

MARIA CAMILA DE BARROS SILVA LEITE

**BACTÉRIAS HALOTOLERANTES ASSOCIADAS A PLANTAS DE CANA-DE-
AÇÚCAR EM SOLOS DA ZONA DA MATA DE PERNAMBUCO**

GARANHUNS, PERNAMBUCO - BRASIL

OUTUBRO - 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO AGRÍCOLA

**BACTÉRIAS HALOTOLERANTES ASSOCIADAS A PLANTAS DE CANA-DE-
AÇÚCAR EM SOLOS DA ZONA DA MATA DE PERNAMBUCO**

MARIA CAMILA DE BARROS SILVA LEITE

ORIENTAÇÃO DA PROFESSORA

DR^a. MARIA BETÂNIA GALVÃO DOS SANTOS FREIRE

COORIENTAÇÃO DA PROFESSORA

DR^a. JÚLIA KUKLINSKY SOBRAL

Dissertação apresentada à
Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como parte das exigências
do Programa de Pós Graduação em
Produção Agrícola, para obtenção do
título de *Mestre*.

GARANHUNS
PERNAMBUCO - BRASIL
OUTUBRO - 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO AGRÍCOLA

**BACTÉRIAS HALOTOLERANTES ASSOCIADAS A PLANTAS DE CANA-DE-
AÇÚCAR EM SOLOS DA ZONA DA MATA DE PERNAMBUCO**

MARIA CAMILA DE BARROS SILVA LEITE

GARANHUNS
PERNAMBUCO - BRASIL
OUTUBRO - 2012

Ficha Catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Setorial UFRPE/UAG

L533b Leite, Maria Camila De Barros Silva
Bactérias halotolerantes associadas a plantas de cana-
de-açúcar em solos da zona da mata de Pernambuco/Maria
Camila De Barros Silva Leite. _Garanhuns, 2012.

91 f.

Orientador: Maria Betânia Galvão dos Santos Freire
Dissertação (Mestrado em Produção Agrícola) -
Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade
Acadêmica de Garanhuns, 2012.

Inclui bibliografias


CDD: 633.61


1. Cana-de-açúcar - Pernambuco
 2. *Saccharum spp*
 3. Solo - Salinidade
 4. Bioprospecção
- I. Freire, Maria Betânia Galvão dos Santos
II. Título

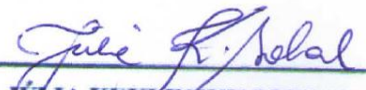
**BACTÉRIAS HALOTOLERANTES ASSOCIADAS A PLANTAS DE CANA-DE-
AÇÚCAR EM SOLOS DA ZONA DA MATA DE PERNAMBUCO**


MARIA CAMILA DE BARROS SILVA LEITE

APROVADA EM 26 DE OUTUBRO DE 2012


**EMÍDIO CANTÍDIO ALMEIDA DE
OLIVEIRA**
(Prof. Dr. / UAST/UFRPE)


FERNANDO DINI ANDREOTE
(Prof. Dr. / ESALQ/USP)


JÚLIA KUKLINSKY SOBRAL
(Prof. Dr. / UAG/UFRPE /
Coorientadora)


**MARIA BETÂNIA GALVÃO DOS
SANTOS FREIRE**
(Prof. Dr. / UFRPE / Orientadora)

“Tudo posso naquele que me fortalece”.

São Paulo Apóstolo

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

Martin Luther King

“A meus pais, que me incentivaram e me deram forças, amando-me incondicionalmente; e, que nunca mediram esforços para que eu chegasse até aqui.”

DEDICO

“A meu amor: Melqui. Que é amigo, companheiro, esposo... Por não me deixar desanimar, sempre me dar forças e, principalmente, por me amar.”

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente a Deus, pois sem ele nada disso faria sentido;
- Aos meus pais, Ariston e Quitéria, pela dedicação e pelo amor, nunca negados; em todos os momentos da minha caminhada... Sem eles não teria chegado até aqui;
- A Melqui, meu esposo, amigo e companheiro, que sempre me incentivou, me ouviu e me alegrou, com sua paciência, dedicação e amor... Por sempre estar presente e por me fazer amá-lo mais a cada dia;
- A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Betânia Galvão Dos Santos Freire, pela oportunidade e pelo apoio;
- A minha coorientadora, Prof^a. Dr^a. Júlia Kuklinsky Sobral, pelo incentivo, paciência e ajuda. Pelas horas dedicadas a conselhos e conversas de verdadeira amizade. E, principalmente, por ter tido o privilégio de fazer parte de sua equipe;
- Ao Prof^o. Dr^o. Alberto E. P. de Araújo, por ter me dado à primeira oportunidade dentro da carreira acadêmica, pelo apoio e incentivo sempre prestados;
- A meus irmãos (Edgar, Flávio e Márcio) e a minhas cunhadas (Tathy, Eli e Eva), que sempre me ouviram, me deram forças e me apoiaram;
- A Dona Auzeni e Seu Joaquim, sogra e sogro, e, amigos; que fizeram parte de minha caminhada e me acolheram como filha;
- A minhas primas, a todos da minha família que me apoiaram e, em especial a minha Madrinha Marinete, que sempre esteve ao meu lado;
- A Eva Vilma, pelas noites que se prestou a ouvir meus desabafos, pelos conselhos e pela sua eterna amizade;
- Aos que fizeram e fazem parte do LGBM, Adjailton, Aldo, Andresa, Arthur, Bruno, Danubia, Diogo, Everthon, Geraldo, Gilka, Iza, Jacyelle, Jesemiel, Jéssica, Luana, Marisângela, Narciso, Pedro, Raquel, Tiago e Williane que sempre estiveram prontos a me ajudar, que não me deixaram desanimar em nenhum momento e que sempre farão parte desta história;
- A minhas amigas: Suiane, Juliana, Cristina e Keila. Por mesmo distante, estarem sempre presentes;

- Aos que fazem a Secretaria Municipal de Saúde de Paratama, em especial, a Alessandra, Angélica, Daia, José, Lene, Norma e Rita, pelo apoio e amizade;
- Ao Dr. Fernando D. Andreote pela ajuda prestada no desenvolvimento deste trabalho;
- A todos os professores e colegas do Mestrado em Produção Agrícola da UAG/UFRPE;
- A FACEPE pela bolsa fornecida e pelo apoio financeiro;
- A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta etapa tão importante da minha vida.

BIOGRAFIA

Maria Camila de Barros Silva Leite, filha de Ariston de Barros Silva e Quitéria Ferreira da Silva, nasceu no dia 12 de julho de 1988, na cidade de Garanhuns, Estado de Pernambuco. Em 1995, ingressou no Ensino Fundamental na Escola Dom Juvêncio de Brito, e finalizou-o no Instituto Presbiteriano de Heliópolis, ambos na cidade de Garanhuns. Em 2003, iniciou o Ensino Médio na Escola Estadual Jerônimo Gueiros, finalizando-o em 2005. Em 2006, ingressou no Curso de Agronomia da Unidade Acadêmica de Garanhuns/Universidade Federal Rural de Pernambuco, graduando-se em fevereiro de 2011. Ingressou em 2011 no Mestrado em Produção Agrícola da Unidade Acadêmica de Garanhuns/Universidade Federal Rural de Pernambuco, finalizando-o em outubro de 2012.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	1
GENERAL SUMMARY.....	2
INTRODUÇÃO GERAL.....	3
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11

CAPÍTULO I

ISOLAMENTO, BIOPROSPECÇÃO E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS A PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR EM SOLOS DA ZONA DA MATA DE PERNAMBUCO

RESUMO	19
SUMMARY.....	20
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3. RESULTADOS.....	29
4. DISCUSSÃO.....	49
5. CONCLUSÕES.....	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

CAPÍTULO II

CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR EM RELAÇÃO A SALINIDADE

RESUMO	63
SUMMARY.....	64
1. INTRODUÇÃO.....	65
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	67
3. RESULTADOS.....	70

4. DISCUSSÃO.....	74
5. CONCLUSÕES.....	76
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

RESUMO GERAL

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, com o Estado de Pernambuco apresentando uma produção de quase 18,4 milhões de toneladas. Porém, o aumento da produtividade e da expansão desta cultura vem sendo dificultado devido à salinidade em alguns solos, especialmente quando submetidos ao descarte de vinhaça, subproduto da produção de álcool. O excesso de sais provoca efeitos tóxicos e uma menor capacidade de absorção de água pelas plantas. Assim como as plantas, as bactérias simbióticas apresentam variação na tolerância à salinidade, podendo ser afetadas nas suas características de promoção de crescimento vegetal. Esta situação pode ser corrigida com a utilização de isolados bacterianos tolerantes à salinidade. Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi isolar e identificar isolados bacterianos de cana-de-açúcar, tolerantes à salinidade e promotores de crescimento vegetal, que possam contribuir para o melhor desenvolvimento desta espécie, tanto em regiões já produtoras, como em regiões do Estado de Pernambuco que possuem solos salinos e que, até então, não são cultivados com a cana-de-açúcar. Para tanto, bactérias endofíticas de raiz e rizosfera foram isoladas, em meio de cultura acrescido de 0 e 5% de NaCl, de plantas de cana-de-açúcar, coletadas em diferentes solos, dois sob uso de vinhaça e outro não. Após o isolamento, foram avaliadas a densidade populacional e características de promoção de crescimento vegetal, os testes realizados constituíram em verificar o potencial para a fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de ácido indol acético (AIA), solubilização de fosfato inorgânico e produção da molécula *quorum sensing*. Além disso, a diversidade cultivável foi avaliada pela técnica da Análise da Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA), com duas enzimas de restrição. E a diversidade não cultivável foi analisada utilizando o DNA total do solo rizosférico e do tecido vegetal (raiz) através da técnica do DGGE do gene *NifH*. Após a seleção de isolados bacterianos promotores de crescimento vegetal, testes de tolerância à salinidade também foram realizados. Como resultado, foi possível isolar 102 isolados bacterianos de rizosfera e endofíticos de raiz, de cana-de-açúcar, com morfologias diversas. Com relação à densidade populacional, foi observado que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Quanto ao potencial para fixação de nitrogênio, produção de AIA, solubilização de fosfato e produção da molécula *quorum sensing*, 72,5; 100; 75,5 e 49% dos isolados foram positivos, respectivamente. Tanto na técnica da ARDRA como no DGGE do gene *nifH*, o dendrograma indicou alta variabilidade genética entre os isolados e entre as amostras de rizosfera e tecido vegetal, respectivamente. Além disso, foi possível observar que a salinidade afeta diretamente tanto o crescimento bacteriano, como características de promoção de crescimento vegetal. Portanto, o presente trabalho contribuiu para o estudo do sistema bactéria/planta/solo, em particular quanto às bactérias halotolerantes associadas a plantas de cana-de-açúcar, selecionando isolados que possam vir a contribuir para o melhor desenvolvimento desta importante cultura em diferentes regiões do Estado de Pernambuco.

Palavras-chave: bioprospecção, diversidade, *Saccharum spp.*, salinidade.

GENERAL SUMMARY

Brazil is the largest sugarcane producer in the world, with the Pernambuco State presenting a production of nearly 18.4 million tons. However, productivity growth and expansion of this culture has been hampered due to salinity in some soils, especially when subjected to dispose of vinasse, a byproduct of ethanol production. Excess salts cause toxic effects and a lower capacity for water absorption by plants. Like plants, the symbiotic bacteria present variation in salinity tolerance and could be affected in their characteristics of plant growth promotion. This situation can be corrected with the use of bacterial isolates tolerant to salinity. Thus, the objective of this study was to isolate and identify bacterial isolates sugarcane, and salt-tolerant plant growth promoters, which may contribute to the better development of this species, both already producing regions, as in regions of Pernambuco that have saline soils, and until then, there are cultivated with sugarcane. Therefore, root endophytic and rhizosphere were isolated in culture medium supplemented with 0 and 5% NaCl, plant sugarcane, collected in different soils, two under vinasse use and another without vinasse use. After isolation, were evaluated population density and characteristics of plant growth promotion, the tests consisted in checking the potential for biological nitrogen fixation (BNF), production of indole acetic acid (IAA), inorganic phosphate solubilization and production *quorum sensing* molecule. Furthermore, the diversity cultivable was assessed by means of restriction analysis of amplified ribosomal DNA (ARDRA) with two restriction enzymes. And uncultivable diversity was analyzed using the total DNA of rhizosphere soil and plant tissue (root) using the technique of DGGE of *nifH*. After the selection of bacterial isolates promoters plant growth, salinity tolerance tests were also performed. As a result, it was possible to isolate 102 bacterial isolates from rhizosphere and endophytic root, sugarcane, with various morphologies. Regarding population density, it was observed that there was no statistical difference between treatments. As for the potential for nitrogen fixation, production of IAA, phosphate solubilization and production of quorum sensing molecule, 72.5; 100; 75.5 and 49% of the isolates were positive, respectively. Both in the ARDRA technique as in DGGE of *nifH*, the dendrogram showed high genetic variability among isolates and among samples of plant tissue and rhizosphere, respectively. Moreover, it was observed that the salinity directly affects both bacterial growth, as characteristics of plant growth promotion. Therefore, this study contributed to the study of bacteria system/plant/soil, particularly regarding halotolerant bacteria associated with plant sugarcane, selecting isolates that may contribute to the better development of this important crop in different regions Pernambuco State.

Keywords: bioprospecting, diversity, *Saccharum* spp., salinity.

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, sendo esta espécie uma das principais culturas brasileiras, pois proporciona o primeiro lugar na produção mundial de açúcar e o segundo na de etanol. Segundo dados da Conab (2011), Pernambuco possui uma produção de cerca de 18,4 milhões de toneladas. Porém, esta produção encontra-se na sua maior parte concentrada na Zona da Mata do Estado. Um dos motivos que pode dificultar sua expansão para outras áreas do Estado de Pernambuco, nas Regiões do Agreste e do Sertão, é a salinidade de alguns solos nas mesmas, que pode causar efeitos tóxicos às plantas e, possivelmente, à microbiota associada a elas (LIMA *et al.*, 1998).

Assim como as plantas, as bactérias simbióticas apresentam variação na tolerância à salinidade. O maior entendimento da interação bactéria/planta, em ambientes diversos, promove um melhor desenvolvimento da planta mesmo em condições de estresse. E o estudo de bactérias promotoras de crescimento vegetal adaptadas a esta condição de estresse, poderá permitir o cultivo e a produtividade desejada da cana-de-açúcar em ambientes salinos.

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)

A cana-de-açúcar é um vegetal pertencente à família *Poaceae*, gênero *Saccharum* e possui pelo menos seis espécies, das quais a mais conhecida é a *Saccharum officinarum* L. É uma das principais culturas do Brasil, pois sequestra cerca de 20% das emissões de carbono que o setor de combustíveis fósseis emite no Brasil (RODRIGUES, 2004); possibilita a produção de açúcar, álcool anidro (aditivo para gasolina) e álcool hidratado (CONAB, 2007). Além disso, possibilita a geração de energia elétrica, através da queima do bagaço, e todos os seus resíduos podem ser utilizados na lavoura como insumo de fertilização.

O Brasil é o maior produtor mundial desta cultura. Segundo a Conab (2011), a previsão do total de cana que será moída na safra 2011/12 é de aproximadamente 571 milhões de toneladas, colhidas em cerca de 8 milhões de hectares. O Nordeste participa apenas com 11,8% da produção e Pernambuco com 3,2% (CONAB, 2011).

Os lucros com a cultura poderiam ser maiores, se não fosse pelos gastos elevados com fertilizantes, controle de ervas daninhas e fitopatógenos, entre outros problemas (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Por este motivo, várias pesquisas vem sendo desenvolvidas com o objetivo de tornar mais eficiente, sustentável e lucrativo a produção desta cultura, neste contexto se encontram as bactérias promotoras de crescimento vegetal.

Poucos são os trabalhos desenvolvidos no Estado de Pernambuco que visam a exploração dos mecanismos de interação bactéria/cana-de-açúcar, tornando-se primordial este conhecimento para a utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal no manejo da cana-de-açúcar, tanto em Pernambuco, como no Nordeste.

Interação bactéria/planta

As plantas são um microecossistema complexo, onde diferentes nichos são explorados por uma extensa variedade de bactérias, que apresentam relações neutras e simbióticas com a planta hospedeira (STURZ *et al.*, 2000). Isto ocorre pelo fato das plantas oferecerem condições favoráveis ao desenvolvimento de micro-organismos, constituindo um excelente habitat para estes (SALA *et al.*, 2005). Deste modo, a planta pode ser colonizada por bactérias benéficas, saprofíticas e fitopatogênicas (REIS, 2005).

Portanto, as bactérias chamadas benéficas são aquelas que convivem em simbiose com seu hospedeiro, de maneira que nenhum dos dois venha a ser prejudicado (RAMOS, 2011). Assim, as bactérias promotoras de crescimento colonizam diferentes órgãos das plantas e exercem efeitos benéficos sobre as mesmas (SANTOS *et al.*, 2005).

São várias as razões para se estudar as interações existentes entre bactéria/planta, dentre elas estão: produção de antibióticos e outros metabólitos de interesse farmacológico; aplicação como agentes de controle biológico de pragas e doenças; produção de substâncias que causam toxicoses induzidas em herbívoros; aplicação como vetores para a expressão de genes em plantas hospedeiras; utilização como indicadores de deficiências nutricionais de plantas; promoção de crescimento vegetal por meio da produção de fitormônios, fixação N₂ ou por outros mecanismos (MELO & AZEVEDO, 1998; STURZ *et al.*, 2000; LODEWYCKX *et al.*, 2002; STROBEL &

DAISY, 2003; KUKLINSKY-SOBRAL *et al.*, 2004; HARDOIM *et al.*, 2008; MENDES, 2008; BERG, 2009; CASTRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2011).

Visando conhecer todas as vantagens destes micro-organismos, pesquisas vêm sendo desenvolvidas para que haja melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nesta interação, proporcionando uma aplicação mais planejada e precisa, visando a eficiência do uso destas bactérias para as mais diferenciadas áreas da biotecnologia e para aumento da produção agrícola.

Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por bactérias

Após diversas pesquisas, foi possível identificar que todos os vegetais estudados possuem interações com micro-organismos, e que alguns destes trazem benefícios ao vegetal. Neste contexto, bactérias associadas às plantas podem produzir fitormônios, antibióticos, fungicidas, inseticidas, dentre outras formas diretas e indiretas de promoção de crescimento vegetal. Ao mesmo tempo, bactérias são capazes de fixar nitrogênio atmosférico e disponibilizá-lo para a planta, elemento este que é essencial ao desenvolvimento do vegetal. Além de solubilizar diversos elementos, como o fósforo, indispensáveis ao desenvolvimento vegetal (LODEWYCKX *et al.*, 2002; KUKLINSKY-SOBRAL *et al.*, 2004; HARDOIM *et al.*, 2008; CASTRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2011).

Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio (N) é o elemento mais abundante na atmosfera terrestre (em torno de 70%). Nas plantas é item essencial, responsável por várias reações, além de fazer parte da estrutura da clorofila, de enzimas e proteínas (FAGAN *et al.*, 2007). Devido à importância do nitrogênio para as plantas, o emprego de fertilizantes nitrogenados faz-se extremamente necessário.

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é o processo em que as bactérias transformam o nitrogênio atmosférico (N₂) em formas absorvíveis pela planta. Este processo ocorre em bactérias de vida livre, porém são as simbióticas que atuam na promoção de crescimento vegetal (MARI *et al.*, 1998). O interesse pela FBN tem aumentado devido ao alto custo dos fertilizantes nitrogenados e à atual conscientização ecológica, já que a FBN possibilita a redução do uso desses fertilizantes. Estima-se que

cerca de 70% do nitrogênio requerido pela cana-de-açúcar é suprido pela fixação biológica de nitrogênio (SUMAN *et al.*, 2005).

Diversos grupos bacterianos foram caracterizados como potenciais fixadores de nitrogênio, entre eles estão: *Azospirillum* (TEJERA *et al.*, 2005; HUNGRIA *et al.*, 2010); *Enterobacter*, *Klebsiella* e outros membros da família *Enterobacteriaceae* (GOVINDARAJAN *et al.*, 2007; FERRARA *et al.*, 2011; TAULÉ *et al.*, 2011); *Burkholderia* (CASTRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2011); *Pseudomonas*, *Rhanelia*, *Stenotrophomonas* e *Xanthomonas* (TAULÉ *et al.*, 2011); *Azotobacter* (TEJERA *et al.*, 2005); entre outros.

Portanto, o estudo destes grupos poderá auxiliar na identificação de um isolado bacteriano eficiente, que possa vir a se tornar um inoculante e reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados, bem como aumentar a produtividade da cultura da cana-de-açúcar.

Produção de ácido indol acético (AIA)

A produção de fitohormônios, ou reguladores de crescimento vegetal, é outra característica que algumas espécies bacterianas, quando em associação com a planta hospedeira, expressam. Um dos fitohormônios mais ativos e mais caracterizados é o ácido indol acético (AIA), pertencente à classe das auxinas. Pesquisas relatam diversos gêneros bacterianos expressando esta característica de promoção de crescimento vegetal (KUKLINSKY-SOBRAI *et al.*, 2004; RADWAN *et al.*, 2005; ALI *et al.*, 2009; MALHOTRA & SRIVASTAVA, 2009; SADEGHI *et al.*, 2011).

O AIA é sintetizado por várias rotas bioquímicas, mas uma das principais utilizadas pelas bactérias é a dependente do triptofano, já que este promove o aumento da síntese deste hormônio (PATTEN & GLICK, 1996).

É importante verificar se a produção de compostos indólicos pode ser afetada por condições de estresse salino, que são as condições normalmente encontradas em solos de áreas de cultivo agrícola, em regiões do Nordeste brasileiro, pois, segundo Radwan *et al.* (2005), o aumento da concentração de sais no meio de cultivo inibe a produção de compostos indólicos.

A resposta das plantas ao AIA produzido por bactérias, pode variar de efeitos benéficos a deletérios, dependendo de sua concentração. Quando em baixas

concentrações, pode estimular e quando em altas, pode inibir o desenvolvimento da raiz (LAMBRECHT *et al.*, 2000). Desta forma, é necessária a caracterização destas linhagens produtoras para avaliar seus verdadeiros efeitos no crescimento vegetal.

Solubilização de fosfato inorgânico

O fósforo (P) é um elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas (SOUCHIE *et al.*, 2005; BARROSO & NAHAS, 2008). E, após o nitrogênio, é o elemento mais limitante ao crescimento vegetal (GYANESHWAR *et al.*, 2002). Especialmente em solos intemperizados de regiões de clima tropical, o P é um elemento de difícil absorção pelos vegetais, por estar presente no solo geralmente em formas de baixa disponibilidade para as plantas, ou seja, não está presente na solução do solo, e sim, encontra-se imobilizado neste, devido aos fenômenos de adsorção e precipitação (GALETI, 1983; PRIMAVESI, 2002; SOUCHIE *et al.*, 2005).

Pelo fato do fósforo ser um composto de fácil adsorção, as alternativas para a solubilização de fosfato são altamente visadas. Neste contexto, algumas bactérias têm a capacidade de solubilizar o fosfato indisponível no solo e disponibilizá-lo para as plantas, através da produção de ácidos orgânicos e inorgânicos (VASSILEV & VASSILEVA, 2003).

Segundo Shiomi *et al.* (2009), as bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico vêm recebendo a atenção dos pesquisadores, principalmente, pela possibilidade de seu emprego em programas de interação com bactérias fixadoras de N₂. Ainda segundo estes autores, entre os gêneros de bactérias mais eficientes na solubilização de fosfatos inorgânicos destacam-se *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Rhizobium*.

Deste modo, o entendimento da capacidade e da eficiência de bactérias, em solubilizar fosfato inorgânico, pode levar à seleção de isolados com alto potencial para o uso na inoculação em plantas.

Produção da molécula *quorum sensing* (N-acil homoserina lactona, AHL)

Quorum sensing é um mecanismo que bactérias possuem para regular a expressão de um conjunto de genes, através da sinalização das células, ou seja, células autoindutoras (RUMJANEK *et al.*, 2004). O sistema *quorum sensing* mais estudado é o

inicializado pela molécula N-acil homoserina lactona, AHL (POONGUZHALI *et al.*, 2007; QUECINE, 2010; LIU *et al.*, 2011).

De acordo com Quecine (2010), a molécula AHL está envolvida com o controle da expressão de colonização de eucariotos por diversas espécies bacterianas. Esta colonização é facilitada pela formação de biofilmes (SILVA, 2008; LIU *et al.*, 2011). Esta formação de biofilmes vem sendo considerada uma resposta ao mecanismo *quorum sensing* (RUMJANEK *et al.*, 2004). O biofilme traz diversos benefícios à comunidade bacteriana, entre eles estão a melhor comunicação entre as células e a possibilidade de uma melhor colonização à planta hospedeira, já que os compostos produzidos no biofilme podem aumentar a resistência a estresses (SILVA, 2008).

Deste modo, a identificação de isolados bacterianos produtores da molécula AHL, podem potencializar a produção de inoculantes, já que a colonização destes será facilitada pela produção de biofilmes.

A salinização dos solos

De acordo com Freire & Freire (2007), os solos salinos se caracterizam pelo acúmulo de sais em horizontes ou camadas próximas à superfície. Estes solos possuem, em alguma de suas partes, condutividade elétrica do extrato de pasta saturada superior a 4 dS m^{-1} , além de geralmente apresentarem, em algumas épocas do ano, lençol freático superficial devido a impedimentos físicos. A salinização pode ocorrer por processos naturais ou pela ação do homem. Geralmente o processo de acúmulo de sais causado por ação antrópica é decorrente de irrigação inadequada, do mau manejo do solo e do uso excessivo de certos fertilizantes.

Na Zona da Mata do Estado, a salinidade vem sendo observada, devido à aplicação de vinhaça. A vinhaça é o produto de calda na destilação do licor de fermentação do álcool de cana-de-açúcar; é líquido residual, também conhecido, regionalmente, por restilo e vinhoto (SILVA *et al.*, 2007).

A vinhaça contém mais de 93% de água, é bastante rica em potássio, possui quantidade expressiva de matéria orgânica e ainda possui outros elementos como: Ca, Mg, SO_4 . No entanto, sua utilização contínua no mesmo solo, ano após ano, pode proporcionar saturação de cátions, principalmente do potássio, ocasionando problemas

de lixiviação desses cátions para a água subterrânea e desbalanço de nutrientes (GARIGLIO, 2008).

Assim como as plantas, as bactérias simbióticas apresentam variação na tolerância à salinidade. Portanto, características de promoção de crescimento vegetal, como fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios, solubilização de fosfato inorgânico, entre outros; podem ser afetadas negativamente pelo efeito dos sais presentes nos solos. Segundo Pereira *et al.* (2012), altas concentrações de NaCl influenciam negativamente o crescimento bacteriano de *Burkholderia glaidoli* e *B. helea* associadas a plantas de cana-de-açúcar, além de influenciar negativamente a produção do ácido indol acético *in vitro*.

Esta situação pode ser invertida com a utilização de linhagens bacterianas tolerantes à salinidade (NÓBREGA *et al.*, 2004). Estas bactérias são conhecidas como halotolerantes, ou seja, não necessitam do sal para o seu metabolismo, mas o toleram, em diferentes concentrações (JHA *et al.*, 2011; MISHRA *et al.*, 2011; OETTERER, 2012). Neste contexto, é de extrema importância encontrar isolados halotolerantes e com potencial promoção de crescimento vegetal, a fim de usá-los em programas de manejo da cana-de-açúcar em solos salinos.

Diversidade bacteriana associada às plantas

A diversidade deve-se à evolução natural dos procariotos, dentre eles, as bactérias representam a maior reserva de diversidade genética, além de apresentarem uma origem anterior aos protistas, metazoários e plantas, e ocuparem um espaço muito maior na biosfera (BERNARDES, 2010). Diversos trabalhos identificam esta diversidade bacteriana associada às mais variadas espécies de plantas (KUKLINSKY-SOBRAL *et al.*, 2004; CASTRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2011; FARINA *et al.*, 2012). E estes estudos possibilitam a compreensão da interação simbiótica bactéria/hospedeiro.

Graças aos avanços da biologia molecular, é possível estudar a diversidade bacteriana. Isto fica claro em trabalho realizado por Dell'Amico *et al.* (2005), onde foram aplicadas técnicas de biologia molecular para avaliar a diversidade de rizobactérias associadas com gramíneas perenes.

O estudo da diversidade genética microbiana pode ser realizado por métodos dependentes de cultivo ou métodos independentes de cultivo. Para os métodos

dependentes de cultivo, o DNA de colônias isoladas deve ser extraído. Após a extração do DNA, é necessário multiplicar diversas vezes o fragmento de interesse para estudá-lo, usa-se assim a Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) (ANTONINI *et al.*, 2004).

A PCR é uma técnica que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, na presença da enzima DNA polimerase (ANTONINI *et al.*, 2004). Nesta, podem ser utilizados *primers* específicos ou universais, como o do gene 16S rRNA. Assim, após a amplificação do gene de interesse, outras técnicas podem ser utilizadas para aprofundar os estudos. No caso do gene 16S rRNA, após sua amplificação é possível realizar a técnica da Análise da Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA), com diversas enzimas de restrição. Esta técnica é fundamentada no grau de conservação dos sítios de restrição do rDNA que reflete padrões filogenéticos (REIS *et al.*, 2002).

Para a análise da diversidade genética independente de cultivo, o DNA total é extraído diretamente da amostra. Após a extração, diversas técnicas podem ser aplicadas, uma delas é a Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DDGE) (ANDREOTE, 2007). Neste caso, também podem ser utilizados tanto *primers* universais como os específicos para alguns genes ou grupos bacterianos.

A diversidade bacteriana deve ser bastante estudada, pois os manejos dados às culturas podem afetá-la. Barriuso & Mellado (2012) mostraram que a aplicação do glifosato em cultivos de algodão resistente não afetou a comunidade bacteriana da rizosfera. No entanto, Dias (2008) verificou que a diversidade bacteriana cultivável e não cultivável do sedimento de manguezal variou de acordo com o ponto amostrado, as épocas e a profundidade.

Deste modo, o estudo da diversidade bacteriana em ambientes diversos é essencial para identificar quais grupos estão presentes e quais se sobressaem, podendo assim identificar os mais relevantes para o manejo das culturas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, B.; SABRI, A.N.; LJUNG, K.; HASNAIN, S. Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phyto-stimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 25, p. 519–526, 2009.
- ANDREOTE, F.D. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, 2007. 201p. Tese de Doutorado.
- ANTONINI, S.R.C.; MENECHIN, S.P.; URASHIMA, A.S. **Técnicas básicas de biologia molecular**. Araras: Centro de Ciências Agrárias/UFSC, 2004, 56p.
- BARRIUSO, J. & MELLADO, R.P. Glyphosate affects the rhizobacterial communities in glyphosate-tolerant cotton. **Applied Soil Ecology**, v. 55, p. 20–26, 2012.
- BARROSO, C.B. & NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 4, p. 529-535, 2008.
- BERG, G. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, p. 11–18, 2009.
- BERNARDES, F.S. **Diversidade bacteriana endofítica associada à *Citrus sinensis* (L.) Osbeck com sintomas de *Greening***. Piracicaba: Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 2010. 60p. Tese de Doutorado.
- CASTRO-GONZÁLEZ, R.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; RAMÍREZ-TRUJILLO, A.; SANTOS, P.E.; CABALLERO-MELLADO, J. High diversity of culturable *Burkholderia* species associated with sugarcane. **Plant Soil**, v. 345, p. 155–169, 2011.
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira cana-de-açúcar Safra 2007/2008, terceiro levantamento, novembro/2007/Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília: **Conab**, 2007.
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira cana-de-açúcar Safra 2011/2012, terceiro levantamento, dezembro/2011/Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília: **Conab**, 2011.

- DELL'AMICO, E.; CAVALCA, L.; ANDREONI, V. Analysis of rhizobacterial communities in perennial *Graminaceae* from polluted water meadow soil, and screening of metal-resistant, potentially plant growth-promoting bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 52, p. 153–162, 2005.
- DIAS, A.C.F. **Diversidade de bactérias do sedimento de manguezal da Ilha do Cardoso Cananéia – São Paulo**. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2008. 61p. Dissertação de Mestrado.
- FAGAN, E.B.; MEDEIROS, S.L.P.; MANFRON, P.A.; CASAROLI, D.; SIMON, J.; NETO, D.D.; LIER, Q.J.; SANTOS, O.S.; MÜLLER, L. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja – Revisão. *Revista da FZVA, Uruguiana*, v. 14 n. 1, p. 89-106, 2007.
- FARINA, R.; BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; CAMPOS, S.B.; LISBOA, B.B.; WENDISCH, V.; VARGAS, L.K.; PASSAGLIA, L.M.P. Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. *Applied Soil Ecology*, v. 55, p. 44– 52, 2012.
- FERRARA, F.I.S.; OLIVEIRA, Z.M.; GONZALES, H.H.S.; FLOH, E.I.S.; BARBOSA, H.R. Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. *Plant Soil*, DOI 10.1007/s11104-011-1042-1, 2011.
- FREIRE, M. B. G. S.; FREIRE, F. J. Fertilidade do solo e seu manejo em solos afetados por sais. In: **Fertilidade do Solo**. Novais, R. F. *et al.* (Ed.). Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. p. 929-954, 2007.
- GALETI, P.A. **Guia do técnico agropecuário: solos**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1983, 142p.
- GARIGLIO, H.A.A. **Alterações físicas e químicas e mobilidade de solutos em solos submetidos à aplicação de vinhaça proveniente da fabricação de álcool carburante**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2008. 86p. Dissertação de Mestrado.
- GOVINDARAJAN, M.; KWON, S.; WEON, H. Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella* sp. GR9. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 23, p. 997-1006, 2007.

- GYANESHWAR, P.; KUMAR, G.N.; PAREKH, L.J.; POOLE, P.S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v. 245, p. 83-93, 2002.
- HARDOIM, P.R.; OVERBEEK, L.S.V.; ELSAS, J.D.V. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Science Direct**, v. 16, n. 10, p. 463-471, 2008.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**, v. 331, p. 413– 425, 2010.
- JHA, B.; GONTIA, I.; HARTMANN, A. The roots of the halophyte *Salicornia brachiata* are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potential. **Plant Soil**, DOI 10.1007/s11104-011-0877-9, 2011.
- KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 6, p. 1244-1251, 2004.
- LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; BROEK, A.V.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, v. 8, p. 298-300, 2000.
- LIMA, G.P.P.; FERNANDES, A.A.H.; CATÂNEO, A.C.; CEREDA, M.P.; BRASIL, O.G. Alterações na atividade da peroxidase e do conteúdo de carboidratos em mandioca cultivada in vitro sob estresse salino. **Scientia Agricola**, v. 55, n. 3, 1998.
- LIU, X.; JIA, J.; POPAT, R.; ORTORI, C.A.; LI, J.; DIGGLE, S.P.; GAO, K. CÁMARA, M. Characterisation of two quorum sensing systems in the endophytic *Serratia plymuthica* strain G3: differential control of motility and biofilm formation according to life-style. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 26, p. 1-12, 2011.
- LODEWYCKX, C.; VANGRONVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E.R.B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; LELIE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant**, v. 21, n. 6, p. 583-606, 2002.

