



SOBREVIVÊNCIA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM SUBSTRATOS ALTERNATIVOS PARA A CANA-DE-AÇÚCAR

SURVIVAL OF DIAZOTROPHIC BACTERIA IN ALTERNATIVE SUBSTRATES FOR SUGARCANE

Ester Schiavon Matoso¹, Edenara De Marco², Francis Radael Tatto³, Gabriela Cavalcanti Alves, Verônica Massena Reis, Sergio Delmar dos Anjos e Silva

Resumo

Uma das opções viáveis para diminuir o uso dos adubos nitrogenados e auxiliar nos incrementos de produtividade dos cultivos, seria a aplicação de bactérias diazotróficas. Na cana-de-açúcar um exemplo é a interação com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus*, da qual se tornou uma importante bactéria na explicação de eventos de fixação de nitrogênio. Nos últimos anos se têm buscado também, métodos para reduzir o volume de material necessário para o plantio de cana-de-açúcar, que pode ser feito através do uso de mudas pré-brotadas. O substrato influencia bastante no desenvolvimento e na aclimatização de mudas através de suas características físicas, químicas e biológicas, podendo ser responsável pelo suporte, fornecimento de água, nutrientes e trocas gasosas. Diante disto, o objetivo do trabalho foi monitorar a sobrevivência de bactérias diazotróficas selecionadas como inoculante em diferentes substratos para plantio de cana-de-açúcar. O experimento foi desenvolvido em condições de laboratório, na Embrapa Agrobiologia, em Seropédica, Rio de Janeiro. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições, onde foram testados seis inoculantes em seis substratos para plantio. Os seis inoculantes consistiram nas espécies: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *Burkholderia tropica*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Nitrospirillum amazonense* além da mistura das cinco referidas espécies. Os substratos foram resultantes da combinação de casca de arroz carbonizada (CAC) com composto orgânico (CO) em cinco diferentes concentrações e o substrato comercial (SC). Substrato 1: 75% CAC + 25% CO; Substrato 2: 50% CAC + 50% CO; Substrato 3: 25% CAC + 75% CO; Substrato 4: 100% CO; Substrato 5: 100% CAC e Substrato 6: 100% SC. Tubos de ensaio com capacidade para 100 mL foram preenchidos com cerca de 5g dos seis substratos e inoculados com 1g dos seis diferentes inoculantes. Foram feitas contagens de bactérias nos tratamentos com intervalo de cerca de cinco a sete dias, ao longo de cinco semanas. Até a terceira contagem, se observava grande quantidade de bactérias em todos os substratos, o número só estava menor nos tratamentos inoculados com *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Entre a terceira e a quarta contagem, após cerca de 20 dias da inoculação, a população das bactérias inoculadas reduziu drasticamente, mostrando ser um ponto crítico para plantio de mudas. Na última contagem ainda foram observadas bactérias diazotróficas em todos os substratos, mas em número abaixo do recomendado. Sendo as espécies *Nitrospirillum amazonense*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *H. seropedicae*, as que mais sobreviveram nos substratos ao longo das avaliações.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio, resíduos, mudas pré-brotadas.

Abstract

One of the viable options to reduce the use of nitrogenated fertilizers and assist in increased productivity of crops would be the application of nitrogen fixing bacteria. In sugarcane an example is the interaction with the bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus*, which became an important bacteria to explaining nitrogen fixation. In recent years they have sought also methods to reduce the

