



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

LILIANDRA BARRETO EMÍDIO

**ESTUDO DA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM PLANTAS DE CAPIM-
ELEFANTE CULTIVADAS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

Dra. VERA LÚCIA DIVAN BALDANI
Orientadora

SEROPÉDICA, RJ
NOVEMBRO – 2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

LILIANDRA BARRETO EMÍDIO

**ESTUDO DA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM PLANTAS DE
CAPIM-ELEFANTE CULTIVADOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Florestal, como requisito parcial para a obtenção do Título de Engenheiro Florestal, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Dra. VERA LÚCIA DIVAN BALDANI
Orientadora

SEROPÉDICA, RJ
NOVEMBRO – 2014

DEDICATÓRIA

Ao Deus Todo Poderoso que guia os meus passos; Aos meus pais, Reinaldo Emídio e Ruth Alves Barreto Emídio, a toda minha família e amigos, dedico.

AGRADECIMENTOS

Foram cinco anos de experiências únicas e momentos memoráveis que só a Rural poderia me permitir. No início, ainda com medo, enfrentei a minha própria incerteza, impulsionada por uma fé latente que sempre existiu dentro de mim, aceitei trilhar um caminho desconhecido acreditando que com bastante coragem, persistência, esforço e dedicação, ao final eu me orgulharia de ter feito a escolha certa.

Graduar-me sempre foi um sonho antigo, alimentado dentro de mim desde a minha infância sonhadora numa imaginação que voava longe. Parecia estar tão distante das minhas mãos, e por vezes pareceu ser um tanto utópico, mas desde pequenina aprendi que aquilo que as minhas mãos não alcançam, meus pensamentos não atingem e não passou no meu coração, é o que o Deus do Universo, a quem eu continuamente sirvo, tem o prazer de realizar para aqueles que O amam.

E foi assim, há cinco anos iniciou-se uma construção! Os pilares fundamentais foram embasados em sentimentos de medo, porém fé, saudade, mas valentia, incerteza, mas persistência, e sobre cada um deles apoiou-se novos sentimentos que transformaram o meu ser: sobre o medo, a força, sobre a saudade a esperança e sobre a incerteza a convicção de que só aqueles que não desistem são capazes de vencer! Agora esta construção está em fase de acabamentos e posso dizer que me orgulho das escolhas que fiz. Isto tudo não seria possível sem as mãos fortes e o apoio de pessoas maravilhosas que cercaram o meu caminho, eu jamais conseguiria sozinha. Por isso tenho o prazer de ser grata:

Primeiramente ao Deus da minha vida por ser o meu maior amigo, fonte, força, inspiração e por sua misericórdia em me levantar sempre quando eu já não tinha forças, cumprindo as suas promessas, realizando os meus sonhos e guardando a minha vida. Ao Deus da minha existência, Toda a Honra, toda a glória, para toda a Eternidade!

“És minha Força e Segurança, És meu Apoio, minha Esperança, És minha Vida e Confiança; Já me fizeste cidadã dos Céus.” Hino 454-Ccb

Aos meus pais, Reinaldo e Ruth, pelo exemplo, dedicação, paciência, amor incondicional, sabedoria com a qual me criaram, pelos valores embutidos ao meu coração e pelo privilégio da vida que eles me proporcionaram. Serão para sempre os

meus maiores exemplos. À minha irmã e cunhado, Leandra e Lívio, pelo cuidado, carinho e companherismo.

“Honra ao teu pai e a tua mãe para que te vá bem e vivas muito tempo sobre a Terra.”

Efésios, 6:2

A toda a minha família, Barreto e Emídio, por serem parte de mim e me acompanharem durante toda a minha história me ajudando a caminhar.

À minhas avós, Vó Lili e Vó Moema, pelo orgulho que sentiam de me ver construindo este sonho, pelos conselhos, carinho e todo o amor. Vocês já não estão aqui para ver, mas eu Venci e vocês fizeram parte disto!

“A saudade é o preço de ter vivido momentos maravilhosos ao lado de pessoas inesquecíveis.”

À minha família CCB, por serem mais do que amigos, irmãos, família e anjos. Em todos os lugares por onde passei senti o mesmo amor, a mesma voz e a mesma paz. A cada um que contribuiu para a concretização deste meu sonho. Eu não seria capaz de nomear a todos aqui, mas em meu coração o nome e o rosto de cada um estão eternizados e estou certa que o sentimento que nos une não provém desta Terra, mas sim do céu!

“Mesmo que os anos passem e até mesmo que a distância nos separe, ficarão dentro de mim os momentos que felizes nós passamos. Posso dizer: Ninguém é mais feliz que nós!”

As minhas amigas ruralinas que foram o maior presente que a Rural poderia me dar:

Mariana por todos os momentos “inimagináveis” que passamos, pela amizade, companheirismo e amor que existe entre nós. Minha irmã, obrigada por tudo!

Priscila, que eu não encontro palavras para definir, sou incapaz de agradecer e talvez eu não saiba demonstrar toda a minha admiração. Você foi um anjo para me ajudar nesta caminhada, tudo o que vivemos juntas aqui, a convivência diária, a paciência, o companheirismo, todas as conversas, cantorias e risos ficarão marcados como páginas lindas da minha história. Estaremos sempre ligadas e todos os nossos

sonhos se realizarão!! Ah, e obrigada por me acordar, não me deixar perder a hora, me esperar, me passar a matéria, me explicar o assunto da prova e por ter me salvado inúmeras vezes. Hahaha. Companheira para todas as horas! Obrigada!

“ Há amigos mais chegados que um irmão. ”

A todas as meninas que moraram na nossa linda república, Juliana, Ruth e Camila, vocês são especiais para mim. À Tatiana pela amizade que nasceu, pela diversão, conversas, risos e comida japonesa. Obrigada!

Aos amigos da Embrapa e do laboratório de gramíneas por todo o suporte, atenção, paciência e ensinamentos. À Dra Vera Baldani pela oportunidade, orientação e por todo o aprendizado. À Sandy pelo carinho, apoio, atenção e suporte para a realização deste trabalho. Em especial queria agradecer aos meus amigos Wilson e Lúcio por todo o carinho, atenção, risadas, companheirismo e amizade que me proporcionaram. Vocês são mais do que técnicos do laboratório para mim, foram professores, meu braço direito e grandes amigos. Vocês são especiais. O meu muito obrigada!

Enfim agradeço a Universidade Rural, aos professores do Instituto de Florestas, a todos os colegas, funcionários e todos aqueles que me auxiliaram neste percurso.

Por fim, me orgulho em dizer que concluí esta missão e se eu venci isto se deve a cada um de vocês!

“Olhei e vi debaixo do Sol que não é dos ligeiros a carreira, nem dos fortes a peleja, nem tampouco dos sábios o pão, nem ainda dos prudentes a riqueza, nem dos entendidos o favor, mas que a oportunidade e a sorte ocorrem a todos.”

Eclesiastes – 9:11

RESUMO

A produção de material energético alternativo renovável representa hoje um dos grandes desafios para a pesquisa no Brasil e no mundo. O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) está entre as gramíneas de maior capacidade de produção de matéria seca, com características qualitativas favoráveis para a produção de energia. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a população de bactérias diazotróficas associada à cultura de capim elefante, com e sem inoculação. Para tal, foi utilizado o genótipo Cameroon, cinco estirpes de bactérias diazotróficas (*G. Diazotrophicus*, *Azospirillum brasilense*, *Enterobacter cloacae*, *G. Sacchari*, *Azospirillum brasilense*), previamente isoladas e identificadas, utilizadas como inoculante, dois tratamentos nitrogenados (25 e 50 kg N ha⁻¹) e uma testemunha absoluta. As amostras de parte aérea e raiz foram coletadas aos 30, 60, 90 e 120 dias após o plantio (DAP) em um ciclo de cultivo no período seco e outro no período chuvoso, e processado no laboratório. A população de bactérias diazotróficas foi quantificada pelo método de número mais provável (NMP) utilizando os meios JNFb, NFb, LGI, LGI-P e JMV semi-sólidos livres de N. A presença de bactérias diazotróficas colonizando as amostras vegetais foi evidenciada pela formação de película característica formada após 5 dias de incubação a 30°C, nos meios semi-sólidos utilizados. A população de bactérias diazotróficas variou de 10² a 10⁷ células por grama de tecido fresco. Em todas as coletas, a maior população foi observada na raiz. De maneira geral, aos 60 DAP do primeiro ciclo, o número e a diversidade de bactérias diminuiu, chegando a níveis não-detectáveis em alguns meios de cultivo. Aos 90 e 120 DAP do primeiro ciclo, início do florescimento das plantas, a população e a diversidade das bactérias diazotróficas aumentou nas raízes nos diferentes tratamentos. Durante o desenvolvimento da cultura no ciclo chuvoso houve um aumento da população em relação ao primeiro ciclo e o maior número de bactérias se deu nos tecidos radiculares. Neste processo foram obtidos 180 isolados bacterianos que estão armazenados para análises fisiológicas e identificação genéticas futuras.

Palavras-chave: FBN, diversidade bacteriana, *Pennisetum purpureum*, variação temporal.

ABSTRACT

The production of renewable alternative energy equipment today represents a major challenge for research in Brazil and worldwide. The elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) is among the grasses with a high production capacity of dry matter, production with favorable quality characteristics for the production of energy. The objective of this study was to evaluate the population of diazotrophic bacteria associated with culture of elephant grass, with and without inoculation. To this end, the genotype Cameroon and five strains Diazotrophic (*G. diazotrophicus*, *Azospirillum brasilense*, *Enterobacter cloacae*, *G. sacchari*, *Azospirillum brasilense*) previously isolated and identified were used as inoculants with two nitrogen treatments (25 and 50 kg was used N ha⁻¹) and an absolute control. Samples of shoot and root were collected at 30, 60, 90 and 120 days after planting (DAP) in a cycle of cultivation in the dry period and another in the rainy season, and processed in the laboratory. The population of diazotrophic bacteria was quantified by the most probable number method (MPN) using the means JNFb NFb, LGI, LGI-P and semisolid JMV free N. The presence of diazotrophic bacteria colonizing the plant samples was evidenced by the formation of the film formed after 5 days incubation at 30 °C in semi-solid media used. The population of diazotrophic bacteria ranged from 10² up to 10⁷ cells per gram of fresh tissue. In all samples, the largest population was observed in the root. Generally, the DAP 60 of the first cycle, the number and diversity of bacteria decreased, reaching undetectable levels in some culture media. At 90 and 120 DAP in the first cycle, the onset of flowering plants, the population and the diversity of diazotrophs in roots increased in different treatments. During the development of culture in the rainy cycle, there was an increase in population over the first cycle and the highest number of bacteria occurred in root tissue. In this process were obtained 180 bacterial isolates that are stored for future genetic and physiological analyzes identification.

