

Ocorrência de bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum* em arroz irrigado no estado de Santa Catarina¹

Occurrence of endophytic bacteria of the genus Azospirillum in lowland rice plants collected in Santa Catarina state

Isabel Cristina Mendonça Cardoso², Osmar Klauberg Filho², James Rodrigo Mariotto², David José Miquelluti², Dalciana Vicente², Anelize Nunes Neves²

Recebido em 18/02/2009; aprovado em 08/09/2010.

RESUMO

Bactérias do gênero *Azospirillum* podem colonizar endofiticamente plantas de arroz irrigado e contribuem para o desenvolvimento da cultura. O objetivo desse estudo foi avaliar a ocorrência de bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum* isoladas de raízes e colmos de arroz irrigado cultivado em Santa Catarina. Amostras de plantas de arroz irrigado foram coletadas em oito propriedades rurais nas cidades de Guaramirim (duas áreas), Massaranduba, Rodeio (duas áreas), Rio do Sul, Agronômica e Pouso Redondo. A ocorrência de bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum* em raízes desinfestadas e colmos foi avaliada através do método do Número Mais Provável de Propágulos (NMP), em meio seletivo semi-sólido NFb (*A. lipoferum* e *A. brasilense*) e LGI (*A. amazonense*), e a similaridade entre as áreas foi estimada através da análise de componentes principais (ACP). As bactérias crescidas nos meios semi-seletivos foram purificadas em seus respectivos meios, isoladas em meio BDA até a obtenção de culturas puras e caracterizadas morfológicamente. A densidade populacional média de *Azospirillum* spp. foi de $1,6 \times 10^8$ e $1,42 \times 10^8$ células g^{-1} de matéria fresca (meio LGI), e $1,76 \times 10^8$ e $1,56 \times 10^8$ células g^{-1} de matéria fresca (meio NFb), para raízes e colmos respectivamente. Ao final do isolamento, foram obtidos 62 isolados, dos quais a maior parte oriunda de raízes desinfestadas. Os resultados obtidos mostraram que

Azospirillum spp. ocorrem em densidades populacionais satisfatórias em regiões produtoras de arroz irrigado de Santa Catarina e podem ser encontrados colonizando endofiticamente raízes e colmos das plantas.

PALAVRAS-CHAVE: *Oryza sativa*, colonização endofítica, bactérias promotoras de crescimento vegetal.

SUMMARY

Bacteria of the genus *Azospirillum* can endophytically colonize lowland rice plants and contribute to the development of this culture. The objective of this work was to evaluate the occurrence of endophytic *Azospirillum* spp. isolated from roots and stems of lowland rice plants grown in the State of Santa Catarina, Brazil. Samples of lowland rice plants were collected in eight farms in the cities of Guaramirim (two areas), Massaranduba, Rodeio (two areas), Rio do Sul, Agronômica and Pouso Redondo. *Azospirillum* spp. occurrence in disinfested roots and stems of the collected plants was evaluated using the More Probable Number method (MPN), in two semi-solid selective broth: NFb (*A. lipoferum* and *A. brasilense*) and LGI (*A. amazonense*), and the similarity among the eight areas was estimated by the principal component analysis (PCA). The bacteria grown in semi-solid broths were purified in their

¹ Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor.

² Departamento de Solos e Recursos Naturais. Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina – CAV/UEDESC. Av. Luiz de Camões, 2090, Bairro: Conta Dinheiro, CEP 88520-000, Lages, SC. E-mail: cardosoicm@yahoo.com.br. *Autor para correspondência.

respective broths, isolated in PDA broth to obtain pure and morphologically characterized cultures. The mean population density of *Azospirillum* spp. varied from 1.6×10^8 to 1.42×10^8 cells g^{-1} of fresh matter (LGI), and from 1.76×10^8 to 1.56×10^8 cells g^{-1} of fresh matter (NFb), in roots and stem, respectively. Sixty two (62) isolates were obtained, most of them from disinfested roots. The results showed that *Azospirillum* spp. occurs in satisfactory population densities in lowland rice fields in Santa Catarina and can be found colonizing roots and stems of rice plants.

KEY WORDS: *Oryza sativa*, endophytic colonization, plant growth-promoting bacteria.

INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa*) é o grão de maior importância econômica e social no mundo por ser alimento básico para a maioria da população. O Brasil está entre os dez principais países produtores de arroz e, a região Sul, onde se concentra o cultivo de arroz irrigado, participa com 70% da produção brasileira. O estado de Santa Catarina, onde a atividade orizícola do estado é fonte de renda para aproximadamente dez mil famílias de pequenos produtores, está entre os principais produtores de arroz e junto com o Rio Grande do Sul detém as maiores produtividades do país (ALONÇO et al., 2005; CONAB, 2008).

A condição de inundação na cultura do arroz irrigado determina uma ecologia microbiana especial e diversificada (KUSS, 2006). Devido ao alagamento do solo, a difusão de oxigênio é reduzida e assim cria-se um ambiente favorável ao desenvolvimento de bactérias microaerofílicas como as do gênero *Azospirillum* que contribuem para melhor nutrição e desenvolvimento da cultura (DÖBEREINER, 1990; SOUZA et al., 2000). Essas bactérias podem ser encontradas colonizando a rizosfera, os colmos e até mesmo folhas em associação endofítica com diversas plantas, dentre elas as gramíneas de interesse econômico cultivadas em regiões de clima tropical, como milho, trigo, aveia e arroz (BALDANI e BALDANI, 2005; REIS e TEIXEIRA, 2005; SILVA, 2006).

As principais espécies do gênero *Azospirillum* estudadas atualmente são *A. lipoferum*, *A. brasilense*

e *A. amazonense*. Essas bactérias podem ser isoladas através dos meios de culturas semi-específicos NFb (*A. lipoferum* e *A. brasilense*) e LGI (*A. amazonense*), ambos livres de nitrogênio e que se diferenciam devido às fontes de carbono. *Azospirillum lipoferum* e *A. brasilense* crescem em meio cuja fonte de carbono é o ácido málico e *A. amazonense* utiliza a sacarose como fonte de carbono e energia (DÖBEREINER et al., 1995).

As bactérias do gênero *Azospirillum* são de ampla ocorrência e podem ser encontradas em densidades populacionais variadas dependendo da sua interação com o genótipo e o ambiente. Ao avaliar a ocorrência de *Azospirillum* spp. em solo e raízes de genótipos de arroz irrigado cultivados Rio Grande do Sul, Kuss (2006) observou densidades populacionais mais baixas de *A. lipoferum*, *A. brasilense* e *A. amazonense* no solo (10^3 células g solo seco $^{-1}$) enquanto nas raízes essas populações variaram entre 10^4 e 10^8 células g raízes $^{-1}$. Estudos de ocorrência de bactérias do gênero *Azospirillum* são importantes devido ao seu caráter ecológico, pois podem fornecer informações úteis a respeito do impacto do manejo de um determinado ecossistema sobre a comunidade bacteriana e se esta é influenciada pelo solo e condições ambientais. Comparando a ocorrência de *Azospirillum* spp. em solo de campo nativo e solo cultivado com milho, na região de Guarapuava no Paraná, Pittner et al. (2007) observaram que a flutuação populacional de *Azospirillum* entre agosto de 2003 e abril de 2004 foi influenciada pelas condições ambientais e também pelo manejo do solo, pois as populações mais altas foram encontradas no solo da área de cultivo de milho ($2,07 \times 10^4$ células g solo $^{-1}$) em relação à área de campo nativo ($1,69 \times 10^4$ células g solo $^{-1}$).

O interesse da comunidade científica em pesquisas sobre *Azospirillum* spp. é justificado pela capacidade desses microrganismos de promover o crescimento vegetal através da fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN) e principalmente pela produção de fitohormônios (DÖBEREINER, 1990; BALDANI e BALDANI, 2005; PERRIG et al., 2007). Por isso, esses microrganismos são considerados como de grande potencial para utilização na agricultura sob a forma de inoculante, com o objetivo de aumentar a sustentabilidade da

produção reduzindo a utilização de fertilizantes e, conseqüentemente, os problemas de contaminação ambiental decorrentes das perdas desses nutrientes (CHOUDHURY e KENNEDY, 2004).

No entanto, para que seja possível conhecer o potencial biotecnológico do gênero *Azospirillum* para aplicação na rizicultura catarinense, os estudos de ocorrência, isolamento e diversidade dessas espécies são essenciais para auxiliar no estudo do comportamento e atividade desses microrganismos e na seleção de isolados com características de interesse para uso como biofertilizantes ou biopromotores de crescimento de plantas. Portanto, os objetivos desse trabalho foram avaliar a ocorrência de bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum* em raízes e colmos de arroz irrigado coletados em propriedades rurais no estado de Santa Catarina, e obter isolados para formação da Coleção de Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina.