volume of material required for the planting of sugarcane, which can be done through the use of pre-sprouted seedlings. The substrate heavily influences in the development and acclimatization of plants through their physical, chemical and biological, and may be responsible for the support, supply of water, nutrients and gas exchange. In view of this, the study aimed to monitor the survival of diazotrophs selected as inoculant in different substrates for sugarcane planting. The experiment was conducted in laboratory conditions at Embrapa Agrobiologia in Seropédica, Rio de Janeiro. The experimental design was completely randomized with four replications, which were tested six inoculants in six substrates for planting. The six inoculants consisted of the species: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *Burkholderia tropica*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Nitrospirillum amazonense* besides mixture of the five such species. The substrates were derived from combinations of carbonized rice rusk (CRR) with organic compost (OC) in five different concentrations and the commercial substrate (CS). Substrate 1: 75% CRR + 25% OC; Substrate 2: 50% CRR + 50% OC; Substrate 3: 25% CRR + 75% OC; Substrate 4: 100% OC; Substrate 5: 100% CRR e Substrate 6: 100% CS. Test tubes with a capacity of 100 ml were filled with about 5g of the six substrates and inoculated with 1g of six different inoculants. Bacteria were counted in treatments with an interval of about five to seven days, over five weeks. Until the third count was observed a lot of bacteria in all substrates, the number was only lower in treatments inoculated with *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Between the third and the fourth count, after about 20 days after inoculation, the population of inoculated bacteria decreased dramatically, proving to be a critical point for planting seedlings. At last count diazotrophs were also observed in all substrates, but the number below recommended. Since the species *Nitrospirillum amazonense*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *H. seropedicae*, the more that survived the substrates along the evaluations.

Keywords: Biological nitrogen fixation, waste, pre-sprouted seedlings.

INTRODUÇÃO

Diversos processos são mediados por microrganismos do solo e desempenham papel importante na ciclagem de nutrientes, sendo o processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN), um dos mais importantes para de nitrogênio a diversos ecossistemas, naturais ou manejados (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Espécies de bactérias diazotróficas associativas têm sido isoladas de raízes e partes aéreas de espécies de importância agrícola como as gramíneas (Fernandes et al., 2001; SALA et al., 2005), orquídeas (LANGE & MOREIRA, 2002), tubérculos (PAULA, 1992; BALOTA, et al., 1997; 1999), cafeeiros (JIMÉNEZ-SALGADO et al., 1997; SANTOS et al., 2001), araucárias (NERONI & CARDOSO, 2007) e fruteiras (RAO, 1983; Weber et al., 1999).

Uma das opções viáveis para diminuir o uso dos adubos nitrogenados e auxiliar nos incrementos de produtividade dos cultivos, seria a aplicação de bactérias diazotróficas, pois estas possuem a habilidade da fixação biológica do nitrogênio (FBN) (REIS JUNIOR et al., 2000) além de produzir reguladores vegetais, como as auxinas (MIRZA et al., 2001), giberelinas e citocininas (BASTIÁN et al., 1998) e ainda agirem como solubilizadores de fosfato (SONG et al., 2008) e auxiliarem na ação contra patógenos (ARENCEBIA et al., 2006).

Quanto a capacidade de fixar nitrogênio, cálculos da contribuição de N fixado para gramíneas estão em torno de 25 a 50 kg N/ha/ano o que equivale ao

suprimento médio de cerca de 17% das demandas das culturas, que mesmo sendo baixa, representa uma grande economia nos custos de produção, justificando estudos visando seu manejo.

Isto por que, os sistemas agrícolas atuais são na maioria dependentes de insumos industrializados (como adubos nitrogenados) e não exploram o grande potencial dos diazotróficos, tanto para a FBN quanto para outros mecanismos de promoção do crescimento vegetal.

Portanto, assim como nas leguminosas, onde ocorre a simbiose entre bactérias-planta, como exemplo, o gênero *Bradyrhizobium* e a cultura da soja, nas *Poaceas* como trigo, milho, aveia e a própria cana-de-açúcar a FBN é possível através da associação com as bactérias diazotróficas (CAMPOS et al., 1999; Gomes et al., 2005; ROESCH et al., 2005).

Na cana-de-açúcar um exemplo é a interação com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (GILLIS et al., 1989; YAMADA et al., 1998), da qual se tornou uma importante bactéria na explicação de eventos de fixação de nitrogênio em cana-de-açúcar.

Essa associação de bactérias com a cana-de-açúcar criou a hipótese para explicar o bom desenvolvimento de cultivares em solos pobres por nutrientes.

No entanto, algumas cultivares podem não apresentar uma resposta satisfatória em outros ambientes, levando a crer que pode existir uma especificidade do genótipo a uma espécie, e até estirpes de bactérias, o que foi demonstrado no trabalho de Caballero-Mellado & Muñoz-Rojas (2003).