- MALHOTRA, M. & SRIVASTAVA, S. Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 73–80, 2009.
- MARI, V.A.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.R.S.; BALDANI, J.I. Fixação biológica de nitrogênio: bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical. 1998. Disponível em: <<http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/doc091.pdf>>. Acesso em 08 nov. 2010.
- MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L.. In: ECOLOGIA MICROBIANA. **Microrganismos endofíticos**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1988, p. 117-137.
- MENDES, R. **Diversidade e caracterização genética de comunidades microbianas endofíticas associadas à cana-de-açúcar**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, 2008. 121p. Tese de Doutorado.
- MISHRA, R.R.; PRAJAPATI, S.; DAS, J.; DANGAR, T.K.; DAS, N.; THATOI, H. Reduction of selenite to red elemental selenium by moderately halotolerant *Bacillus megaterium* strains isolated from *Bhitarkanika* mangrove soil and characterization of reduced product. **Chemosphere**, v. 84, p. 1231–1237, 2011.
- NÓBREGA, R.S.A.; MOTTA, J.S.; LACERDA, A.M.; MOREIRA, F.M.S. Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 4, p. 899-905, 2004.
- OETTERER, M. O processo de fermentação do pescado (Anchovamento). USP/ESALQ. LAN. 662. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/Fermentacao%20do%20pescado.pdf>>. Acesso em: 27 mar. 2012.
- OLIVEIRA, T.B.A.; OLIVEIRA, M.W.; FARIA, R.O.; HESPANHOL, P.O. Custo de produção e tecnologia em cultura de cana-de-açúcar de alta produtividade. In: **XXIII Encontro Nacional de Engenharia de Produção** - Ouro Preto, MG, Brasil, 2003.
- PATTEN, C.L. & GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 207-220, 1996.
- PEREIRA, A.P.A.; BARROS, M.C.S.; OLIVEIRA, J.R.S.; RAMOS, A.P.S.; FREIRE, M.B.G.S.; FREIRE, F.J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Influência da salinidade

- sobre o crescimento e a produção de ácido indol acético de *Burkholderia* spp. endofíticas de cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 112-121, 2012.
- POONGUZHALI, S.; MADHAIYAN, M.; SA, T. Quorum-sensing signals produced by plant-growth promoting *Burkholderia* strains under in vitro and in plant conditions. **Research in Microbiology**, v. 158, p. 287-294, 2007.
- PRIMAVESI, A. **Manejo ecológico do solo: a agricultura em regiões tropicais**. São Paulo: Nobel, 2002. 549p.
- QUECINE, M.C. **Aspectos biotecnológicos da interação entre bactérias e cana-de-açúcar (*Saccharum sp.* L.)**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, 2010. 196p. Tese de Doutorado.
- RADWAN, T.ES.ED.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 10, p. 997-1004, 2005.
- RAMOS, A.P.S. **Bactérias associadas a variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco: diversidade genética e produção de ácido indol acético**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2011. 128p. Dissertação de Mestrado.
- REIS, F.B.J.; MENDES, I.C.; TEIXEIRA, K.R.S.; REIS, V.M. **Uso de ferramentas moleculares em estudo da diversidade de microrganismos do solo**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002, 33p.
- REIS, V.M. **Interações entre plantas e microrganismos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005, 24p. (Embrapa Agrobiologia, Documento 194).
- RODRIGUES, R. Século XXI, o novo tempo da agroenergia renovável. **Visão Agrícola**, v. 1, p. 4-7, 2004.
- RUMJANEK, N.G.; FONSECA, M.C.C.; XAVIER, G.R. *Quorum sensing* em sistemas agrícolas. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, p. 35-50, 2004.
- SADEGHI, A.; KARIMI, E.; DAHAJI, P.A.; JAVID, M.G.; DALVAND, Y.; ASKARI, H. Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, DOI 10.1007/s11274-011-0952-7, 2011.

- SALA, V.M.R.; FREITAS, S.S.; DONZELI, V.P.; FREITA, J.G.; GALLO, P.B.; SILVEIRA, A.P.D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 345-352, 2005.
- SANTOS, M.H.L.C.; MARIANO, R.L.R.; CAMARA, T.R.; ANDRADE, A.G.; WILLADINO, L.; LIMA, G.P.P. Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f. **Hoehnea**, v. 32, n. 2, p. 1-8, 2005.
- SHIOMI, H. F.; VICENSI, M.; DEDORDI, C.; OLIARI, Í.C.R. Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico, presentes em líquido ruminal bovino. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, p. 294 – 297, 2009.
- SILVA, M.A.S.; GRIEBELER, N.P.; BORGES, L.C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 108–114, 2007.
- SILVA, M.C.P. **Interação entre *Methylobacterium extorquens* e cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.)**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, 2008. 79p. Dissertação de Mestrado.
- SOUCHIE, E.L.; AZCÓN, R.; BAREA, J.M.; SAGGIN-JÚNIOR, O.J.; SILVA, E.M.R. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1149-1152, 2005.
- STROBEL, G. & DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491–502, 2003.
- STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19, p. 1-30, 2000.
- SUMAN, A.; GAUR, A.; SHRIVASTAVA, A.K.; YADAV, R.L. Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Plant Growth Regulation**. v. 47, p. 155-162, 2005.
- TAULÉ, C.; MAREQUE, C.; BARLOCCO, C.; HACKEMBRUCH, F.; REIS, V.M.; SICARDI, M.; BATTISTONI. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant Soil**, DOI 10.1007/s11104-011-1023-4, 2011.

- TEJERA, N.; LLUCH, C.; MARTÍNEZ-TOLEDO, M.V.; GONZÁLES-LÓPEZ, J..
Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. **Plant and Soil**, v. 270, p. 223-232, 2005.
- VASSILEV, N; VASSILEVA, M. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 435-440, 2003.

CAPÍTULO I

ISOLAMENTO, BIOPROSPECÇÃO E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS A PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR EM SOLOS DA ZONA DA MATA DE PERNAMBUCO

RESUMO

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas brasileiras e, juntamente com o milho nos Estados Unidos, é responsável pela maior parte do etanol produzido no mundo. É uma cultura exigente quanto à fertilidade e apresenta-se sensível a aspectos limitantes do solo, como a salinidade. Problemas de acúmulo de sais em solos da Zona da Mata do Estado de Pernambuco vem sendo observados, devido à aplicação de vinhaça, subproduto da produção de álcool. O excesso de sais provoca efeitos tóxicos e uma menor capacidade de absorção de água pelas plantas. Assim como as plantas, as bactérias simbióticas apresentam variação na tolerância à salinidade, podendo ser afetadas nas suas características de promoção de crescimento vegetal. Outro fator que deve ser levado em consideração é a diversidade bacteriana associada à cultura, pois os manejos podem afetá-la. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi isolar e identificar isolados bacterianos de cana-de-açúcar, tolerantes a salinidade e promotores de crescimento vegetal; bem como avaliar a diversidade genética dependente de cultivo, pela técnica da ARDRA e, independente de cultivo, pelo DGGE do gene *nifH*. Para tanto, bactérias endofíticas de raiz e rizosfera foram isoladas, em meio de cultura acrescido de 0 e 5% de NaCl, de plantas de cana-de-açúcar, coletadas em diferentes solos, dois sob aplicação de vinhaça e um não. Após o isolamento, foram avaliadas a densidade populacional e características de promoção de crescimento vegetal, os testes realizados constituíram em verificar o potencial para a fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de ácido indol acético (AIA), solubilização de fosfato inorgânico e produção da molécula *quorum sensing*. Além disso, a diversidade cultivável foi avaliada pela técnica da análise da restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA), com duas enzimas de restrição. E a diversidade não cultivável foi analisada utilizando o DNA total do solo rizosférico e do tecido vegetal (raiz) através da técnica do DGGE do gene *NifH*. Como resultado, foi possível isolar 102 isolados bacterianos de rizosfera e endofíticos de raiz, de cana-de-açúcar, com morfologias diversas. Com relação à densidade populacional, foi observado que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Quanto ao potencial para fixação de nitrogênio, produção de AIA, solubilização de fosfato e produção da molécula *quorum sensing*, 72,5; 100; 75,5 e 49% dos isolados foram positivos, respectivamente. Tanto na técnica da ARDRA como no DGGE do gene *NifH*, o dendrograma indicou alta variabilidade genética entre os isolados e entre as amostras de rizosfera e tecido vegetal, respectivamente. Foi possível concluir que bactérias isoladas em meio com o acréscimo de sal, e sob diversos manejos de aplicação de vinhaça, também apresentam-se eficientes nas características de promoção de crescimento vegetal, além, da comunidade bacteriana da rizosfera e endofíticas de raiz, presentes na cana-de-açúcar, cultivada em diferentes solos do Estado de Pernambuco apresentar elevada diversidade, tanto do gene 16S rRNA quanto do *nifH*.

SUMMARY

The sugarcane is an important crop in Brazil and together with corn in the United States, is responsible for most of the ethanol produced in the world. It is a culture demanding for fertility and appears sensitive to limiting aspects such as salinity soil. Problems accumulation of salts in soils in the forest zone of Pernambuco has been observed due to the application of vinasse, a byproduct of ethanol production. Excess salts cause toxic effects and a lower capacity for water absorption by plants. Like plants, the symbiotic bacteria present variation in salinity tolerance and could be affected in their characteristics of plant growth promotion. Another factor that should be taken into consideration is the diversity associated with bacterial culture, as the managements can affect it. In this context, the objective of this study was to isolate and identify bacterial isolates of sugarcane, and salt-tolerant plant growth promoters, and assess the genetic diversity dependent on cultivation technique of ARDRA and, regardless of culture, by DGGE of *nifH*. Therefore, root endophytic and rhizosphere were isolated in culture medium supplemented with 0 and 5% NaCl, plant sugarcane, collected in different soils, two under vinasse use and another without vinasse use. After isolation, were evaluated population density and characteristics of plant growth promotion, the tests consisted in checking the potential for biological nitrogen fixation (BNF), production of indole acetic acid (IAA), inorganic phosphate solubilization and production *quorum sensing* molecule. Furthermore, the diversity cultivable was assessed by means of restriction analysis of amplified ribosomal DNA (ARDRA) with two restriction enzymes. And uncultivable diversity was analyzed using the total DNA of rhizosphere soil and plant tissue (root) using the technique of DGGE of *nifH*. As a result, it was possible to isolate 102 bacterial isolates from rhizosphere and endophytic root, sugarcane, with various morphologies. Regarding population density, it was observed that there was no statistical difference between treatments. As for the potential for nitrogen fixation, production of IAA, phosphate solubilization and production of *quorum sensing* molecule, 72.5; 100; 75.5 and 49% of the isolates were positive, respectively. Both in the ARDRA technique as in DGGE of *nifH*, the dendrogram showed high genetic variability among isolates and among samples of plant tissue and rhizosphere, respectively. It was concluded that bacteria isolated in the middle with the addition of salt, and under various managements vinasse application also presents the characteristics of efficient plant growth promotion, in addition, the bacterial community of the rhizosphere and root endophytic bacteria present in sugarcane, grown in different soils of Pernambuco present high diversity of both the 16S rRNA gene as the *nifH*.

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas brasileiras e, juntamente com o milho nos Estados Unidos, é responsável pela maior parte do etanol produzido no mundo (WACLAWOVSKY *et al.*, 2010). Além do etanol, rapadura, melado, aguardente e açúcar também são produtos que têm a cana-de-açúcar como matéria-prima. Na sua forma *in natura*, é utilizada geralmente para alimentação animal, e seus subprodutos, como a vinhaça, podem ser utilizados na lavoura como insumos de fertilização (CARDOZO & ARAÚJO, 2011; SOOBADAR & KWONG, 2012).

A cana-de-açúcar é uma cultura exigente quanto à fertilidade e apresenta-se sensível a aspectos limitantes do solo, como a salinidade. De acordo com Freire & Freire (2007), os solos salinos se caracterizam pelo acúmulo de sais em horizontes ou camadas próximas à superfície e o excesso de sais, próximos às raízes, provoca efeitos tóxicos nas plantas e diminui a absorção de água.

Apesar de ser uma área sob clima úmido, problemas de acúmulo de sais em solos da Zona da Mata do Estado de Pernambuco vem sendo observados, devido à aplicação de vinhaça. Ao ser aplicada ao solo, a vinhaça provoca uma série de modificações nas suas características químicas e físicas, principalmente no pH, na capacidade de troca catiônica (CTC), carbono orgânico, retenção de água, condutividade elétrica, porosidade, afetando também a população e a atividade de micro-organismos do solo (PEREIRA *et al.*, 1992; ESPAÑA-GAMBOA *et al.*, 2011).

Assim como as plantas, as bactérias que se encontram em associação com a cana-de-açúcar, apresentam variação na tolerância à salinidade, podendo ser afetadas nas suas características de promoção de crescimento vegetal, como fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios, solubilização de fosfato inorgânico, entre outros (NÓBREGA *et al.*, 2004). Esta situação pode ser invertida com a utilização de linhagens bacterianas tolerantes à salinidade.

As bactérias que promovem o crescimento vegetal são altamente visadas, e segundo Castro-González *et al.* (2011), ainda existe uma grande dificuldade em encontrar um isolado eficiente, não patogênico a humanos e estável para ser um promissor inoculante para a cana-de-açúcar. Vale ressaltar que rizobactérias promotoras de crescimento podem aumentar o desenvolvimento vegetal, especialmente em condições limitantes, como estresses (Nabti *et al.*, 2010).

Outro fator que deve ser levado em consideração é a diversidade bacteriana associada à cultura, pois os manejos podem afetá-la. Barriuso & Mellado (2012), utilizando pirosequenciamento, demonstraram que a aplicação do glifosato em cultivos de algodão resistente não afetaram a comunidade bacteriana da rizosfera. No entanto, Dias *et al.* (2010) verificaram que a diversidade bacteriana cultivável e não cultivável de sedimento de manguezal variou de acordo com o ponto amostrado, as épocas e a profundidade.

Esta diversidade genética pode ser avaliada através de ferramentas da biologia molecular. Para a análise de populações bacterianas por meio de cultivo, é possível realizar a Análise da Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA), com diversas enzimas de restrição. Esta técnica é fundamentada no grau de conservação dos sítios de restrição do rDNA que reflete padrões filogenético (REIS *et al.*, 2002). Para a análise de comunidades microbianas independentes de cultivo, o DNA total é extraído diretamente da amostra. Após a extração, pode-se realizar a Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DDGE – *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (LACAVA *et al.*, 2006; ANDREOTE, 2007).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi isolar e identificar isolados bacterianos de cana-de-açúcar, tolerantes a salinidade e promotores de crescimento vegetal, que possam contribuir para o melhor desenvolvimento desta espécie, tanto em regiões já produtoras, como em regiões do Estado de Pernambuco que possuem solos salinos e que, até então, não são cultivados com a cana-de-açúcar; bem como avaliar a diversidade genética dependente de cultivo, pela técnica da ARDRA e, independente de cultivo, pelo DGGE do gene *nifH*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostra vegetal e solo rizosférico

Foram utilizadas amostras de solo agregado à superfície externa da raiz, sendo aqui considerado solo da rizosfera, e de raiz de plantas da variedade RB 863129 de cana-de-açúcar, coletada no segundo semestre de 2011 (cana-de-açúcar soca com 10 meses de cultivo), em três áreas da Usina Petribu S/A, Lagoa de Itaenga – PE; a primeira área com aplicação de vinhaça há dois anos (V-2 anos), como fertilizante; a segunda, com aplicação de vinhaça há quatro anos (V-4 anos), como fertilizante; e a terceira, sem aplicação de vinhaça (Sem V); sendo três repetições em cada uma das áreas. As amostras foram levadas para o Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana (LGBM) da Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UAG/UFRPE), para serem processadas.

2.2. Caracterização do solo

O solo foi enviado para análise no Laboratório de Solos e Geologia, da Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG/UFRPE). Na caracterização química, foram medidos o pH do solo e a condutividade elétrica do extrato de saturação (CEes), determinando-se os teores de P disponível, K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , H+Al, calculando-se a soma de bases (SB), a capacidade de troca de cátions (CTC) e a saturação por bases (V), pelos métodos descritos em EMBRAPA (1997) (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização química das amostras de solo coletadas nas três áreas cultivadas com cana de açúcar sem e com vinhaça

Área	pH	CEes	P	K^+	Na^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Al^{3+}	H+Al	SB	CTC	V
		$dS\ m^{-1}$	$mg\ kg^{-1}$	$cmol_c\ kg^{-1}$								%
Sem V ¹	5,57	1,96	0,33	0,09	0,22	2,20	0,70	0,05	1,65	3,20	4,85	66,0
V-2 anos ²	6,00	0,95	7,33	0,35	0,22	2,80	1,20	0,05	2,31	4,57	6,88	66,4
V-4 anos ³	5,88	1,14	3,00	0,50	0,30	4,70	2,50	0,05	3,63	8,00	11,63	68,8

¹Solo sem aplicação de vinhaça, coletado no Engenho Granjita (S 07°50,509' e W 035°13,207'), Lote 02; ²Solo com aplicação de vinhaça há dois anos, coletado no Engenho Barro Branco (S 07°55,065' e W 035°14,825'), Lote 51; ³Solo com aplicação de vinhaça há quatro anos, coletado no Engenho Barro Branco (S 07°55, 292' e W 035°14, 909'), Lote 76; todos da Usina Petribu S/A, Lagoa de Itaenga – PE.

2.3. Isolamento de bactérias

Após a coleta, cerca de 5 g do solo rizosférico, coletado após o atrito mecânico de separação do solo com as raízes de plantas de cana-de-açúcar, foram colocadas sob agitação (com tampão PBS - *Phosphate Buffered Saline*) a 120 rpm, à temperatura ambiente, por 40 min, conforme Araújo *et al.* (2010).

As raízes de plantas de cana-de-açúcar foram lavadas em água corrente, para a retirada de resíduos de poeira e solo, passaram por um processo de desinfecção superficial, onde cerca de 3 g de raízes, de cada amostra, foram incubadas em álcool 70% por 1 min, depois passaram 3 min imersas em hipoclorito de sódio (entre 2 a 2,5% do cloro ativo), foram novamente colocadas em outra solução de álcool 70% por 30 seg, e, ao término do processo, passaram por duas lavagens em água destilada estéril. Em seguida, as amostras de raiz foram cortadas, assepticamente, em pequenos fragmentos e triturados em 10 mL de tampão PBS, com o auxílio de pistilos e almofarizes, segundo Araújo *et al.* (2010). Após este processo, todo o material foi transferido para tubos de 50 mL e incubados, sob agitação (120 rpm), à temperatura ambiente, por 40 min.