Keywords: FBN, bacterial diversity, *Pennisetum purpureum*, temporal variation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 A Cultura do Capim Elefante	17
2.2 Energia da Biomassa e Culturas com Potencial Energético	20
2.3 Bactérias Diazotróficas associativas	21
2.4 Fixação Biológica de Nitrogênio	23
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo Geral	25
3.2 Objetivos Específicos	25
4. MATERIAS E MÉTODOS	26
4.1 Área Experimental e Implantação do Experimento	26
4.2 Avaliação da população de bactérias diazotróficas	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 Quantificação e Isolamento de Bactérias Diazotróficas Cultiváveis	30
6. CONCLUSÃO	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Tratamentos e Estirpes utilizadas no experimento **27**
- Tabela 2.** Contagem por NMP de bactérias diazotróficas presente nas amostras de Folha e Raiz de plantas de Capim-Elefante submetidas a cinco tratamentos de inoculação e não inoculado. Primeira Coleta aos 30 DAG. **31**
- Tabela 3.** Contagem por NMP de bactérias diazotróficas referente às amostras de Raiz de plantas de Capim-Elefante submetidas a cinco tratamentos de inoculação e três não inoculados. Segunda Coleta aos 60 DAG (dias após a germinação) **31**
- Tabela 4.** Contagem por NMP de bactérias diazotróficas referente às amostras de Folhas de plantas de Capim-Elefante submetidas a cinco tratamentos de inoculação e três não inoculados. Segunda Coleta aos 60 DAG (dias após a germinação) **32**
- Tabela 5.** Contagem por NMP de bactérias diazotróficas referente às amostras de Raiz de plantas de Capim-Elefante submetidas a cinco tratamentos de inoculação e três não inoculados. Terceira Coleta aos 90 DAG **33**
- Tabela 6.** Contagem por NMP de bactérias diazotróficas referente às amostras de Folhas de plantas de Capim-Elefante submetidas a cinco tratamentos de inoculação e três não inoculados. Terceira Coleta aos 90 DAG **31**
- Tabela 7.** Contagem por NMP de bactérias diazotróficas referente às amostras de Raiz de plantas de Capim-Elefante submetidas a cinco tratamentos de inoculação e três não inoculados. Segunda Coleta aos 120 DAG **35**
- Tabela 8.** Contagem por NMP de bactérias diazotróficas referente às amostras de Raiz de plantas de Capim-Elefante submetidas a cinco tratamentos de inoculação e três não inoculados. Segunda Coleta aos 120 DAG **32**
- Tabela 9.** Contagem por NMP de bactérias diazotróficas referente às amostras de Raiz de plantas de Capim-Elefante submetidas a cinco tratamentos de inoculação e três não inoculados. Primeira Coleta após rebrotamento em 24 de janeiro de 2013 (30 DAP) **37**
- Tabela 10.** Contagem por NMP de bactérias diazotróficas referente às amostras de Folha de plantas de Capim-Elefante submetidas a cinco tratamentos de inoculação e três não inoculados. Terceira Coleta após rebrotamento em 10 de abril de 2013 (90 DAP) **38**
- Tabela 11.** Contagem por NMP de bactérias diazotróficas referente às amostras de Raiz de plantas de Capim-Elefante submetidas a cinco tratamentos de inoculação e três não inoculados. Terceira Coleta após rebrotamento em 10 de abril de 2013 (90 DAP) **39**

Tabela 12. Contagem por NMP de bactérias diazotróficas referente às amostras de Folhas de plantas de Capim-Elefante submetidas a cinco tratamentos de inoculação e três não inoculados. Terceira Coleta após rebrotamento em 10 de abril de 2013 (90 DAP) **40**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Preparo dos tecidos vegetais para contagem pelo método do número mais provável (NMP). 27
- Figura 2.** Contagem Número mais provável (NMP) - Inoculação de amostras diluídas e formação de película 28
- Figura 3.** Ciclo de desenvolvimento das plantas de capim-elefante aos 30 dias após germinação (A), 60 DAG (B) e 90 DAG (C) e 120 DAG (D). – Período Seco 29
- Figura 4.** Ciclo de desenvolvimento das plantas de capim-elefante no período de novembro a abril de 2013 – Período das águas 30
- Figura 5.** Isolados das estirpes de cada amostragem obtida e estocada em meio batata sólido 38

1. INTRODUÇÃO

A biomassa tem sido desde a origem da humanidade, uma das mais importantes fontes de energia, seja para preparação dos alimentos, ou como fonte de calor e iluminação, ou até mesmo impulsionando o desenvolvimento industrial ao movimentar as primeiras máquinas a vapor. Muitos desses usos ainda prevalecem especialmente nos países mais pobres, porém, com o advento da utilização dos combustíveis fósseis, estas fontes foram sendo substituídas. Todo esse fenômeno tem ocorrido a expensas do desmatamento, intensificando fenômenos climáticos como o efeito estufa, por exemplo, e causando fortes pressões sobre as florestas. Além disso, diante do aquecimento global existe uma crescente procura por fontes alternativas de energia, que permitam reduzir significativamente o consumo de petróleo, principal causa de emissões de gases de efeito estufa (GEE). (Samson et al., 2005).

No Brasil, as florestas naturais ainda são fonte de madeira para a transformação em lenha usada em olarias, restaurantes, pizzarias e outros segmentos. Com a preocupação Global em reduzir os índices de desmatamento, alterando a matriz energética, a biomassa de capim elefante pode servir como alternativa.

O perfil energético do sistema industrial brasileiro está baseado em setores que exigem grandes consumos de energia com determinada qualidade. Entre esses setores, está o cerâmico, por exemplo, grande consumidor de energia térmica, hoje suprida basicamente pela combustão de fontes de energia primárias e secundárias, como, por exemplo, lenha, eletricidade, óleo combustível e gás natural. Segundo o Balanço Energético Nacional (BEN, 2009), cerca de 45% da oferta interna de energia se concentra no uso de energias renováveis, destas quase 32% no uso da biomassa vegetal.

Variedades de capim-elefante pesquisadas atingem anualmente até 40 toneladas de biomassa seca por hectare. Esse volume representa o dobro da produtividade do eucalipto cultivado em florestas de grupos empresariais que dependem de madeira para diferentes usos, principalmente, como fonte energética. O eucalipto depende de bom manejo e leva de seis a sete anos para crescer, enquanto o capim-elefante pode render duas colheitas por ano, produzindo o dobro de biomassa e sem necessidade de fertilizantes químicos. Além do que a utilização do capim elefante como combustível permitiria a destinação de madeiras de eucaliptos para fins mais nobres.

Os produtos da cana-de-açúcar contribuem com cerca de 13% da produção primária de energia do país. O Brasil é detentor do mais importante programa de geração renovável de energia do planeta com o uso da biomassa sucroalcooleira. O álcool carburante atende a cerca de 32% do consumo de energia de veículos leves. O Capim-elefante tem apresentado um potencial energético muito superior à cana-de-açúcar, por exemplo. Sua biomassa seca pode gerar 25 unidades de energia para cada unidade de origem fóssil consumida em sua produção. Por sua vez, a cana-de-açúcar, convertida em etanol, alcança uma relação de apenas nove para uma (Osava, 2007).

Muitos países, incluindo o Brasil, vêm buscando alternativas para o uso de combustível fóssil, devido principalmente a três motivos: a diminuição pela dependência de petróleo e derivados, pelo fato de serem fontes finitas; as preocupações com o meio ambiente; e o ganho econômico que os mesmos poderão ter, quer seja por produtos valorizados por não serem degradadores do meio ambiente, quer seja por créditos conseguidos por mecanismos de desenvolvimento limpo (MDL), previsto pelo Protocolo de Quioto (Kraxner et al., 2003; Quesada, 2005). Nesse contexto, há, pois, um renovado interesse dos países, na biomassa energética, apontada por uma participação maior na matriz de energia primária no futuro próximo (Samson et al., 2005). Nestas situações, o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) parece ser a ferramenta chave (Baldani et al., 1998), para garantir parte do nitrogênio necessário para o crescimento da planta.

Dos nutrientes considerados essenciais ao desenvolvimento destas plantas, o nitrogênio (N) é o que promove os maiores aumentos de produção de matéria seca (Vitor, 2006). O aporte de N aos solos pode ser por meio de decomposição de material orgânico, descarga elétrica, utilização de fertilizantes nitrogenados e fixação biológica de nitrogênio. Dentre estas possibilidades, a utilização de fertilizantes sintéticos é a prática mais empregada para reposição do N aos solos cultiváveis. Estes fertilizantes são demasiadamente dispendiosos, custando para a agricultura cerca de U\$\$ 45 bilhões anualmente (Ladha & Reddy, 2003). Além disso, inúmeros danos são gerados quando estes fertilizantes são aplicados. Cerca de 50% do nitrogênio aplicado é utilizado pelas plantas, o restante deste nutriente é perdido do sistema solo-planta contaminando recursos hídricos devido à mobilidade no solo através do fluxo de massa e grandes perdas por volatilização e desnitrificação (Stolzfus et al., 1997; Saikia & Jain, 2007) além de gerar prejuízos econômico. Sendo assim, processos biológicos de incorporação

de N ao sistema solo-planta, como a fixação biológica de nitrogênio (FBN) vêm sendo amplamente estudado para avaliar o potencial de sua utilização nos sistemas de produção agrícola (Reis et al.,2001; Brasil, 2005; Muthukumarasamy et al., 2007; Govindarajan et al., 2008).

A gramínea forrageira, capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), apresenta resultados promissores que indicam contribuições de N derivado da FBN, para os melhores genótipos, variam entre 30 e 45% ou equivalente a 55 a 130 kg N ha⁻¹ (Reis et al.,2001; Morais, 2008). A produção de biomassa variou entre 34 e 55 Mg ha⁻¹ano. Isto mostra a alta adaptação de plantas de capim-elefante a solos pobres em N-disponível e evidencia a alta contribuição da FBN neste sistema de produção. A importância deste processo na produção de biomassa é essencial, pois ao contribuir para a economia de N-fertilizante (economia de energia fóssil), o balanço energético positivo é favorecido diretamente, parâmetro este de grande importância em qualquer programa bioenergético (Samson et al., 2005).