Nos últimos anos se têm buscado também, métodos para reduzir o volume de colmos/mudas necessários para o plantio de cana-de-açúcar, com o objetivo de incorporação de ganhos produtivos através da mecanização do plantio e diminuição do uso de colmos que poderão ser moídos. Uma das alternativas recentemente lançadas é a utilização do sistema de Mudanças Pré-Brotadas (MPB) o qual é desenvolvido no âmbito público pelo Programa Cana do IAC (LANDELL et. al., 2012).

O substrato influencia bastante no desenvolvimento e na aclimatização das mudas através de suas características físicas, químicas e biológicas, podendo ser responsáveis pelo fornecimento de água, nutrientes, trocas gasosas e suporte para as mudas. Desta forma, a busca por métodos que aprimorem a utilização de substratos alternativos, visando o emprego de resíduos agrícolas disponíveis regionalmente, pode propiciar a redução de custos, assim como auxiliar na minimização da poluição decorrente do acúmulo desses materiais no meio ambiente (BARRETO et. al., 2015).

Diante disto, o objetivo deste trabalho foi monitorar a sobrevivência de bactérias diazotróficas selecionadas como inoculante em diferentes substratos para plantio de cana-de-açúcar.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido em condições de laboratório, na Embrapa Agrobiologia, localizada na cidade de Seropédica, no Rio de Janeiro.

Para atingir o objetivo foi montado um experimento onde foram testados seis inoculantes em seis substratos para plantio. Os seis inoculantes consistiram nas estirpes: HCC103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, HRC54 de *H. seropedicae*, PPe8 de *Burkholderia tropica*, Pal5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, CBAmc de *Nitrospirillum amazonense* além da mistura das 5 referidas estirpes.

Antes da inoculação, no dia 12 de junho de 2015, foi feita a contagem de bactérias diazotróficas nos inoculantes, todos apresentaram população adequada de unidades formadoras de colônias por grama (UFC g⁻¹): *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (estipe HCC103) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (estipe Pal5) apresentaram o maior valor de 4,5 x 10¹¹ UFC g⁻¹, já as bactérias *Herbaspirillum seropedicae* (estipe HRC54) e *Burkholderia tropica* (estipe PPe8) apresentaram 2,5 x 10¹¹ UFC g⁻¹ e a *Nitrospirillum amazonense* (estipe CBAmc) apresentou 1,5 x 10¹¹ UFC g⁻¹.

Os substratos foram resultantes da combinação de casca de arroz carbonizada (CAC) com composto orgânico (CO) em 5 diferentes concentrações e o substrato comercial (SC). Substrato 1: 75% CAC + 25% CO; Substrato 2: 50% CAC + 50% CO; Substrato 3: 25% CAC + 75% CO; Substrato 4: 100% CO; Substrato 5: 100% CAC e Substrato 6: 100% SC.

Foi feita contagem de bactérias diazotróficas nos 6 substratos e não foi detectada a presença de bactérias diazotróficas nos meios seletivos testados (JMV, LGI, LGI-P e JNFb).

No dia 12/06/2015 tubos de ensaio (capacidade para 100 mL) foram preenchidos com cerca de 5 g dos 6 substratos e inoculados com 1 g dos 6 diferentes inoculantes com 4 repetições resultando em 36 tratamentos distribuídos em 144 tubos (Tabela 1). Todos os tubos com substrato receberam entre 5 a 10 mL de água destilada estéril visando permitir uma melhor sobrevivência das estirpes bacterianas.

Tabela 1. Esquema utilizado para identificação dos tratamentos.

Inoculante	Substratos					
	1	2	3	4	5	6

<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	1	7	13	19	25	31
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	2	8	14	20	26	32
<i>Burkholderia tropica</i>	3	9	15	21	27	33
<i>Nitrospirillum amazonense</i>	4	10	16	22	28	34
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	5	11	17	23	29	35
Mistura	6	12	18	24	30	36

Para a contagem da população de bactérias diazotróficas nos 36 tratamentos amostras de 1 g foram colocadas em 9 mL de salina e feita a diluição seriada até a concentração 10⁻⁵. Das três menores diluições foi retirada uma alíquota de 0,1 mL e em seguida inserida em frascos de penicilina contendo 6 mL de meio semi-sólido seletivo para as bactérias inoculadas.

