

# DIVISÃO 2 - PROCESSOS E PROPRIEDADES DO SOLO

## Comissão 2.1 - Biologia do solo

### DENSIDADE E DIVERSIDADE FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NÃO SIMBIÓTICAS EM SOLOS DA RESERVA BIOLÓGICA SERRA DOS TOLEDOS, ITAJUBÁ (MG)<sup>(1)</sup>

Talita Filomena Silva<sup>(2)</sup> & Rogério Melloni<sup>(3)</sup>

#### RESUMO

Bactérias diazotróficas não simbióticas (BDNS) atuam no desenvolvimento das plantas por meio da fixação biológica de nitrogênio e também pela produção e liberação de substâncias reguladoras do crescimento vegetal. Este estudo objetivou avaliar a densidade e diversidade fenotípica desse grupo de bactérias em fragmentos de solo da Reserva Biológica Serra dos Toledos e entorno, em Itajubá/MG. Essa reserva localiza-se na Área de Proteção Ambiental da Mantiqueira, constituindo-se em uma importante área de recarga e de abrigo à flora e fauna endêmicas. Amostras de solo superficial foram coletadas em áreas com diferentes declividades na reserva, em épocas representativas das estações de inverno (setembro/2006) e verão (abril/2007). A densidade, avaliada pelo número mais provável, utilizando os meios de cultura NFb, JNFb e Fam, para *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp. e *A. amazonense*, respectivamente, variou de 0,12 a 75,60 (NMP x 10<sup>5</sup>) bactérias g<sup>-1</sup> solo seco. Foram obtidos 172 e 174 isolados, respectivamente para as amostras de inverno e verão, dos quais 30 e 55 % apresentaram similaridade igual ou superior a 70 % com as estirpes-tipo *Azospirillum brasilense*, *A. amazonense*, *A. lipoferum*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Burkholderia brasilensis*. O resultado do comportamento dos isolados com base na tolerância à salinidade nem sempre foi semelhante ao obtido pelas características fenotípicas culturais a 70 % de similaridade, sendo indicado para estudos complementares de diversidade desses organismos. As BDNS apresentam potencial de utilização em estudos de avaliação da qualidade e sustentabilidade de ecossistemas. No entanto, apesar da alta densidade e diversidade fenotípica em solos da reserva, maiores valores foram obtidos no entorno, evidenciando o efeito positivo da cobertura vegetal do tipo gramíneas sobre elas, independentemente da variação climática.

**Termos de indexação:** fixação biológica de nitrogênio, reserva biológica, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*.

<sup>(1)</sup> Trabalho apresentado na FERTBIO 2008, Londrina (PR). Recebido para publicação em março de 2010 e aprovado em janeiro de 2011.

<sup>(2)</sup> Engenheira ambiental e mestranda em Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Itajubá – UNIFEI. Av. BPS 1303, Pinheirinho, CEP 37500–903 Itajubá (MG). E-mail: taeam@unifei.edu.br

<sup>(3)</sup> Docente do Instituto de Recursos Naturais, UNIFEI. E-mail: rmelloni@unifei.edu.br

**SUMMARY: DENSITY AND PHENOTYPIC DIVERSITY OF NON-SYMBIOTIC DIAZOTROPHIC BACTERIA IN SOILS OF THE BIOLOGICAL RESERVE SERRA DOS TOLEDOS, ITAJUBÁ (MG)**

*Non-symbiotic diazotrophic bacteria (NSDB) influence plant growth through biological nitrogen fixation and also production and release of plant growth-regulating substances. The aim of this study was to evaluate the density and phenotypic diversity of this bacterial group in fragments of the "Reserva Biológica Serra dos Toledos" and surroundings, in Itajubá/MG. This reserve is located in the environmental protection area of Mantiqueira and represents an important recharge area and shelter for endemic flora and fauna. Topsoil samples were collected in areas with different slopes in the reserve and surroundings, at the end of the winter season (September/2006) and of the summer (April/2007). Population densities were evaluated by the Most-Probable-Number method (MPN) using the growth media NFb, JNFb and Fam for *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp. and *A. amazonense*, respectively, and a range of 0.12 to 75.60 (MPN x 10<sup>5</sup>) bacteria g<sup>-1</sup> dry soil was observed. In September/2006, 172 isolates were obtained, of which 30 % had a similarity of at least 70 % with the reference strains. In April/2007, 174 isolates were obtained, in 55 % of which a similarity of at least 70 % was observed with the reference strains evaluated (*Azospirillum brasilense*, *A. amazonense*, *A. lipoferum*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia brasilensis*). The results based on salt tolerance of the isolates were not always similar to those related to phenotypic similarity of 70 % of the cultures; so salt tolerance is recommended for additional diversity studies on these NSDB. The NSDB are indicated for studies on quality and sustainability of ecosystems. However, despite the high bacteria population density and phenotypic diversity in soils of the reserve, higher values were observed in the neighboring areas, showing the positive effect of a grass cover, regardless of climatic variations.*

*Index terms: biological nitrogen fixation, biological reserve, Azospirillum, Herbaspirillum, Burkholderia.*

## INTRODUÇÃO

O N é geralmente considerado o nutriente mais limitante para o crescimento de plantas no seu ambiente natural (Buchanan et al., 2000). Na natureza, esse elemento é encontrado em abundância em uma forma quimicamente estável (N<sub>2</sub>), a qual não é acessível à maioria dos seres vivos, sendo necessária a sua transformação para uma forma combinada que facilite sua assimilação (Marin et al., 1999). Segundo Moreira & Siqueira (2006), apenas uma pequena parcela das espécies de procariontos possui a enzima nitrogenase, que é capaz de reduzir o N<sub>2</sub> para a forma inorgânica combinada NH<sub>3</sub>, disponível às plantas e outros organismos, sendo estes organismos denominados diazotróficos e o mecanismo responsável pela incorporação de N à biomassa é chamado de fixação biológica de N<sub>2</sub> (FBN).

Entre os sistemas biológicos capazes de aproveitar o N diretamente da atmosfera, a simbiose rizóbio-leguminosa tornou-se o mais especializado, com destaque para a cultura da soja, onde até 94 % do N requerido pelas cultivares mais produtivas pode ser fornecido pela FBN (Hungria et al., 2006). Um dos grandes interesses dos pesquisadores é a extensão desse processo biológico para outras culturas, como gramíneas e cereais, principalmente as de grande importância socioeconômica (Sala et al., 2005). As

associações entre bactérias diazotróficas e não leguminosas são denominadas comumente de simbiose associativa ou fixação de N<sub>2</sub> associativa (Baldani et al., 1997a). Essas bactérias diazotróficas não simbióticas (BDNS), assim chamadas por Kennedy et al. (2004), apesar de serem aeróbias, apenas conseguem fixar o N<sub>2</sub> quando este se encontra como única fonte de N em condições microaerófilas (Döbereiner, 1992).

Entre as BDNS mais estudadas destacam-se aquelas pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, que já foram isoladas de plantas como arroz (Rodrigues et al., 2006), milho (Perin et al., 2006), cana-de-açúcar (Reis Junior et al., 2000) e *Brachiaria* spp. (Reis Junior et al., 2004). Estudos consideram bactérias do gênero *Azospirillum* como diazotróficas facultativas, sendo capazes de colonizar raízes de plantas não leguminosas interna e externamente (Baldani et al., 1997a). O gênero *Herbaspirillum*, apesar de também sobreviver no solo, é comumente encontrado no interior de raízes e também na parte aérea das plantas (Olivares et al., 1997), assim como o gênero *Burkholderia*, que teve sua capacidade diazotrófica descoberta na década de 90 (Baldani et al., 1997b).