O gênero *Pennisetum* compreende mais de 140 espécies (Brunken, 1977), sendo algumas de importância forrageira (*P. purpureum*, *P. clandestinum*, *P. unisetum*, *P. pedicellatum*), uma cerealífera e forrageira (*P. americanum*) e outras ornamentais (*P. villosum*, *P. setaceum*) (Kativu & Mithen, 1987). A espécie *P. purpureum* se reproduz predominantemente por cruzamento e apresenta elevado grau de protogenia, sendo também, facilmente propagada de forma assexuada, cujo mecanismo de reprodução vegetativa possibilita a seleção e fixação de características superiores existentes em um único genótipo, o qual poderá ser mantido através da clonagem (Pereira et al., 2001).

O capim elefante geralmente é altamente responsivo ao nitrogênio (Mistura et al., 2006) e os estudos com a planta até agora visaram somente o enriquecimento desta forrageira em proteína, através da adubação nitrogenada, para ganho de peso mais rápido de bovinos e maior aproveitamento dos mesmos. Nos últimos anos, foram desenvolvidas novas técnicas de uso de biomassa de capim elefante como fonte de energia alternativa, e neste sentido, novo rumo deve ser dado em relação às características que se deseja obter da planta (Urquiaga et al., 2006). Não mais importa uma planta rica em proteína para a alimentação de bovinos, e sim uma planta que seja rica em fibras e lignina, aliada a alta produção de biomassa.

Embora já se reconheça o potencial e a importância ecológica e econômica do Capim-elefante aos interesses mundiais, ainda são pouco expressivos estudos sobre a

associação de bactérias diazotróficas com plantas desta cultura. Grande parte dos estudos realizados até o momento apresentaram resultados pontuais. Diante disso, neste trabalho implantou-se um experimento, sob condições de campo, com o genótipo Cameroon, que foi, segundo Quesada (2005) e Morais(2008) o mais responsivo à FBN e ao acúmulo de biomassa. O objetivo geral é observar e identificar a variabilidade da população de bactérias diazotróficas durante todo o ciclo de desenvolvimento.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a variabilidade populacional de bactérias diazotróficas durante o desenvolvimento da cultura do capim elefante no período seco e chuvosos.

3.2 Objetivos Específicos

- Quantificar pela técnica de NMP, a população de bactérias diazotróficas presente nos tecidos de capim-elefante aos 30, 60, 90 e 120 dias após plantio nos períodos de seca e das águas;
- Avaliar a variabilidade da comunidade bacteriana nos diferentes estágios de desenvolvimento na parte aérea e raiz do capim-elefante no período seco;
- Avaliar a variabilidade da comunidade bacteriana nos diferentes estágios de desenvolvimento na parte aérea e raiz do capim-elefante no período chuvoso

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A Cultura do Capim Elefante

O capim elefante é uma monocotiledônea e como tal, apresenta o colmo como uma parte fibrosa, mais dura, que forma a casca e uma medula com feixes vasculares. Sua estrutura morfológica é bastante semelhante à do bagaço de cana-de-açúcar, representando a seguinte composição: 65% de fibras e 35% de material não fibroso e, segundo Kauter et al. (2006), a biomassa de plantas que apresentam teor de fibras acima de 30% já pode ser adaptadas para produção de energia. Quesada (2005) em experimentos conduzidos em solos de baixa fertilidade, obteve altas produtividades de biomassa com teores de fibras próximos de 55% e 50 % em colmos e folhas, respectivamente. Segundo Quesada (2005) esses percentuais são mais baixos que os de algumas plantas utilizadas para a mesma finalidade, como Eucalipto, por exemplo, mas quando inserida a produtividade e a quantidade de cortes por ano no contexto, o capim elefante leva grande vantagem, pois o Eucalipto leva sete anos para ser cortado, e o capim elefante, nesse manejo, pode ser cortado até 14 vezes (2 cortes/ano), superando substancialmente o Eucalipto em produtividade.

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), comumente conhecido como pasto elefante, napier, cameroon, mineiro, entre outros (Pereira, 1994), é uma das gramíneas mais importantes e mais difundidas em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo (Carvalho et al., 1994). Foi descoberta na África Tropical (atual Zimbábue), em 1905 e introduzida no Brasil em 1920 (Veiga, 1985), no Rio Grande do Sul, a partir de estacas procedentes de Cuba (Mozzer, 1993). Sua descrição original data de 1827 (Tcacenco e Botrel, 1997), sofrendo modificações ao longo do tempo. De acordo com a taxonomia atual, o capim-elefante pertence à classe Monocotiledônea, à família Poaceae, subfamília Panicoideae, tribo Paniceae, gênero *Pennisetum*, o qual compreende mais de 140 espécies, sendo algumas de importância forrageira (*P. purpureum*, *P. clandestinum*,

P. unisetum, *P. pedicellatum*), cerealífera (*P. americanum*) e ornamentais (*P. villosum* e *P. setaceum*) (Kativu e Mithen, 1987).

A espécie *Pennisetum purpureum* Schumack tem sido utilizada desde a década de 70 quase que exclusivamente como capineira para fornecimento de forragem verde em sistemas de produção de leite e carne, em decorrência do seu potencial produtivo e da sua qualidade (Almeida et al., 2004). Quando corretamente adubado e manejado (Corsi e Nussio, 1992), tem mostrado elevado rendimento de biomassa, chegando a produzir em média 30-40 Mg por hectare por ano (Pereira, 1993; Xavier et al., 1998), além disso, são de fácil multiplicação, alta rusticidade e apresentam resistência considerável à seca e ao frio. A partir das dificuldades que o uso da madeira com fins energéticos começou a apresentar no final dos anos 80, seja por questões ambientais ou concorrência de usos mais nobres, alternativas à madeira passaram a serem observadas mais cuidadosamente, e as características de alguns genótipos de *Pennisetum purpureum* despertaram o interesse de alguns grupos de pesquisa (Samson et al., 2005).

Diante das características desejáveis do capim elefante para uso energético, novos estudos vêm sendo desenvolvidos para aprimorar o uso da biomassa desta espécie como forma alternativa de energia, e neste sentido, um novo rumo deve ser dado em relação às características que se deseja obter da planta (Samson et al., 2005). Não mais interessa uma planta rica em proteína para a alimentação de bovinos, e sim a planta ideal para esta finalidade deve ser rica em fibras e lignina, de alta relação C:N, aliada a alta produção de biomassa associada à fixação biológica de nitrogênio (FBN), para que o produto que se queira produzir deste material seja de boa qualidade e com um mínimo consumo de energia fóssil (Morais, 2009; Samson et al., 2005; Quesada, 2005; Urquiaga et al., 2010; Lemus et al., 2002).

É importante salientar que em sistemas sustentáveis de produção de energia a minimização de insumos, tais como nitrogênio, fósforo e água torna-se essencial, pois influencia diretamente no balanço energético (Byrt et al., 2011). Dentro deste contexto, um dos desafios da pesquisa agropecuária para a implantação destes sistemas é o aumento ou manutenção do balanço energético, que pode ser favorecido pela minimização dos fertilizantes sintéticos e/ou utilização de fontes alternativas de incorporação de nutrientes ao sistema solo-planta, como os processos biológicos.

Em se tratando de fertilidade do solo adequado para o cultivo desta espécie, o capim elefante se adapta bem a diversos tipos de solos, contanto que tenham adequada

umidade e sejam bem drenados. Também é muito utilizado em áreas de pendentes elevadas, apresentando razoável eficiência no controle da erosão. Visto que se trata de uma forrageira com alto potencial de produção, suas necessidades de nutrientes são diretamente proporcionais aos seus rendimentos, por isso a importância do solo estar corrigido e adubado adequadamente. Outra característica importante do capim-elefante, no que diz respeito a possibilidade de seu uso na agroenergia como, por exemplo, para a produção de carvão vegetal, é a semelhança que o mesmo apresenta em relação ao bagaço de cana-de-açúcar, que tem em sua composição, 65% de fibras e 35% de material não fibroso, sendo o teor de fibras fundamental para a produção de carvão (Quesada, 2005).

Atualmente centenas de genótipos de capim-elefante são conhecidos na literatura. Apesar deste grande número de genótipos que se encontram disponíveis em coleções ou que são utilizadas por produtores, não existe uma lista mínima de descritores que permita a perfeita distinção entre as mesmas. Um fator que dificulta a determinação do número real de cultivares de capim-elefante é que muitas vezes uma mesma cultivar é introduzida em diversos locais sem que as identificações originais sejam mantidas (Carvalho et al., 1997).

Existem alguns genótipos de capim elefante de alto potencial para uso em agroenergia, dentre eles o Cameroon que foi introduzido no Brasil na década de 60 (Faria et al., 1970). Os estudos de adaptação, envolvendo o genótipo Cameroon em diversas regiões do Brasil, são relativamente escassos (Carvalho et al., 1997). Pesquisas voltadas à pecuária, conduzidas na região Sudeste por Alcântara et al. (1980), Gonzalez (1980), e Mozzer (1986), mostram existirem outras cultivares com maior desempenho forrageiro, principalmente no que diz respeito à produção de forragem.

Quesada (2005) avaliou a adaptação deste genótipo para uso energético em diferentes condições edafoclimáticas do país, e foi apresentado como um dos mais promissores genótipos para uso como fonte de energia alternativa. Os estudos de Moraes et al. (2009), demonstraram que o genótipo Cameroon é considerado um dos mais propícios para a agroenergia devido as suas características de produtividade e qualidade da biomassa produzida.

3.2 Energia da Biomassa e Culturas com Potencial Energético

Estudos estimam que, no ano de 2025, a população mundial possa atingir 8,4 bilhões de pessoas, estima-se que haverá uma alta demanda por alimentos, fibra, energia e água em quantidade e qualidade, fato que deverá se constituir no principal problema ambiental deste século (Resck et al., 2008). O uso da biomassa como fonte direta de energia acompanhou o desenvolvimento da espécie humana ao longo da sua história, tendo inclusive impulsionado os primeiros ciclos de industrialização. Com o advento dos combustíveis fósseis e suas possibilidades múltiplas de aplicações criou-se, a partir do final do Século XIX, um sistema tecnológico global eficiente e dinâmico baseado principalmente no petróleo, assumindo para si a função de agente energético promotor do desenvolvimento econômico e social. Assim, a energia extraída da biomassa se tornou sinônimo de pobreza e subdesenvolvimento, e suas explorações indiscriminadas, extrativistas e não planejada começou a refletir-se em custos ambientais altos como extração ilegal de madeira da floresta, e sob certos aspectos associados ao excessivo desmatamento natural (Morais, 2008) A existência de uma forte relação de energia e meio ambiente e com o modelo de desenvolvimento da humanidade tem resultado em um grande movimento em prol de uma revolucionária modificação deste modelo energético baseado no uso de combustíveis não renováveis (Alves Junior, 2003).