Para os tratamentos com inoculação da estirpe *Herbaspirillum rubrisubalbicans* ou *H. seropedicae* o meio utilizado foi o JNFb, para o tratamento com a estirpe *B. tropica*, o meio JMV, para o tratamento com a estirpe *N. amazonense*, o meio LGI e para a estirpe *G. diazotrophicus*, o meio LGI-P.

As contagens foram feitas com intervalo de cerca de cinco a sete dias. A primeira contagem foi feita cinco dias após a inoculação no início do experimento, elas foram realizadas nos dias 17/06, 24/06, 30/06, 07/07 e 14/07 de 2015.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira contagem de bactérias nos substratos, feita no dia 17/06/2015 (Tabela 2) não se observou diminuição significativa de nenhuma das espécies. Apenas ocorreu uma leve queda na população de *Herbaspirillum seropedicae* no substrato 6 e de *Burkholderia tropica* no substrato 4, assim como em mistura no substrato 6.

Tabela 2. Contagem de bactérias (UFC g⁻¹) em amostras de substratos inoculados realizada em 17/06/2015.

Inoculante	Meio	Substratos					
		1	2	3	4	5	6
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	JNFb	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	JNFb	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	2,5x10⁷
<i>Burkholderia tropica</i>	JMV	1,1x10 ⁸	1,5x10 ⁷	1,5x10 ⁶	0,3x10⁶	2,5x10 ⁷	1,4x10 ⁸
<i>Nitrospirillum amazonense</i>	LGI	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,1x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	LGI-P	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸
Mistura	JNFb	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,1x10 ⁸	1,1x10 ⁸	1,4x10 ⁸
	JMV	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	4,5x10⁶
	LGI	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸
	LGI-P	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	2,0x10⁶	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸

Tabela 3. Contagem de bactérias (UFC g⁻¹) em amostras de substratos inoculados realizada em 24/06/2015.

Inoculante	Meio	Substratos					
		1	2	3	4	5	6
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	JNFb	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	2,5x10⁷
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	JNFb	1,4x10 ⁸	4,5x10 ⁷	1,5x10 ⁷	4,5x10⁶	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸
<i>Burkholderia tropica</i>	JMV	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	9,5x10⁶	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸
<i>Nitrospirillum amazonense</i>	LGI	1,5x10 ⁷	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	LGI-P	0,4x10⁶	9,5x10⁶	1,5x10⁶	2x10⁶	3x10⁶	0,4x10⁶
Mistura	JNFb	1,4x10 ⁸	2,5x10⁷	1,4x10 ⁸	2,5x10⁷	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸
	JMV	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	2,5x10⁷	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,1x10 ⁸
	LGI	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	2,5x10⁷	2,5x10⁷
	LGI-P	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	0	2,5x10⁶	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸

Tabela 4. Contagem de bactérias (UFC g⁻¹) em amostras de substratos inoculados realizada em 30/06/2015.

Inoculante	Meio	Substratos					
		1	2	3	4	5	6
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	JNFb	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	4,5x10 ⁷	2,5x10⁷	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸

<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	JNFb	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	4,5x10 ⁷	2x10⁶	1,1x10 ⁸	1,4x10 ⁸
<i>Burkholderia tropica</i>	JMV	1,4x10 ⁸	4,5x10 ⁷	1,5x10 ⁷	3x10⁶	1,1x10 ⁸	1,4x10 ⁸
<i>Nitrospirillum amazonense</i>	LGI	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,1x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	LGI-P	7,5x10⁶	9,5x10⁶	2,5x10⁷	2x10⁶	2,5x10⁷	4,5x10⁶
Mistura	JNFb	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸
	JMV	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	2,5x10⁷	1,1x10 ⁸	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸
	LGI	1,4x10 ⁸	7,5x10⁶	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	2,5x10⁷	2,5x10⁷
	LGI-P	1,4x10 ⁸	1,4x10 ⁸	0	2,5x10⁷	1,5x10⁷	0,9x10⁶

Até a terceira contagem, se observava grande quantidade de bactérias em todos os substratos. O número só estava menor nos tratamentos inoculados com a estirpe Pal5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, entre 10⁶ e 10⁷, inclusive no tratamento mistura nos substratos 4, 5 e 6, quando inoculados em LGI-P.

