i>	5.007 a	3.450 b	6.370 a	4.942 A
Média	5.003 AB	4.075 B	6.508 A	

* Valores seguidos de mesma letra minúscula dentro de cada coluna para coletas e maiúscula na coluna para médias dos tratamentos de inoculação e médias de coletas não são diferentes significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

cresceram no meio NFb no decorrer das três coletas, bem como não foram verificadas diferenças entre os tratamentos ao longo das coletas. Também não foi verificado efeito do tratamento sobre a densidade dessas bactérias em cada coleta, exceto na

segunda coleta da parte aérea (Tabela 4) onde o tratamento com a mistura de *Asozpirillum* foi superior ao tratamento com *A. amazonense* mas não diferenciando do controle.

Tabela 4. Logaritmo do número de bactérias por planta crescidas no meio NFb. em raízes lavadas (A), raízes esterilizadas (B) e parte aérea (C) de capim Braquiaria (*Brachiaria humidicola*) em diferentes épocas e nos tratamentos controle sem inoculação, inoculação da mistura de *Asozpirillum brasilense* e *A.lipoferum* e inoculação de *A.amazonense*. Média de quatro repetições.

Tratamento	Coletas (meses após a inoculação)			Média
	1	2	3	
	(A) Raiz lavada			
Controle	6.840 a*	6.087 a	6.120 a	6.349 A
Mistura	6.382 a	6.172 a	6.055 a	6.203 A
<i>A. amazonense</i>	6.645 a	5.785 a	6.492 a	6.307 A
Média	6.622 A	6.015 A	6.222 A	
	(B) Raiz esterilizada			
Controle	4.345 a	3.975 a	2.950 a	3.757 A
Mistura	4.462 a	4.770 a	3.795 a	4.342 A
<i>A. amazonense</i>	4.577 a	3.635 a	2.752 a	3.655 A
Média	4.462 A	4.127 A	3.166 A	
	(C) Parte aérea			
Controle	4.810 a	5.245 ab	5.467 a	5.174 A
Mistura	4.170 a	5.770 a	5.077 a	5.006 A
<i>A. amazonense</i>	5.255 a	4.347 b	5.885 a	5.162 A
Média	4.745 A	5.121 A	5.477 A	

*Valores seguidos de mesma letra minúscula dentro de cada coluna para coletas e maiúscula na coluna para médias dos tratamentos de inoculação e médias de coletas não são diferentes significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

O capim Mimoso não apresentou diferenças no número de bactérias diazotróficas em todas as partes da planta (Tabela 5) no decorrer das épocas de coleta, bem como entre os tratamentos. As raízes lavadas e parte aérea também não mostraram efeito do tratamento com inoculação dentro de cada coleta, no entanto, as raízes lavadas na terceira coleta apresentaram efeitos significativos decorrentes dos tratamentos, mostrando um número de bactérias maior no controle sem inoculação que nos outros tratamentos. É possível que as bactérias inoculadas não foram tão competitivas em relação às aquelas pré-existentes nas plantas e sua população tenha diminuído ou tenha se mantido estável como aconteceu para as outras partes da planta, não conseguindo se estabelecer.

O número de bactérias diazotróficas nas raízes lavadas de capim Carona (Tabela 6) não foi diferente para as três épocas amostradas e também não houve efeito de tratamento entre as coletas e em coletas separadas. É possível que as bactérias inoculadas não foram tão competitivas quanto a população natural da planta. Nas raízes esterilizadas (Tabela 6) a população

de bactérias diazotróficas foi significativamente maior na terceira coleta quando comparada com a segunda, mas diferenciou da primeira coleta. Analisando a segunda e terceira coletas separadamente, podemos observar que na segunda coleta o número de bactérias no tratamento com a mistura de bactérias se igualou estatisticamente ao controle e foi superior ao inoculado com *A. amazonense*. Isto pode indicar que a inoculação da mistura de *Azospirillum* pode ter estimulado o aumento da população de bactérias nativas dessa planta. Na terceira coleta, o tratamento com *A. amazonense* apresentou maior número de bactérias que o tratamento inoculado com a mistura mas não diferenciou do controle.