No Brasil o consumo de energéticos primários teve nas energias renováveis, no ano de 1998, uma participação de 55,77%. Sendo que 19,71% foram representados pela biomassa, que tem despertado maior interesse como alternativa aos combustíveis fósseis (Vale et al., 2000). Ao longo das últimas três décadas a lenha, como combustível doméstico, teve papel importante como energético primário no Brasil. Em 1998, dos 19,71% de biomassa, 9,06% foram compostos pela lenha, ou seja, $6,94 \times 10^7$ toneladas de madeira foram utilizadas para geração de calor. Do total da lenha consumida, $2,7 \times 10^7$ toneladas o foram em forma indireta, principalmente na fabricação de carvão vegetal, e $4,23 \times 10^7$ toneladas, em forma direta. Do total consumido em forma direta, $2,0 \times 10^7$ toneladas foram queimadas em residências, para cocção de alimentos (Vale et al., 2000). A principal fonte de madeira para produção de energia, no Brasil, tem sido os ecossistemas naturais, como o Cerrado e a Mata Atlântica. O desmatamento desses biomas e a pressão conservacionista, associadas à necessidade anual de mais madeira para energia, têm levado a crescente dificuldade para a obtenção desse recurso a partir de florestas nativas. É importante observar que não pesa somente o aspecto quantitativo

do uso da madeira como energia, mas também o aspecto econômico ligado à utilização energética pelas indústrias. Desta forma, o uso da biomassa moderna pode ser uma alternativa de fonte de energia nesses biomas (Flores, 2009).

Estudos apontam a possibilidade de introdução de gramíneas perenes em programas de produção de energia, intensificados a partir dos anos 80. Nos países desenvolvidos, de clima predominantemente temperado e com baixa incidência de radiação solar durante boa parte do ano, se percebe claramente a maior eficiência na captação da luz solar apresentada pelas plantas C-4. De início, a finalidade energética principal destas gramíneas consistiu na combustão direta em fornos, como substituto à lenha e ao carvão, muitas vezes passando por uma etapa de adensamento e estruturação em pellets, cubos ou briquetes. Samson et al. (2005) realizaram o balanço energético apenas para a etapa agrícola de produção do capim elefante, encontrando um valor de 21,3:1, ou seja, para cada unidade de energia fóssil utilizada no processo produtivo foram obtidas 21,3 unidades de energia renovável. Esta condição é válida se o material é utilizado in-natura, diretamente para combustão.

Neste novo cenário mundial de demanda de energia, o capim-elefante tem sido apontado como uma espécie de grande potencial energético devido a sua elevada produção de biomassa com baixo uso de insumos e investimentos (Morais et al., 2009). Sua biomassa seca pode gerar 25 unidades de energia para cada uma de origem fóssil consumida em sua produção. Por sua vez, a cana, convertida em etanol, alcança uma relação de apenas nove para uma (Osava, 2007). O interesse energético por essa cultura foi recentemente despertado por sua alta produtividade. A biomassa do capim elefante pode ser utilizada para queima direta, gaseificação e produção de carvão vegetal, com rendimentos de energia diferenciada para cada uso. Este capim, quando adequadamente cultivado pode produzir ao redor de 30 Mg de MS ha⁻¹ ano⁻¹ (Morais, 2008; Quesada, 2005).

3.3 Bactérias Diazotróficas associativas

Bactérias constituem um grupo de micro-organismos de ocorrência cosmopolita, possuem importância indiscutível na sustentabilidade da biosfera e têm papel preponderante nos ciclos biogeoquímicos. As espécies bacterianas existentes estão presentes em todos os ambientes terrestres, ocupando e colonizando todos os nichos possíveis, incluindo a superfície e interior de plantas, água doce e salgada, interior de

rochas e geleiras.

Em particular, as plantas constituem um perfeito ecossistema microbiano. Nas plantas hospedeiras os microrganismos são capazes de colonizar a superfície das raízes (rizoplano) e folhas (filoplano) ou o interior de diversos tecidos das plantas endofíticas. Entre as bactérias associadas a espécies vegetais as bactérias fixadoras de nitrogênio são consideradas como um dos grupos mais importantes na agricultura tropical pela sua associação com plantas leguminosas ou não. Embora a simbiose rizóbio-leguminosa seja a associação mais estudada, apresentando as maiores contribuições da FBN (Straliotto Rumjanek, 1999), algumas plantas da família *Poáceae* tem mostrado potencial significativo na FBN (Videira, 2007).

Sabe-se hoje que uma grande quantidade de bactérias diazotróficas ocupa nichos distintos em diferentes plantas da família *Poaceae*, sendo essas classificadas como de vida livre e endofíticas. As bactérias de vida livre são encontradas no solo e vivem harmonicamente com as plantas, utilizando para a sua nutrição os exudados de suas raízes. Nesta associação não ocorre, aparentemente, a formação de uma estrutura especializada para a fixação do nitrogênio (como o nódulo, por exemplo). Os produtos da fotossíntese são liberados pela planta, sendo absorvidos pelas bactérias que habitam a rizosfera, e estas, por sua vez, fixam nitrogênio para seu metabolismo e liberam, após a morte da células, o NH_4^+ para as plantas. Dentro deste grupo de bactérias encontram-se os gêneros *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azotobacter*, dentre outras. Atualmente se considera que o tipo de relação de bactérias diazotróficas com plantas da família *poacea* pode ser mais restrita, necessitando do vegetal para completar o seu ciclo de vida e manter-se viável no ambiente. Bactérias que fazem associações internas foram denominadas como endofíticas, sendo capazes de colonizar o interior dos tecidos vegetais sem causar nenhum tipo de sintoma de patogenicidade, promovendo o crescimento da planta hospedeira (Kloepper, et al, 1997). Bactérias como *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Azoarcus* podem ser classificadas como bactérias diazotróficas endofíticas (Videira, 2007).

A fixação biológica de nitrogênio foi inicialmente descrita em plantas leguminosas e, posteriormente, as interações simbióticas entre organismos fixadores de nitrogênio associativas da rizosfera e do rizoplano de uma grande variedade de plantas não leguminosas também foram descritas (Döbereiner, 1992). De fato, os resultados mostram que as maiores contribuições de nitrogênio via FBN têm sido detectadas em

plantas leguminosas. No entanto, evidências de significativas de FBN em poáceas (*Gramineae*) de importância econômica, como cana-de-açúcar, arroz, milho, trigo, sorgo, *Brachiaria* sp, entre outras despertaram grandes interesses nos estudos de fixação de nitrogênio em plantas não leguminosas (Baldani e Baldani, 2005; Reis et al., 2006). Desde então, um grande número de gêneros/espécies de bactérias capazes de contribuir significativamente com N para seus hospedeiros têm sido identificadas incluindo *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Sphingomonas*, *Xanthobacter*, entre outros (Barriuso e Solano, 2008; Roy et al., 2010; Saharan e Nehra, 2011).

3.4 Fixação Biológica de Nitrogênio

Como a fotossíntese – processo realizado pelas plantas para a produção da energia necessária para a sua sobrevivência –, a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é considerada um dos processos biológicos mais importantes. Esse é um processo no qual alguns gêneros de bactérias, que possuem a enzima nitrogenase, captam o nitrogênio presente no ar, tornando-o assimilável pelos vegetais. Trata-se de uma verdadeira fábrica biológica, capaz de suprir as necessidades das plantas. Dessa forma, a adubação nitrogenada pode ser substituída parcial ou totalmente. (Videira, 2012).

Apesar de extremamente abundante na atmosfera (aproximadamente 80%), essencialmente na combinação molecular N_2 , o nitrogênio é um dos principais problemas para a produtividade agrícola. Isto acontece porque as plantas apenas conseguem observar o nitrogênio sob a forma de íons de amônio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), cuja existência é escassa. Desta forma, o aporte do nitrogênio aos solos torna-se necessário e ocorre através de processos como a fixação atmosférica, por descargas elétricas, fixação industrial, pelo processo Haber-Bosch, mineralização da matéria orgânica e a fixação biológica (Carvalho, 2002).

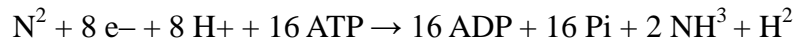
Nos países de clima tropical, as plantas são mais dependentes do emprego de fertilizante nitrogenados, devido à grande quantidade de chuvas e à rápida

decomposição da matéria orgânica pelas elevadas temperaturas. Este fato acarreta na utilização de quantidades superiores às necessárias para suprir a demanda dos vegetais. De maneira geral, a eficiência de uso destes fertilizantes é baixa. Alguns trabalhos mostram que cerca da metade do adubo nitrogenado aplicado anualmente nos campos é perdida por mecanismos como a lixiviação de nitrato, escoamento superficial, erosão e perdas gasosas de desnitrificação e volatilização da amônia (Follett e Follett, 2001; Sala et al., 2007; Saikia e Jain, 2007). O excesso de nitrogênio nos ambientes tem causado diversos danos ambientais, tais como: acúmulo de NO^3 nas águas de rios, lagos e aquíferos subterrâneos, podendo atingir níveis tóxicos aos peixes e ao homem, a oxidação da uréia e do amônio a nitrato, que levam a acidificação do solo; eutrofização de corpos d'água, consequência da elevada concentração de nutrientes; aumento de chuvas ácidas; produção de NO e N_2O redução do NO^{3-} pela ação de microrganismos do solo, decorrentes da transformação do N fertilizante, que contribuem para a degradação da camada de ozônio e para o aquecimento global, entre outros (Saikia e Jain, 2007). Para minimizar os impactos gerados pelos fertilizantes nitrogenados, novas abordagens vêm ganhando espaço nos sistemas de produção agrícola como o uso mais eficiente dos fertilizantes aplicados ou a substituição, parcial ou total, por processos biológicos como a fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Govindarajan et al., 2008).

A descoberta da FBN foi atribuída aos cientistas alemães Hellriegel e Wilfarth em 1886, que reportaram que as leguminosas apresentavam nódulos radiculares capazes de usar o nitrogênio molecular. Em 1888, Martinus Beijerinck comprovou que a fixação de nitrogênio observada em plantas leguminosas estava associada a bactérias presente no interior destes tecidos. Este pesquisador isolou uma estirpe do interior dos nódulos, denominado-a *Rhizobium* (*rhiza* = root; *bios* = life). A partir de então, considerando a importância da forma orgânica do nitrogênio, o estudo do processo de FBN recebeu grande atenção mundial. Juntamente com a decomposição da matéria orgânica, e atrás apenas da fotossíntese, a FBN é considerada um dos mais importantes processos biológicos do planeta.