No substrato 4 verifica-se uma população menor de *B. tropica* comparado aos demais substratos nas quatro contagens realizadas e de *H. seropedicae* nas três últimas contagens. Neste substrato, notou-se uma diferente consistência em relação ao teor de água, sendo ela mais úmida. Esta consistência conferiu maior anaerobiose, o que resultou numa menor população de todas as bactérias diazotróficas inoculadas (Tabela 4) desde a primeira contagem.

Pandey & Maheshwari, (2007) estudando uma bioformulação contendo diferentes espécies bacterianas como *Burkholderia* sp, estirpe MSSP, *Sinorhizobium meliloti* estirpe PP3, *Rhizobium leguminosarum* estirpe Pec e *Bacillus* sp. estirpe B1, verificaram que, a presença de outras bactérias na bioformulação não promoveu efeito deletério para a viabilidade da estirpe MSSP de *Burkholderia* sp. nos veículos de baixo custo.

No que se refere ao pH do meio de crescimento, a maioria das bactérias apresenta caráter neutrófilo crescendo na faixa que vai de 6,0 a 8,0. *Gluconacetobacter diazotrophicus* que faz parte do grupo das bactérias do ácido acético, consegue sobreviver em pH em torno de 3,0 (DOBEREINER et al., 1995).

Embora a sobrevivência de células em substratos utilizados como veículo de bactérias esteja relacionado com a composição do substrato e o metabolismo celular de cada microrganismo, devem ser consideradas as características de cada microrganismo no processo de maturação e estocagem do inoculante (ROUGHLEY & VINCENT, 1967).

Ao selecionar os veículos turfoso, oleoso e caldo bacteriano para inoculante com estirpes previamente selecionadas de *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 (BR11417) e *Burkholderia* spp. Estirpe M130 (BR11340) e as variedades de arroz IR42 e IAC4440, Ferreira et al. (2003) verificaram que o número de células viáveis ficou em torno de 10⁸ células g⁻¹ ou mL⁻¹ para o inoculante turfoso e oleoso,

respectivamente aos 110 dias de armazenamento e o caldo bacteriano apresentou valor inferior aos 30 dias após o preparo.

Entre a terceira e a quarta contagem, após cerca de 20 dias da inoculação, a população das bactérias inoculadas reduziu drasticamente, apontando que já não é um bom momento para plantio de mudas.

A partir da quarta contagem (Tabela 5) a Pal5 não foi mais detectada nos substratos no tratamento mistura nem nos substratos 1, 2, 3, e 5, mas foi verificada em baixa concentração no substrato 4. Também não é mais detectada a *Burkholderia tropica* no substrato 1, embora seja verificado na mistura.

Tabela 5. Contagem de bactérias (UFC g⁻¹) em amostras de substratos inoculados realizada em 07/07/2015.

Inoculante	Meio	Substratos					
		1	2	3	4	5	6
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	JNFb	1,1x10 ⁶	2,5x10⁵	1,1x10 ⁶	2,5x10⁵	1,1x10 ⁶	4,0x10⁴
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	JNFb	1,4x10 ⁶	4,5x10⁵	1,4x10 ⁶	6,5x10⁴	1,4x10 ⁶	7,5x10⁴
<i>Burkholderia tropica</i>	JMV	0	2,0x10⁴	1,4x10 ⁶	4,5x10⁴	2,0x10⁵	1,1x10 ⁶
<i>Nitrospirillum amazonense</i>	LGI	1,4x10 ⁶	4,5x10⁵	1,5x10⁵	2,0x10⁵	1,4x10 ⁶	3,0x10⁵
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	LGI-P	0	0	0	2,0x10⁴	0	0,4x10⁴
Mistura	JNFb	1,4x10 ⁶	1,1x10 ⁶	1,4x10 ⁶	1,1x10 ⁵	1,4x10 ⁶	1,1x10 ⁶
	JMV	1,1x10 ⁶	1,4x10 ⁶	4,5x10⁵	1,1x10 ⁵	4,5x10⁵	2,0x10⁵
	LGI	1,1x10 ⁶	1,1x10 ⁶	2,5x10⁵	4,5x10⁴	1,4x10 ⁶	1,4x10 ⁶
	LGI-P	0	0	0	0	0	0

Tabela 6. Contagem de bactérias (UFC g⁻¹) em amostras de substratos inoculados realizada em 14/07/2015.