Não houve efeito da coleta sobre o número de bactérias presentes na parte aérea da planta, bem como efeito de tratamento inoculação (Tabela 6). Analisando a parte aérea da planta em cada coleta, observou-se que o tratamento com *A. amazonense* promoveu um aumento do número de bactérias diazotróficas na primeira coleta, enquanto na segunda coleta ela não diferenciou da inoculação com a mistura de *Azospirillum* e do controle o que pode indicar, de certa forma, que a inoculação de bactérias

Tabela 5. Logaritmo do número de bactérias por planta crescidas no meio NFb em raízes lavadas (A), raízes esterilizadas (B) e parte aérea (C) de capim Mimoso (*Axonopus purpusii*) em diferentes épocas e nos tratamentos controle sem inoculação, inoculação da mistura de *A. brasilense* e *A. lipoferum* e inoculação de *A. amazonense*. Média de quatro repetições.

Tratamento	Coletas (meses após a inoculação)			Média
	1	2	3	
(A) Raiz lavada				
Controle	5.747 a*	5.205 a	6.465 a	5.806 A
Mistura	4.995 a	5.730 a	5.945 b	5.557 A
<i>A. amazonense</i>	5.430 a	5.642 a	5.472 b	5.515 A
Média	5.391 A	5.526 A	5.961 A	
(B) Raiz esterilizada				
Controle	3.515 b	3.123 a	4.740 a	5.806 A
Mistura	4.577 a	3.123 a	3.745 a	5.557 A
<i>A. amazonense</i>	3.123 b	3.320 a	4.695 a	3.71 B
Média	3.738 A	3.188 A	4.393 A	
(C) Parte aérea				
Controle	5.640 a	4.947 a	5.620 a	5.402 A
Mistura	5.832 a	5.640 a	5.860 a	5.777 A
<i>A. amazonense</i>	5.105 a	5.455 a	5.740 a	5.433 A
Média	5.552 A	5.347 A	5.740 A	

a. Valores seguidos de mesma letra minúscula dentro de cada coluna para coletas e maiúscula na coluna para médias dos tratamentos de inoculação e médias de coletas não são diferentes significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 6. Logaritmo do número de bactérias por planta crescidas no meio NFb em raízes lavadas (A), raízes esterilizadas (B) e parte aérea (C) de capim Carona (*Elyonurus muticus*) em diferentes épocas e nos tratamentos controle sem inoculação, inoculação da mistura de *A. brasilense* e *A. lipoferum* e inoculação de *A. amazonense*. Média de quatro repetições.

Tratamento	Coletas (meses após a inoculação)			Média
	1	2	3	
	(A) Raiz lavada			
Controle	6.615 a	6.247 a	7.140 a	6.667 A
Mistura	6.397 a	6.183 a	6.427 a	6.336 A
<i>A. amazonense</i>	6.865 a	6.120 a	6.840 a	6.608 A
Média	6.626 A	6.183 A	6.802 A	
	(B) Raiz esterilizada			
Controle	5.600 a	4.572 ab	6.145 ab	5.439 A
Mistura	6.365 a	5.907 a	5.487 b	5.920 A
<i>A. amazonense</i>	5.680 a	3.690 b	6.840 a	5.403 A
Média	5.882 AB	4.723 B	6.157 A	
	(C) Parte aérea			
Controle	5.955 b	5.017 b	6.207 a	5.727 A
Mistura	4.805 b	6.055 ab	6.207 a	5.689 A
<i>A. amazonense</i>	6.615 a	6.642 a	6.390 a	6.549 A
Média	5.792 A	5.905 A	6.262 A	

* Valores seguidos de mesma letra minúscula dentro de cada coluna para coletas e maiúscula na coluna para médias dos tratamentos de inoculação e médias de coletas não são diferentes significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

estimulou o crescimento da população nativa na parte aérea, podendo ter contribuído para a eficiência na FBN, bem como para o melhor desenvolvimento das raízes, devido aos possíveis efeitos hormonais que possuem essas bactérias.