As BDNS podem desempenhar importante papel na sustentabilidade dos ecossistemas, uma vez que incorporam N<sub>2</sub> por meio da fixação biológica, podendo

produzir e liberar substâncias reguladoras do crescimento vegetal (Dobbelaere et al., 2003), como auxinas, giberelinas e citocininas, as quais contribuem para melhorar a nutrição mineral e utilização de água pelas plantas (Bazzicalupo & Okon, 2000). No entanto, Bashan & Holguin (1997) relataram que a ocorrência e a atividade dessas bactérias no solo e na planta, ressaltando as condições de ambiente favoráveis, são fortemente influenciadas por estresses físicos (baixa umidade e alta temperatura), químicos (acidez e baixos teores de nutrientes e C) e biológicos (espécie vegetal não hospedeira).

Diversos trabalhos têm sido realizados nos últimos anos nessa área de BDNS no Brasil, principalmente em culturas como trigo (Sala et al., 2007), milho (Reis Junior et al., 2008), cana-de-açúcar (Oliveira et al., 2009), arroz (Ferreira et al., 2010), abacaxi (Baldotto et al., 2010), entre outras, evidenciando o potencial dessas bactérias no crescimento das culturas.

A Reserva Biológica Serra dos Toledos localiza-se na Área de Proteção Ambiental da Mantiqueira, sendo o maior trecho de Mata Atlântica preservada da região sul mineira, abrigando grande diversidade de espécies da fauna e flora endêmicas (Itajubá, 2002a). É um ecossistema rico em mananciais e participa do fornecimento de água potável ao município de Itajubá/MG. A avaliação das BDNS dentro da reserva foi definida em razão da importância na incorporação de N ao solo e devido à possibilidade de esses microrganismos indicarem variações de atributos edáficos, comuns em áreas de interferência antrópica. Esses estudos, aliados a outros, servirão como ferramentas para a elaboração de um plano estratégico de gerenciamento da reserva.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a densidade e diversidade fenotípica de isolados de BDNS pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, em solos sob gradientes de declividade na Reserva Biológica Serra dos Toledos e entorno, em duas épocas contrastantes (setembro/2006 e abril/2007).

## MATERIAL E MÉTODOS

Após levantamento de dados sobre mapas de declividades da Reserva Biológica Serra dos Toledos, foram selecionadas três áreas no seu interior, representativas dessas variações de gradientes. Uma área foi selecionada fora da reserva e sob ação antropogênica, para confronto dos resultados. As áreas estudadas foram: Área Plana (P): área em relevo suave a suave ondulado, 0,13 m m<sup>-1</sup> de declive (22 ° 25 ' 48,8 " sul e 45 ° 22 ' 18,3 " oeste) e altitude de 1.311 m; Área Mediana (M): área em relevo ondulado, declive de 0,35 m m<sup>-1</sup> (22 ° 25 ' 33,3 " sul e 45 ° 22 ' 20,9 " oeste) e altitude de 1.306 m; Área Inclinada (I): área em relevo montanhoso, 0,56 m m<sup>-1</sup>

de declive (22 ° 25 ' 45,5 " sul e 45 ° 22 ' 17,0 " oeste) e altitude de 1.307 m; e Área Fora (F): área de média a baixa declividade, localizada fora da reserva (22 ° 25 ' 28,2 " sul e 45 ° 22 ' 15,0 " oeste), com altitude de 1.307 m, onde se pode observar a presença de gado e vegetação de campo (pasto abandonado em sucessão, com domínio de braquiária (*Brachiaria* spp.)). Estudo realizado pelo Instituto Estadual de Florestas (IEF) nesse ecossistema revela a presença de espécies importantes, como peroba (*Aspidosperma parvifolium*), angico (*Parapiptadenia rigida*), jacarandá (*Jacaranda mimosifolia*), cedro (*Cedrela fissilis*), jequitibá (*Cariniana estrellensis*), cajarana (*Spondias dulcis*), candeia (*Arisarum vulgare*), canelas (*Nectandra lanceolata*), araucária (*Araucaria angustifolia*) e grande variedade de bromélias (*Vriesea* sp.) e orquídeas (*Dendrobium* sp.), e baixa densidade de gramíneas no sub-bosque em virtude do elevado sombreamento. Sua cobertura vegetal original é representada pelo contato Floresta Ombrófila Densa/ Floresta Ombrófila Mista, sendo atualmente a maior parte composta por vegetação secundária (Itajubá, 2002a).

Sob influência da elevada altitude da região, o clima da reserva é do tipo tropical temperado, com oscilações bruscas de temperatura e predominância de ventos nordeste (NE), com temperatura média de 25 °C e precipitação pluvial de 1.410 mm ano<sup>-1</sup>; as estações do ano são bem definidas, com maiores temperaturas e precipitação pluvial durante os meses de verão, e clima frio e seco nos meses de inverno, com temperaturas abaixo de 10 °C (Itajubá, 2002b).

Cada área foi subdividida em cinco subáreas, obtendo-se cinco amostras compostas, formadas por cinco subamostras cada. As subamostras foram retiradas em ziguezague, na profundidade de 0 a 10 cm, em setembro/2006 (representativa do inverno) e abril/2007 (representativa do verão), na distância de 10 m entre elas. As amostras de solo foram acondicionadas em sacos plásticos e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia, da UNIFEI, peneiradas em malha de 4 mm e mantidas a 4 °C até a determinação dos atributos microbiológicos. Para cada amostra, determinou-se a umidade atual do solo. O solo de todas as áreas possui mesma formação litológica (gnaisse finos, escuros a claros, muito deformados), sendo classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo aluminico (Nassar, 2007).

Para a avaliação da densidade de BDNS, foram preparados os meios de cultura com consistência semissólida NFb para *Azospirillum* spp. e JNFb para *Herbaspirillum* spp., conforme descrito em Döbereiner et al. (1995), e o meio Fam para *Azospirillum amazonense*, descrito em Magalhães (1983). Foram realizadas diluições sucessivas das amostras de solo em solução salina, de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-5</sup>; dessas suspensões, 0,1 mL foi inoculado em frascos contendo os meios de cultura semissólidos, com três repetições por diluição. Essas culturas foram mantidas sob incubação por

7 dias a 28 °C, avaliando-se a presença ou ausência de crescimento bacteriano pela formação de película próxima à superfície no meio. As densidades de bactérias foram avaliadas por meio do método do número mais provável (NMP), para cada subárea, obtendo-se o NMP por grama de solo úmido por meio do programa MPNES (Woomer et al., 1990). Assim, com os dados de umidade, pôde-se obter o NMP por grama de solo seco. A análise de variância, assim como as pressuposições desse modelo (normalidade dos dados e resíduos e homogeneidade de variâncias), e testes de comparações múltiplas (Duncan a 5 %) foram feitos utilizando-se o programa R (R Development Core Team, 2009) e seu complementar Tinn R, seguindo-se a transformação dos dados para log(NMP). Cada área amostrada foi considerada tratamento (com cinco repetições por área/tratamento), sendo todas analisadas em delineamento inteiramente ao acaso.