Em seguida, diluições seriadas apropriadas das soluções foram inoculadas, em triplicata, em placas de Petri contendo meio de cultura TSA (*Tryptone Soy Agar*), acrescido de 0 e 5% de NaCl e incubadas a 28°C por 10 dias.

A purificação das colônias foi realizada pela técnica de esgotamento em meio TSA. Colônias isoladas foram armazenadas em TSA e acondicionadas a 4°C, além de serem estocadas a -20°C, em meio TSA líquido, acrescido de glicerol 20%.

2.4. Seleção de bactérias fixadoras de nitrogênio

A seleção de bactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio foi realizada por meio da inoculação de colônias isoladas, em meio semissólido NFb, livre de fonte nitrogenada, de acordo com Döbereiner *et al.* (1995), sendo incubadas a 28°C por 10 dias. Os experimentos foram realizados em duplicatas e o resultado positivo foi caracterizado pela formação de um halo horizontal no interior do meio de cultura, sendo repicadas por três vezes consecutivas.

2.5. Seleção de bactérias produtoras de ácido indol acético

A seleção de bactérias produtoras de ácido indol acético (AIA) foi realizada por meio do método colorimétrico e específico que caracteriza a produção do fitohormônio (CROZIER *et al.*, 1988).

Colônias isoladas foram inoculadas em meio de cultura líquido TSA, e incubadas a 28°C por 24 h sob agitação (120 rpm). Após esta etapa, cerca de 10 µL da cultura bacteriana foram inoculados em meio líquido TSA 10%, suplementado com 5 mM de L-triptofano, incubados sob agitação (120 rpm) a 28°C, na ausência de luz, por 24 h. Após esta etapa, a cultura bacteriana foi acrescida do reagente de Salkowski (2% de FeCl₃ 0,5 M em 35% de ácido perclórico), na proporção de 1,5:0,5, incubadas por 30 min a 28°C, na ausência de luz. Os experimentos foram realizados em triplicatas e o resultado positivo foi caracterizado pela formação de uma coloração rósea. Para tanto, foi utilizada como controle positivo a linhagem EN303 (*Pseudomonas oryzae*), bactéria endofítica de soja, produtora de auxina, solubilizadora de fosfato inorgânico e fixadora de N₂ (KUKLINSKY-SOBRAL *et al.*, 2004).

Após a seleção de isolados produtores de AIA, foi realizada a quantificação deste fitohormônio por meio da seguinte metodologia: 10 µL da cultura bacteriana foram inoculados em meio líquido TSA 10% suplementado com 5 mM de L-triptofano, incubados sob agitação (120 rpm) a 28°C, na ausência de luz, por 24 h. Após esta etapa, dois mililitros da cultura foram centrifugados a uma rotação de 12.000 g por 5 min. Ao término da centrifugação, a cultura bacteriana foi acrescida do reagente de Salkowski, na proporção de 1,5:0,5, incubadas por 30 min a 28°C, na ausência de luz. Em seguida, as amostras foram avaliadas em espectrofotômetro, sendo as absorbâncias medidas a 530 nm, e, para a conversão das leituras, foi utilizada uma curva padrão, a partir de uma solução de AIA (Vetec) de diferentes concentrações (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 µg L⁻¹) (BARBOSA, 2010). O teste foi realizado em triplicata.

2.6. Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico

A seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico foi realizada por meio da inoculação dos isolados em meio de cultura sólido contendo fosfato insolúvel (10 g L⁻¹ de glicose; 5g L⁻¹ de NH₄Cl; 1g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 4g L⁻¹ de CaHPO₄; 15 g L⁻¹ de ágar; pH 7,2). As placas foram incubadas a 28°C por 72 h e, em seguida,

realizadas as leituras. Os experimentos foram realizados em triplicatas e a presença de um halo claro em torno da colônia indicou a solubilização do fosfato. Foram medidos os halos das colônias e os halos de solubilização para obtenção do Índice de Solubilização (IS) (razão entre o halo de solubilização e halo da colônia).

2.7. Seleção de bactérias produtoras da molécula *quorum sensing* (N-acil homoserina lactona, AHL)

Colônias isoladas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio LB (*Luria-Bertani*) acrescido de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) por toda a superfície. Transversalmente e próxima aos isolados, a bactéria *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4), biossensor de AHLs, também foi inoculada. De acordo com metodologia descrita por Szenthe & Page (2003) e Quecine (2010), após incubação a 28°C por 48 h, pode-se observar, para o teste positivo, as colônias de *A. tumefaciens* com pigmentação azul, indicando a produção de AHLs pelo isolado avaliado. O teste foi realizado em duplicata.

2.8. Análise da variabilidade genética bacteriana pela técnica da Análise da Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA)

Para a análise da variabilidade genética, os isolados bacterianos foram inoculados, a partir de colônias isoladas, em 4 mL de meio líquido TSA 10%, incubadas a 28°C sob agitação constante (120 rpm) por 24 horas. Após o período de crescimento, a cultura foi transferida para microtubos autoclavados de 2 mL, centrifugados a $12.000 g$ por 5min, descartando-se o sobrenadante, e repetindo-se o procedimento, até utilizar todo o meio de cultura com o crescimento bacteriano. O *pellet* formado, ao final do processo de centrifugação, foi ressuspenso em 300 μL de TE (10 mM de Tris-HCl; 1 mM de EDTA; pH 8,0), sendo utilizado como fonte de DNA.

As amostras de DNA dos isolados foram submetidas à amplificação do gene 16S rRNA, utilizando os *primers* PO27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e R1387 (5'-GCCCCGGGAACGTATTCACCG-3'). As reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram preparadas para um volume final de 50 μL , contendo 0,5 a 10 ng de DNA molde; 2,5 mM de cada dNTP; 25 mM de MgCl_2 ; 1x do tampão da enzima KCl, 100 μM do *primer* PO27F e 100 μM do *primer* R1387; e, 5U da enzima Taq DNA

Polimerase (Fermentas). A reação de PCR foi realizada em termociclador, com a seguinte condição de ciclo: 94°C por 4 minutos, seguido de 25 ciclos para desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 63°C por 1 minuto, extensão de *primer* a 72°C por 1 minuto, e seguida de extensão final a 72°C por 7 minutos.

Todos os produtos de PCR foram verificados em gel de agarose 1,2% em TAE 1X (40 mM de Tris-acetato; 1 mM de EDTA), para confirmação da amplificação do produto desejado, ou seja, uma banda com cerca de 1350 pb.

Com o gene 16S rRNA amplificado, a análise da diversidade genética dos isolados foi realizada por meio da técnica da ARDRA. A digestão foi realizada utilizando as enzimas de restrição *Mbol* e *BsuRI* (Fermentas). As reações foram preparadas para um volume final de 11 µL, contendo 1 µL do tampão da enzima R; 0,3 µL para cada enzima (separadamente) e 7 µL da reação do PCR 16S rDNA. A reação foi incubada a 37°C por 2 h para que fosse possível a digestão enzimática.

Após a amplificação, toda a reação de digestão foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (2,5% p/v) em tampão TAE 1X, corado com *Blue Green Loading Dye* (LGC Bio), observado sobre luz ultravioleta e fotodocumentado.

As bandas geradas pela amplificação foram transformadas em dados binários e, com estes, foi construída uma planilha que foi analisada através do software Past 1.90 (HAMMER *et al.*, 2001), empregando-se o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) e aplicado o Coeficiente de Jaccard para obter-se a matriz de similaridade entre as linhagens analisadas.

2.9. Análise da diversidade bacteriana não cultivável pela técnica de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)

As mesmas amostras de rizosfera e raízes de plantas de cana-de-açúcar, cultivadas nos diferentes solos, foram utilizadas para a extração de DNA total, por meio do ‘Power Soil DNA kit’ (MoBio; EUA), segundo recomendações do fabricante. Após a extração, os DNAs foram encaminhados ao Laboratório de Microbiologia do Solo, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), e foram amplificados, utilizando os *primers* FGPH19 (5'-TACGGCAARGGTGGNATH-3') e PolR (5'-ATSGCCATCATYTCRCCG-3'), específicos para o gene *nifH*, seguindo metodologia descrita a seguir.

A amplificação ocorreu em 25 μL de volume final, contendo 0,2 mM de dNTP; 1X de Taq Buffer (Fermentas); 2,5 mM de MgCl_2 ; 0,05 μL de BSA (bovine serum albumin), 0,25 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de Taq DNA Polimerase (Fermentas); 1 μM de cada *primer* e 10 ng de DNA total do solo ou da raiz, sendo o restante do volume completado com água ultra pura autoclavada. As condições da amplificação foram: 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94 °C; 1 min a 56 °C; 2 min a 72 °C e 30 min a 72 °C.

Uma segunda reação de amplificação foi realizada, utilizando-se os produtos da amplificação como fonte de DNA, com os *primers* PolF-GC (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCCGCCCCGCCCCCTGCGAYCCSAA RGCBGACTC-3') e AQER (5'-ACGATGTAGATYTCCTG-3'). A amplificação ocorreu em 50 μL de volume final, contendo: 0,2 mM de dNTP; 1X de Taq Buffer (Fermentas); 2,0 mM de MgCl_2 ; 0,25 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de Taq DNA Polimerase (Fermentas); 1 μM de cada *primer* e 2 μL do PCR da 1ª reação (10 ng de DNA), sendo o restante do volume completado com água ultra pura autoclavada. Os ciclos de amplificação foram 5 min a 94 °C; 30 ciclos de 1 min a 94 °C; 1 min a 48 °C; 2 min a 72 °C e 30 min a 72 °C.

Todos os produtos de PCR foram verificados em gel de agarose 1% em TAE 1X, para confirmação da amplificação do produto desejado.

O produto da última amplificação foi utilizado para a análise do DGGE, segundo metodologia realizada por Andreote (2007).

As bandas geradas pela amplificação foram transformadas em dados binários e, com estes, houve a construção de uma planilha, que foi analisada através do software Past 1.90 (HAMMER *et al.*, 2001), empregando-se o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) e aplicando o Coeficiente de Jaccard, para obter-se a matriz de similaridade entre as linhagens analisadas.

2.10. Análise estatística

O teste do qui-quadrado (χ^2), com probabilidade de 5%, foi utilizado para verificar a possível influência dos seguintes tratamentos: rizosfera e endofíticos, aplicação ou não de vinhaça, presença ou ausência do NaCl, sobre a expressão bacteriana das características avaliadas. Os resultados da quantificação do ácido indol acético e do Índice de Solubilização de Fosfato foram avaliados pelo teste de Scott-Knott, com probabilidade de 5%, através do programa SISVAR 5.3.

3. RESULTADOS

3.1. Isolamento de bactérias

Durante os experimentos de isolamento, foram obtidos 102 isolados bacterianos da variedade RB 863129 de cana-de-açúcar (soca), após 10 meses de cultivo em três áreas da Usina Petribu, em Pernambuco. Sendo 41 da rizosfera e 61 endofíticos de raiz, que foram purificados em meio TSA e nomeados em UAGCV1 a UAGCV120.

Quanto à distribuição dos isolados com relação à aplicação de vinhaça, foram obtidos 39 da área sem aplicação de vinhaça, 35 da área com aplicação há dois anos e 28 da área com aplicação há quatro anos. Dos 102 isolados, 48 foram isolados em meio TSA com o acréscimo de sal, como pode ser observado na Tabela 2.

A caracterização da morfologia dos isolados permitiu a observação de vários grupos morfológicos, dentre eles, laranja, bege, branco, amarelo, rosa forte, entre outros; sendo selecionados isolados representantes de cada grupo. A Figura 1 é uma representante do isolamento bacteriano, mostrando alguns dos grupos morfológicos.

Quanto à densidade populacional bacteriana, foi observado que não houve diferença estatística entre os nichos, rizosfera e endofíticos de raiz; entre os tratamentos com e sem aplicação de vinhaça; e, com a presença ou ausência de sal, como pode ser observado na Figura 2.

Tabela 2. Distribuição dos isolados bacterianos quanto ao nicho, ao manejo e a presença ou ausência de NaCl no meio de cultura.

Isolado	Nicho	Manejo ¹	Presença de NaCl ²
UAGCV1	Rizosfera	Sem V	Não
UAGCV2	Rizosfera	Sem V	Não
UAGCV3	Rizosfera	Sem V	Não
UAGCV4	Rizosfera	Sem V	Não
UAGCV5	Rizosfera	Sem V	Não
UAGCV6	Rizosfera	Sem V	Não
UAGCV7	Rizosfera	Sem V	Não
UAGCV8	Rizosfera	Sem V	Não
UAGCV10	Endofítico	Sem V	Não
UAGCV11	Endofítico	Sem V	Não
UAGCV12	Endofítico	Sem V	Não
UAGCV13	Endofítico	Sem V	Não
UAGCV14	Endofítico	Sem V	Não

UAGCV15	Endofítico	Sem V	Não
UAGCV16	Endofítico	Sem V	Não
UAGCV17	Endofítico	Sem V	Não
UAGCV18	Endofítico	Sem V	Não
UAGCV19	Rizosfera	V-2 anos	Não
UAGCV20	Rizosfera	V-2 anos	Não
UAGCV22	Rizosfera	V-2 anos	Não
UAGCV23	Rizosfera	V-2 anos	Não
UAGCV24	Rizosfera	V-2 anos	Não
UAGCV25	Rizosfera	V-2 anos	Não
UAGCV26	Rizosfera	V-2 anos	Não
UAGCV28	Endofítico	V-2 anos	Não
UAGCV29	Endofítico	V-2 anos	Não
UAGCV30	Endofítico	V-2 anos	Não
UAGCV31	Endofítico	V-2 anos	Não
UAGCV32	Endofítico	V-2 anos	Não
UAGCV33	Endofítico	V-2 anos	Não
UAGCV34	Endofítico	V-2 anos	Não
UAGCV35	Endofítico	V-2 anos	Não
UAGCV36	Endofítico	V-2 anos	Não
UAGCV37	Rizosfera	V-4 anos	Não
UAGCV39	Rizosfera	V-4 anos	Não
UAGCV40	Rizosfera	V-4 anos	Não
UAGCV41	Rizosfera	V-4 anos	Não
UAGCV42	Rizosfera	V-4 anos	Não
UAGCV44	Rizosfera	V-4 anos	Não
UAGCV45	Rizosfera	V-4 anos	Não
UAGCV46	Endofítico	V-4 anos	Não
UAGCV47	Endofítico	V-4 anos	Não
UAGCV48	Endofítico	V-4 anos	Não
UAGCV49	Endofítico	V-4 anos	Não
UAGCV50	Endofítico	V-4 anos	Não
UAGCV51	Endofítico	V-4 anos	Não
UAGCV52	Endofítico	V-4 anos	Não
UAGCV53	Endofítico	V-4 anos	Não
UAGCV54	Endofítico	V-4 anos	Não
UAGCV55	Rizosfera	Sem V	Sim
UAGCV56	Rizosfera	Sem V	Sim
UAGCV57	Rizosfera	Sem V	Sim
UAGCV58	Rizosfera	Sem V	Sim
UAGCV59	Rizosfera	Sem V	Sim
UAGCV60	Rizosfera	Sem V	Sim
UAGCV61	Rizosfera	Sem V	Sim
UAGCV62	Rizosfera	Sem V	Sim
UAGCV63	Rizosfera	Sem V	Sim
UAGCV64	Endofítico	Sem V	Sim
UAGCV65	Endofítico	Sem V	Sim
UAGCV66	Endofítico	Sem V	Sim

UAGCV67	Endofítico	Sem V	Sim
UAGCV68	Endofítico	Sem V	Sim
UAGCV69	Endofítico	Sem V	Sim
UAGCV70	Endofítico	Sem V	Sim
UAGCV71	Endofítico	Sem V	Sim
UAGCV72	Endofítico	Sem V	Sim
UAGCV74	Rizosfera	V-2 anos	Sim
UAGCV76	Rizosfera	V-2 anos	Sim
UAGCV77	Rizosfera	V-2 anos	Sim
UAGCV78	Rizosfera	V-2 anos	Sim
UAGCV80	Endofítico	V-2 anos	Sim
UAGCV81	Endofítico	V-2 anos	Sim
UAGCV82	Endofítico	V-2 anos	Sim
UAGCV83	Endofítico	V-2 anos	Sim
UAGCV84	Endofítico	V-2 anos	Sim
UAGCV85	Endofítico	V-2 anos	Sim
UAGCV86	Endofítico	V-2 anos	Sim
UAGCV87	Endofítico	V-2 anos	Sim
UAGCV88	Endofítico	V-2 anos	Sim
UAGCV89	Endofítico	V-2 anos	Sim
UAGCV90	Endofítico	V-2 anos	Sim
UAGCV91	Endofítico	V-2 anos	Sim
UAGCV93	Rizosfera	V-4 anos	Sim
UAGCV94	Rizosfera	V-4 anos	Sim
UAGCV96	Rizosfera	V-4 anos	Sim
UAGCV101	Endofítico	V-4 anos	Sim
UAGCV102	Endofítico	V-4 anos	Sim
UAGCV104	Endofítico	V-4 anos	Sim
UAGCV105	Endofítico	V-4 anos	Sim
UAGCV106	Endofítico	V-4 anos	Sim
UAGCV107	Endofítico	V-4 anos	Sim
UAGCV108	Endofítico	V-4 anos	Sim
UAGCV109	Endofítico	V-4 anos	Sim
UAGCV110	Rizosfera	Sem V	Não
UAGCV112	Rizosfera	Sem V	Não
UAGCV114	Rizosfera	V-4 anos	Não
UAGCV116	Endofítico	V-2 anos	Não
UAGCV117	Endofítico	V-2 anos	Não
UAGCV118	Endofítico	Sem V	Sim
UAGCV119	Endofítico	Sem V	Sim
UAGCV120	Endofítico	V-2 anos	Sim

¹V-2 anos: área com aplicação de vinhaça há dois anos, como fertilizante; V-4 anos: área com aplicação de vinhaça há quatro anos, como fertilizante; Sem V: área sem aplicação de vinhaça.