De uma maneira geral, a inoculação de bactérias diazotróficas em plantas que já possuem uma microflora nativa pode resultar numa interação sinérgica entre as bactérias inoculadas e as nativas, sendo que as inoculadas podem contribuir para um melhor desempenho de microrganismos benéficos presentes na planta. Bashan e Holguin (1997) numa revisão sobre as relações de *Azospirillum* com as plantas mostraram que misturas de bactérias interagem entre si e auxiliam na produção de nutrientes, remoção de alguns produtos inibitórios, cooperando um com o outro através de mecanismos físicos e bioquímicos. Outra hipótese levantada é que as bactérias inoculadas poderiam ser mais competitivas e se estabeleceriam melhor no solo. Burdman et al. (2000) descreveram que as bactérias do gênero *Azospirillum* possuem várias características que parecem contribuir para sua sobrevivência e competitividade no solo, como a quimiotaxia e motilidade, além de

produzir bacteriocinas que podem aumentar a competitividade no solo.

Os resultados dos efeitos da inoculação com *Azospirillum* na produção de MS da raiz, da parte aérea e acúmulo de N da parte aérea das coletas nos três capins são mostrados nas Figura 1, 2 e 3, respectivamente. Observações nas diferenças no volume das raízes das plantas com e sem inoculação durante as coletas, estimulou a investigação do efeito da inoculação sobre o peso da MS das raízes na segunda e terceira coletas.

As plantas do capim Braquiaria inoculadas com a mistura de *Azospirillum*, assim como com *A. amazonense* tiveram produção da MS radicular significativamente maior que o tratamento sem inoculação nas duas coletas avaliadas (Figura 1). No capim Mimosa foram observadas diferenças significativas das plantas inoculadas com *A. amazonense* em relação àquelas inoculadas com a mistura de *Azospirillum* na coleta feita aos 60 dias, no entanto não foi melhor que o controle. Aos 90 dias pôde-se notar que as plantas de capim Mimosa inoculadas com a mistura de *Azospirillum* foi significativamente maior que os outros tratamentos (Figura 1).

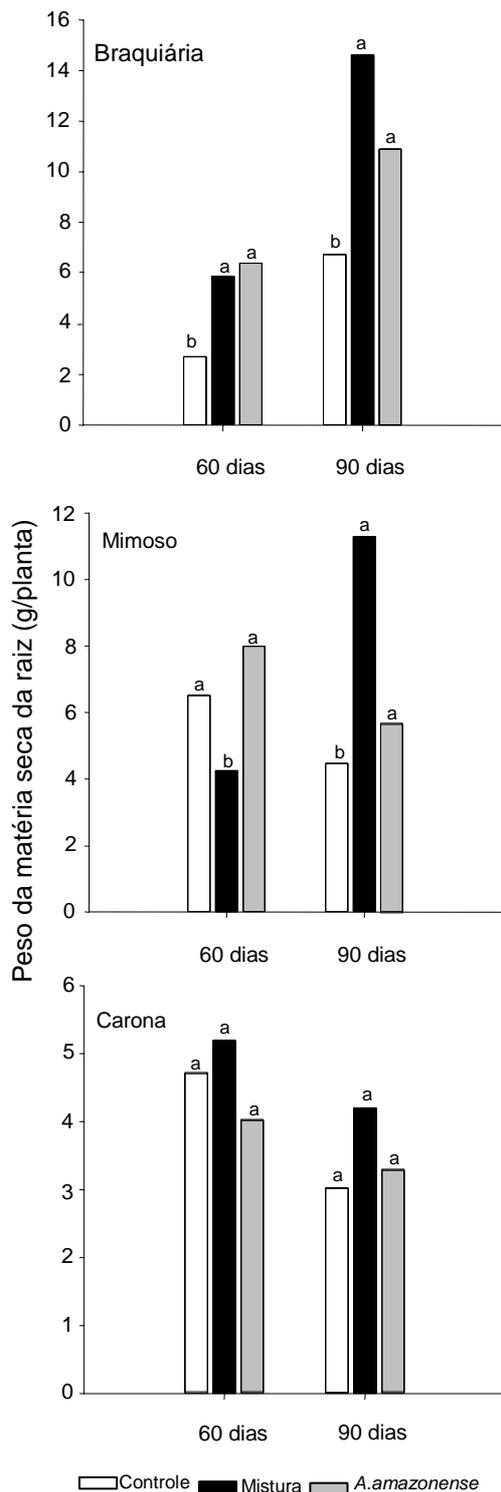


Figura 1. Peso da MS da raiz de Braquiária (*Brachiaria humidicola*), capim Mimoso (*Axonopus purpusii*), capim Carona (*Elyonurus muticus*), em diferentes épocas e nos tratamentos controle sem inoculação, inoculação da mistura de *Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum* e inoculação de *A. amazonense*. Média de quatro repetições. Valores seguidos de mesma letra dentro de cada coleta não são significativamente diferentes pelo teste Tukey a 5%.