Para obtenção dos isolados de BDNS, procedeu-se ao método utilizado por Melloni et al. (2004). Os isolados crescidos no meio batata foram caracterizados quanto a cor, diâmetro e consistência das colônias. Os isolados que apresentaram as mesmas características fenotípicas foram unidos em um grupo fenotípico cultural. Em função do número de isolados obtidos por grupo fenotípico, pôde-se calcular o índice de diversidade de Shannon & Weaver, que relaciona a riqueza e uniformidade de espécies (Odum, 1983), para cada área de estudo. As estirpes-tipo de *Azospirillum lipoferum* (BR11080), *Azospirillum brasilense* (BR11001), *Azospirillum amazonense* (BR11040), *Herbaspirillum seropedicae* (BR11175) e *Burkholderia brasilensis* (BR11340) também foram caracterizadas fenotipicamente em meio batata, para comparação com os isolados previamente obtidos das amostras de solo. Todos os isolados e estirpes-tipo foram agrupados em dendrograma de similaridade pelo método *Complete Linkage* e Distância Euclidiana (Everitt, 1993), por meio do programa STATISTICA 5.0 (Statistica, 1995), de acordo com os valores atribuídos para as características fenotípicas (Quadro 1).

Os resultados dos atributos microbiológicos foram submetidos à análise de componentes principais (PCA), utilizando-se o programa PC-ORD 3.12 (McCune & Mefford, 1997). Essa técnica é frequentemente utilizada para reduzir o número de variáveis totais para discussão, distribuídas de acordo com componentes principais (CP) de maior correlação dos dados (Baretta et al., 2008), tornando a análise mais eficiente e mantendo a maioria ou todas as informações originais (Reyment & Jöreskog, 1993).

O teste de tolerância à salinidade é recomendado por Nóbrega et al. (2004) para estudos de diversidade fenotípica desse grupo bacteriano e foi empregado no presente trabalho a fim de avaliar o comportamento dos isolados e estirpes-tipo em relação aos dendrogramas elaborados por meio de atributos ligados aos aspectos morfológicos das colônias. Para essa análise, selecionaram-se, no máximo, três isolados de cada grupo fenotípico cultural que apresentaram similaridade igual ou superior a 70 % com as estirpes-tipo, tanto no dendrograma de similaridade para a coleta de setembro/2006 quanto no dendrograma referente à coleta de abril/2007. Nesse teste, porções das colônias dos isolados e estirpes-tipo em estudo foram transferidas para microtubos de ensaio contendo 1,5 mL de meio batata líquido, sendo estes submetidos à agitação em temperatura ambiente por 3 dias, tempo necessário para que atingissem a fase logarítmica (Nóbrega et al., 2004). Aliquotas de 25 µL das suspensões de bactérias foram inoculadas e espalhadas em miniplacas de Petri contendo meio de cultura batata sólido, modificado por adição de NaCl com concentrações finais de 0, 10, 20, 40 e 80 g L<sup>-1</sup>, incubados a 28 °C por 4 dias. Os tratamentos foram distribuídos ao acaso, com três repetições. A tolerância das bactérias ao NaCl foi observada por meio da porcentagem de crescimento da bactéria em relação à área superficial do meio de cultura. Assim como proposto por Trannin et al. (2001), foram atribuídos valores ou notas às médias dos percentuais de crescimento para cada concentração de NaCl: 1 (0–20 %), 2 (20–40 %), 3 (40–60 %), 4 (60–80 %) e 5 (80–100 %).

**Quadro 1. Valores atribuídos às características fenotípicas para construção dos dendrogramas de similaridade**

Característica fenotípica	Setembro/2006	Abril/2007
Coloração das colônias	1 (branco acastanhado) 2 (branco) 3 (branco azulado) 4 (creme) 5 (a marelo acastanhado) 6 (amarelo ouro) 7 (amarelo esverdeado) 8 (laranja) 9 (transparente)	1 (branco acastanhado) 2 (branco) 3 (creme) 4 (amarelo acastanhado) 5 (amarelo esverdeado) 6 (transparente) 7 (rosa)
Diâmetro das colônias	1 (< 1 mm), 2 (1–2 mm), 3 (2–3 mm), 4 (> 3 mm)	
Consistência das colônias	1 (seca), 2 (baixa produção de goma), 3 (média produção de goma), 4 (alta produção de goma)	

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a coleta de setembro/2006 (Quadro 2), exceto a área com declividade mediana (M) que apresentou menor densidade de BDNS nos meios NFb e JNFb, não houve diferença significativa entre as demais nos três meios utilizados.

Na coleta de abril/2007 (Quadro 2), o maior valor de densidade foi obtida nos solos localizados fora da reserva no meio JNFb, o que possivelmente ocorreu devido à maior ocupação por hospedeiros (gramíneas) nesse local, em razão das condições ligadas à maior temperatura e umidade nesse período. Esse resultado corrobora aquele apresentado por Melloni et al. (2004), os quais encontraram forte correlação entre presença de gramíneas e densidade dessas bactérias, em solos de mineração em reabilitação, mostrando que a presença do hospedeiro é mais importante do que atributos físicos e químicos do solo. Segundo dados climatológicos da reserva, obtidos pelo CPTEC (2010),

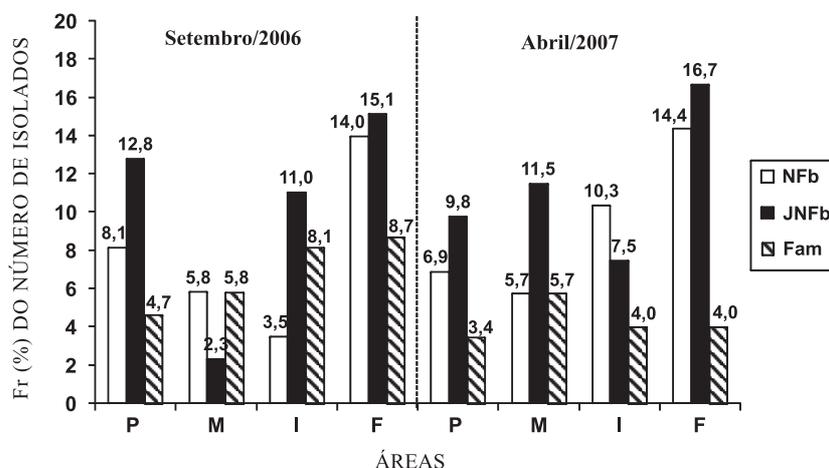
as condições climáticas do verão (290 mm e 22 °C, respectivamente para precipitação total mensal e temperatura média) são comparativamente maiores que as do inverno (27 mm e 16 °C) e podem estar ligadas à maior densidade bacteriana nesse período (Moreira & Siqueira, 2006). De acordo com Melloni (2007), temperaturas e umidades mais elevadas e revegetação com gramíneas do tipo capim-gordura e braquiária contribuíram para a maior multiplicação dessas BDNS e maior facilidade de isolamento em laboratório.