²Presença ou ausência de NaCl no meio de cultura TSA no isolamento.

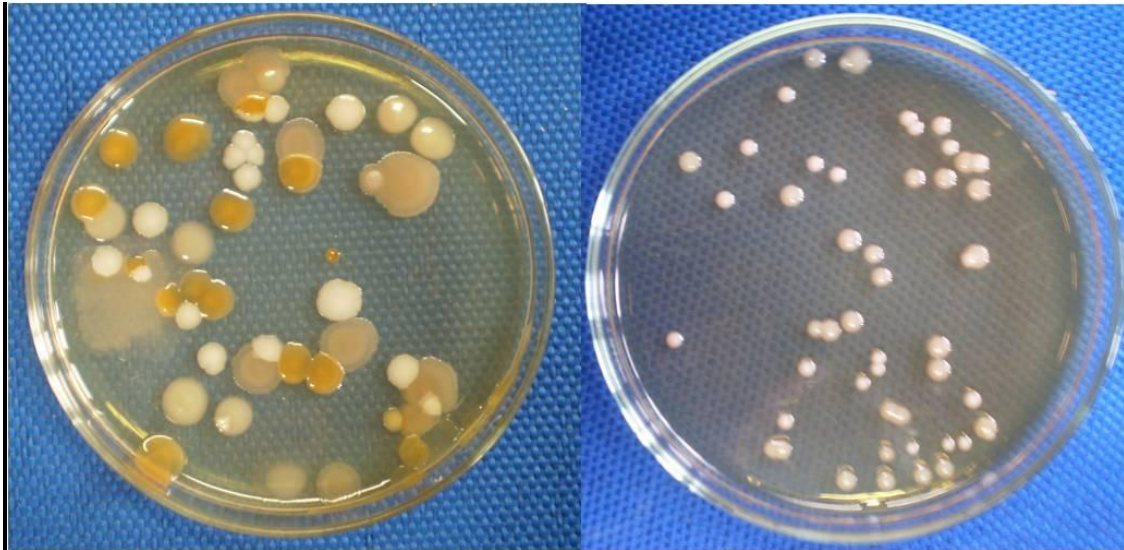


Figura 1. Placas de Petri do isolamento de bactérias da rizosfera e associadas endofiticamente as raízes de plantas de cana-de-açúcar, em meio de cultura TSA.

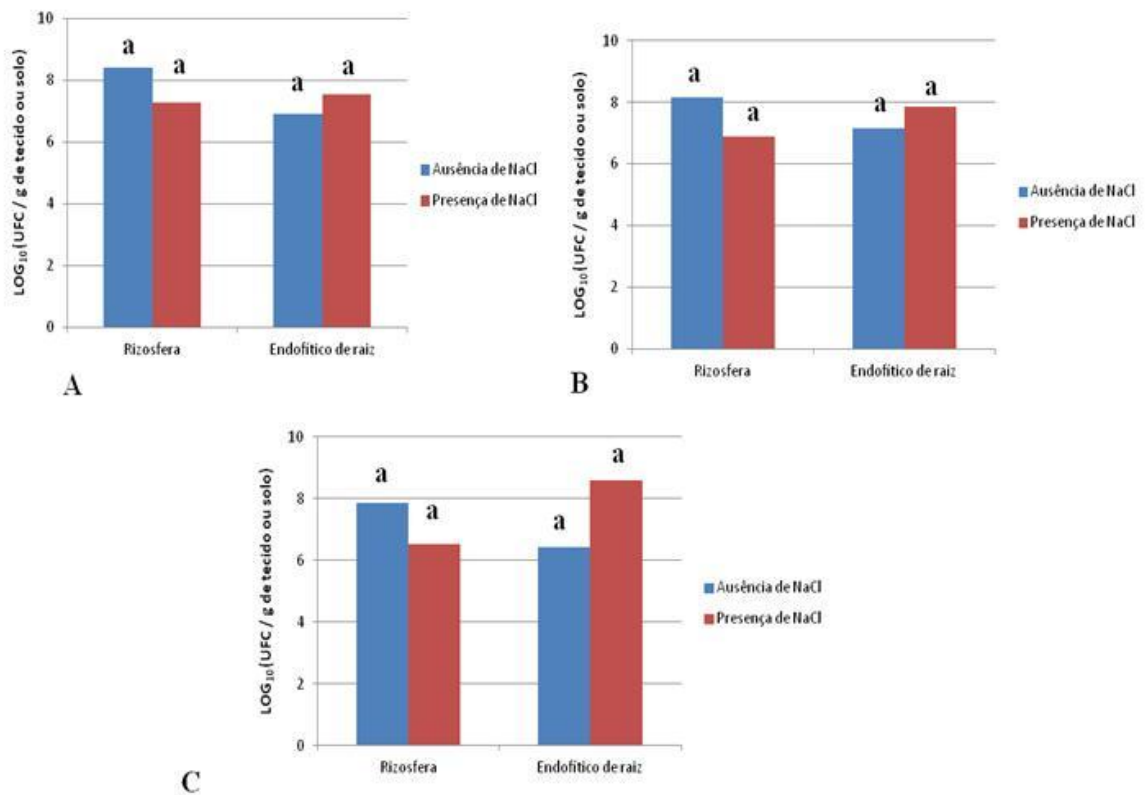


Figura 2. Densidade populacional bacteriana com relação ao nicho e a presença ou ausência de sal (NaCl): **A** – Área sem aplicação de vinhaça; **B** – Área com aplicação de vinhaça há dois anos; e, **C** – Área com aplicação de vinhaça há quatro anos. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si,

tanto nos nichos, como na presença ou ausência de sal, de acordo com o teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

3.2. Seleção de bactérias fixadoras de nitrogênio

Foi observado que dos 102 isolados testados, 72,5% foram positivos para o potencial de fixação biológica de nitrogênio (FBN), ou seja, apresentaram um halo horizontal de coloração branca no interior do meio de cultura, conforme ilustrado na Figura 3. Dentre os isolados positivos, 66,22% são provenientes da raiz (a análise pelo teste do χ^2 revelou haver influência dos tratamentos) e 50% do meio com acréscimo de sal (a análise pelo teste do χ^2 revelou não haver influência dos tratamentos).

Os tratamentos sem vinhaça, com vinhaça há dois anos e com vinhaça há quatro anos obtiveram, aproximadamente, 42, 30 e 28%, respectivamente, de isolados positivos para a fixação biológica. Para este último resultado, a análise pelo teste do χ^2 revelou não haver influência dos tratamentos.

Quando se comparou a distribuição dos isolados positivos para FBN, de acordo com a presença de vinhaça e a região da planta, verificou-se que, em todos os casos, os isolados endofíticos de raiz se sobressaíram (Figura 4). Isto também ocorreu na presença e na ausência de sal no meio de cultura (Figura 5).

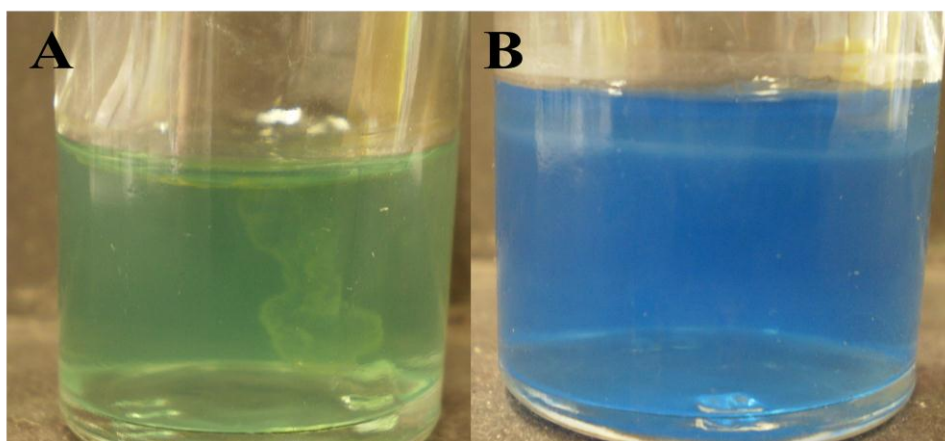


Figura 3. Teste de fixação de nitrogênio em meio NFb. A) Isolado negativo, ausência da névoa de crescimento; B) Isolado positivo, apresentando uma névoa de crescimento.

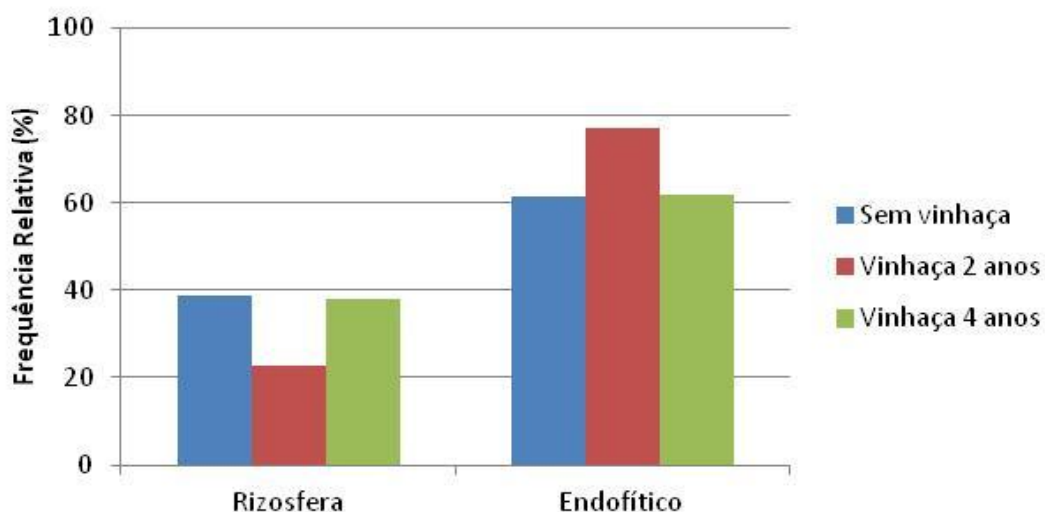


Figura 4. Distribuição dos isolados fixadores de nitrogênio em relação ao uso da vinhaça e região da planta hospedeira. A análise pelo teste do χ^2 revelou haver influência dos tratamentos entre nichos ($P < 0,05$).

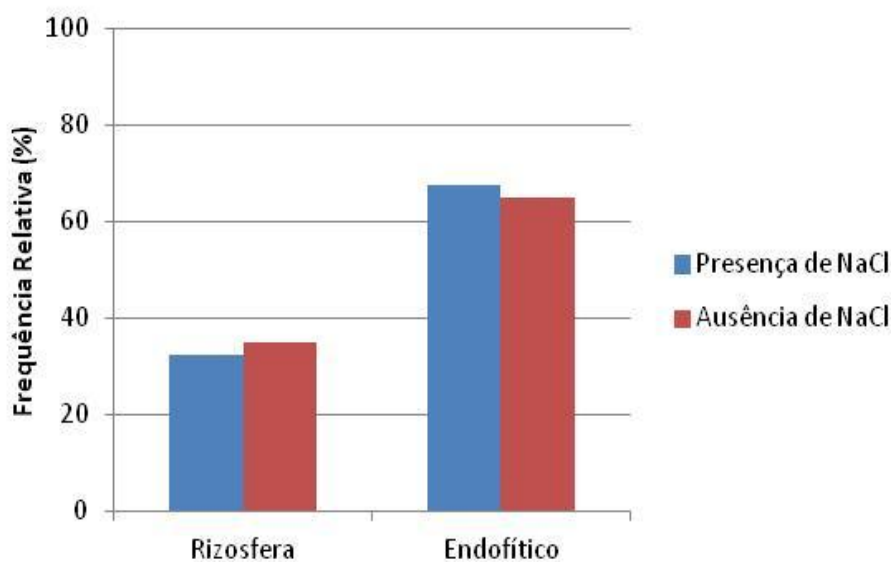


Figura 5. Distribuição dos isolados fixadores de nitrogênio em relação à presença de sal no meio de cultura (NaCl). A análise pelo teste do χ^2 revelou haver influência dos tratamentos entre nichos ($P < 0,05$).

3.3. Seleção de bactérias produtoras de ácido indol acético (AIA)

Quanto à produção de AIA, 100% dos isolados foram positivos. Na Figura 6 observam-se os padrões de cores observadas durante os testes de seleção de bactérias

produtoras de ácido indol acético, com uma gradação na intensidade de cor em função da produção de AIA. Alguns isolados tiveram produção muito baixa, a exemplo do UAGCV7 com $1,45 \mu\text{g mL}^{-1}$; enquanto outros apresentaram alta produção, como o isolado UAGCV117, com $162,23 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Como se pode observar na produção de AIA pelos isolados (Tabela 3), foram obtidos sete grupos de produção, onde os dois maiores produtores foram endofíticos de raiz, isolados em meio sem o acréscimo de sal, sendo um da área com aplicação de vinhaça há dois anos (UAGCV117) e outro há quatro anos (UAGCV51).



Figura 6. Padrões de cores observados durante os testes de seleção de bactérias produtoras de ácido indol acético (AIA).

Tabela 3. Produção de ácido indol acético pelos isolados bacterianos, em meio TSA com acréscimo de L-triptofano (em $\mu\text{g mL}^{-1}$)

Isolado bacteriano	Produção de AIA $\mu\text{g mL}^{-1}$	Isolado bacteriano	Produção de AIA $\mu\text{g mL}^{-1}$	Isolado bacteriano	Produção de AIA $\mu\text{g mL}^{-1}$
UAGCV7	1,451g	UAGCV78	16,675g	UAGCV33	77,529d
UAGCV1	2,054g	UAGCV94	17,883g	UAGCV63	78,435d
UAGCV22	2,184g	UAGCV85	18,832g	UAGCV28	79,212d
UAGCV19	2,486g	UAGCV108	19,780g	UAGCV54	79,729d
UAGCV8	3,133g	UAGCV109	19,781g	UAGCV4	80,419d
UAGCV44	3,737g	UAGCV105	19,996g	UAGCV30	81,799d
UAGCV39	4,038g	UAGCV32	20,686g	UAGCV107	82,360d
UAGCV87	4,944g	UAGCV53	21,721g	UAGCV48	95,126d
UAGCV20	5,074g	UAGCV15	21,764g	UAGCV29	103,191c

UAGCV3	5,721g	UAGCV46	22,066g	UAGCV96	103,752c
UAGCV41	5,850g	UAGCV31	22,541g	UAGCV83	103,967c
UAGCV40	5,936g	UAGCV114	24,999f	UAGCV49	104,442c
UAGCV23	5,936g	UAGCV80	25,128f	UAGCV119	106,167c
UAGCV56	5,979g	UAGCV47	26,939f	UAGCV 89	107,202c
UAGCV25	6,238g	UAGCV88	27,457f	UAGCV 12	109,099c
UAGCV24	6,411g	UAGCV110	28,018f	UAGCV 50	109,660c
UAGCV26	6,669g	UAGCV2	28,148f	UAGCV 42	110,264c
UAGCV17	6,928g	UAGCV10	33,797f	UAGCV112	111,644c
UAGCV37	7,317g	UAGCV11	43,285e	UAGCV69	112,248c
UAGCV45	9,861g	UAGCV34	43,458e	UAGCV65	113,240c
UAGCV93	9,990g	UAGCV116	44,666e	UAGCV104	115,483c
UAGCV58	10,077g	UAGCV70	46,520e	UAGCV106	121,175c
UAGCV55	10,853g	UAGCV36	46,908e	UAGCV91	122,556c
UAGCV59	11,457g	UAGCV90	50,876e	UAGCV68	123,375c
UAGCV57	11,586g	UAGCV13	54,585e	UAGCV66	123,677c
UAGCV61	12,061g	UAGCV52	61,917d	UAGCV118	123,893c
UAGCV81	12,147g	UAGCV5	62,003d	UAGCV35	129,413b
UAGCV 60	12,406g	UAGCV67	62,133d	UAGCV72	130,793b
UAGCV 62	12,664g	UAGCV71	62,133d	UAGCV82	131,441b
UAGCV 77	13,699g	UAGCV6	65,324d	UAGCV102	137,478b
UAGCV 74	14,347g	UAGCV64	65,540d	UAGCV101	137,737b
UAGCV 76	14,821g	UAGCV86	71,147d	UAGCV120	138,901b
UAGCV 84	15,338g	UAGCV18	73,044d	UAGCV51	153,953a
UAGCV 16	15,726g	UAGCV14	76,624d	UAGCV117	162,234a

Médias seguidas por letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.4. Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico

Dos 102 isolados analisados, 75,5% foram positivos para a solubilização do fosfato inorgânico, ou seja, apresentaram o halo de solubilização (Figura 7). Considerando-se o nicho de origem dos isolados bacterianos, 74% são endofíticos de raiz e 26% da rizosfera de cana-de-açúcar (a análise pelo teste do χ^2 revelou haver influência do tratamento).

Ao avaliar os efeitos da ausência de vinhaça, sua aplicação há dois anos e há quatro anos, foi observado uma frequência de 35, 36 e 29% de isolados positivos à solubilização de fosfato, respectivamente. Considerando-se a presença de sal, 56,8% dos isolados positivos foram provenientes de meio de cultura com o acréscimo de sal. Para estes últimos, a análise pelo teste do χ^2 revelou não haver influência nos tratamentos.

Assim como para a FBN, ao se comparar a distribuição dos isolados positivos para solubilização de fosfato, de acordo com a presença de vinhaça e a região da planta,

nota-se que, em todos os casos, os isolados endofíticos de raiz se sobressaíram (Figura 8). Isto também ocorreu na presença e na ausência de sal no meio de cultura (Figura 9).