Este processo é realizado por microrganismos procariotos denominados fixadores de nitrogênio ou diazotróficos. Estes organismos, através do complexo proteico da nitrogenase, são capazes de reduzir o nitrogênio molecular ($\text{N}\equiv\text{N}$) à amônia (NH_3) em condições normais de temperatura e pressão. Esta reação, embora termodinamicamente favorável, não ocorre espontaneamente, visto que os dois átomos

de nitrogênio encontram-se unidos por uma tripla ligação altamente estável. Do ponto de vista energético, esse processo é bastante dispendioso para os microrganismos que o realizam. De acordo com Simpson e Burris (1984), em condições ótimas, a estequiometria global da reação é:



A reação de incorporação do nitrogênio pelas bactérias diazotróficas é catalisada pelo complexo enzimático da nitrogenase (Sur et al., 2010). A forma mais comum desta enzima, denominada nitrogenase de molibdênio ou nitrogenase convencional (FeMo), consiste de uma ferro-proteína (Fe-proteína) e de uma molibdênio-ferro-proteína (MoFe-proteína) (Sur et al., 2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área Experimental e Implantação do Experimento

O experimento foi implantado no Campo Experimental da Embrapa Agrobiologia, localizado no Município de Seropédica, RJ (coordenadas geográficas 22° 46' de latitude Sul e 43° 41' de longitude Oeste), em um solo classificado como Planossolo. O preparo do solo consistiu de aração, seguida de gradagem e sulcação. Foi aplicado PO₄, na forma de super simples e K₂O, na forma de KCl no fundo do suco de plantio de acordo com os resultados da análise de solo. As parcelas não foram adubadas com N fertilizante nitrogenado.

Foi utilizada a cultivar de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach) Cameroon, selecionada previamente, com base na eficiência de produção de biomassa e contribuição do sistema de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Morais et al., 2011). Os tratamentos consistiram de: inoculação com 5 estirpes de bactérias diazotróficas (Tabela 1): Tratamento 1 referente a inoculação da estirpe *Gluconacetobacter diazotrophicus*; Tratamento 2 referente a inoculação da estirpe *Azospirillum brasilense*; Tratamento 3 referente à inoculação da estirpe *Enterobacter cloacae*; Tratamento 4 referente à inoculação de *Gluconacetobacter sacchar*; Tratamento 5 referente à inoculação de *Azospirillum brasilense*, previamente isoladas desta cultura, dois tratamentos (6 e 7) nitrogenados (25 e 50 kg N ha⁻¹ respectivamente) e um controle absoluto (não adubado e não inoculado). O delineamento experimental foi em blocos casualizados com quatro repetições. As parcelas foram constituídas de 4 linhas com 5 m de comprimento, com espaçamento de 1,00 m, totalizando 20 m² por parcela.

Tabela 1. Tratamentos e Estirpes utilizadas no experimento

Tratamento	Id	16S rRNA	Origem	Nase	AIA	PO-4
LP343	T1	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Folha/CNPGL	+++	++	+
JN73	T2	<i>Azospirillum brasilense</i>	Colmo.apical/ Cameroon	+++	+	-
JM235	T3	<i>Enterobacter cloacae</i>	Raiz/Cameroon	+	+++	-
LG49	T4	<i>G. sacchari</i>	Folha/Cameroon	+	++	++
J246	T5	<i>A. brasilense</i>	Raiz/Cameroon	+++	+	-
25Kg N.ha	T6					
50Kg N.ha	T7					
Testemunha	T8					

Id: identificação dos tratamentos;

Os colmos foram cortados, selecionados e utilizados como material propagativo de duas gemas. A inoculação dos toletes foi realizada, separadamente, através da imersão dos toletes em uma solução bacteriana durante 1 hora. Posteriormente, os toletes foram retirados da solução e plantados numa densidade de 6 gemas por metro linear.

Aos 30, 60, 90 e 120 dias após germinação (DAG), uma planta de cada parcela foi colhida e uma amostra composta de cada tratamento foi feita para as análises de contagem da população de bactérias diazotróficas (Figura 1).



Figura 1. Esquema de preparo dos tecidos vegetais para contagem pelo método do número mais provável (NMP).

4.2 Avaliação da população de bactérias diazotróficas

O método utilizado para a contagem de bactérias diazotróficas foi o Número Mais Provável (NMP), conforme descrito por Döbereiner et al. (1995) (Figuras 1 e 2). As plantas foram desinfestadas superficialmente com álcool 70% e posteriormente lavadas com água destilada. Dez gramas do material vegetal foram triturados com 90 ml de solução salina. Em seguida, foram feitas diluições seriadas em solução salina (10^{-2} a 10^{-7}) e a inoculação de 0,1ml de cada diluição em frascos contendo 5 ml dos meios de cultura semi-sólidos NFb, LGI, JNFb, LGI e LGI-P, conforme descrito por Döbereiner et al. (1995). Foram utilizados três frascos por diluição, os quais foram incubados a 30 °C por cinco dias, avaliando-se,

posteriormente, a presença ou ausência de película característica nos meios de cultivo (Figura 2). A tabela de McCrady (Dobereiner et al., 1995) foi utilizada para determinar o número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas por grama de tecido fresco. As culturas que apresentaram o crescimento na forma de película característica foram utilizadas no isolamento e purificação das bactérias diazotróficas (Döbereiner et al., 1995).



Figura 2. Contagem NMP – Inoculação de amostras diluídas e formação de película após 5 dias de incubação a 30°C

Como o melhor período de desenvolvimento da cultura em estudo é o das águas, as plantas do campo foram cortadas e um novo ciclo foi iniciado (Novembro a Abril de 2013). Foram realizadas as mesmas análises de tecido vegetal descrito para o cultivo no período seco, sendo as bactérias quantificadas pelo método de NMP. Detectou-se diferenças quantitativas e qualitativas na comunidade de bactérias diazotróficas quando comparados os períodos seco e das águas, bem como sua contribuição para o desenvolvimento das plantas de capim-elefante.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Quantificação e Isolamento de Bactérias Diazotróficas Cultiváveis

A presença de bactérias diazotróficas colonizando amostras de folha, colmo e raiz de capim-elefante foi evidenciada pela formação de película característica em todos os cinco meios semi- sólidos inoculados com amostras vegetais. A população natural de bactérias diazotróficas variou de 10^2 a 10^7 células por grama de tecido fresco. Os resultados mostraram que a população de bactérias diazotróficas variou em função do meio de cultivo, parte da planta e dias após o plantio. Em geral, a maior população foi obtida na raiz. Observou-se maior população no meio JMV. O experimento foi realizado em dois ciclos, um no período seco, com baixos índices de precipitação e temperaturas mais baixas e outro ciclo no período das águas onde os índices de precipitação aumentaram e a temperatura também.

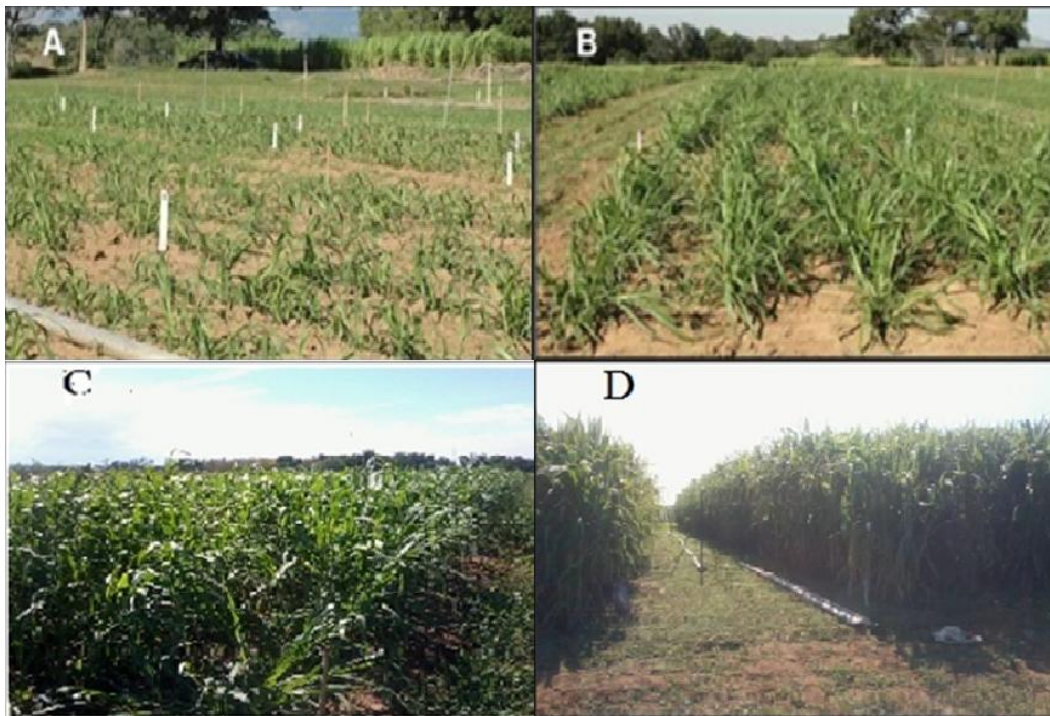


Figura 3. Ciclo de desenvolvimento das plantas de capim-elefante aos 30 dias após germinação (A), 60 DAG (B) e 90 DAG (C) e 120 DAG (D). – Período Seco



Figura 4. Ciclo de desenvolvimento das plantas de capim-elefante no período de novembro a abril de 2013 – Período das águas

A primeira coleta foi realizada aos 30 dias após a germinação (Tabela 2), nesta ocasião as plantas ainda se encontravam bastante tenras e pouco desenvolvidas e por esse motivo não houve separação entre os tecidos da parte aérea e raiz para que a população de bactérias pudesse ser melhor observada. Nesta coleta foi possível observar que o meio JMV, semi seletivo para o gênero *Burkholderia*, apresentou a maior população de bactérias

Tabela 2. Contagem por NMP de bactérias diazotróficas presente nas amostras de Folha e Raiz de plantas de Capim-Elefante submetidas a cinco tratamentos de inoculação e a testemunha (TN). Primeira Coleta aos 30 DAG.