Notou-se efeito marcante no número obtido de isolados em amostras do solo fora da reserva (Figura 1), principalmente nos meios NFb e JNFb. De acordo com as características fenotípicas culturais de cada isolado, puderam-se estabelecer os grupos fenotípicos culturais por época de amostragem, conforme demonstrado nos quadros 3 e 4, juntamente com as descrições das características fenotípicas das estirpes-tipo. Dessa forma, foi observado grande número de

**Quadro 2.** Densidade de bactérias diazotróficas não simbióticas em amostras de solo nas diferentes áreas de estudo P (plana), M (mediana), I (inclinada) e F (fora da reserva), coletadas em setembro/2006 e abril/2007, utilizando meios de cultura específicos para *Azospirillum* spp. (NFb), *Herbaspirillum* spp. (JNFb) e *Azospirillum amazonense* (Fam)

Área	Setembro/2006			Abril/2007		
	NFb	JNFb	Fam	NFb	JNFb	Fam
	(NMP x 10 <sup>5</sup> ) bactérias g <sup>-1</sup> solo seco					
P	4,88 a	4,89 a	5,81 a	10,3 a	3,73 b	0,85 b
M	0,40 b	0,12 b	4,20 a	3,56 a	1,68 b	2,20 ab
I	11,44 a	3,85 a	1,55 a	15,7 a	2,47 b	1,08 b
F	16,90 a	5,08 a	9,44 a	21,8 a	75,60 a	4,63 a
CV (%)	7,8	10,1	11,0	7,4	5,5	6,5

Médias seguidas por letras iguais em áreas diferentes, dentro do mesmo meio de cultura, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan a 5%. Para análise estatística, os dados foram transformados para log(NMP). CV: coeficiente de variação dos dados transformados.



**Figura 1.** Frequência relativa (Fr) do número de isolados de bactérias diazotróficas não simbióticas obtidos em amostras de solo nas diferentes áreas de estudo P (plana), M (mediana), I (inclinada) e F (fora da reserva), por época de amostragem (setembro/2006 e abril/2007), utilizando meios de cultura específicos para *Azospirillum* spp. (NFb), *Herbaspirillum* spp. (JNFb) e *Azospirillum amazonense* (Fam).

grupos fenotípicos, onde 172 isolados foram distribuídos em 61 grupos (31, 16, 23 e 39 grupos nas áreas plana, mediana, inclinada e fora, respectivamente) para as amostras de setembro/2006, e 174 isolados em 37 grupos (16, 14, 19 e 23 nas áreas plana, mediana, inclinada e fora, respectivamente) para as amostras de abril/2007. O maior número de grupos fenotípicos em setembro/2006 esteve ligado aos maiores valores do índice de diversidade de Shannon & Weaver ( $H'$ ) (Quadros 3 e 4), em todas as áreas, quando comparados aos da segunda coleta. Assim como observado por Melloni et al. (2004), houve queda de cerca de 40 % no número de grupos na segunda época, evidenciando a dinâmica temporal dessa comunidade, em função das condições ligadas à temperatura e umidade, características de cada época do ano.

Os dendrogramas de similaridade estão representados nas figuras 2 e 3. Para análise da coerência taxonômica entre os grupos culturais, foi feito um estudo de similaridade igual ou superior a 70 %, onde se observaram 11 grandes grupos (GG) culturais no inverno e 10 no verão. Os GG são aqueles formados pela interseção com a linha de 70 % de similaridade. Dos 11 GG formados na época de inverno, três apresentaram similaridade igual ou superior a 70 % com as cinco estirpes-tipo, compreendendo 52 isolados. Na época de verão, três GG apresentaram similaridade igual ou superior a 70 % com as estirpes-tipo analisadas, com um total de 95 isolados. Esse resultado comprova a variação sazonal dos isolados em relação às suas características fenotípicas. Assim, pôde-se obter a distribuição dos grupos fenotípicos

**Quadro 3. Descrição dos grupos fenotípicos culturais de isolados e estirpes-tipo de bactérias diazotróficas não simbióticas, com os índices de diversidade calculados por área de estudo, em setembro/2006**

Grupo/ estirpe-tipo	Descrição <sup>(1)</sup>	Nº de isolados	Identificação dos isolados	Grupo/ estirpe-tipo	Descrição <sup>(1)</sup>	Nº de isolados	Identificação dos isolados
1	1-2-1	3	53, 54, 55	32	4-4-1	1	132
2	1-4-2	2	56, 57	33	4-2-1	6	32, 33, 34, 35, 36, 37
3	1-2-2	14	58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71	34	4-4-2	2	133, 134
4	1-3-3	7	72, 73, 74, 75, 76, 77, 78	35	4-2-3	2	38, 39
5	1-1-2	2	1, 2	36	4-1-1	2	40, 41
6	1-3-1	2	79, 80	37	4-3-4	2	135, 136
7	1-2-4	1	81	38	4-1-3	2	137, 138
8	1-2-3	5	82, 83, 84, 85, 86	39	4-1-4	1	139
9	1-1-3	1	3	40	5-2-2	10	140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149
10	1-4-4	1	87	41	5-1-1	4	42, 43, 44, 45
11	1-1-1	6	88, 89, 90, 91, 92, 93	42	5-4-2	1	150
12	1-3-4	1	94	43	5-2-1	4	46, 47, 48, 49
13	2-2-2	4	4, 5, 6, 7	44	5-4-3	1	151
14	2-2-3	2	8, 9	45	5-3-3	2	152, 153
15	2-3-4	2	95, 96	46	5-2-3	2	154, 155
16	2-4-3	5	97, 98, 99, 100, 101	47	5-1-3	2	156, 157
17	2-1-1	3	102, 103, 104	48	5-3-2	1	158
18	2-3-2	2	105, 106	49	5-1-4	1	159
19	2-3-3	4	107, 108, 109, 110	50	5-4-4	1	160
20	2-4-4	4	111, 112, 113, 114	51	5-1-2	2	50, 51
21	2-4-2	3	115, 116, 117	52	5-3-1	1	52
22	2-2-1	1	118	53	6-3-3	1	161
23	2-1-4	1	10	54	6-2-3	1	162
24	3-2-3	1	11	55	6-2-2	4	163, 164, 165, 166
25	3-2-1	1	119	56	6-3-2	1	167
26	4-4-4	3	120, 121, 122	57	7-2-2	1	168
27	4-3-2	4	12, 13, 14, 15	58	7-2-3	1	169
28	4-2-2	13	16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28	59	8-2-2	1	170
29	4-4-3	4	123, 124, 125, 126	60	9-3-1	1	171
30	4-3-3	5	127, 128, 129, 130, 131	61	9-2-2	1	172
31	4-1-2	3	29, 30, 31	<i>A. brasilense</i>	4-2-3	1	BR11001
<i>A. amazonense</i>	2-2-2	1	BR11 040	<i>A. lipoferum</i>	4-1-2	1	BR11080
<i>H. seropedicae</i>	4-2-2	1	BR11 175	<i>B. brasiliensis</i>	4-1-2	1	BR11340

Diversidade de Shannon & Weaver ( $H'$ ) por área de estudo: Plana (3,29), Mediana (2,59), Inclinada (2,95) e Fora (3,53)

<sup>(1)</sup> Descrição: 1º valor (cor da colônia): 1: branco acastanhado, 2: branco, 3: branco azulado, 4: creme, 5: amarelo acastanhado, 6: amarelo ouro, 7: amarelo esverdeado, 8: laranja, 9: transparente. 2º valor (diâmetro médio da colônia): 1: < 1 mm, 2: 1-2 mm, 3: 2-3 mm, 4: > 3 mm. 3º valor (consistência da colônia): 1: seca, 2: baixa produção de goma, 3: média produção de goma, 4: alta produção de goma.