Inoculante	Meio	Substratos					
		1	2	3	4	5	6
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	JNFb	4,5x10 ⁵	2,5x10 ⁵	1,5x10 ⁵	1,4x10 ⁶	2,5x10 ⁵	2,5x10 ⁴
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	JNFb	1,1x10 ⁶	4,5x10 ⁵	2,5x10 ⁵	0,3x10 ⁴	1,1x10 ⁶	9,5x10 ⁴
<i>Burkholderia tropica</i>	JMV	0	2,0x10 ⁴	4,5x10 ⁵	4,5x10 ⁵	4,5x10 ⁵	1,5x10 ⁵
<i>Nitrospirillum amazonense</i>	LGI	1,1x10 ⁶	1,5x10 ⁵	4,5x10 ⁵	1,5x10 ⁵	1,4x10 ⁶	4,5x10 ⁶
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	LGI-P	0	0	0	0,3x10 ⁴	0	0
Mistura	JNFb	1,4x10 ⁶	1,4x10 ⁶	1,4x10 ⁶	4,5x10 ⁵	1,4x10 ⁶	2,5x10 ⁵
	JMV	1,4x10 ⁶	4,5x10 ⁵	4,5x10 ⁴	0,7x10 ⁵	1,4x10 ⁶	4,5x10 ⁵
	LGI	4,5x10 ⁵	4,5x10 ⁵	4,5x10 ⁵	4,5x10 ⁵	1,1x10 ⁶	4,5x10 ⁵
	LGI-P	0	0	0	0	0	0

Essa diminuição de algumas estirpes ao se aproximar dos 30 dias, que é verificada em maior parte nos substratos contendo composto orgânico, pode ser explicada, provavelmente pela presença de alguns microrganismos antagônicos, como o que foi encontrado por Figueiredo et. al. (1992).

No entanto, trabalhos realizados por Roughley & Vincent (1967) e Burton (1991) comentam que, dependendo da característica dos veículos, tanto valores altos como baixos de umidade podem interferir na população antagônica pela competição de nutrientes, porém a níveis mais baixos são menos favorecidos. Existe uma relação bem definida entre a taxa de morte da bactéria e a taxa de perda de água do material.

Na última coleta (Tabela 6) ainda são observadas bactérias diazotróficas em todos os substratos, mas em número abaixo do recomendado.

CONCLUSÃO

O substrato contendo apenas casca de arroz carbonizada é o que melhor mantém a presença de bactérias diazotróficas.

A capacidade de retenção de água dos materiais influencia diretamente na sobrevivência de bactérias nos substratos.

Bactérias do gênero *Herbaspirillum* e da espécie *Nitrospirillum amazonense* sobrevivem melhor nos substratos estudados.

REFERÊNCIAS

ARENCEBIA, A. D.; VINAGRE, F.; ESTEVEZ, Y.; BERNAL, A.; PEREZ, J.; CAVALCANTI, J.; SANTANA, I.; HEMERLY, A. S. *Gluconacetobacter diazotrophicus* Elicits a Sugarcane Defense Response Against a Pathogenic Bacteria *Xanthomonas albilineans*. **Plant Signaling & Behavior**, v.1, n.5, p.265-273, 2006.

BALOTA, E.L.; LOPES, E.S., HUNGRIA, M.; DÖBEREINER, J. 1999. Ocorrência de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 34: 1265-1276.

BALOTA, E.L.; LOPES, E.S; HUNGRIA. M.; DÖBEREINER, J. 1997. Inoculação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 32: 627-639.

BARRETO, M. C. S.; DIAS, A. L. F.; FIGUEIREDO, M. V. B. BARBOSA, M. R.; SANTOS, A. A.; ANDRADE, A. G. Aclimatização de mudas pré-brotadas de cana-de-

açúcar (*Saccharum officinarum* L.) em diferentes substrates. **Anais...** Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. Natal, RN. 2015.

BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BOTTINI, R.; BARALDI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v.24, n.1, p.7-11, 1998.