MATERIALE MÉTODOS

Amostras de plantas inteiras (planta + solo adjacente às raízes) de arroz irrigado, no estágio de floração, foram coletadas ao acaso em oito propriedades rurais nos municípios de Guarimirim (duas áreas), Massaranduba, Rodeio (duas áreas), Rio do Sul, Agrônômica e Pouso Redondo. A coleta foi realizada no dia 28 de fevereiro de 2007 e os dados de localização das áreas encontram-se descritos na Tabela 1. Em cada propriedade foram coletadas seis amostras compostas por quatro plantas, que foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas em

caixa de isopor com gelo. Também foram coletadas amostras de solo compostas para determinação do pH em água, nitrogênio mineral (N-NH_4^+ e $\text{N-NO}_3^- + \text{NO}_2^-$), e fósforo disponível extraível pelo método da resina de troca catiônica (TEDESCO et al., 1995). As análises biológicas e químicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia e Fauna do Solo, no Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/UEDESC).

O processo de isolamento de *Azospirillum* spp. seguiu a metodologia descrita por Videira et al. (2007). Raízes e colmos das plantas coletadas foram lavados em água para retirada de partículas de solo aderidas e utilizadas para o estudo da ocorrência de *Azospirillum* spp. como endófito. Amostras de 10 g de raízes e colmos foram desinfetadas pela imersão em solução de hipoclorito de sódio (1%) por 30 segundos, enxaguadas com água destilada e trituradas em 90 mL de solução de sacarose (4%). A solução resultante foi diluída sucessivamente até 10^7 utilizando solução de sacarose (4%) como diluente, e então 100 μL das diluições 10^{-2} a 10^{-7} foram inoculados em frascos com capacidade para 10 mL, contendo 5 mL de meio semi-sólido. Foram utilizados os meios NFb para isolamento de *A. brasiliense* e *A. lipoferum*, e LGI para isolamento de *A. amazonense* (DÖBEREINER et al., 1995).

Foram realizadas cinco repetições de cada diluição inoculada nos frascos contendo meio semi-sólido, os quais foram incubados a 32°C por quatro a sete dias em incubadora BOD, até a formação da película aerotóxica típica do crescimento de bactérias microaerofílicas. No sétimo dia de incubação foram realizadas as avaliações, sendo considerados positivos os frascos que apresentaram a formação da película

Tabela 1 - Localização das áreas de coleta de plantas de arroz irrigado em Santa Catarina.

ÁREA	LATITUDE	LONGITUDE	ALTITUDE (m)
Guarimirim 1	26° 24' 38.1" S	48° 57' 50.9" W	44
Guarimirim 2	26° 31' 07.8" S	48° 58' 52.3" W	37
Massaranduba	26° 38' 11.6" S	49° 00' 52.1" W	38
Rodeio 1	26° 57' 47.5" S	49° 20' 07.9" W	80
Rodeio 2	26° 57' 47.5" S	49° 20' 07.9" W	80
Rio do Sul	27° 10' 41.5" S	49° 34' 45.4" W	332
Agrônômica	27° 15' 49.6" S	49° 43' 24.0" W	334
Pouso Redondo	27° 14' 49.1" S	50° 01' 23.9" W	358

aerotóxica em forma de véu, característica do crescimento de bactérias do gênero em meio semi-sólido. O número de frascos positivos para cada diluição foi utilizado para a estimativa do número de células por grama de matéria fresca de colmos e raízes, utilizando o método do Número Mais Provável de Propágulos (NMP) seguindo a tabela de McCrady (DÖBEREINER et al., 1995).