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com inoculação nas duas coletas realizadas na produção de MS de raízes do capim Carona (Figura 1). O aumento da MS das raízes no presente trabalho deve estar relacionado com a produção de fitormônios das bactérias inoculadas, que pode induzir o crescimento das raízes. Muitos autores atribuem que esta característica aliada à FBN é muito importante uma vez que as plantas podem dessa maneira aumentar a sua capacidade de absorção de água e nutrientes essenciais para o seu crescimento. Okon e Kapulnik (1986) relataram que os principais efeitos da inoculação com *Azospirillum* foram derivados de mudanças morfológicas e fisiológicas em raízes das plantas inoculadas, precedido do aumento da absorção de água e sais minerais.

Não foi observado efeito dos tratamentos de inoculação na produção de MS da parte aérea do capim Braquiária na coleta feita aos 30 e 90 dias após a implantação do experimento, no entanto aos 60 dias, as plantas submetidas aos tratamentos com inoculação apresentaram produção de MS superior ao controle (Figura 2).

O capim Mimoso não apresentou diferença na produção de MS entre os tratamentos com inoculação na coleta feita aos 30 dias, porém ao 60 dias o tratamento com *A. amazonense* mostrou-se superior ao tratamento com a mistura e com o controle, e aos 90 dias ambos tratamentos com inoculação não diferenciaram entre si mas apresentaram maior produção de MS de parte aérea do que o controle (Figura 2).

Por ser uma planta pouco adaptável as condições de alagamento e sendo uma planta nativa da região pantaneira, o capim Carona teve dificuldades de aclimação em casa de vegetação, uma vez que foram observadas muitas oscilações no desenvolvimento da planta durante o período experimental, o que poderia explicar o comportamento desse capim em relação aos tratamentos impostos. Mesmo assim, na coleta feita aos 30 dias, as plantas inoculadas apresentaram produções de MS da parte aérea superior ao controle. Aos 60 dias o tratamento com a mistura de *Azospirillum* produziu mais MS do que o