BURTON, J. D. *Rhizobium* inoculant for developing countries. **Tropical Agriculture**, London, v.58, n.4, p.291-303, 1981.

CABALLERO-MELLADO, J.; MUNÓZ-ROJAS, J. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. **Microbial Ecology**, v.46, p.454-464, 2003.

CAMPOS, B. C.; THEISEN, S.; GNATTA, V. Inoculante —graminante || nas culturas de trigo e aveia. **Ciência Rural**, v.29, n.3, p.401-407, 1999.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa – SPI; Itaguaí, RJ: Embrapa-Agrobiologia, 60 p. 1995.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. M.; RODRIGUES, L. S. Bactérias diazotróficas associadas a coqueiros na região de baixada litorânea em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 36: 1509-1517. 2001.

FIGUEIREDO, M. V. B.; STAMFORD, N. P.; VIDOR, C.; VILAR, J. J.; FILHO, E. C. O. Sobrevivência do *Bradyrhizobium* sp. em substratos alternativos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.27, n.11, 1992.

GOMES, A. A.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R. Relação entre distribuição de nitrogênio e colonização por bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 11, p.1105-1113, 2005.

JIMÉNEZ-SALGADO, T.; FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; TAPIA-HERNÁNDEZ, A.; MASCARÚA-ESPARZA, M. A.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO.

J. 1997. *Coffea arabica* L.: a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of the nitrogenfixing-acetobacteria. **Applied of Environmental of Microbiology** 63: 3676-3683.

LANDELL, M. G. DE A.; CAMPANA, M. P. ; FIGUEIREDO, P.; XAVIER, M.A. ; ANJOS, I. A.; DINARDOMIRANDA, L. L.; SCARPARI, M. S.; GARCIA, J. C. ; BIDÓIA, M. A. P.; SILVA, D. N.; MENDONCA, J. R.; KANTACH, R. A. D.; CAMPOS, M. F. DE.; BRANCALIÃO, S. R.; PETRI, R. H.; MIGUEL, P. E. M. **Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas**. Documentos IAC, N.109, Campinas, 2012, 16 p.

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

MIRZA, M. S.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALIK, K. A. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. **Plant and Soil**, v. 237, n. 1, p.47-54, 2001.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2a ed. UFLA, Lavras, Brasil. 729 p. 2006.

NERONI, R. F.; CARDOSO, E. J. B. N. Occurrence of diazotrophic bacteria in *Araucaria angustifolia*. **Scientia Agricola** 64: 303-304. 2007.

PANDEY, P.; MAHESHWARI, D. K. Bioformulation of *Burkholderia* sp. MSSP with a multispecies consortium for growth promotion of *Cajanus cajan*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, CA, v.53, n. 2, p. 213-22, fev. 2007.

PAULA, M. A. **Interação micorrizas vesículoarbusculares - bactérias diazotróficas em batata-doce (*Ipomoea batatas* (L))**. 168f. (Tese de Doutorado)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, Brasil. 1992.

Rao, N.S.S. Nitrogen-fixing bacteria associated with plantation and orchard plants. **Canadian Journal of Microbiology** 29: 863-866. 1983.

REIS JUNIOR, F. B.; SILVA, L. G.; REIS, V. M.; DOBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n. 5, p.985-994, 2000.

ROESCH, L. F. W.; CAMARGO, F. A. O.; SELBACH, P. A.; SA, E. L. S.; PASSAGLIA, L. M. P. Identificação de cultivares de milho eficientes na absorção de nitrogênio e na associação com bactérias diazotróficas. **Ciência Rural**, v.35, n.4, p.924-927, 2005.

ROUGHLEY, R. J.; VINCENT, J. M. Growth and survival of *Rhizobium* spp. In peat culture. **The Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, UK, v.30, n. 2, p.362-376, aug.1967.

SALA, V. M. R.; FREITAS, S. S.; DONZELI, P.; FREITAS J. G.; GALLO, P. B.; SILVEIRA, A. P. D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 29: 345-352. 2005.

SANTOS, P. E. L.; CRISTALES, R. B.; MELLADO, J. C. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixer with wide environmental geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology** 67: 2790-2798. 2001.

WEBER, O. B.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil** 210: 103-113. 1999.