Os resultados do estudo de ocorrência de *Azospirillum* spp. nas raízes e colmos de arroz irrigado foram transformados em $\log(x+1)$ para análise da similaridade entre as áreas utilizando análise de componentes principais (ACP). Considerando que as populações de microrganismos podem ser afetadas por fatores abióticos como pH e disponibilidade de nutrientes, os atributos químicos dos solos de cada área também foram analisados utilizando ACP. O objetivo da ACP é representar os objetos de estudo e suas variáveis em um sistema de coordenadas em que, através de uma matriz de correlação, a máxima variância dos dados originais possa ser retratada e os resultados são ilustrados em *biplots* para que possam ser interpretados (RAMETTE, 2007). As análises de ACP foram conduzidas utilizando o programa computacional R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

Os frascos que apresentaram a película de crescimento em forma de véu foram utilizados para isolamento de culturas puras. Uma alçada de cada frasco foi repicada em placas de Petri contendo os meios semi-específicos LGI e NFb sólidos e incubadas a 32°C por três a cinco dias. Então as placas com crescimento foram inoculadas em meios LGI e NFb semi-sólidos e novamente incubadas por quatro dias para a formação de um novo véu. Os frascos que continuaram apresentando crescimento após esse período, tiveram suas colônias purificadas pela repicagem em placas de Petri contendo meio BDA por repetidas vezes, até que fossem formadas colônias puras e isoladas. Como o gênero *Azospirillum* é formado por bactérias gram-negativas, os isolados obtidos foram caracterizados bioquimicamente pelo teste de coloração Gram, seguindo o protocolo sugerido por Yano et al. (1991). Os isolados gram-positivos foram descartados da coleção.

As placas com isolados gram-negativos tiveram

suas colônias transferidas para tubos de ensaio com tampa rosqueável (uma colônia por tubo) contendo meio BDA inclinado, em triplicatas, e incubados por três dias. Para estocagem, as culturas foram cobertas com meio batata (VIDEIRA et al., 2007) mais glicerol (50%), e então os tubos foram vedados e identificados com a sigla SC que acompanha o número do isolado, e armazenados em câmara seca a 4°C.

Os isolados obtidos foram incluídos na Coleção de Bactérias Diazotróficas Promotoras de Crescimento do CAV/UEDESC, que está integrada à “Rede Centro-Sul para a manutenção, bioprospecção e caracterização da biodiversidade de coleção de culturas e de genes de bactérias de importância agroindustrial: diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas”, sob coordenação da Embrapa Soja.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se a ocorrência de bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum* spp. em raízes e colmos de arroz irrigado nas oito áreas estudadas (Tabela 2). Tanto o meio NFb (*A. lipoferum* e *A. brasilense*) quanto o meio LGI (*A. amazonense*) apresentaram número mais provável de propágulos da ordem de 10^8 células g^{-1} de matéria fresca de raízes e colmos. A densidade média de *A. lipoferum* e *A. brasilense* foi de $1,6 \times 10^8$ células g^{-1} de raízes e $1,42 \times 10^8$ células g^{-1} de colmos, enquanto a média populacional de *A. amazonense* foi de $1,76 \times 10^8$ células g^{-1} de raízes e $1,56 \times 10^8$ células g^{-1} de colmos. Segundo Baldani e Baldani (2005), bactérias do gênero *Azospirillum* e outras diazotróficas são encontradas colonizando gramíneas em populações que variam entre 10^4 a 10^7 células g^{-1} de matéria fresca.

As populações de *Azospirillum* em raízes de arroz irrigado variaram entre $1,5 \times 10^8$ e $1,8 \times 10^8$ células g^{-1} de matéria fresca, no entanto, as densidades populacionais encontradas em colmos tiveram maior variação ($9,22 \times 10^7$ a $1,8 \times 10^8$ células g^{-1} de matéria fresca) (Tabela 2). O maior número de bactérias do gênero *Azospirillum* colonizando raízes, possivelmente se deve à morfologia da própria planta, cujas raízes possuem aerênquimas que possibilitam a aeração da rizosfera em condições de inundação e a secreção de substâncias orgânicas. Essas

Tabela 2 - Estimativa da ocorrência de bactérias do gênero *Azospirillum* em raízes e colmos de plantas de arroz irrigado coletadas em Santa Catarina, utilizando-se os meios de isolamento NFb (*A. lipoferum* e *A. brasilense*) e LGI (*A. amazonense*), pelo método NMP*. Média de cinco repetições.