**Quadro 4. Descrição dos grupos fenotípicos culturais de isolados e estirpes-tipo de bactérias diazotróficas não simbióticas, com os índices de diversidade calculados por área de estudo, em abril/2007**

Grupo/ estirpe-tipo	Descrição <sup>(1)</sup>	Nº de isolados	Identificação dos isolados	Grupo/ estirpe-tipo	Descrição <sup>(1)</sup>	Nº de isolados	Identificação dos isolados
1	1-2-1	3	154, 163, 169	20	3-1-1	18	60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77
2	1-2-2	6	145, 100, 135, 113, 164, 125	21	3-3-4	2	78, 79
3	1-1-2	3	132, 98, 131	22	3-1-3	4	173, 136, 118, 104
4	1-2-4	1	103	23	3-1-4	8	108, 155, 147, 116, 102, 107, 101, 96
5	1-1-2	2	152, 148, 165, 151, 139, 144, 170, 171, 161, 119, 115, 158, 157, 130, 126, 124	24	3-2-4	10	80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89
6	2-2-2	3	1, 2, 3	25	3-3-1	1	137
7	2-2-3	2	4, 5	26	4-2-2	1	90
8	2-3-4	2	97, 122	27	4-1-1	1	91
9	2-1-1	1	153	28	4-2-1	1	92
10	2-3-2	1	127	29	4-3-2	1	149
11	2-3-3	4	112, 156, 111, 128	30	4-1-2	3	93, 94, 95
12	2-1-2	5	134, 160, 133, 159, 129	31	5-1-1	1	168
13	2-1-3	2	172, 174	32	6-3-1	1	120
14	3-3-2	2	150, 166	33	6-2-1	6	110, 141, 105, 106, 162, 114
15	3-2-2	25	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30	34	6-1-1	7	109, 117, 146, 143, 142, 167, 140
16	3-3-3	3	31, 32, 33	35	6-1-2	1	99
17	3-1-2	12	34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45	36	6-1-4	1	138
18	3-2-1	4	46, 47, 48, 49	37	7-1-1	2	121, 123
19	3-2-3	10	50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59	<i>A. brasilense</i>	3-2-3	1	BR11001
<i>A. amazonense</i>	2-2-2	1	BR11040	<i>A. lipoferum</i>	3-1-2	1	BR11080
<i>H. seropedicae</i>	3-2-2	1	BR11175	<i>B. brasiliensis</i>	3-1-2	1	BR11340

Diversidade de Shannon & Weaver (H') por área de estudo: Plana (3,29), Mediana (2,59), Inclinação (2,95) e Fora (3,53)

<sup>(1)</sup> Descrição: 1º valor (cor da colônia): 1: branco acastanhado, 2: branco, 3: creme, 4: amarelo acastanhado, 5: amarelo esverdeado, 6: transparente, 7: rosa. 2º valor (diâmetro médio da colônia): 1: < 1 mm, 2: 1-2 mm, 3: 2-3 mm, 4: > 3 mm. 3º valor (consistência da colônia): 1: seca, 2: baixa produção de goma, 3: média produção de goma, 4: alta produção de goma.

culturais que apresentaram similaridade igual ou superior a 70 % com as estirpes-tipo, por área analisada, para as duas épocas de amostragem (Quadro 5). O maior número de grupos fenotípicos culturais foi obtido na área fora da reserva (13 grupos), a qual apresentava, conforme já discutido, maior ocorrência de hospedeiros (braquiária) e, conseqüentemente, maior densidade radicular de gramíneas com contribuição ao aumento desses microrganismos (Melloni, 2007).

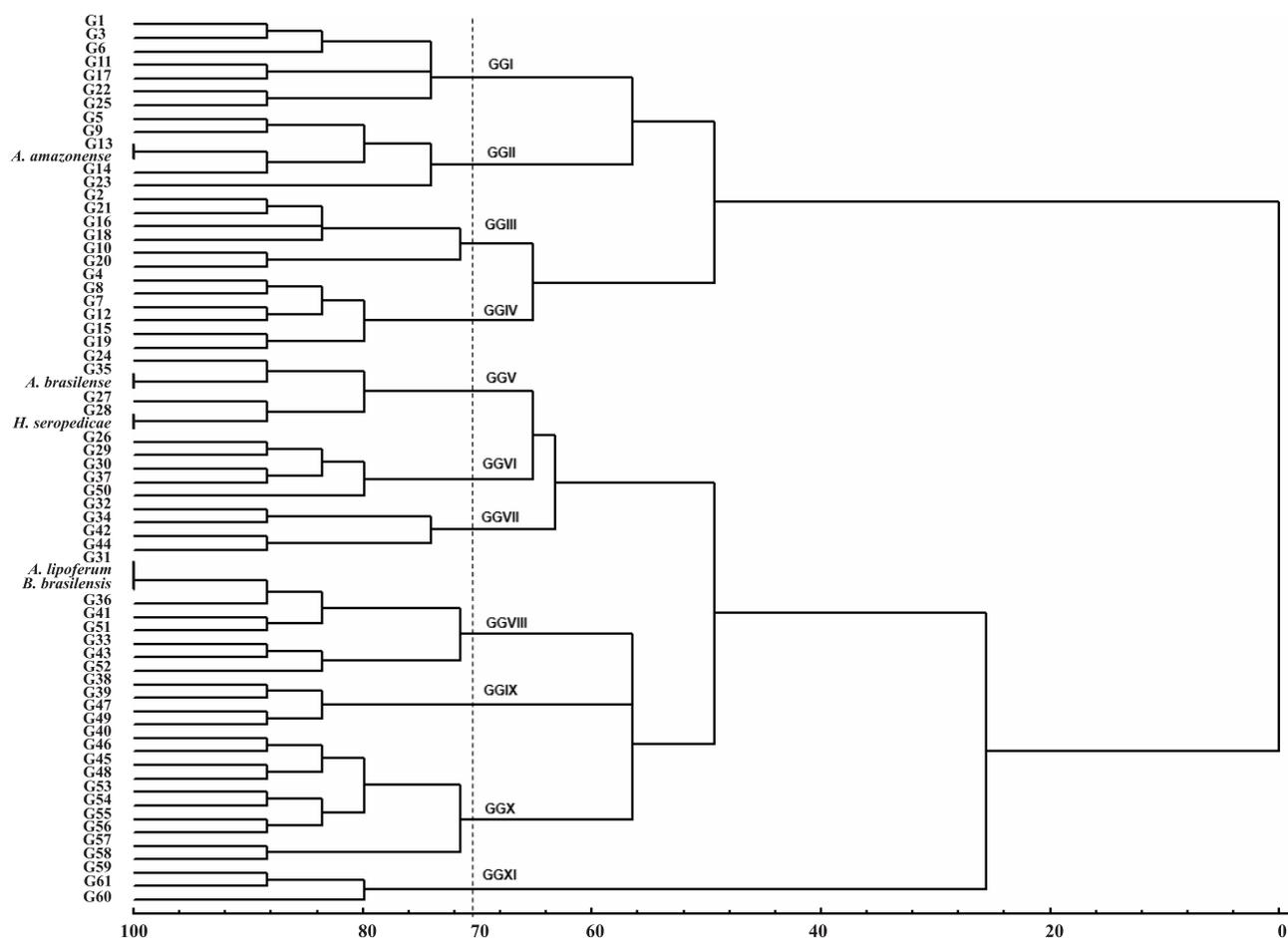
Do total de isolados obtidos nas épocas de inverno e verão, 30 % e 55 %, respectivamente, apresentaram similaridade igual ou superior a 70 % em relação às estirpes-tipo em estudo. Embora o maior número de isolados tenha sido obtido com a utilização do meio JNFb (Figura 1), a análise de similaridade (Figuras 2 e 3) indica que esses não necessariamente

apresentaram maior similaridade a *Herbaspirillum*, concordando com os resultados obtidos por Melloni et al. (2004). Segundo esses autores, a falta de especificidade do meio JNFb, já considerada por Baldani et al. (1999), indica que o meio JNFb permite o crescimento de outras bactérias, principalmente aquelas capazes de tolerar a maior acidez inicial desse meio, como as espécies do gênero *Azospirillum*, o que pode explicar a similaridade igual ou superior a 70 % da estirpe-tipo *H. seropedicae* BR11175 com a estirpe *A. brasilense* BR11001 na época de inverno e com a estirpe *A. lipoferum* BR11080 na época de verão. Do mesmo modo, Magalhães & Döbereiner (1984) mostraram que, mesmo sendo as espécies de *Azospirillum* favorecidas nos meios NFb e Fam, outros microrganismos diazotróficos podem apresentar crescimento, como ocorreu no presente estudo, onde as estirpes de *A. lipoferum* BR11080 e *B. brasiliensis*