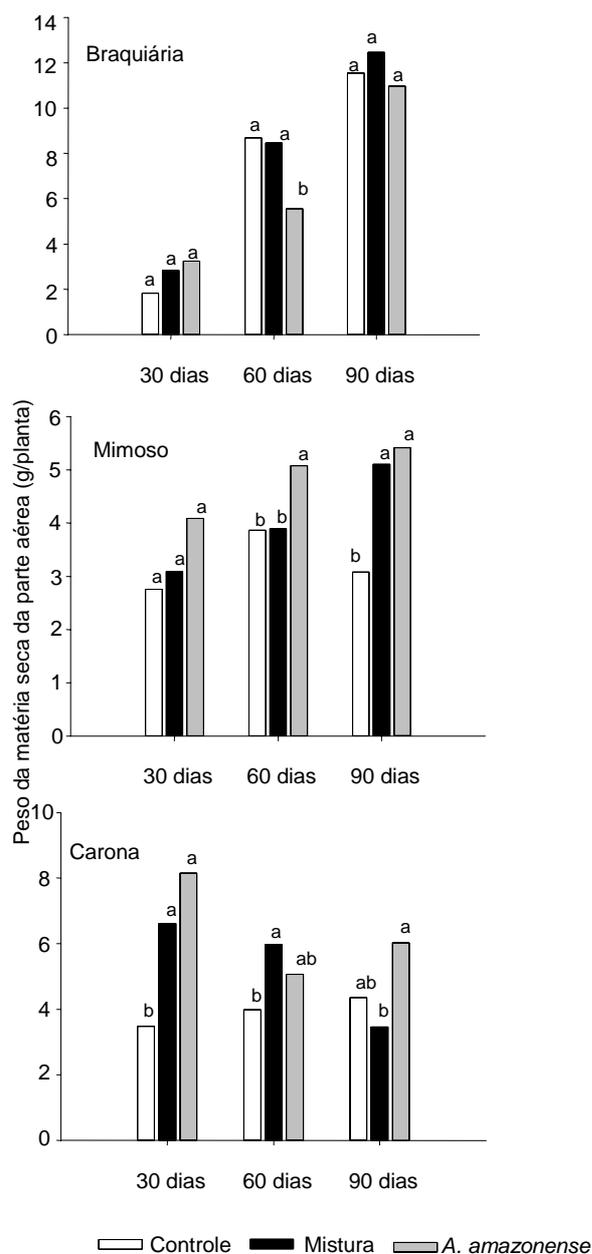


Figura 2. Peso da MS da parte aérea de Braquiária (*Brachiaria humidicola*), capim Mimoso (*Axonopus purpusii*) e capim Carona (*Elyonurus muticus*) em diferentes épocas e nos tratamentos controle sem inoculação, inoculação da mistura de *Asozpirillum brasilense* e *A.lipoferum* e inoculação de *A.amazonense*. Média de quatro repetições. Valores seguidos de mesma letra dentro de cada coleta não são significativamente diferentes pelo teste Tukey a 5%.

controle, porém aos 90 dias foi a inoculação com *A. amazonense* que se destacou, mas não foi diferente do tratamento controle (Figura 2).

Foi observado um efeito significativo

da inoculação com mistura de *A. brasilense* + *A. lipoferum* no N acumulado na parte aérea de plantas do capim Braquiária aos sessenta e noventa dias após a instalação do experimento (Figura 3). No capim Mimoso esse mesmo efeito foi observado aos noventa dias após a inoculação da mistura. Para o capim Carona a inoculação com a mistura promoveu um aumento significativo no acúmulo de N na primeira e segunda coletas.

Os resultados obtidos mostraram que os efeitos da inoculação sobre a produção da MS e acúmulo de N na parte aérea das plantas dos três capins variaram de acordo com a espécie em estudo, mas de uma maneira geral, os efeitos da inoculação de bactérias na planta tornaram-se mais evidentes aos sessenta e aos 90 dias. Provavelmente este foi o tempo que as bactérias levaram para aclimatar e restabelecer o equilíbrio com os microrganismos presentes nas plantas.

Um fato interessante foi o efeito da inoculação com a mistura de bactérias em relação a inoculação com o *A. amazonense*. Poucos estudos de inoculação em plantas, envolvendo misturas de estirpes de *Azospirillum* em comparação à inoculação de apenas uma estirpe, têm sido feitos. O trabalho desenvolvido por Han e New (1998) mostrou aumento na MS e acúmulo de N em plantas de trigo quando as plantas foram inoculadas com uma mistura de estirpes de *Azospirillum* em comparação com a inoculação simples. Oliveira (2000) num experimento de inoculação de bactérias diazotróficas em plantas de cana de açúcar mostrou que a inoculação com a mistura de estirpes foi capaz de suprir em mais de 30% as necessidades de nitrogênio das plantas inoculadas quando comparadas com a comunidade bacteriana natural. Por outro lado, os trabalhos de inoculação em gramíneas forrageiras e de grãos têm apontado a espécie *A. brasilense* como aquela que tem apresentado melhores resultados (Fallik e Okon, 1996; Itzigsohn et al., 2000).

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram algumas vezes a eficiência da inoculação, isto pode ser explicado pelo fato que essas plantas foram