ÁREA	RAIZ		COLMO	
	NFb	LGI	NFb	LGI
-----n° de células g ⁻¹ de matéria fresca-----				
Guaramirim 1	1,5x10 ⁸	1,8x10 ⁸	1,21x10 ⁸	9,22x10 ⁷
Guaramirim 2	1,8x10 ⁸	1,8x10 ⁸	1,24x10 ⁸	1,8x10 ⁸
Massaranduba	1,57x10 ⁸	1,8x10 ⁸	1,62x10 ⁸	1,8x10 ⁸
Rodeio 1	1,57x10 ⁸	1,8x10 ⁸	1,51x10 ⁸	1,51x10 ⁸
Rodeio 2	1,57x10 ⁸	1,8x10 ⁸	1,51x10 ⁸	1,51x10 ⁸
Rio do Sul	1,77x10 ⁸	1,8x10 ⁸	9,78x10 ⁷	1,8x10 ⁸
Agronômica	1,57x10 ⁸	1,8x10 ⁸	1,51x10 ⁸	1,33x10 ⁸
Pouso Redondo	1,5x10 ⁸	1,51x10 ⁸	1,8x10 ⁸	1,78x10 ⁸
Média	1,6x10 ⁸	1,76x10 ⁸	1,42x10 ⁸	1,56x10 ⁸

*NMP = número mais provável de propágulos (DÖBEREINER et al., 1995).

características tornam as camadas mucilaginosas da epiderme e os espaços intercelulares do córtex um ambiente rico em substrato para o crescimento de bactérias diazotróficas microaerofílicas deste gênero (SIQUEIRA e FRANCO, 1988).

A análise multivariada das oito áreas de coleta, considerando a ocorrência de *Azospirillum* spp. em raízes (RA) e colmos (CO) de arroz irrigado isolados de meio LGI (LGI-RA e LGI-CO) e NFb (NFb-RA e NFb-CO), utilizando análise de componentes principais (ACP), mostrou que os dois primeiros componentes (Comp1 e Comp2) explicam 59% dos resultados, sendo 32% explicados por Comp1. Dentre as variáveis analisadas, as que mais contribuíram para a variação dos resultados foram NFb-RA e LGI-CO (Figura 1).

Na ACP, ilustrada na Figura 1, observou-se a formação de um grande grupo que incluiu as áreas Rodeio 1 (rodeio1), Rodeio 2 (rodeio2), Agronômica (agron), Massaranduba (massa) e Guaramirim 2 (guara2), onde foram encontradas densidades populacionais semelhantes de *Azospirillum* em raízes e colmos, tanto para o meio de isolamento NFb quanto para o meio LGI. A área de Rio do Sul (rsul) também foi similar a este grande grupo, embora tenha apresentado uma baixa população de bactérias isoladas de colmos em meio NFb (9,78x10⁷ células g⁻¹ de matéria fresca) em relação às demais áreas. A

área Guaramirim 1 (guara1), que apresentou médias populacionais mais baixas para NFbRA e LGICO, não se agrupou a nenhuma área, assim como Pouso Redondo (pron) onde também foram observadas populações mais baixas colonizando raízes e colmos em meio NFb (NFbRA e NFbCO) e meio LGI (LGICO).

Com relação aos atributos químicos dos solos [pH, N-NH₄⁺ (NH₄), N-NO₃⁻ + NO₂⁻ (NO₃.NO₂) e P disponível (P)], a análise de componentes principais mostrou que juntos Comp1 (52%) e Comp2 (30%) explicam 82% dos resultados. A análise dos atributos químicos dos solos das oito áreas em que foram coletadas amostras de plantas de arroz irrigado separou as áreas em dois grupos distintos e as variáveis NH₄, NO₃.NO₂ e P contribuíram para esse agrupamento (Figura 2).

O primeiro grupo foi formado por Rodeio 1 e Rodeio 2, e o segundo grupo por Massaranduba e Agronômica. Essas áreas se assemelharam quanto aos atributos pH, N-NH₄⁺ e P disponível, e não apresentaram teores detectáveis de N-NO₃⁻ + N-NO₂⁻. As demais áreas apresentaram valores variados em relação aos teores de N-NH₄⁺, N-NO₃⁻ + N-NO₂⁻ e P disponível, portanto, não se agruparam (Tabela 3). O pH dos solos coletados variou entre 4,2 (Rodeio 1) e 4,9 (Rio do Sul), dentro da faixa ácida para crescimento de bactérias considerando-