**Quadro 5. Total de isolados de bactérias diazotróficas não simbióticas por grupo fenotípico cultural (G) que apresentaram similaridade igual ou superior a 70 % em relação às estirpes-tipo, nas diferentes áreas de estudo P (plana), M (mediana), I (inclinada) e F (fora da reserva), correspondentes às épocas de amostragem em setembro/2006 e abril/2007**

Áreas	Grupos Fenotípicos Culturais															Total isolados	Total grupos	
	Setembro/2006																	
	G5	G9	G13	G14	G23	G24	G27	G28	G31	G33	G35	G36	G41	G43	G51	G52		
P	0	0	2	1	0	0	1	4	1	2	1	1	0	0	0	0	13	8
M	0	1	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	1	0	0	0	5	4
I	2	0	0	1	0	0	1	4	0	2	0	0	0	1	0	0	11	6
F	0	0	2	0	1	1	2	3	2	1	1	1	3	3	2	1	23	13
	Abril/2007																	
	G6	G7	G15	G16	G17	G18	G19	G20	G21	G24	G26	G27	G28	G30	-( <sup>1</sup> )	-		
P	0	0	5	0	2	2	2	4	1	1	0	0	1	1	-	-	19	9
M	2	0	5	0	3	1	4	6	0	0	0	0	0	0	-	-	21	6
I	1	0	4	2	4	0	1	7	0	0	0	1	0	0	-	-	20	7
F	0	2	11	1	3	1	3	1	1	9	1	0	0	2	-	-	35	11

(<sup>1</sup>) Dados ausentes na época de abril/2007.



**Figura 2. Dendrograma de similaridade considerando as características fenotípicas culturais (cor, tamanho e consistência de colônias) de isolados e estirpes-tipo de bactérias diazotróficas não simbióticas, para a coleta de setembro/2006.**

BR11340 apresentaram alta similaridade. A grande maioria dos isolados não apresentou similaridade com

as estirpes-tipo em questão, podendo pertencer a outras espécies de diazotróficos não simbióticos.

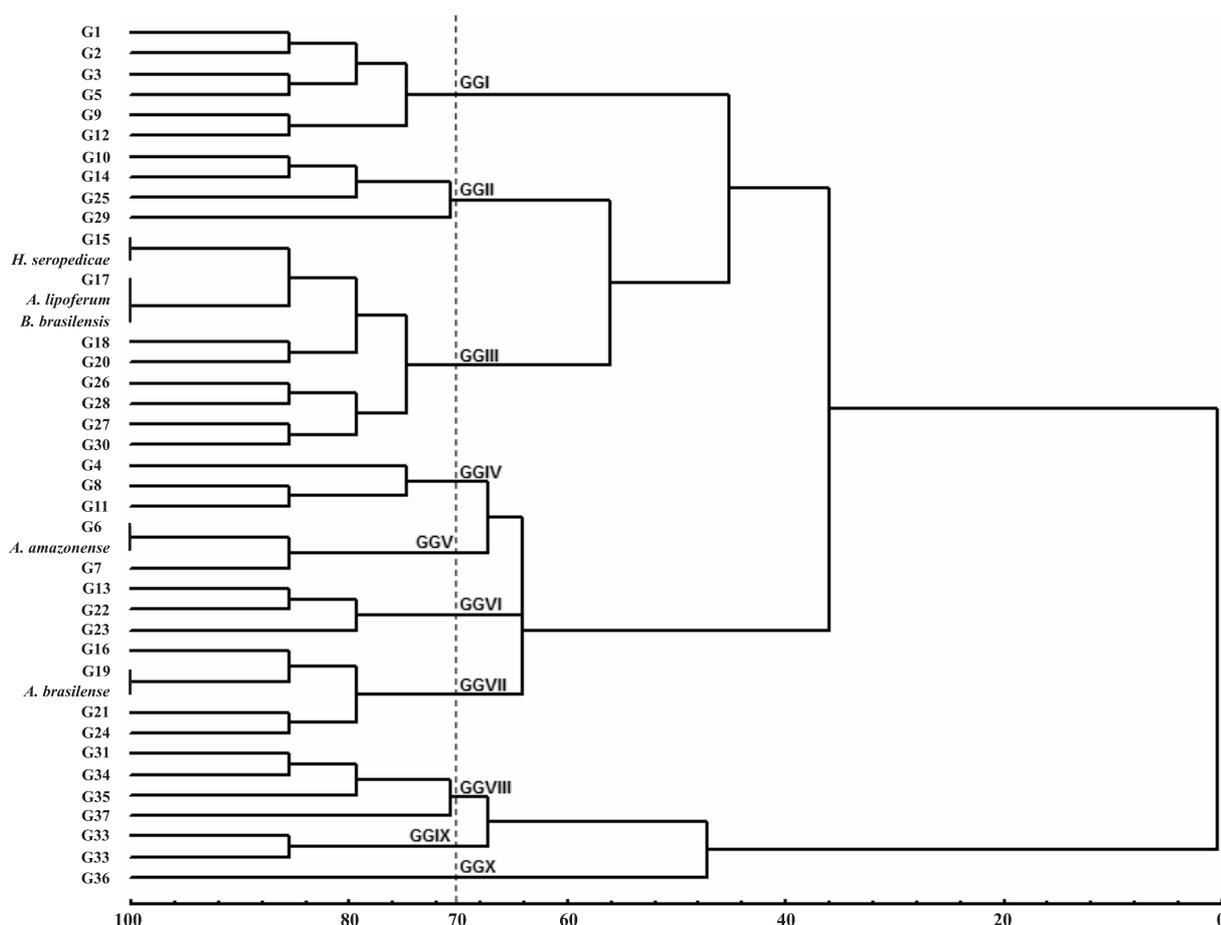


Figura 3. Dendrograma de similaridade considerando as características fenotípicas culturais (cor, tamanho e consistência de colônias) de isolados e estirpes-tipo de bactérias diazotróficas não simbióticas, para a coleta de abril/2007.

Com relação ao teste de tolerância à salinidade (Figuras 4 e 5), na coleta de setembro/2006 (Figura 4), a maioria dos isolados selecionados do GGII apresentou queda no crescimento na concentração de 40 g L<sup>-1</sup> de NaCl, comportamento bastante diferenciado daquele apresentado pela estirpe-tipo *A. amazonense*, cuja sensibilidade ao NaCl foi bem maior, apresentando redução no crescimento em concentrações de 10 g L<sup>-1</sup>, concordando com o resultado obtido por Nóbrega et al. (2004). Dessa forma, o comportamento dos isolados desse agrupamento é diferente daquele obtido pela característica fenotípica cultural a 70 % de similaridade, onde encontravam-se no mesmo GG da estirpe-tipo em questão.