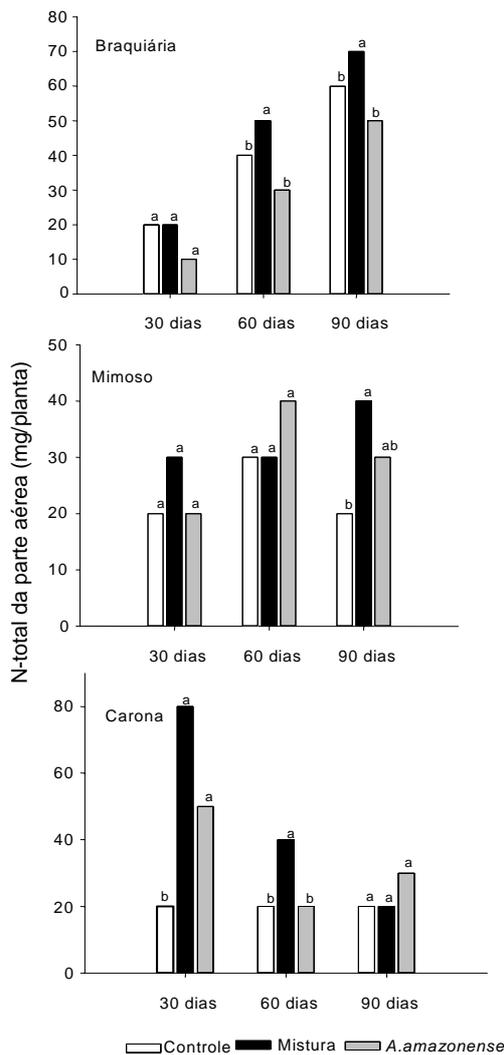


Figura 3. N total da parte aérea de Braquiária (*Brachiaria humidicola*), capim Mimoso (*Axonopus purpusii*) e capim Carona (*Elyonurus muticus*) em diferentes épocas e nos tratamentos controle sem inoculação, inoculação da mistura de *A. brasilense* e *A. lipoferum* e inoculação de *A. amazonense*. Média de quatro repetições. Valores seguidos de mesma letra dentro de cada coleta não são significativamente diferentes pelo teste Tukey a 5%.

inoculadas com bactérias previamente isoladas das próprias plantas, indicando haver uma certa especificidade entre a planta e o hospedeiro. A literatura consultada não mostra muitos estudos na área de inoculação de gramíneas forrageiras, principalmente as tropicais. Assim, o pioneirismo deste trabalho mostra a viabilidade de se usarem métodos biológicos que permitem estudar a ciclagem de nutrientes no ambiente pantaneiro.

Conclusões

Os efeitos da inoculação de bactérias na planta tornou-se mais evidente aos 60 e 90 dias após o plantio. Os efeitos da inoculação variaram de acordo com a espécie de capim em estudo, porém grande parte das plantas inoculadas com a mistura de bactérias (*A. brasilense* + *A. lipoferum*) apresentaram maior produção de MS de raiz, de parte aérea e acúmulo de N do que o controle sem inoculação.

Resumen

En casa de vegetación de la Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Agrobiologia) localizada en Seropédica-RJ, Brasil, se evaluaron los efectos de la inoculación con *Azospirillum* spp. en la colonización de bacterias, la acumulación de N y producción de MS en la parte aérea y las raíces de las gramíneas Carona (*Elyonurus muticus*), Mimoso (*Axonopus purpusii*) y Braquiaria (*Brachiaria humidicola*). Las plantas fueron establecidas en macetas con suelo Podzol Hidromórfico recolectado en la subregión de la Nhecolândia (18° 59' S e 56° 39' O) de Pantanal, Brasil. Antes de la siembra se hicieron conteos de bacterias diazotróficas en el suelo, encontrándose un promedio de 10³/g de suelo. Se utilizó un diseño de bloques al azar en arreglo factorial 3 x 3 x 3 (tres tratamientos de inoculación = control sin inoculación, inoculación de una mezcla de *A. brasilense* y *A. lipoferum* e inoculación de *A. amazonense*), tres especies de forrajeras y tres épocas de cosecha (30, 60 y 90 días después de la inoculación) con cuatro repeticiones. Para la inoculación, las bacterias fueron aisladas de plantas nativas del Pantanal. Tres días después de la inoculación las macetas fueron inundadas con una lámina de agua de 3 a 4 cm. Los efectos de los tratamientos en el número de bacterias en las raíces y en la parte aérea de las plantas dependieron de la combinación entre el medio de cultivo, la especie de forrajera y la época de recolección. En general, se observó un efecto de sinergia entre las bacterias inoculadas y las nativas en el suelo. El aumento de la producción de MS en las raíces posiblemente se relacionó con la producción de fitohormonas por las

bacterias inoculadas, lo que puede inducir el crecimiento de las raíces. Los efectos de la inoculación sobre la producción de MS y la acumulación de N en la parte aérea de las plantas de las tres gramíneas variaron de acuerdo con la especie en estudio y el tiempo después de la inoculación. La inoculación con la mezcla de *Azospirillum* mostró los mejores resultados después de 60 y 90 días. El conocimiento de las bacterias diazotróficas asociadas con las forrajeras del Pantanal ayudará a la realización de nuevos trabajos que contribuirán a un mejor desarrollo de los sistemas agropastoriles en esa región.