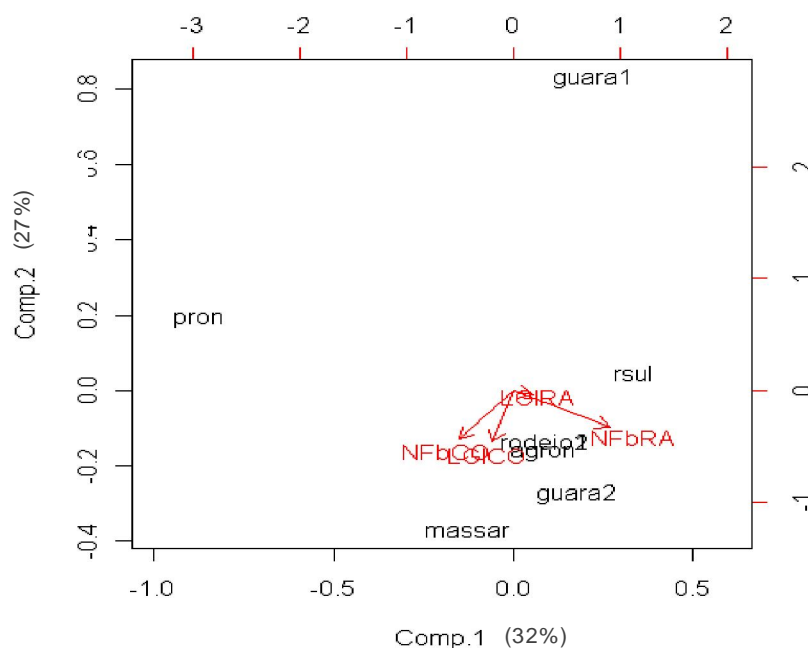


Figura 1 - Similaridade entre áreas de coleta de arroz irrigado (guara1: Guaramirim 1, guara2: Guaramirim 2, massar: Massaranduba, rodeio1: Rodeio 1, rodeio2: Rodeio 2, rsul: Rio do Sul, agron: Agronômica, pron: Pouso Redondo), considerando a ocorrência de *Azospirillum* spp. em raízes (RA) e colmos (CO) isolados em meio NFb (NFb-RA e NFb-CO) e LGI (LGI-RA e LGI-CO), estimada através da análise de componentes principais (ACP).

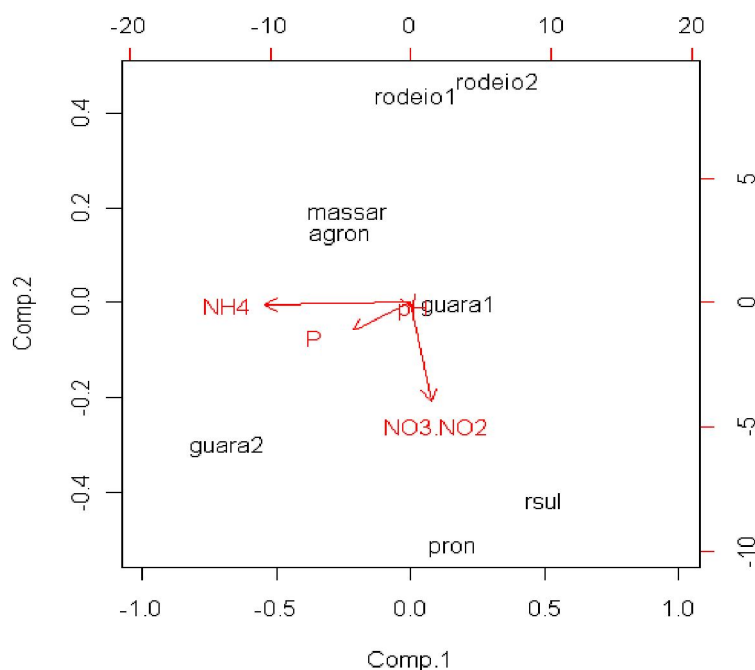


Figura 2 - Similaridade entre áreas de coleta de arroz irrigado (guara1: Guaramirim 1; guara2: Guaramirim 2; massar: Massaranduba; rodeio1: Rodeio 1; rodeio2: Rodeio 2; rsul: Rio do Sul; agron: Agronômica; pron: Pouso Redondo), considerando os atributos químicos dos solos: pH, N-NH₄⁺ (NH₄), N-NO₃⁻ + N-NO₂⁻ (NO₃.NO₂) e P disponível (P), estimada através da análise de componentes principais (ACP).

Tabela 3- Atributos químicos dos solos das áreas de coleta de plantas de arroz irrigado.