TRATAMENTOS	RAÍZ e PARTE AÉREA (log ₁₀ .graiz ⁻¹)				
	JMV	NFB	LGI-P	LGI	JNFB
T1	6,40	5,95	6,40	5,60	6,18
T2	7,65	5,85	5,85	5,95	5,60
T3	8,04	6,65	5,85	6,18	6,88
T4	7,40	6,40	6,48	5,60	5,85
T5	8,04	6,18	6,98	6,18	6,98
TN*	8,04	5,60	≥ 2,00	≥ 2,00	5,60

População expressa em nº de células/grama de massa fresca. T1= Tratamento 1 referente à inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, T2= Tratamento 2 referente à inoculação de *Azospirillum brasilense*, T3= Tratamento 3 referente à inoculação de *Enterobacter cloacae*, T4= Tratamento 4 referente à inoculação de *Gluconacetobacter sacchari*, T5= Tratamento 5 referente à inoculação de *Azospirillum brasilense*, TN= Referentes aos tratamentos 6, 7 e 8 não inoculado.

Aos 60 dias após a germinação, o número e a diversidade de bactérias diminuiu drasticamente (Tabela 3 e 4), chegando a níveis não detectáveis em alguns meios de cultivo. Aos 45 dias após a germinação, foi aplicado uma dose de 10kg N/ha, na forma de sulfato de amônio, em todos os tratamentos inoculados e as doses de 25 kg N/ha e 50 kg N/ha para os tratamentos nitrogenados específicos. Desta forma, é possível que a população de alguns grupos de diazotróficos, aos 60 DAG, tenha sido influenciada negativamente pela adição de nitrogênio ao solo. Tem sido relatado que a adubação nitrogenada aumenta o número de bactérias heterotróficas que colonizam a rizosfera de plantas de poáceas (Kolb e Martin, 1998), o que sugere que o decréscimo no número de diazotróficos pode ter sido causado por competição entre bactérias diazotróficas e heterotróficas. Além da adição de N, é provável que as baixas temperaturas e a pouca precipitação do período também possa ter influenciado a população de diazotróficos na raiz e na parte aérea. Estes fatores bióticos influenciam diretamente a taxa de crescimento das plantas e conseqüentemente diminuem a taxa de absorção de nutrientes, influenciando negativamente a quantidade e qualidade dos fotoassimilados transferidos até a raiz. Tem sido sugerido por alguns autores que a variação no número de diazotróficos presentes associados, principalmente, às raízes, seja governada pela disponibilidade de fontes de carbono fornecida através da exsudação radicular (Bredemier e Mundstock, 2000).

Tabela 3. Contagem por NMP de bactérias diazotróficas referente às amostras de Raiz de plantas de Capim-Elefante submetidas a cinco tratamentos de inoculação e três não inoculados. Segunda Coleta aos 60 DAG (dias após a germinação).

TRATAMENTOS	RAÍZ (log ₁₀ .graiz ⁻¹)				
	JMV	NFB	LGI-P	LGI	JNFB
T1	≤ 2,00	8,15	6,30	6,40	≤ 2,00
T2	6,40	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00
T3	7,06	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00
T4	8,04	5,95	5,95	≤ 2,00	≤ 2,00
T5	7,65	≤ 2,00	6,18	5,95	≤ 2,00
T6	6,60	≤ 2,00	5,60	5,60	≤ 2,00
T7	6,65	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00
T8	8,15	5,60	≤ 2,00	5,95	≤ 2,00

População expressa em nº de células/grama de massa fresca. T1= Tratamento 1 referente à inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, T2= Tratamento 2 referente à inoculação de *Azospirillum brasilense*, T3= Tratamento 3 referente à inoculação de

Enterobacter cloacae, T4= Tratamento 4 referente à inoculação de *Gluconacetobacter sacchari*, T5= Tratamento 5 referente à inoculação de *Azospirillum brasilense*, T6,T7 e T8= Referentes aos tratamentos não inoculados.

Tabela 4. Contagem por NMP de bactérias diazotróficas referente às amostras de Parte aérea de plantas de Capim-Elefante submetidas a cinco tratamentos de inoculação e três não inoculados. Segunda Coleta aos 60 DAG (dias após a germinação).

TRATAMENTOS	PARTE AÉREA (log ₁₀ .graiz ⁻¹)				
	JMV	NFB	LGI-P	LGI	JNFB
T1	5,60	≤ 2,00	4,60	≤ 2,00	≤ 2,00
T2	4,60	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00
T3	5,40	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00
T4	5,65	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00	6,48
T5	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00
T6	5,88	≤ 2,00	4,48	≤ 2,00	≤ 2,00
T7	6,20	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00
T8	6,20	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00

População expressa em nº de células/grama de massa fresca. T1= Tratamento 1 referente à inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, T2= Tratamento 2 referente à inoculação de *Azospirillum brasilense*, T3= Tratamento 3 referente à inoculação de *Enterobacter cloacae*, T4= Tratamento 4 referente à inoculação de *Gluconacetobacter sacchari*, T5= Tratamento 5 referente à inoculação de *Azospirillum brasilense*, T6,T7 e T8= Referentes aos tratamentos não inoculados.

Aos 90 e 120 DAG, a população e a diversidade de diazotróficos tendeu a aumentar nos diferentes tratamentos. Este comportamento é mais bem observado para os diazotróficos presentes nas raízes (Tabela 5 e 7). Interessantemente, neste período iniciou-se o estágio de florescimento das plantas de capim-elefante. Utilizando a técnica de NMP, outros autores verificaram um comportamento semelhante ao observado neste estudo. Estes constataram que o número de bactérias diazotróficas presente nos tecidos de diferentes poáceas é maior nas raízes, quando comparado a parte aérea, sendo no período do florescimento os maiores números populacionais destes organismos (Sabino, 2007; Rodrigues et al., 2006). Existem relatos de que no estágio do florescimento, devido a grande necessidade de acúmulo de nitrogênio para utilização nos estágios subsequentes, seja o período de maior contribuição das bactérias diazotróficas. Para as plantas de capim-elefante, esta hipótese ainda precisa ser testada com futuras avaliações experimentais. De maneira geral, a população de bactérias detectada pela formação de película no meio JMV não sofreu tanta influencia da época de amostragem, dos fatores bióticos e abióticos.

Tabela 5. Contagem por NMP de bactérias diazotróficas referente às amostras de Raiz de plantas de Capim-Elefante submetidas a cinco tratamentos de inoculação e três não inoculados. Terceira Coleta aos 90 DAG

TRATAMENTOS	RAÍZ (log ₁₀ .graiz ⁻¹)				
	JMV	NFB	LGI-P	LGI	JNFB
T1	8,15	5,60	6,48	6,78	8,04
T2	8,15	5,60	≤ 2,00	5,60	6,78
T3	8,04	≤ 2,00	≤ 2,00	5,95	6,18
T4	8,04	5,60	≤ 2,00	≤ 2,00	6,40
T5	8,15	6,40	6,20	6,40	6,18
T6	7,65	≤ 2,00	≤ 2,00	5,60	5,60
T7	7,65	5,60	≤ 2,00	5,85	5,60
T8	8,04	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00

População expressa em n° de células/grama de massa fresca. T1= Tratamento 1 referente à inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, T2= Tratamento 2 referente à inoculação de *Azospirillum brasilense*, T3= Tratamento 3 referente à inoculação de *Enterobacter cloacae*, T4= Tratamento 4 referente à inoculação de *Gluconacetobacter sacchari*, T5= Tratamento 5 referente à inoculação de *Azospirillum brasilense*, T6,T7 e T8= Referentes aos tratamentos não inoculados.

Tabela 6. Contagem por NMP de bactérias diazotróficas referente às amostras de Folha de plantas de Capim-Elefante submetidas a cinco tratamentos de inoculação e três não inoculados. Terceira Coleta aos 90 DAG

TRATAMENTOS	PARTE AÉREA (log ₁₀ .graiz ⁻¹)				
	JMV	NFB	LGI-P	LGI	JNFB
T1	5,18	3,85	3,85	≤ 2,00	≤ 2,00
T2	4,30	3,60	≤ 2,00	≤ 2,00	3,95
T3	5,30	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00
T4	5,40	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00
T5	4,98	3,95	3,85	3,95	3,95
T6	5,65	3,60	3,60	≤ 2,00	≤ 2,00
T7	5,40	3,95	4,18	3,60	4,18
T8	4,65	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00

População expressa em n° de células/grama de massa fresca. T1= Tratamento 1 referente à inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, T2= Tratamento 2 referente à inoculação de *Azospirillum brasilense*, T3= Tratamento 3 referente à inoculação de *Enterobacter cloacae*, T4= Tratamento 4 referente à inoculação de *Gluconacetobacter sacchari*, T5= Tratamento 5 referente à inoculação de *Azospirillum brasilense*, T6, T7 e T8= Referentes aos tratamentos não inoculados.

Tabela 7. Contagem por NMP de bactérias diazotróficas referente às amostras de Raiz de plantas de Capim-Elefante submetidas a cinco tratamentos de inoculação e três não inoculados. Segunda Coleta aos 120 DAG

TRATAMENTOS	RAÍZ (log ₁₀ .graiz ⁻¹)				
	JMV	NFB	LGI-P	LGI	JNFB
T1	5,60	5,60	≤ 2,00	5,60	5,60
T2	5,85	≤ 2,00	≤ 2,00	5,95	≤ 2,00
T3	≤ 2,00	5,85	6,18	5,85	7,65
T4	5,60	≤ 2,00	5,85	≤ 2,00	6,65
T5	7,48	≤ 2,00	6,48	7,48	8,04
T6	6,04	6,48	5,60	6,54	7,65
T7	5,60	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00	6,65
T8	5,60	≤ 2,00	5,85	≤ 2,00	5,60

População expressa em n° de células/grama de massa fresca. T1= Tratamento 1 referente à inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, T2= Tratamento 2 referente à inoculação de *Azospirillum brasilense*, T3= Tratamento 3 referente à inoculação de *Enterobacter cloacae*, T4= Tratamento 4 referente à inoculação de *Gluconacetobacter sacchari*, T5= Tratamento 5 referente à inoculação de *Azospirillum brasilense*, T6,T7 e T8= Referentes aos tratamentos não inoculados.