Summary

This work evaluates the effects of the inoculation of *Azospirillum* in a bacteria culture, the cumulated N and the DM yield in the roots and shoots of the grasses Carona (*Elyonurus muticus*), Mimosa (*Axonopus purpusii*) and Braquiaria (*Brachiaria humidicola*) sowed in pots with Podzol Hydromorphic collected from the sub-region of Nhecolândia (18° 59' S e 56° 39' W) of Pantanal, Brasil. Before the sowing, countings of diazotrophic bacteria in the soil were made, finding around 10³ cells/g soil. A randomized block design in a factorial array 3 x 3 x 3 was used (three treatments of inoculation = control without inoculation, inoculation of a combination of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum*, and inoculation of *A. amazonense*), three species of forages, three times of harvesting (30, 60 and 90 days after the inoculation), and four repetitions. For the inoculation, bacteria from the Pantanal native plants were isolated. Three days after the inoculation, the pots were flooded with a 3-4 cm layer of water. The effects of the treatments with inoculation in the number of bacteria in the roots and shoots depended on the combination between the culture (LG or NFb), the forage species and the time of harvesting; in general, a synergy effect between the inoculated and the soil-native bacteria was observed. The increase of DM yield in the roots was related probably on the phytohormones produced by the inoculated bacteria, which could induce to the growth of the roots. The effects of the inoculation on the DM yield and the N accumulation in the shoots of the three

species of grasses varied according to the studied species and the time after the inoculation. The inoculation with the mixture of *Azospirillum* showed higher results after 60 and 90 days. The knowledge of the diazotrophic bacteria associated to the Pantanal forrages will permit the establishment of new studies contributing to a better development of an agro-pastoral system in the Pantanal conditions.

Referências

- Alves, B. J. R.; Urquiaga, S.; Cadisch, J.; Souto, C. M.; e Boddey, R. M. 1989. In situ estimation of soil nitrogen mineralization. En: Dynamics of soil organic matter in relation to sustainability of tropical agriculture Soil Microbiology and Biochemistry. San Diego: Academic Press.
- Bashan, Y. e Levanony, H. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Can. J. Microbiol. 36:591-608.
- Bashan, Y. e Holguin, G. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990 - 1996). Can. J. Microbiol. 43:103-121.
- Burdman, S.; Okon, Y.; e Jukervitch, E. 2000. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. Critical Rev. Microb. 26(2):91-110.
- Chalk, P. M. 1991. The contribution of associative and symbiotic nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of non-legumes. Plant Soil 132:29-39.
- Döbereiner, J.; Baldani, V. L. D.; e Baldani, J. I. 1995. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: Embrapa-SPI: Itaguaí, RJ : Embrapa-CNPAB. 60 p.
- Fallik, J. e Okon, Y. 1996. Inoculants of *Azospirillum brasilense*: biomass production, survival and growth

- promotion of *Setaria italica* and *Zea Mays*. Soil. Biol. Biochem. 28:123-126.
- Han, S. O. e New, P. B. 1998. Variation in Nitrogen fixing ability among natural isolates of *Azospirillum*. Microbiol. Ecol. 36:193-201.
- Itzigsohn, R.; Burdman, S.; Okon, Y.; Zaady, E.; Yonatan, R.; e Perevolotsky, A. 2000. Plant-growth promotion in natural pastures by inoculation with *Azospirillum brasilense* under suboptimal growth conditions. Arid Soil Res. Rehab. 13:151-158.
- Okon, Y. e Labandera-Gonzalez, C. A. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biol. Biochem. 12(26):1591-1601.
- Okon, Y. e Kapulnik, Y. 1986. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. Plant Soil 90:3-16.
- Oliveira, A. L. M. 2000. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio por bactérias diazotróficas na cultura da cana-de-açúcar: avaliação da interação entre espécies de relevância agrônômica com a planta hospedeira . Rio de Janeiro-RJ., Tese de Mestrado UFRJ, DBV. 127 p.