De acordo com a Tabela 4, as bactérias foram reunidas em três grupos com índices de solubilização de fosfato (IS) significativamente diferentes, com base na análise de médias. Deste modo, os isolados foram classificados como grupo A, com 9,10% das bactérias, apresentando valores de IS entre 2,09 e 2,49; grupo B, com 20,78%, apresentando IS entre 1,67 e 2,00; e o grupo C, com 70,12%, apresentando IS entre 1,11 e 1,60.

Os sete isolados que obtiveram o maior índice de solubilização, do grupo A, são provenientes da área com aplicação de vinhaça há dois anos e endofíticos de raiz, sendo quatro isolados do meio de cultura sem o acréscimo de sal (UAGCV31, UAGCV32, UAGCV33 e UAGCV36) e três do meio de cultura com o acréscimo de sal (UAGCV80, UAGCV87 e UAGCV88).

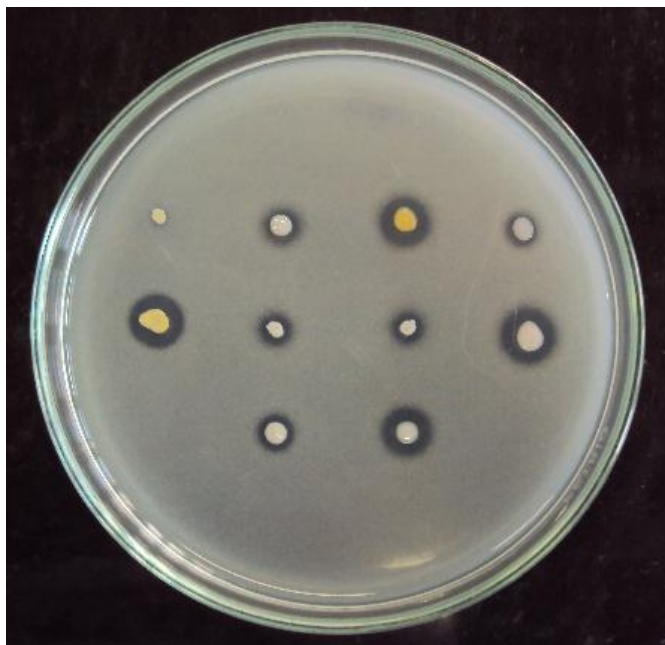


Figura 7. Detecção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico: crescimento bacteriano em meio de cultura suplementado com fosfato insolúvel.

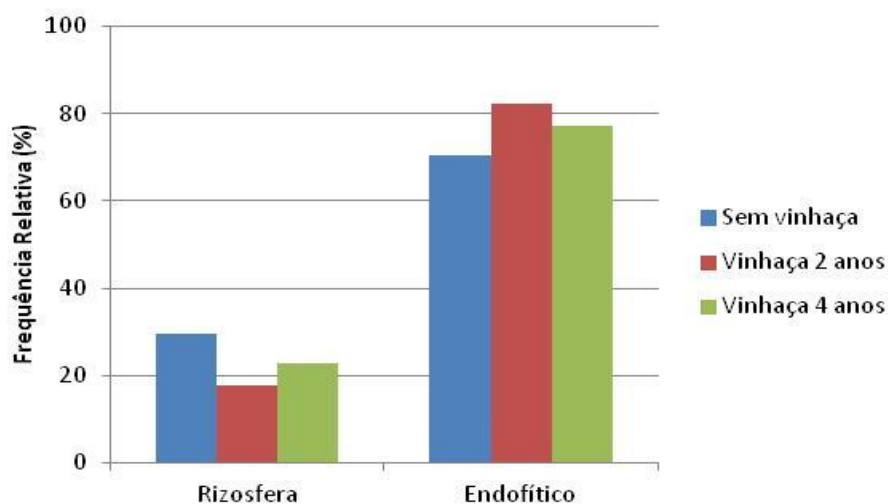


Figura 8. Distribuição dos isolados solubilizadores de fosfato quanto a presença de vinhaça e região da planta hospedeira. A análise pelo teste do χ^2 revelou haver influência dos tratamentos entre nichos ($P < 0,05$).

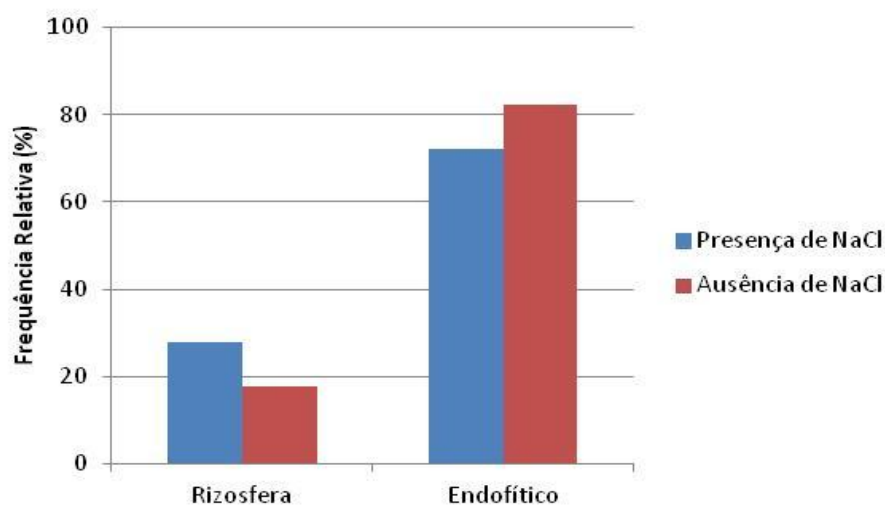


Figura 9. Distribuição dos isolados solubilizadores de fosfato quanto a presença de sal no meio de cultura (NaCl). A análise pelo teste do χ^2 revelou haver influência dos tratamentos entre nichos ($P < 0,05$).

Tabela 4. Índice de Solubilização de fosfato dos isolados bacterianos de cana-de-açúcar

Isolado bacteriano	IS	Isolado bacteriano	IS	Isolado bacteriano	IS
UAGCV18	1,11c	UAGCV53	1,36c	UAGCV47	1,58c
UAGCV77	1,12c	UAGCV117	1,37c	UAGCV90	1,60c
UAGCV26	1,13c	UAGCV82	1,37c	UAGCV16	1,67b

UAGCV60	1,16c	UAGCV93	1,38c	UAGCV114	1,68b
UAGCV74	1,17c	UAGCV59	1,39c	UAGCV35	1,71b
UAGCV24	1,18c	UAGCV116	1,40c	UAGCV91	1,75b
UAGCV94	1,21c	UAGCV71	1,40c	UAGCV101	1,77b
UAGCV17	1,21c	UAGCV69	1,41c	UAGCV13	1,79b
UAGCV65	1,22c	UAGCV54	1,41c	UAGCV86	1,79b
UAGCV76	1,24c	UAGCV106	1,42c	UAGCV104	1,80b
UAGCV4	1,26c	UAGCV34	1,43c	UAGCV49	1,83b
UAGCV61	1,27c	UAGCV52	1,44c	UAGCV105	1,83b
UAGCV118	1,27c	UAGCV28	1,44c	UAGCV96	1,83b
UAGCV62	1,28c	UAGCV48	1,44c	UAGCV50	1,89b
UAGCV85	1,31c	UAGCV46	1,45c	UAGCV72	1,90b
UAGCV67	1,31c	UAGCV83	1,45c	UAGCV70	1,91b
UAGCV84	1,32c	UAGCV63	1,47c	UAGCV14	1,97b
UAGCV108	1,32c	UAGCV41	1,47c	UAGCV102	2,00b
UAGCV29	1,32c	UAGCV64	1,47c	UAGCV32	2,09a
UAGCV7	1,32c	UAGCV109	1,48c	UAGCV88	2,12a
UAGCV107	1,34c	UAGCV119	1,48c	UAGCV80	2,16a
UAGCV10	1,34c	UAGCV120	1,52c	UAGCV87	2,20a
UAGCV12	1,35c	UAGCV89	1,52c	UAGCV31	2,29a
UAGCV30	1,35c	UAGCV11	1,55c	UAGCV36	2,29a
UAGCV56	1,35c	UAGCV68	1,55c	UAGCV33	2,49a
UAGCV66	1,36c	UAGCV51	1,58c		

Médias seguidas por letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.5. Seleção de bactérias produtoras da molécula *quorum sensing* (N-acil homoserina lactona, AHL)

Dos 102 isolados analisados, 49% foram positivos para a produção da molécula *quorum sensing* (N-acil homoserina lactona, AHL), pois as colônias de *A. tumefaciens* apresentaram a pigmentação azul (Figura 10). Dos isolados positivos, 44% foram provenientes da rizosfera e 56% endofíticos de raiz das plantas de cana-de-açúcar (a análise pelo teste do χ^2 revelou não haver influência dos tratamentos).

Quanto à aplicação de vinhaça há quatro anos, há dois anos e à ausência de aplicação, foram obtidos 26, 26 e 48% de isolados positivos, respectivamente, em relação a esta capacidade. Com relação à presença de sal no meio de cultura, 64% dos isolados positivos foram provenientes do meio sem o acréscimo de NaCl. A análise pelo teste do χ^2 revelou haver influência destes tratamentos.

Ao se comparar a distribuição dos isolados positivos para a produção de AHL, de acordo com a presença de vinhaça e a região da planta, nota-se que os isolados da rizosfera se sobressaíram na ausência de vinhaça, enquanto que nos outros tratamentos

os isolados endofíticos de raiz tiveram maior frequência relativa (Figura 11). Já com relação à presença e à ausência de sal no meio de cultura, apenas os isolados endofíticos se destacaram (Figura 12).

Vale ressaltar que, dos 102 isolados, 33 foram positivos para os quatro testes. Na Tabela 5 encontra-se a distribuição dos isolados positivos para cada teste de promoção de crescimento vegetal.

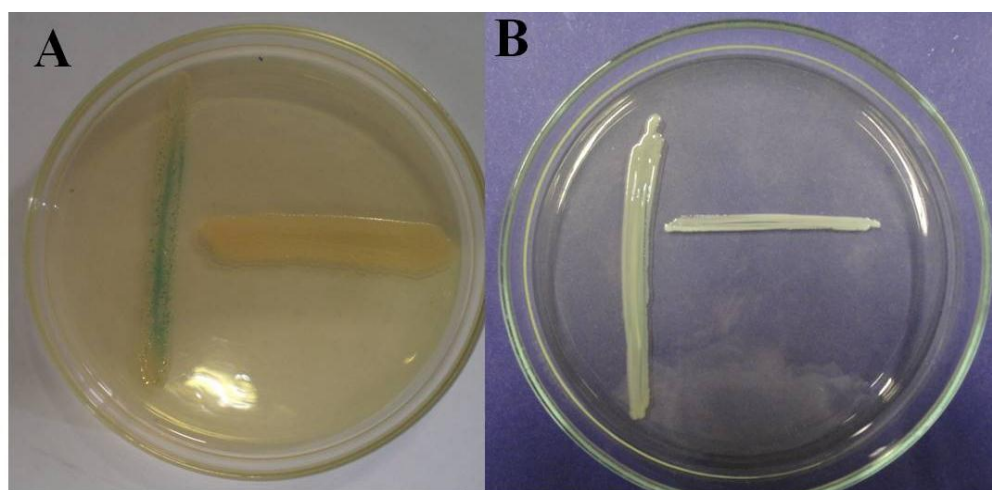


Figura 10. Detecção da produção de *quorum sensing* AHL devido à coloração azul da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4), inoculada verticalmente em relação ao isolado teste. A: Positivo; B: Negativo.

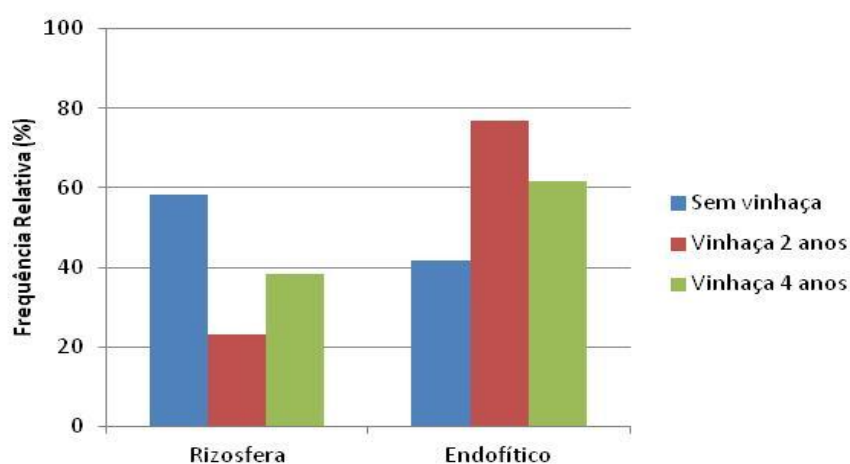


Figura 11. Distribuição dos isolados produtores de AHL quanto à presença de vinhaça e região da planta hospedeira. A análise pelo teste do χ^2 revelou haver influência dos tratamentos entre nichos e na presença ou ausência de vinhaça ($P < 0,05$).

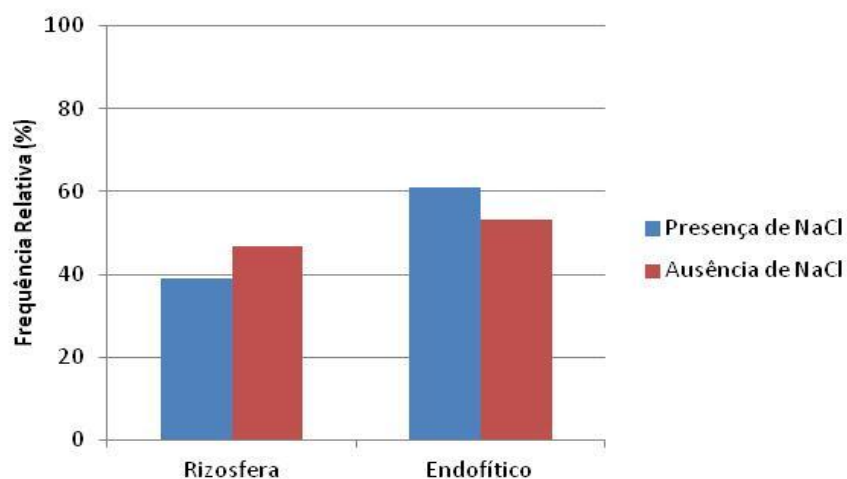


Figura 12. Distribuição dos isolados produtores de AHL quanto à presença de sal no meio de cultura (NaCl). A análise pelo teste do χ^2 revelou haver influência dos tratamentos entre nichos ($P < 0,05$).

Tabela 5. Distribuição dos isolados positivos para cada teste de promoção de crescimento vegetal

Isolado	FBN	Produção de AHL	Solubilização de fosfato	Produção de AIA
UAGCV1	+	+	-	+
UAGCV2	+	+	-	+
UAGCV3	+	+	-	+
UAGCV4	+	+	+	+
UAGCV5	-	+	-	+
UAGCV6	-	+	-	+
UAGCV7	+	-	+	+
UAGCV8	+	+	-	+
UAGCV10	+	+	+	+
UAGCV11	+	+	+	+
UAGCV12	+	-	+	+
UAGCV13	+	-	+	+
UAGCV14	+	+	+	+
UAGCV15	+	+	-	+
UAGCV16	+	+	+	+
UAGCV17	+	+	+	+
UAGCV18	+	+	+	+
UAGCV19	-	-	-	+
UAGCV20	-	-	-	+
UAGCV22	-	-	-	+
UAGCV23	-	-	-	+

UAGCV24	+	-	+	+
UAGCV25	-	+	-	+
UAGCV26	-	+	+	+
UAGCV28	-	-	+	+
UAGCV29	+	+	+	+
UAGCV30	+	+	+	+
UAGCV31	-	-	+	+
UAGCV32	+	+	+	+
UAGCV33	+	+	+	+
UAGCV34	-	+	+	+
UAGCV35	+	-	+	+
UAGCV36	+	-	+	+
UAGCV37	+	+	-	+
UAGCV39	+	+	-	+
UAGCV40	-	-	-	+
UAGCV41	+	-	+	+
UAGCV42	-	+	-	+
UAGCV44	+	-	-	+
UAGCV45	-	-	-	+
UAGCV46	-	-	+	+
UAGCV47	-	-	+	+
UAGCV48	+	-	+	+
UAGCV49	+	-	+	+
UAGCV50	+	+	+	+
UAGCV51	+	+	+	+
UAGCV52	+	-	+	+
UAGCV53	+	+	+	+
UAGCV54	+	+	+	+
UAGCV55	-	-	-	+
UAGCV56	+	+	+	+
UAGCV57	+	-	-	+
UAGCV58	-	-	-	+
UAGCV59	+	+	+	+
UAGCV60	-	+	+	+
UAGCV61	+	+	+	+
UAGCV62	+	+	+	+
UAGCV63	-	-	+	+
UAGCV64	+	+	+	+
UAGCV65	+	-	+	+
UAGCV66	+	-	+	+
UAGCV67	+	-	+	+
UAGCV68	+	+	+	+
UAGCV69	+	-	+	+
UAGCV70	+	-	+	+
UAGCV71	+	-	+	+
UAGCV72	-	-	+	+
UAGCV74	+	-	+	+
UAGCV76	+	-	+	+

UAGCV77	+	+	+	+
UAGCV78	+	-	-	+
UAGCV80	+	-	+	+
UAGCV81	-	-	-	+
UAGCV82	-	-	+	+
UAGCV83	-	-	+	+
UAGCV84	+	-	+	+
UAGCV85	-	+	+	+
UAGCV86	+	+	+	+
UAGCV87	+	-	+	+
UAGCV88	+	+	+	+
UAGCV89	+	+	+	+
UAGCV90	+	-	+	+
UAGCV91	+	-	+	+
UAGCV93	+	-	+	+
UAGCV94	+	+	+	+
UAGCV96	+	-	+	+
UAGCV101	-	-	+	+
UAGCV102	+	+	+	+
UAGCV104	+	+	+	+
UAGCV105	+	+	+	+
UAGCV106	+	-	+	+
UAGCV107	+	-	+	+
UAGCV108	+	+	+	+
UAGCV109	-	-	+	+
UAGCV110	+	+	-	+
UAGCV112	-	+	-	+
UAGCV114	+	+	+	+
UAGCV116	+	-	+	+
UAGCV117	+	+	+	+
UAGCV118	+	+	+	+
UAGCV119	+	-	+	+
UAGCV120	+	-	+	+

3.6. Análise da variabilidade genética bacteriana pela técnica da Análise da Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA)

A análise da diversidade genética, pela técnica de ARDRA, foi realizada em 100 isolados, sendo 52 da rizosfera e 48 endofíticos de raiz. Foram 49 bactérias do isolamento sem o acréscimo de sal no meio de cultura, e 51 com o acréscimo de sal. Com relação às áreas com aplicação de vinhaça há quatro anos, há dois anos e sem a aplicação, foram selecionados 31, 29 e 40 isolados, respectivamente.