Área	pH (H ₂ O)	N-NH ₄ ⁺ + N-NO ₃ ⁻ + N-NO ₂ ⁻		P disponível*
		mg kg ⁻¹		
Guaramirim 1	4,3	12,5	2,3	1,5
Guaramirim 2	4,3	23,9	2,3	6,0
Massaranduba	4,5	17,1	Nd	5,3
Rodeio 1	4,2	14,8	Nd	1,0
Rodeio 2	4,3	10,2	Nd	0,8
Rio do Sul	4,9	7,9	4,5	1,6
Agronômica	4,5	17,1	Nd	6,3
Pouso Redondo	4,3	12,5	4,5	3,2

*Avaliado pelo método da resina de troca de ânions.

Nd= não detectado.

se que, em condições *in vitro*, o pH ótimo para *Azospirillum* spp. está próximo à neutralidade (entre 6,0 e 6,8). No entanto, em solos tropicais tipicamente ácidos, a ocorrência dessas bactérias é verificada em solos com pH abaixo de 4,5 sendo *A. amazonense* a espécie com maior adaptabilidade a ambientes ácidos (MAGALHÃES et al. 1983; SIQUEIRA e FRANCO, 1988).

Embora os solos das oito áreas em estudo tenham apresentado valores variados para os atributos químicos analisados, estes não se correlacionaram com as altas densidades populacionais de *Azospirillum* spp., observadas em todas as áreas. Esse resultado permite concluir que a ocorrência dessas bactérias de colonização endofítica em raízes e colmos de arroz irrigado não foi influenciada pelo nível de fertilidade do solo. No entanto, vale salientar que embora não afetem diretamente sua ocorrência, esses fatores nutricionais podem ter efeito na atividade e diversidade desses microrganismos. Devido à sua diversidade genética e funcional, a atividade dessas bactérias pode variar em função das concentrações de P e N no solo que são elementos envolvidos nos processos de fixação biológica de nitrogênio e produção de hormônios de crescimento vegetal (DÖBEREINER, 1990; RADWAN et al., 2005). Portanto, é importante que os isolados obtidos a partir desse estudo sejam também avaliados quanto à sua atividade em termos de produção de fitohormônios e capacidade de FBN.

Noventa e quatro isolados foram obtidos de raízes e colmos de arroz irrigado provenientes das áreas de estudo. A coloração diferencial de Gram das células destes isolados demonstrou que 62 isolados eram gram-negativos e 32 isolados eram gram-

positivos. Os isolados gram-positivos foram descartados já que as bactérias do gênero *Azospirillum* são gram-negativas.

Das 62 bactérias gram negativas, 39 (62,9%) foram isoladas de meio LGI (*A. amazonense*) e as demais de meio NFb (*A. lipoferum* e *A. brasilense*). Semelhante ao observado no estudo de ocorrência, as raízes desinfetadas permitiram a obtenção de um número mais alto de isolados em relação ao colmo, sendo que 59,7% foram oriundos das raízes (15 isolados em meio NFb e 22 isolados em meio LGI). Os resultados encontrados nesse estudo se assemelham ao que foi relatado por Brasil (2006) que, em isolamento de bactérias diazotróficas que colonizavam raízes, colmos e folhas das cultivares de arroz irrigado IAC4440, CNA7553 e IR42, cultivadas em um argissolo na Embrapa Agrobiologia, obteve um número mais alto de isolados de *Azospirillum* originados de raízes (19) em comparação com colmos (16), e observou que dos 56 isolados caracterizados como pertencentes ao gênero *Azospirillum*, 69% eram da espécie *A. amazonense*.

Considerando que várias bactérias associativas e de vida livre podem ser isoladas a partir de meios semi-sólidos livres de N (KIRCHOFF et al., 1997), o crescimento de isolados bacterianos nos meios semi-seletivos NFb e LGI não implica que todos os isolados obtidos nesse estudo sejam do gênero *Azospirillum*. Sendo assim, é importante que esses isolados também sejam caracterizados quanto às suas características fenotípicas, fisiológicas e genéticas para confirmação das espécies.

Em relação à área de coleta das plantas de arroz irrigado utilizadas para isolamento de

Azospirillum spp., 77,4% dos isolados foram obtidos de plantas coletadas nas propriedades localizadas no Vale do Itajaí (Rodeio 1, Rodeio 2, Rio do Sul, Agrônômica e Pouso Redondo), sendo que as áreas de Rodeio 1 e Agrônômica tiveram 19,3% e 20,9% do total de isolados, respectivamente. No entanto, apesar da elevada densidade de populações de *Azospirillum* spp. colonizando raízes e colmos das plantas coletadas nas áreas do norte catarinense (Guaramirim 1, Guaramirim 2 e Massaranduba), poucos isolados dessas áreas resistiram até o final do processo de purificação provavelmente por não serem do gênero *Azospirillum* e não apresentarem as mesmas exigências nutricionais das bactérias desse gênero.