No GGV, percebeu-se que a maior parte dos isolados apresentou redução de crescimento nas concentrações de 40 e 80 g L<sup>-1</sup> de NaCl, o que corresponde ao comportamento das estirpes-tipo *A. brasiliense* e *H. seropedicae*, mostrando tendência de mesmo comportamento fenotípico a 70 % de similaridade. Os isolados do GGVIII, de modo geral, apresentaram queda de crescimento nas concentrações de 40 e 80 g L<sup>-1</sup>, aproximando-se da observada para a estirpe-tipo *B. brasiliensis* nessa primeira concentração.

Dentro de um mesmo grupo fenotípico cultural, os isolados apresentaram comportamentos diferenciados, mostrando assim a diferenciação em relação ao comportamento fenotípico cultural.

Na coleta de abril/2007 (Figura 5), os isolados do GGIII apresentaram comportamentos variados até mesmo dentro do grupo fenotípico cultural, com queda acentuada de crescimento na concentração de 40 g L<sup>-1</sup>, semelhante ao das estirpes-tipo. Os isolados do GGV apresentaram comportamento diferenciado da estirpe-tipo *A. amazonense*, mostrando resistência maior que esta em relação ao NaCl. A maioria dos isolados do GGVII apresentou comportamento semelhante ao da estirpe-tipo *A. brasiliense*, com queda de crescimento na concentração de 40 g L<sup>-1</sup>.

Dessa forma, nem sempre um agrupamento com base na tolerância à salinidade foi semelhante àquele obtido pelas características fenotípicas culturais (a 70 % de similaridade). Essa afirmativa pode ser confirmada ao se confrontar o comportamento das estirpes-tipo *A. lipoferum* e *B. brasiliensis*, que, apesar de terem apresentado características fenotípicas culturais semelhantes, mostraram diferentes tolerâncias à salinidade.

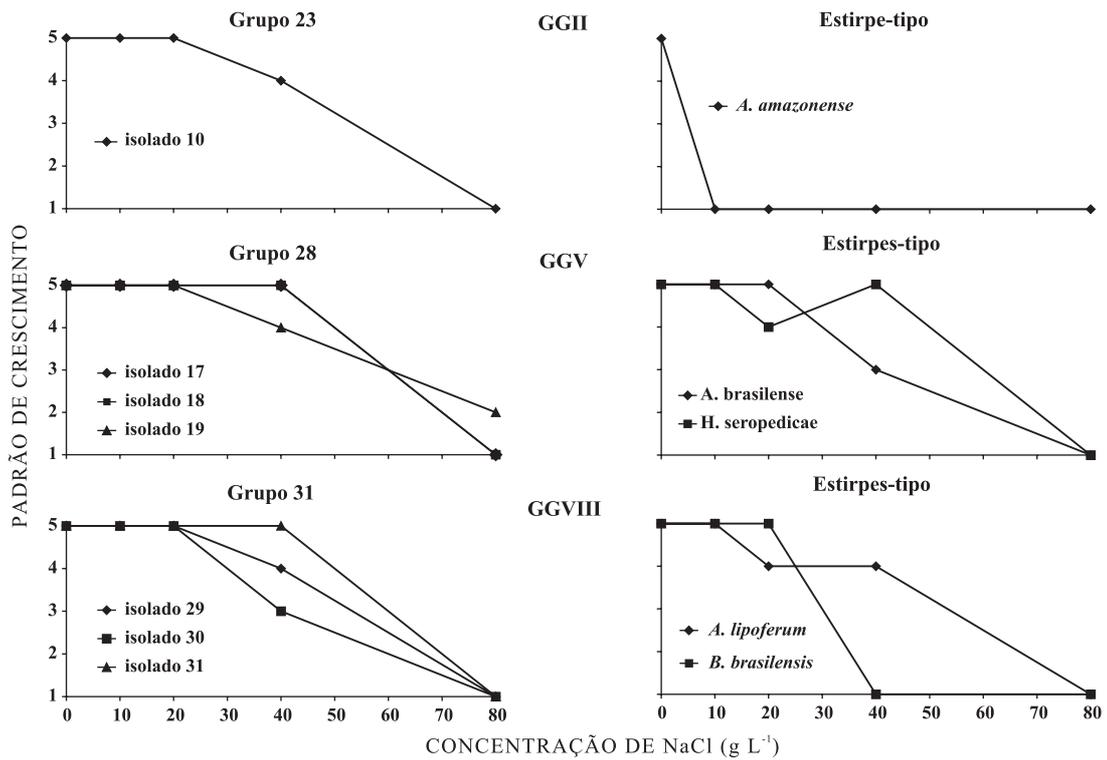


Figura 4. Teste de tolerância à salinidade dos isolados de bactérias diazotróficas não simbióticas de alguns grupos fenotípicos culturais pertencentes aos grandes grupos (GG) avaliados, referentes à coleta de setembro/2006.

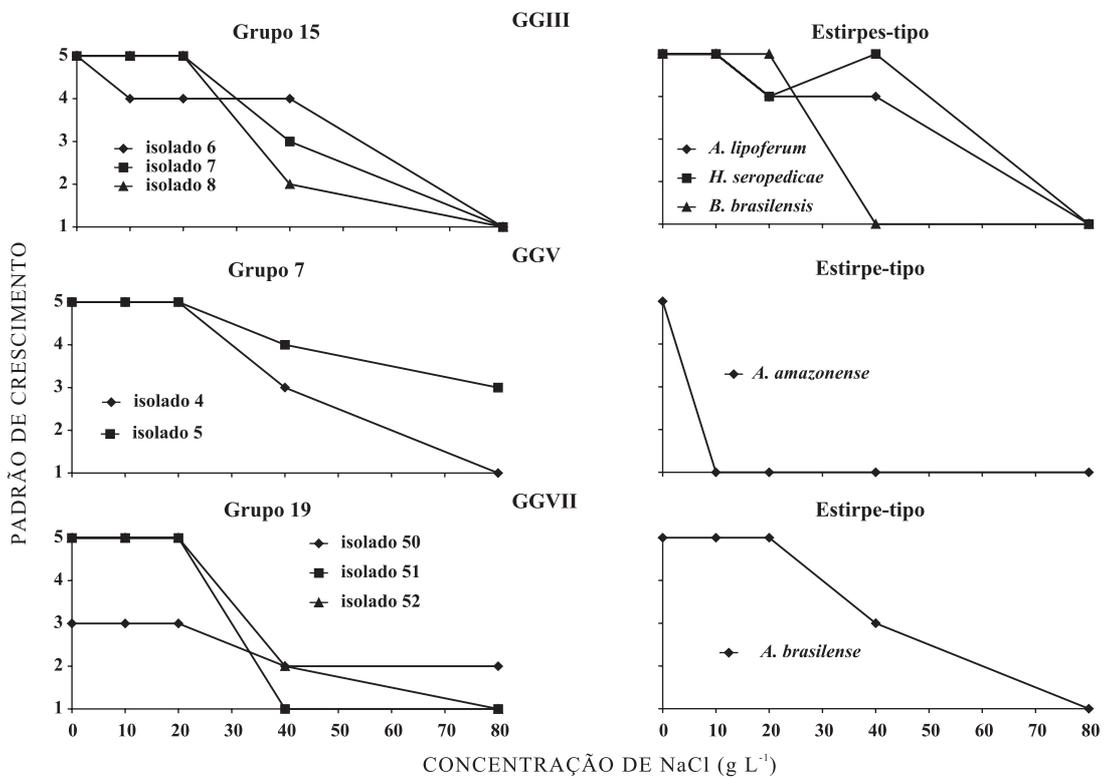


Figura 5. Teste de tolerância à salinidade dos isolados de bactérias diazotróficas não simbióticas de alguns grupos fenotípicos culturais pertencentes aos grandes grupos (GG) avaliados, referentes à coleta de abril/2007.