A técnica utilizada permitiu a visualização de perfis de bandas, variando entre 200 e 1000 pb, que foram gerados pela digestão do gene 16S rRNA que continham as

sequências de corte das enzimas de restrição *Mbol* e *BsuRI*. A Figura 13 representa um gel de agarose com os perfis de bandas gerados pela técnica da ARDRA. A análise foi feita através do uso de um dendrograma de similaridade (Figura 14), construído através de uma matriz binária de presença e ausência de banda, de acordo com os perfis de bandas dos isolados.

O dendrograma indicou alta variabilidade genética entre os isolados, no entanto, 14 ribotipos se formaram com alta similaridade, superior a 70%. E sete ribotipos apresentaram 100% de similaridade. Vale ressaltar que bactérias isoladas em condições, com manejos e nichos diferentes, apresentaram-se, no dendrograma, geneticamente semelhantes.

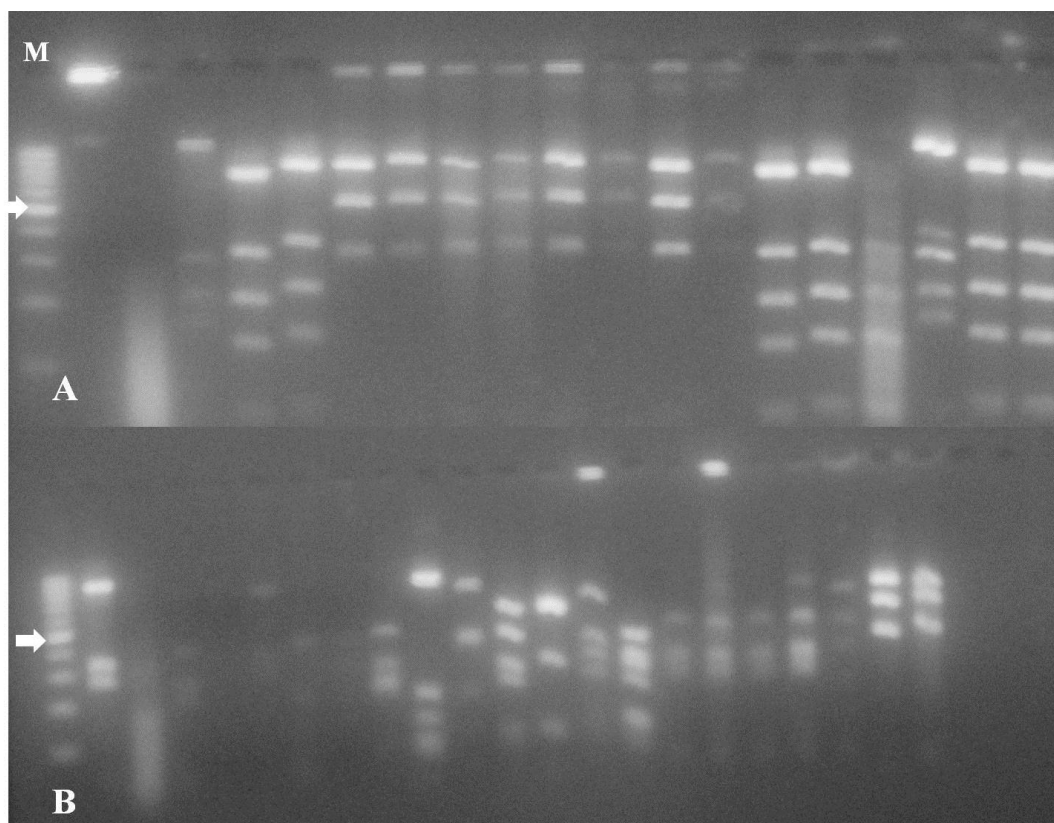


Figura 13. Gel de agarose obtido na técnica da ARDRA, utilizando as enzimas de restrição *Mbol* (A) e *BsuRI* (B), de bactérias da rizosfera e endofíticas de raiz, presentes em cana-de-açúcar cultivada em diferentes solos do Estado de Pernambuco. M: marcador 100pb; Seta: banda de 500pb.

Average) com bootstrap de 1000 vezes. Os números nos nós em questão indicam a porcentagem de vezes que o grupo permaneceu no consenso.

3.7. Análise da diversidade bacteriana não cultivável pela técnica de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)

A análise da diversidade bacteriana não cultivável pela técnica do DGGE, através do gene *nifH*, permitiu observar alta variabilidade genética, tanto na comunidade rizosférica como na endofítica de raiz, de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em solos com e sem uso de vinhaça no Estado de Pernambuco. A Figura 15 representa o gel de poliacrilamida com os perfis de banda do gene *nifH*, obtidos a partir do DGGE.

Apenas duas repetições das amostras da rizosfera sem a aplicação de vinhaça e duas da rizosfera com aplicação há dois anos apresentaram similaridade superior a 70% (Figura 16), todos os outros agrupamentos tiveram similaridade baixa, evidenciando a diversidade bacteriana diazotrófica existente em plantas de cana-de-açúcar, cultivada em diferentes solos.

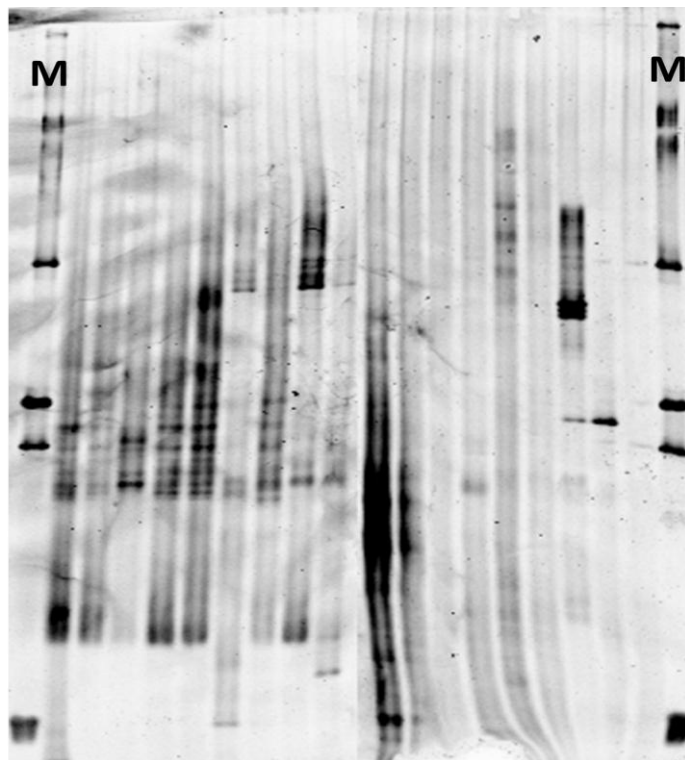


Figura 15. Gel de poliacrilamida obtido na técnica no DGGE do gene *nifH*, de comunidades bacterianas da rizosfera e endofíticas de raiz, presentes em cana-de-açúcar cultivada em diferentes solos do Estado de Pernambuco. M: marcador.

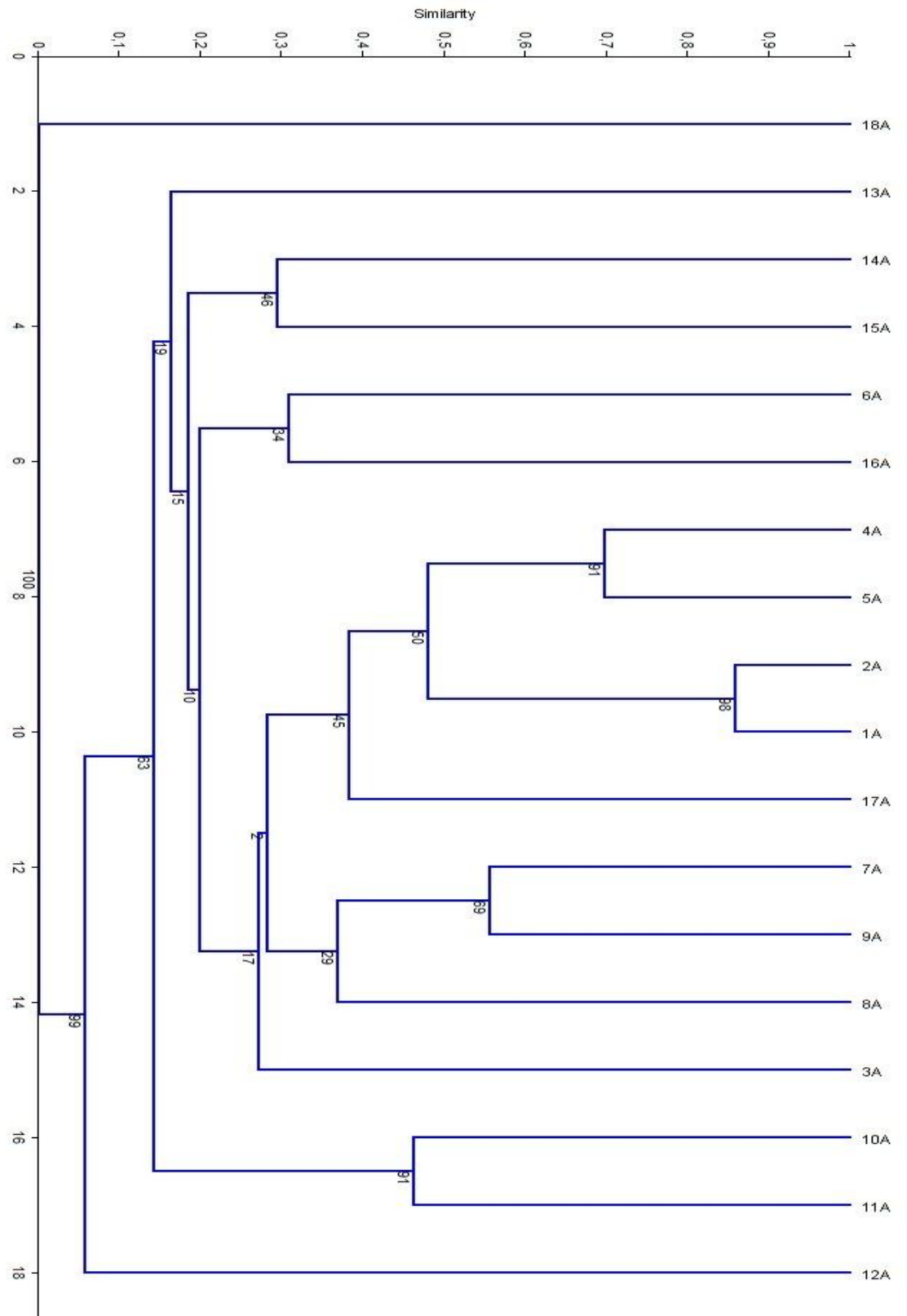


Figura 16. Dendrograma de similaridade construído com base nas sequências de bandas obtidas pelos *primers* FGPH19, PolR, PolF-GC e AQUER, para o gene *NifH*, pela técnica do DGGE, através do coeficiente de Jaccard e pelo método do

UPMGA (*Unweighted Pair-Group Method with Average*) com bootstrap de 1000 vezes. Os números nos nós em questão indicam a porcentagem de vezes que o grupo permaneceu no consenso. Legenda: 1A, 2A e 3A, rizosfera – sem vinhaça; 4A, 5A e 6A, rizosfera – aplicação de vinhaça há dois anos; 7A, 8A e 9A, rizosfera – aplicação de vinhaça há quatro anos; 10A, 11A e 12A, endofítico de raiz – sem vinhaça; 13A, 14A e 15A, endofítico de raiz – aplicação de vinhaça há dois anos; 16A, 17A e 18A, endofítico de raiz – aplicação de vinhaça há quatro anos.

4. DISCUSSÃO

É de extrema importância estudar a interação bactéria/planta, pois diversos fatores podem influenciá-la, como o clima, tratamento com pesticidas, tipo de solo, estrutura do solo, estágio de desenvolvimento da planta hospedeira, entre outros (RASCHE *et al.*, 2006; BERG & SMALLA, 2009). Esses fatores influenciam a comunidade bacteriana da planta, podendo torná-la mais diversa ou com grupos dominantes (SOARES *et al.*, 2006; PROCÓPIO *et al.*, 2009).

Essa comunidade bacteriana pode apresentar características morfológicas diversas, podendo assim, visualmente se observar a diversidade daquela, associada com a planta. Soares *et al.* (2006) observaram que a população nativa nodulífera, em feijão-caupi, teve alta diversidade fenotípica, assim como a diversidade observada no trabalho aqui apresentado. Kumar *et al.* (2012) também observaram alta diversidade morfológica em plantas de *Ajuga bracteosa*.

Essa diversidade morfológica também é influenciada pelo meio de cultura utilizado. O meio TSA por ser rico em nutrientes beneficia o desenvolvimento de diversos grupos bacterianos, além de favorecer uma alta densidade populacional bacteriana, como o observado neste trabalho. De acordo com Mendes *et al.* (2007), a densidade populacional bacteriana na rizosfera de cana-de-açúcar foi várias ordens maior que a densidade dos endofíticos de raiz. Compant *et al.* (2010) também mostram que a rizosfera se sobressai na densidade populacional, o que difere deste trabalho, já que não houve diferença estatística entre os nichos.

Em relação à presença ou ausência de sal no meio de cultura, também não houve diferença estatística na densidade populacional, demonstrando que o NaCl, na concentração avaliada, não influenciou o desenvolvimento bacteriano. No entanto, Dias Júnior *et al.* (1998) avaliaram o efeito dos metais pesados, em uma área de deposição de rejeitos da industrialização de zinco, sobre a população microbiana do solo, e observaram que a densidade bacteriana foi afetada negativamente pela presença dos metais pesados (Cd, Cu e Zn). Demonstrando que esta população pode vir a ser afetada pelas características de cada solo.

Devido a grande importância da cultura da cana-de-açúcar para o Brasil, o incentivo a pesquisa tem sido alto (PEREIRA *et al.*, 2012), visando encontrar um inoculante eficaz, já que a cana-de-açúcar retira do solo quantidades de nitrogênio

maiores do que as que são aplicadas ao solo pelas adubações, isto pode ser explicado pela fixação biológica de nitrogênio (FBN) (BODDEY *et al.*, 2003).

O nitrogênio é um dos elementos mais limitantes ao desenvolvimento das culturas, e o uso de um inoculante eficiente poderá diminuir o uso de fertilizantes nitrogenados. Estima-se que cerca de 70% do nitrogênio requerido pela cana-de-açúcar é suprido pela fixação biológica de nitrogênio (SUMAN *et al.*, 2005). No entanto, de acordo com Castro-González *et al.* (2011), ainda existe grande dificuldade em encontrar um isolado eficiente, não patogênico a humanos e estável para ser um promissor inoculante para a cana-de-açúcar.

No presente trabalho, 72,5% dos isolados mostraram-se potenciais fixadores de nitrogênio atmosférico, demonstrando o potencial destas bactérias para programas de manejo da cultura da cana-de-açúcar. Em trabalho realizado por Govindarajan *et al.* (2006), foi demonstrado o potencial de um isolado bacteriano (*Burkholderia* sp. MG43), onde houve uma economia de 140 kg/ha de N. Os isolados do presente trabalho devem ser testados *in vivo*, para identificar se desempenham uma fixação satisfatória em campo.

Foi observado que o maior número de isolados fixadores é endofítico de raiz da cana-de-açúcar, tanto na presença ou ausência de sal, como na presença ou ausência de vinhaça, provavelmente por este grupo bacteriano poder ter um importante papel neste nicho ou por ter melhores condições de colonização. Este fato pode se dar pela interação bactéria/planta, já que esta influencia nas características de promoção de crescimento vegetal, como observado por diversos autores (BODDEY *et al.*, 2003; KUKLINSKY-SOBRAL *et al.*, 2004).

De acordo com os resultados, também foi possível observar a capacidade dos isolados em produzirem ácido indol acético, já que a produção de fitohormônios, ou reguladores de crescimento vegetal, é outra característica que algumas espécies bacterianas, quando em associação com a planta hospedeira, expressam. A frequência de isolados produtores de AIA foi alta (100%) quando comparada com trabalho realizado por Mendes *et al.* (2007), que também avaliaram bactérias isoladas da cana-de-açúcar, no entanto, apenas cerca de 47% foram positivas para esta característica. Taurian *et al.* (2010), trabalhando com bactérias isoladas de amendoim, também observaram baixa frequência de isolados positivos, cerca de 8%.

No entanto, Ramos (2011) e Lima (2012), trabalhando com variedades de cana-de-açúcar na fase soca, também observaram que 100% dos isolados bacterianos avaliados apresentaram capacidade de produzir AIA em meio com acréscimo de triptofano. Estes resultados demonstram que a cana-de-açúcar é amplamente colonizada por bactérias produtoras deste fitohormônio.