Tabela 8. Contagem por NMP de bactérias diazotróficas referente às amostras de Folhas de plantas de Capim-Elefante submetidas a cinco tratamentos de inoculação e três não inoculados. Segunda Coleta aos 120 DAG

TRATAMENTOS	PARTE AÉREA (log ₁₀ .graiz ⁻¹)				
	JMV	NFB	LGI-P	LGI	JNFB
T1	4,04	3,85	≤ 2,00	≤ 2,00	4,88
T2	4,18	6,04	≤ 2,00	4,18	4,40
T3	≤ 2,00	3,85	≤ 2,00	4,18	3,85
T4	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00	3,48
T5	3,60	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00	3,85
T6	4,48	5,30	3,48	4,98	5,48
T7	3,60	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00	3,85
T8	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00	4,04

População expressa em n° de células/grama de massa fresca. T1= Tratamento 1 referente à inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, T2= Tratamento 2 referente à inoculação de *Azospirillum brasilense*, T3= Tratamento 3 referente à inoculação de *Enterobacter cloacae*, T4= Tratamento 4 referente à inoculação de *Gluconacetobacter sacchari*, T5= Tratamento 5 referente à inoculação de *Azospirillum brasilense*, T6,T7 e T8= Referentes aos tratamentos não inoculados.

Um novo ciclo foi iniciado no período das águas (Novembro a Abril de 2013). Foram realizadas as mesmas análises de tecido vegetal descrito para o cultivo no período seco, sendo as bactérias quantificadas pelo método de NMP. As tabelas 9 e 10, apresentam os resultados da contagem aos 60 dias após a germinação no segundo ciclo de desenvolvimento do capim elefante pela técnica NMP. É possível observar um número superior de bactérias diazotróficas colonizando as raízes em comparação a parte aérea, o que já era previsto. O meio JMV continuou apresentando maior taxa de formação de película característica da fixação de nitrogênio quando comparado aos demais meios utilizado. Em relação ao período seco, notou-se um aumento da população de bactérias diazotróficas, o que pode ser justificado pelas condições climáticas que favoreceram o melhor desenvolvimento das plantas e a interação planta-bactéria.

Tabela 9. Contagem por NMP de bactérias diazotróficas referente às amostras de raiz de plantas de Capim-Elefante submetidas a cinco tratamentos de inoculação e três não inoculados. Primeira Coleta após rebrotamento em 24 de janeiro de 2013 (60 DAP)

TRATAMENTOS	RAÍZ (log ₁₀ .graiz ⁻¹)				
	JMV	NFB	LGI-P	LGI	JNFB
T1	3,95	4,40	5,65	≤ 2,00	4,48
T2	5,60	3,60	5,98	≤ 2,00	4,48
T3	8,40	4,40	3,60	4,48	3,95
T4	6,48	6,48	5,18	3,60	3,60
T5	8,15	8,15	8,15	7,65	8,15
T6	3,95	3,85	5,30	4,40	4,48
T7	≤ 2,00	≤ 2,00	3,60	≤ 2,00	≤ 2,00
T8	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00	3,95

População expressa em n° de células/grama de massa fresca. T1= Tratamento 1 referente à inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, T2= Tratamento 2 referente à inoculação de *Azospirillum brasilense*, T3= Tratamento 3 referente à inoculação de *Enterobacter cloacae*, T4= Tratamento 4 referente à inoculação de *Gluconacetobacter sacchari*, T5= Tratamento 5 referente à inoculação de *Azospirillum brasilense*, T6, T7 e T8= Referentes aos tratamentos não inoculados.

Tabela 10. Contagem por NMP de bactérias diazotróficas referente às amostras de Folha de plantas de Capim-Elefante submetidas a cinco tratamentos de inoculação e três não inoculados. Terceira Coleta após rebrotamento em 10 de abril de 2013 (90 DAP)

TRATAMENTOS	PARTE AÉREA (log ₁₀ .graiz ⁻¹)				
	JMV	NFB	LGI-P	LGI	JNFB
T1	≤ 2,00	5,60	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00
T2	≤ 2,00	5,95	≤ 2,00	≤ 2,00	5,60
T3	≤ 2,00	≤ 2,00	5,60	5,60	5,60
T4	≤ 2,00	7,78		5,60	6,85
T5	6,48	6,48	6,40	≤ 2,00	≤ 2,00
T6	7,60	≤ 2,00	5,95	5,60	6,40
T7	≤ 2,00	5,60	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00
T8	≤ 2,00	5,60	≤ 2,00	5,60	≤ 2,00

População expressa em nº de células/grama de massa fresca. T1= Tratamento 1 referente à inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, T2= Tratamento 2 referente à inoculação de *Azospirillum brasilense*, T3= Tratamento 3 referente à inoculação de *Enterobacter cloacae*, T4= Tratamento 4 referente à inoculação de *Gluconacetobacter sacchari*, T5= Tratamento 5 referente à inoculação de *Azospirillum brasilense*, T6,T7 e T8= Referentes aos tratamentos não inoculados.

A última coleta foi realizada aos 120 dias após a germinação (Tabelas 11 e 12) apresentando uma população de bactérias superior a contagem realizada no período seco. As condições climáticas de umidade, temperatura e precipitação podem ter sido responsáveis pelo melhor desenvolvimeto da comunidade bacteriana o que justifica o aumento da população quando comparado ao período seco. Os tecidos radiculares, como nas outras coletas, apresentaram um número maior de bactérias quando comparado aos tecidos de parte aérea e isso se explica pela maior superfície de contato com a biota do solo favorecendo a associação das bactérias como vegetal. Nesta última coleta foi possível perceber um maior equilíbrio dos gêneros bacterianos que estão associados a planta, os meios semi-sólidos semi seletivos para gêneros distintos apresentaram película característica da fixação biológica de nitrogênio de forma homogênea, ou seja, os diferentes gêneros bacterianos conseguiram se desenvolver de maneira mais equilibrada.

Tabela 11. Contagem por NMP de bactérias diazotróficas referente às amostras de Raiz de plantas de Capim-Elefante submetidas a cinco tratamentos de inoculação e três não inoculados. Terceira Coleta após rebrotamento em 10 de abril de 2013 (120 DAP)

TRATAMENTOS	RAÍZ (log ₁₀ .graiz ⁻¹)				
	JMV	NFB	LGI-P	LGI	JNFB
T1	6,88	5,60	6,85	6,40	7,48
T2	7,40	6,48	6,85	6,30	7,40
T3	7,98	6,40	6,85	6,48	7,98
T4	6,40	6,85	7,18	6,40	7,98
T5	7,65	7,65	6,78	6,30	7,18
T6	5,95	6,85	7,30	6,18	5,60
T7	5,60	5,60	6,85	7,18	7,04
T8	≤ 2,00	5,60	7,30	7,65	5,60

População expressa em nº de células/grama de massa fresca. T1= Tratamento 1 referente à inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, T2= Tratamento 2 referente à inoculação de *Azospirillum brasilense*, T3= Tratamento 3 referente à inoculação de *Enterobacter cloacae*, T4= Tratamento 4 referente à inoculação de *Gluconacetobacter sacchari*, T5= Tratamento 5 referente à inoculação de *Azospirillum brasilense*, T6,T7 e T8= Referentes aos tratamentos não inoculados.

Tabela 12. Contagem por NMP de bactérias diazotróficas referente às amostras de Folhas de plantas de Capim-Elefante submetidas a cinco tratamentos de inoculação e três não inoculados. Terceira Coleta após rebrotamento em 10 de abril de 2013 (120 DAP)

TRATAMENTOS	PARTE AÉREA (log ₁₀ .graiz ⁻¹)				
	JMV	NFB	LGI-P	LGI	JNFB
T1	5,95	4,30	4,98	6,04	6,48
T2	≤ 2,00	4,18	6,88	≤ 2,00	3,60
T3	≤ 2,00	4,18	6,30	5,95	3,60
T4	3,95	3,85	6,30	≤ 2,00	≤ 2,00
T5	5,95	3,60	5,85	≤ 2,00	3,60
T6	5,85	6,30	6,54	3,60	4,60
T7	3,60	≤ 2,00	3,60	3,78	≤ 2,00
T8	≤ 2,00	≤ 2,00	6,04	3,95	3,95

População expressa em nº de células/grama de massa fresca. T1= Tratamento 1 referente à inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, T2= Tratamento 2 referente à inoculação de *Azospirillum brasilense*, T3= Tratamento 3 referente à inoculação de *Enterobacter cloacae*, T4= Tratamento 4 referente à inoculação de *Gluconacetobacter sacchari*, T5= Tratamento 5 referente à inoculação de *Azospirillum brasilense*, T6,T7 e T8= Referentes aos tratamentos não inoculados.

Ao fim das coletas e processamento das amostras foram obtidos cerca de 20 isolados por coleta, totalizando aproximadamente 180 estirpes de bactérias diazotróficas isoladas ao fim deste trabalho. Estas estirpes foram armazenadas em frascos contendo 5ml de meio batata ou Dygs e submersas em óleo mineral.

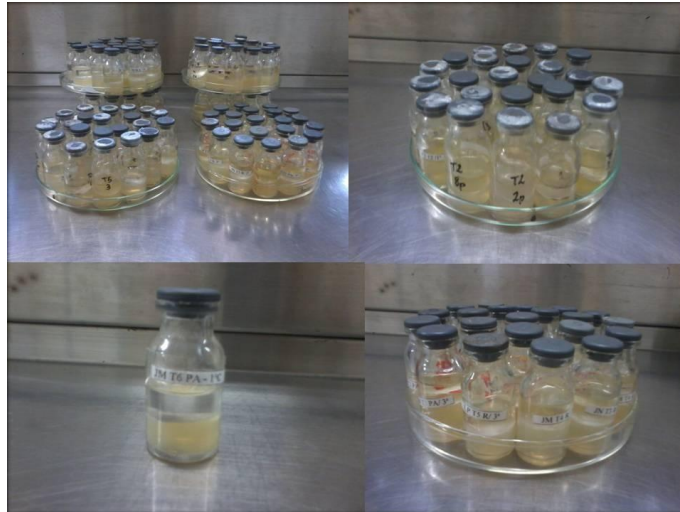


Figura 5. Isolados das estirpes de cada amostragem obtida e estocada em meio batata sólido

6. CONCLUSÕES

A utilização de métodos dependentes de cultivo mostrou que a população de bactérias totais e diazotróficas foram influenciadas pelo tecido vegetal, sendo a maior população encontrada nos tecidos de raiz;

Considerando a comunidade bacteriana, os gêneros *Gluconacetobacter*, *Enterobacter* e *Burkholderia* foram predominantemente detectados por métodos dependentes de cultivo.

No período seco, durante a época de florescimento das panículas, observou-se um maior número de bactérias.