- BALDANI, V.L.D.; OLIVEIRA, E.; BALOTA, E.; BALDANI, J.I.; KIRCHHOF, G. & DÖBEREINER, J. *Burkholderia brasiliensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. *An. Acad. Bras. Ci.*, 69:116, 1997b.
- BALDOTTO, L.E.B.; BALDOTTO, M.A.; OLIVARES, F.L.; VIANA, A.P. & BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar 'Vitória' durante a aclimatização. *R. Bras. Ci. Solo*, 34:349-360, 2010.
- BARETTA, D.; BARETTA, C.R.D.M. & CARDOSO, E.J.B.N. Análise multivariada de atributos microbiológicos e químicos do solo em florestas com *Araucaria angustifolia*. *R. Bras. Ci. Solo*, 32:2683-2691, 2008.
- BASHAN, Y. & HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: Environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.*, 43:103-121, 1997.
- BAZZICALUPO, M. & OKON, Y. Associative and endophytic symbiosis. In: PEDROSA, F.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G. & NEWTON, W.E., eds. Nitrogen fixation: From molecules to crop productivity. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 2000. p.409-410.
- BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W. & JONES, R.L. Biochemistry and molecular biology of plants. Rockville, American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367p.
- CENTRO DE PREVISÃO DE TEMPO E ESTUDOS CLIMÁTICOS – CPTEC. Plataformas de coleta de dados. Disponível em: <[http://satelite.cptec.inpe.br/PCD/historico/consulta\\_pcdm.jsp](http://satelite.cptec.inpe.br/PCD/historico/consulta_pcdm.jsp)>. Acesso em 6 de maio de 2010.
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J. & OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 22:107-149, 2003.
- DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: Endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria. *Ci. Cult.*, 44:310-313, 1992.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D. & BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Itaguaí, Embrapa- CNPAB, 1995. 60p.
- EVERITT, B.S. Cluster analysis. New York, J. Wiley, 1993.
- FERREIRA, J.S.; BALDANI, J.I. & BALDANI, V.L.D. Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. *Acta Sci. Agron.*, 32:179-185, 2010.
- HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CAMPO, R.J.; CRISPINO, C.C.; MORAES, J.Z.; SIBALDELLI, R.N.R.; MENDES, I.C. & ARIHARA, J. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: Contributions of biological N<sub>2</sub> fixation and of N fertilizer to grain yield. *Can. J. Plant Sci.*, 86:927-939, 2006.
- ITAJUBÁ. Prefeitura Municipal. Elaboração do Plano de Manejo: Reserva Biológica Serra dos Toledos. Itajubá, Documento apresentado ao Fundo Nacional do Meio Ambiente\_Edital 10/2001: Apoio à Gestão Integrada em Unidades de Conservação de Proteção Integral de Reservas Particulares do Patrimônio Natural, 2002a. (Administração 2001-2004)
- ITAJUBÁ. Secretaria Municipal da Educação. Atlas escolar, histórico e geográfico do Município de Itajubá. Itajubá, 2002b. (Administração 2001-2004)
- KENNEDY, I.R.; CHOUDHURY, A.T.M.A. & KECSKÉS, M.L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: Can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biol. Biochem.*, 36:1229-1244, 2004.
- MAGALHÃES, F.M.M. Caracterização e distribuição de uma nova espécie de bactéria fixadora de nitrogênio. Manaus, Universidade do Amazonas, 1983. 89p. (Tese de Mestrado)
- MAGALHÃES, F.M.M. & DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. *R. Microbiol.*, 15:246-252, 1984.
- MARIN, V.A.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.R.S. & BALDANI, J.I. Fixação biológica de nitrogênio de importância para a agricultura tropical. Seropédica, Embrapa Agrobiologia, 1999 (Série Documentos).
- MCCUNE, B. & MEFFORD, M.J. Multivariate analysis of ecological data. Version 3.12. Gleneden Beach, MjM Software, 1997.
- MELLONI, R. Quantificação microbiana da qualidade do solo. In: SILVEIRA, A.P.D. & FREITAS, S.S., eds. Microbiota do solo e qualidade ambiental. Campinas, Instituto Agrônomo, 2007. p.193-218.
- MELLONI, R.; NÓBREGA, R.S.A.; MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. Densidade e diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita em reabilitação. *R. Bras. Ci. Solo*, 28:85-93, 2004.
- MOREIRA, F.M.S & SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2.ed. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2006. 729p.
- NASSAR, E.A. Influência do relevo na profundidade de solos da Reserva Biológica Serra dos Toledos. Itajubá, Universidade Federal de Itajubá, 2007. 142p. (Trabalho de Conclusão de Curso)
- NÓBREGA, R.S.A.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. & LIMA, A.S. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. *R. Bras. Ci. Solo*, 28:269-279, 2004.
- ODUM, E.P. Ecologia. Rio de Janeiro, Guanabara, 1983.
- OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I.; JAMES, E.K. & DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease and resistant sugar varieties by endophytic diazotrophic *Burkholderia*. *New Phytol.*, 135:723-737, 1997.
- OLIVEIRA, A.L.M.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. & HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. *Eur. J. Soil Biol.*, 45:106-113, 2009.
- PERIN, L.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDESVALDEZ, G.; BALDANI, J.I.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; REIS, V.M. & CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56:1931-1937, 2006.

- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, 2009. Disponível em: <URL <http://www.R-project.org>>
- REIS JUNIOR, F.B.; SILVA, L.G.; REIS, V.M. & DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. *Pesq. Agropec. Bras.*, 35:985-994, 2000.
- REIS JUNIOR, F.B.; SILVA, M.F.; TEIXEIRA, K.R.S.; URQUIAGA, S. & REIS, V.M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados à *Brachiaria* spp. em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitohormônio pela bactéria. *R. Bras. Ci. Solo*, 28:103-113, 2004.
- REIS JUNIOR, F.B.; MACHADO, C.T.T.; MACHADO, A.T. & SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. *R. Bras. Ci. Solo*, 32:1139-1146, 2008.
- REYMENT, R. & JÖRESKOG, K.G. Applied factor analysis in the natural sciences. Cambridge, Cambridge University Press, 1993.
- RODRIGUES, L.S.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M. & BALDANI, J.I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. *Pesq. Agropec. Bras.*, 41:275-284, 2006.
- SALA, V.M.R.; FREITAS, S.S.; DONZELI, V.P.; FREITAS, J.G.; GALLO, P.B. & SILVEIRA, A.P.D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. *R. Bras. Ci. Solo*, 29:345-352, 2005.
- SALA, V.M.R.; CARDOSO, E.J.B.N.; FREITAS, J.G. & SILVEIRA, A.P.D. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. *Pesq. Agropec. Bras.*, 42:833-842, 2007.
- STATISTICA. Statistic Analysis. Versão 5.0. Cary, 1995.
- TRANNIN, I.C.B.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. & LIMA, A. Tolerância de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium* a zinco, cádmio e cobre "in vitro". *R. Bras. Ci. Solo*, 25:305-316, 2001.
- WOOMER, P.; BENNET, J. & YOST, R. Overcoming the inflexibility of most-probable-number procedures. *Agron. J.*, 82:349-353, 1990.