Sob uma visão geral, é importante destacar que foi comprovada a ocorrência de bactérias do gênero *Azospirillum* colonizando endofiticamente raízes e colmos de plantas de arroz cultivado sob inundação em todas as áreas estudadas. Portanto, é imprescindível que esses isolados sejam caracterizados fisiologicamente e geneticamente para fins de taxonomia, e comprovação do seu potencial biotecnológico para aplicação na cultura do arroz irrigado sob a forma de inoculantes biológicos e biofertilizantes.

CONCLUSÕES

Bactérias do gênero *Azospirillum* ocorrem em regiões produtoras de arroz irrigado no estado de Santa Catarina e colonizam endofiticamente tanto raízes quanto colmos, não sendo afetadas pelos atributos químicos dos solos das áreas de coleta das plantas.

A maioria dos isolados (62,9%) foram obtidos a partir do meio LGI para isolamento de *A. amazonense*, sendo 59,7% destes, oriundos de raízes desinfestadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONÇO, A. dos S. et al. Importância econômica, agrícola e alimentar do arroz. In: PEREIRA, D. P. et al. **Cultivo do arroz irrigado no Brasil**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, nov. 2005. EMBRAPA - CPACT. Sistema de produção, 3. Disponível em: <http://sistemas_deproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/cap01.htm> Acesso em: 22 out. 2008.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.
- BALDANI, J. I. et al. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA – SPI; Itaguaí: EMBRAPA – CNPAB, 1995. 60 p.
- BRASIL, M. S. **Ocorrência e diversidade genética de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes variedades de arroz**. 2005. 105 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2005.
- CHOUDHURY, A. T. M. A. & KENNEDY, I. R. Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. **Bio Fertil Soils**, Berlin, v. 39, p. 219-277, 2004.
- CONAB. **Indicadores da agropecuária**. Ano 8, n. 07, jul. 2008. 66 p. Disponível em < <http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 01 set. 2008.
- DÖBEREINER, J. Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica do nitrogênio no Brasil. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 4, n. 8, p. 144-152, 1990.
- KIRCHHOF, G. et al. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 5/6, p. 853-862, 1997.
- KUSS, A. V. **Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado**. 2006. 109 p. Tese (Doutorado-Ciência do Solo) – Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria, 2006.
- MAGALHÃES, F. M. et al. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 417-430, 1983.
- PERRIG, D. et al. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin. 75, p. 1143-1150, 2007.
- PITTNER, E. et al. Flutuação populacional de

- bactérias do gênero *Azospirillum* em solo cultivado com milho e em campo nativo. **Ambiência**, Guarapuava, v. 3, n. 2, p. 243-252, mai/ago 2007.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2008. ISBN 3900051070. Disponível em: <<http://www.R-project.org>> Acesso em: 27 out. 2008.
- RADWAN, T. E. E. et al. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 10, p. 997-1004, 2005.
- RAMETTE, A. Multivariate analyses in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 62, p. 142-160, 2007.
- REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. dos S. Fixação biológica do nitrogênio – Estado da arte. In: AQUINO, A. M. de; ASSIS, R. L. de (Ed.) **Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 368p.
- SILVA, L. R. **Produção experimental de inoculantes agrícolas á base de *Azospirillum* spp. para fixação biológica de nitrogênio em gramíneas e forrageiras**. 2006. 137 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade do Estado de São Paulo, São Paulo, 2006
- SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC, ABEAS; Lavras: ESAL, FAEPE, 1988. 236 p.
- SOUZA, R. O. et al. Solos alagados. In: MEURER, E. J. (org.). **Fundamentos de química do solo**. Porto Alegre: GENESIS, 2000. p. 126-149.
- TEDESCO, M. J. et al. Análises de solo, plantas e outros materiais. Boletim Técnico nº 5, Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, UFRGS. Porto Alegre, 1995. 174 p.
- VIDEIRA, S. S. et al. **Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômica de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 74 p. EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 234.
- YANO, D. M. Y. et al. **Técnicas de microbiologia em controle de qualidade**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1991.