No período chuvoso o número de bactérias foi superior em relação ao período seco, tanto na raiz como na parte aérea.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, E.X., MARASCHIN, G., HARTHMANN, O.E.L., RIBEIRO FILHO, H.M.N., SETELICH, E.A. Oferta de forragem de capim-elefante anão 'Mott' e o rendimento animal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.5, p.1288-1295, 2000.
- ALVES, B.J.R.; SANTOS, J.C.F. dos; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. Métodos de determinação do nitrogênio em solo e planta. In: HUNGRIA, M.E.; ARAUJO, R.S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p.449-470.
- ALVES, G.C. **Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em genótipos de milho**. 2007,. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciência do Solo)- Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropedica - RJ.
- BACA, B. E. & ELMERICH, C. Microbial Production of Plant Hormones. In: ELMERICH, C. & NEWTON, W. E. (Eds.) **Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations**, Springer: v. 5, 2007. p.111-137.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 29, nos 5/6, p. 911-922, 1997.
- BALDANI, J. I.; OLIVARES, F.L.; HEMERLY, A. S.; REIS JUNIOR, F.B.; OLIVEIRA, A.L.M.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; REIS, V.M.; DOBEREINER, J. Nitrogen-fixing endophytes: recent advances in the association with graminaceous plants grown in the tropics. In: ELMERICH, C.; KONDOROSI, A.; NEWTON, W.E. (Ed.). **Biological nitrogen fixation for the 21st century**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p.203-206, 1998.
- BARRIUSO, MAICAS, J., RAMOS, SOLANO, B.GUTIÉRREZ, MANERO, F.J. Protection against pathogen and salt stress by four PGPR isolated from *Pinus* sp. On *Arabidopsis thaliana*. V. 98, P. 666-672, 2008.
- BODDEY, R. M.; CLARK, P. M.; VICTORIA, R. L.; MATSUI, E. The ¹⁵N-isotope dilution technique applied to the estimation of biological nitrogen fixation associated with *Paspalum notatum* cv. batatais in the field. **Soil Biology and Biochemistry** 15, 25–32, 1983

BODDEY, R. M. & VICTORIA, R. L. Estimation of biological nitrogen-fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using ¹⁵N labelled organic matter and fertilizer. **Plant and Soil** 90, 265–294, 1986.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C.M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, v.30, p.365-372, 2000.

BURBANO, C.S.; LIU, Y.; ROESNER, K.L.; REIS, V.M.; CABALLERO-MELLADO, J.; REINHOLD- HUREK, B.; HUREK, T. Predominant *nifH* transcript 16 phylotypes related to *Rhizobium rosettiformans* in field-grown sugarcane plants and in Norway spruce. **Environmental Microbiology Reports**, v.3, p.383–389, 2011.

BYRT, C.S.; GROF, C.P.L.; FURBANK, R.T. C₄ plants as biofuel feedstocks: optimising biomass production and feedstock quality from a lignocellulosic perspective. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 53, p.120-135, 2011.

CASSAN, F. D.; LUCANGELI, C. D.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P. N. *Azospirillum* spp.. metabolize [17,17-²H₂]gibberellin A20 to [17,17-²H₂]gibberellin A1 in vivo in *dy* rice mutant seedlings. **Plant and Cell Physiology**, v. 42, no 7, p.763-767, 2001.

DE-POLLI, H.; MATSUI, E.; DOBEREINER, J.; SALATI, E. Confirmation of nitrogen fixation in two tropical grasses by ¹⁵N incorporation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.9, p.119-123, 1977.

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

FLORES, Rilner Alves. **Produção de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) para fins energéticos no Cerrado: Resposta à adubação nitrogenada e idade de corte**. 2009. 66f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

FERREIRA, Joilson Silva. **Inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* em duas variedades de arroz: Qualidade do inoculante e necessidade de reinoculação**. 2008, Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo)- Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ.

FURUSHITA, M.; SHIBA, T.; MAEDA, T.; YAHATA, M.; KANEOKA, A.; TAKAHASHI, Y.; TRIL, K.; HASEGAWA, T.; OHTA, M. Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.5336–5342, 2003.

GLICK, B. R., PATTEN, C. L., HOLGUIN, G., PENROSE, D. M. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. London, UK: **Imperial College Press**, p 86–179, 1999.

GOVINDARAJAN, M.; BALANDREAU, J.; KWON, S. W.; WEON, H. Y.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Effects of the Inoculation of *Burkholderia vietnamensis* and Related Endophytic Diazotrophic Bacteria on Grain Yield of Rice. **Microbial Ecology**, v.55, no1, p. 21-37, 2008.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; REDDY, P. M.; LADA, J. K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytologist**, v. 154, p. 131-145, 2002.

JACQUES, A.V.A. Fisiologia do crescimento do capim-elefante. In: **Simpósio Sobre Capim-Elefante. Anais...** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, p.23-34, 1990.

JAMES, E. K. Nitrogen fixation n endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**. v.3854, p.1-13, 2000.

KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; HARTMANN,A. *Herbaspirillum frisingense* sp.nov., anew nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **Intern. J. System Evolut Microb**, v.51, p.157-168, 2001.

KOLB, W.; MARTIN, P. **Influence of nitrogen on the number of N₂ fixing and bacteria in the rhizosphere.** Soil Biology and Biochemical, Oxford, 20: p.221-225, 1988.

LADHA, J. K. & REDDY, P. M. **Nitrogen fixation in rice systems: state ofknowledge and future prospects.** Plant and Soil, v. 252, p. 151–167, 2003.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. **Protein measurement with the folin phenol reagent.** Journal of Biological Chemistry, Bethesda, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MORAIS, R. F.; SOUZA, B.J.; LEITE, J.M.; SOARES, L.H.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. **Elephant grass genotypes for bioenergy production by direct biomass combustion.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.44, p.133-140, 2009.

MUTHUKUMARASAMY, R.; KANG, U. G.; PARK, K. D.; JEON, W.-T.; PARK, C. Y.; CHO, Y. S.; KWON, S.-W.; SONG, J.; ROH, D.-H.; REVATHI, G. **Enumeration, isolation and identification of diazotrophs from Korean wetland rice varieties grown with long-term application of N and compost and their short-term inoculation effect on rice plants.** Journal of Applied Microbiology, v.102, no4, p.981–991, 2007.

MYLONA P, PAWLOWSKI K, BISSELING T. **Symbiotic nitrogen fixation.** Plant Cell, 7:869-885, 1995.

OSAVA, M. **Capim elefante, novo campeão em biomassa no Brasil.** 2007. Disponível em: <http://www.mwglocal.org/ipsbrasil.net/nota.php?idnews=3292> . Acesso em: 28/11/2008.

PEREIRA, A. V.; FERREIRA, R. P.; PASSOS, L. P.; FREITAS, V. P.; VERNEQUE, R.; BARRA, R. B.; SILVA, C. H. P. E. **Variação da qualidade de folhas em capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) e híbridos de capim-elefante x milho (*P. purpureum* x *P. glaucum*), em função da idade da planta** Ciência e agrotecnologia, v. 24, n. 2, p. 490-499, 2000.

QUESADA, D.M. **Parâmetros quantitativos e qualitativos da biomassa de genótipos de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) com potencial para uso energético, na forma de carvão vegetal.** 2005. 86p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

QUESADA, D.M. **Seleção de genótipos de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) para a alta produção de biomassa e eficiência da fixação biológica de nitrogênio (FBN).** 2001. 86p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

REIS V. M.; DOS REIS F. B.; QUESADA D. M.; DE OLIVEIRA O.C. A. ; ALVES B. J. R. ;URQUIAGA S.; BODDEY R. M. **Biological nitrogen fixation associated with tropical pasture grasses.** Aust. J. Plant Physiol., 28:837–844, 2001.

Reis VM, Estrada-De Los Santos P, Tenorio-Salgado S, Vogel J, Stoffels M, Guyon S, Mavingui P, Baldani VLD, Schmid M, Baldani JI, Balandreau J, Hartmann A, Caballero- Mellado J (2004). ***Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium.** Int J Syst Evol Microbiol 54:2155 – 2162.

RESCK, D. V. S.; FERREIRA, E. A. B.; FIGUEIREDO, C. C.; ZINN, Y. L. **Dinâmica da matéria orgânica no Cerrado.** In: SANTOS, G. de A.; SILVA, L. S. da; CANELLAS, L. P.; 47 CAMARGO, F. A. O. (Eds.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo – Ecossistemas tropicais e subtropicais**, 2, Porto Alegre, 2008. p. 359-406.

RODRIGUES, L. da 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.

SAMSON, R; MANI, S; BODDEY, R; SOKHANSANJ, S; QUESADA, D; URQUIAGA, S; REIS, V; HO LEM, C. **The potential of C4 perennial grasses for developing a global BIOHEAT industry.** Critical reviews in plant sciences. 24:1-35, 2005.

VITOR, C. M. T. **Adubação nitrogenada e lamina de água no crescimento do capim-elefante.** 2006 Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Vicos- MG.

UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUCHI T. **Remarkable N₂ –fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of nifH gene sequences.** Journal of Bacteriology, v. 177, n. 5, p. 1414-1417, 1995.

URQUIAGA S.; CRUZ K.H.S.; and BODDEY R.M. **Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates.** Soil Sci. Soc. Am. J. 56:105-114. 1992.

URQUIAGA. S.; GILLER K. E.; e CADISCH, G. **Tracing mechanisms of nitrogen transfer from legume to grass in tropical pastures.** In **Soil Management in Sustainable Agriculture**, eds. H. Lee and H. Cook, pp. 104-112. Wye College, Wye, 1994.

VALE, A. T. do; BRASIL, M. A. M.; LEÃO, A. L. Caracterização da madeira e da casca de *Sclerolobium paniculatum*, *Dalbergia miscolobium* e *Pterodon pubescens* para uso energético. In: **Encontro de energia no meio rural**, 3., 2000, Disponível em: <http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=MSC000000002200000100002&lng=en&nrm=abn>. Acesso em: 28/11/2008.

VIDEIRA, Sandy Sampaio. **Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas associadas à plantas de capim elefante e seus efeitos na promoção de crescimento vegetal.** 2012. 142f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

VIDEIRA, Sandy Sampaio. **Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas.** Jean Luiz Simões Araújo, Vera Lúcia Divan Baldani. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 74p. (Documentos / Embrapa Agrobiologia, 234)

WANG, H.; QI, M.; CUTLER, A. J. **A simple method of preparing plant samples for PCR.** *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 21, n.17, p. 4153-4154, 1993.

ZANETTI, Juliano Brás. **Identificação de Genótipos de Capim-Elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach.) de Alta Produção de Biomassa com Qualidade para Fins Energéticos.** 73f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.