Vale ressaltar que alguns isolados apresentaram alta produção de AIA, como o isolado UAGCV117, com $162,23 \mu\text{g mL}^{-1}$. Este valor foi bastante expressivo, quando comparado com os resultados do trabalho realizado por Sheng *et al.* (2008) com *Allium macrostemon*, onde o isolado endofítico *Enterobacter* sp. 12J1 foi capaz de produzir apenas $8,077 \pm 0,45 \mu\text{g mL}^{-1}$. E, de acordo com Hernández-Rodríguez *et al.* (2010), cerca de $29 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA foram produzidos por isolados de *Burkholderia cepacia* em plântulas de milho e arroz, valor baixo, quando comparado com a produção de AIA dos isolados do presente trabalho.

Outras características que estimulem o desenvolvimento vegetal são almejadas, para a produção de um inoculante eficiente. Desta maneira, a solubilização de fosfato é uma característica de extrema importância, pois, depois do nitrogênio, o fósforo, é o elemento mais limitante ao crescimento vegetal (GYANESHWAR *et al.*, 2002). Já que este nutriente tem forte aderência às partículas do solo, dificultando sua absorção pelas plantas.

Dos isolados avaliados, 75,5% foram positivos para a solubilização do fosfato inorgânico, resultado semelhante ao de Lira-Cadete *et al.* (2012), onde 75% das bactérias diazotróficas de cana-de-açúcar foram positivas para esta característica. No entanto, este resultado foi inferior ao apresentado por Santos *et al.* (2012), onde os autores observaram que das 30 bactérias diazotróficas associadas a plantas de cana soca, endofíticas de raiz e da rizosfera, 90% foram capazes de solubilizar fosfato inorgânico *in vitro*. Segundo Shiomi *et al.* (2009), as bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico vêm ganhando grande atenção, principalmente, pela possibilidade de seu emprego em programas de interação com bactérias fixadoras de N_2 .

Vale ressaltar que, assim como para a FBN e para a produção de AIA, a presença de vinhaça e a presença de NaCl, não influenciaram os resultados da solubilização de fosfato. No entanto, mais uma vez o nicho se sobressaiu em todos os casos, onde os isolados endofíticos de raiz apresentaram percentual significativamente

maior de solubilizadores de fosfato. Demonstrando, mais uma vez, que este grupo bacteriano pode ter um importante papel neste nicho da planta hospedeira. Este resultado é semelhante ao de Lira-Cadete *et al.* (2012), onde os isolados endofíticos de raiz, se sobressaíram nesta característica de promoção de crescimento vegetal.

Com relação ao Índice de Solubilização, sete isolados apresentaram índice maior que dois, que foi o grupo com índice mais alto. Quando se observa trabalho realizado por Santos *et al.* (2012), os isolados chegaram a ter índice de 3,48. No entanto, os isolados deste trabalho mostram-se como potenciais promotores de crescimento vegetal, pois, apresentaram IS satisfatório, ou seja, maior que 2 (LEALEM & GASHE, 1994).

A fim de complementar a seleção de uma bactéria com potencial para se tornar um inoculante, a produção da molécula *quorum sensing*, AHL, se torna uma aliada. Pois, a formação de biofilmes vem sendo considerada uma resposta ao um mecanismo *quorum sensing* (RUMJANEK *et al.*, 2004), e o biofilme é um grande aliado da colonização bacteriana (LIU *et al.*, 2011). Deste modo, um inoculante que possui alguma facilidade em colonizar a planta hospedeira, é essencial para a eficácia do processo.

Dos 102 isolados avaliados, 49% foram positivos para a produção da molécula *quorum sensing* (N-acil homoserina lactona, AHL), percentual inferior ao apresentado por Ravn *et al.* (2001), onde, dentre 148 isolados da família *Enterobacteriaceae*, 99% eram produtores de moléculas AHLs. No entanto, os isolados positivos mostram-se potenciais para o uso no manejo da cultura da cana-de-açúcar.

Vale ressaltar que 48% dos isolados positivos foram provenientes da área sem aplicação de vinhaça, demonstrando que a população bacteriana presente neste solo é mais eficiente para esta característica; e, que os isolados da rizosfera também foram mais eficientes nesta condição, reforçando, que a população bacteriana pode mudar de um manejo para outro. Além disso, 64% foram isolados em meio de cultura sem o acréscimo de NaCl. O que demonstra a influência do manejo e da presença de sal sobre uma característica de promoção de crescimento vegetal.

Assim, isolados que expressam características de promoção de crescimento vegetal, mesmo em condições de estresse, são de extrema importância para o desenvolvimento da cultura. Segundo Nabti *et al.* (2010), rizobactérias promotoras de crescimento podem aumentar o desenvolvimento vegetal, especialmente em condições

limitantes, como estresses. Os isolados deste trabalho se mostraram promissores, pois, 33 foram positivos para os quatro testes realizados, sendo fortes aspirantes a programas futuros de testes *in vivo*.

Além da avaliação da promoção de crescimento vegetal, a diversidade bacteriana deve ser bastante estudada, pois os manejos dados às culturas podem afetá-la. No trabalho apresentado, foram formados 14 ribotipos com alta similaridade, superior a 70%. Em trabalho realizado por Tian *et al.* (2009), com bactérias produtoras de sideróforos, 28 ribotipos foram formados. No entanto, a diversidade do presente trabalho foi mais alta, já que muitos outros ribotipos foram formados, com similaridade inferior a 70%. Apesar da alta diversidade, sete ribotipos apresentaram 100% de similaridade, demonstrando alta possibilidade de serem do mesmo grupo bacteriano.

Algumas bactérias isoladas em condições com manejos e nichos diferentes apresentaram-se, no dendrograma, geneticamente semelhantes. Isto mostra que a mesma espécie bacteriana pode se adaptar a condições diferentes. Barriuso & Mellado (2012) demonstraram que a aplicação do glifosato em cultivos de algodão resistente não influenciou a comunidade bacteriana da rizosfera, quando comparada ao controle, evidenciando a adaptação daquela. No entanto, Prasad *et al.* (2012) observaram que altas concentrações de Cd^{2+} reduz a diversidade de *Azotobacter* spp. Deste modo, estudar a diversidade bacteriana em ambientes diversos é essencial para identificar quais grupos estão presentes e quais se sobressaem, podendo assim identificar os mais relevantes para o manejo das culturas.

Além de avaliar a comunidade bacteriana associada a plantas de cana por métodos dependentes de cultivo, é de extrema importância utilizar metodologias independentes de cultivo, como a técnica de DGGE. O resultado do presente trabalho demonstra a diversidade da comunidade diazotrófica existente na cana-de-açúcar cultivada em diferentes solos. Resultado semelhante foi obtido por Lima (2012), onde houve alta variabilidade genética da comunidade bacteriana diazotrófica da rizosfera e endofítica de raiz de plantas de cana soca, com 4 e 10 meses de cultivo, da variedade RB 867515. No entanto, o mesmo autor descreveu que os nichos foram determinantes para o agrupamento das comunidades bacterianas, o que não foi observado no presente trabalho.

Coelho *et al.* (2009), trabalhando com doses de fertilizante nitrogenado, também observaram alta diversidade da comunidade bacteriana diazotrófica da rizosfera do sorgo. De acordo com Berg & Smalla (2009), tanto o tipo de solo, quanto a espécie cultivada, podem ser os principais fatores que estariam influenciando na comunidade bacteriana. Assim, fica evidente que os manejos dados ao solo relativos à aplicação de vinhaça, neste trabalho, podem ter sido cruciais para a diversidade genética observada.

5. CONCLUSÕES

Diante do exposto, conclui-se que:

- A variedade RB 863129 de cana-de-açúcar cultivada em solos da Zona da Mata de Pernambuco apresentam interação com bactérias da rizosfera e endofíticas de raiz;
- Bactérias isoladas em meio com o acréscimo de sal (NaCl), e sob diversos manejos de aplicação de vinhaça, apresentam-se eficientes nas características de promoção de crescimento vegetal;
- Os isolados endofíticos foram mais eficientes no potencial de fixar nitrogênio, solubilizar fosfato, produzir AIA e a molécula *quorum sensing* AHL;
- A presença de vinhaça influenciou negativamente os isolados bacterianos da rizosfera quanto à produção da molécula *quorum sensing* AHL;
- Isolados bacterianos, com mais de uma característica relacionada à promoção de crescimento vegetal, são promissores para programas de manejo desta cultura;
- Existe elevada diversidade da comunidade bacteriana, tanto do gene 16S rRNA quanto do *nifH*, da rizosfera e endofíticas de raiz, presentes na variedade RB 863129 de cana-de-açúcar cultivada em solos da Zona da Mata de Pernambuco.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREOTE, F.D. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, 2007. 201p. Tese de Doutorado.
- ARAÚJO, W.L.; LACAVA, P.T.; MARCON, J.; LIMA, A.O.S.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. **Guia prático: Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos.** Piracicaba: CALO, 2010, 167p.
- BARBOSA, M.V. **Interação entre bactérias produtoras de auxinas e diferentes variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) cultivadas em Pernambuco.** Garanhuns: Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, 2010. 73p. Monografia.
- BARRIUSO, J. & MELLADO, R.P. Glyphosate affects the rhizobacterial communities in glyphosate-tolerant cotton. **Applied Soil Ecology**, v. 55, p. 20–26, 2012.
- BERG, G. & SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 68, p. 1–13, 2009.
- BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, p. 139-149, 2003.
- CARDOZO, R.B. & ARAÚJO, F. F. Multiplicação de *Bacillus subtilis* em vinhaça e viabilidade no controle da meloidoginose, em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 12, p. 1283–1288, 2011.
- CASTRO-GONZÁLEZ, R.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; RAMÍREZ-TRUJILLO, A.; SANTOS, P.E.; CABALLERO-MELLADO, J. High diversity of culturable *Burkholderia* species associated with sugarcane. **Plant Soil**, v. 345, p. 155–169, 2011.
- COELHO, M.R.R.; MARRIEL, I.E.; JENKINS, S.N.; LANYON, C.V.; SELDIN, L.; O'DONNELL, A.G. Molecular detection and quantification of *nifH* gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer. **Applied Soil Ecology**, v. 42, p. 48–53, 2009.

- COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, p. 669-678, 2010.
- CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J.M.; MONTEIRO, A.M.; SANDBERG, G. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasiliense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 2833-2837, 1988.
- DIAS, A.C.F.; ANDREOTE, F.D.; RIGONATO, J.; FIORE, M.F.; MELO, I.S.; ARAÚJO, W.L. The bacterial diversity in a Brazilian non-disturbed mangrove sediment. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 98, n. 4, p. 541-551, 2010.
- DIAS-JÚNIOR, H.E.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; SILVA, R. Metais pesados, densidade e atividade microbiana em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 22, p. 631-640, 1998.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: Itaguaí: RJ, EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60p.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 1997. 212p.
- ESPAÑA-GAMBOA, E.; MIJANGOS-CORTES, J.; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J.; HERNÁNDEZ-ZARATE, G.; ALZATE-GAVIRIA, LILIANA. Vinasses: characterization and treatments. **Waste Management & Research**, v. 29, n. 12, p. 1235–1250, 2011.
- FREIRE, M. B. G. S.; FREIRE, F. J. Fertilidade do solo e seu manejo em solos afetados por sais. In: **Fertilidade do Solo**. Novais, R. F. *et al.* (Ed.). Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 929-954.
- GOVINDARAJAN, M.; BALANDREAU, J.; MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Improved yield of

- micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. **Plant Soil**, v. 280, p. 239–252, 2006.
- GYANESHWAR, P.; KUMAR, G.N.; PAREKH, L.J.; POOLE, P.S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v. 245, p. 83-93, 2002.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. **PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. 1.90**. 2001.
- HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, A.; HEYDRICH-PÉREZ, M.; DIALLO, B.; JAZIRI, M.E.; VANDEPUTTE, O.M. Cell-free culture medium of *Burkholderia cepacia* improves seed germination and seedling growth in maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*). **Plant Growth Regulation**, v. 60, p. 191–197, 2010.
- KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 6, p. 1244-1251, 2004.
- KUMAR, G.; KANAUIA, N.; BAFANA, A. Functional and phylogenetic diversity of root-associated bacteria of *Ajuga bracteosa* in Kangra Valley. **Microbiological Research**, v. 167, p. 220–225, 2012.
- LACAIVA, P.T.; ANDREOTE, F.D.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR específico e DGGE. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 637-642, 2006.
- LEALEM, F. & GASHE, B.A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, p. 348-352, 1994.
- LIMA, D.R.M. **Bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a plantas de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2012. 110p. Dissertação de Mestrado.
- LIRA-CADETE, L.; FARIAS, A.R.B.; RAMOS, A.P.S.; COSTA, D.P.; FREIRE, F.J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Variabilidade genética de bactérias diazotróficas associadas a plantas de cana-de-açúcar capazes de solubilizar fosfato inorgânico. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 122-129, 2012.

- LIU, X.; JIA, J.; POPAT, R.; ORTORI, C.A.; LI, J.; DIGGLE, S.P.; GAO, K. CÁMARA, M. Characterization of two quorum sensing systems in the endophytic *Serratia plymuthica* strain G3: differential control of motility and biofilm formation according to life-style. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 26, p. 1-12, 2011.
- MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; ARAUJO, W.L.; RAAIJMAKERS, J.M. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 7259–7267, 2007.
- NABTI, E.; SAHNOUNE, M.; GHOUL, M.; FISCHER, D.; HOFMANN, A.; ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. Restoration of growth of durum wheat (*Triticum durum* var. waha) under saline conditions due to inoculation with the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* NH and extracts of the marine alga *Ulva lactuca*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 29, p. 6-22, 2010.
- NÓBREGA, R.S.A.; MOTTA, J.S.; LACERDA, A.M.; MOREIRA, F.M.S. Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 4, p. 899-905, 2004.
- PEREIRA, A.P.A.; BARROS, M.C.S.; OLIVEIRA, J.R.S.; RAMOS, A.P.S.; FREIRE, M.B.G.S.; FREIRE, F.J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Influência da salinidade sobre o crescimento e a produção de ácido indol acético de *Burkholderia* spp. endofíticas de cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 112-121, 2012.
- PEREIRA, J.P.; ALVARENGA, E.M.; TOSTES, J.R.P.; FONTES, L.E.F. Efeito da adição de diferentes dosagens de vinhaça a um latossolo vermelho-amarelo distrófico na germinação e vigor de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 14, n. 2, p. 147-150, 1992.
- PRASAD, D.; SUBRAHMANYAM, G.; BOLLA, K. Effect of cadmium on abundance and diversity of free living nitrogen fixing *Azotobacter* spp. **Journal of Environmental Science and Technology**, v. 5, n. 3, p. 184-191, 2012.
- PROCÓPIO, R.E.L.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JR., W.; AZEVEDO, J.L. Characterization of an endophytic bacterial community associated with

- Eucalyptus spp. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 4, p. 1408-1422, 2009.
- QUECINE, M.C. **Aspectos biotecnológicos da interação entre bactérias e cana-de-açúcar (*Saccharum sp.* L.)**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, 2010. 196p. Tese de Doutorado.
- RAMOS, A.P.S. **Bactérias associadas a variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco: diversidade genética e produção de ácido indol acético**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2011. 128p. Dissertação de Mestrado.
- RASCHE, F.; VELVIS, H.; ZACHOW, C.; BERG, G.; ELSAS, J.D.; SESSITSCH, A. Impact of transgenic potatoes expressing antibacterial agents on bacterial endophytes is comparable to effects of soil, wildtype potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 555–566, 2006.
- RAVN, L.; CHRISTENSEN, A.B.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; GRAM, L. Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, p. 239-251, 2001.
- REIS, F.B.J.; MENDES, I.C.; TEIXEIRA, K.R.S.; REIS, V.M. **Uso de ferramentas moleculares em estudo da diversidade de microrganismos do solo**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 33p.
- RUMJANEK, N.G.; FONSECA, M.C.C.; XAVIER, G.R. *Quorum sensing* em sistemas agrícolas. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, p. 35-50, 2004.
- SANTOS, I.B.; LIMA, D.R.M.; BARBOSA, J.G.; OLIVEIRA, J.T.C.; FREIRE, F.J.; KUKLINSKY-SOBRAI, J. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de-açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 142-149, 2012.
- SHENG, X.; CHEN, X.; HE, L. Characteristics of an endophytic pyrene-degrading bacterium of *Enterobacter sp.* 12J1 from *Allium macrostemon* Bunge. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, p. 88–95, 2008.
- SHIOMI, H. F.; VICENSI, M.; DEDORDI, C.; OLIARI, Í.C.R. Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico, presentes em líquido ruminal bovino. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, p. 294–297, 2009.

- SOARES; A.L.L.; PEREIRA, J.P.A.R.; FERREIRA, P.A.A.; VALE, H.M.M.; LIMA, A.S.; ANDRADE, M.J.B.; MOREIRA, F.M.S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). I – Caupi. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 5, p. 795-802, 2006.
- SOOBADAR, A. & KWONG, K.F.R.N.K. Impact of high rates of vinasse on some pertinent soil characteristics and on sugarcane yield in Mauritius. **Journal of Sustainable Agriculture**, v. 36, n. 1, p. 36-53, 2012.
- SUMAN, A.; GAUR, A.; SHRIVASTAVA, A.K.; YADAV, R.L. Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 155-162, 2005.
- SZENTHE, A.; PAGE, W.J. Quorum sensing in *Agrobacterium tumefaciens* using N-oxo-Acyl-homoserine lactone chemical signal. In: **Tested studies for laboratory teaching**, v. 24 (M.A. O'Donnell, Editor). p. 145-152, 2003. Disponível em: <http://www.zoo.utoronto.ca/able/volumes/copyright.html>.
- TAURIAN, T.; ANZUAY, M.S.; ANGELINI, J.G.; TONELLI, M.L.; LUDUEÑA, L.; PENA, D.; IBÁÑEZ, F.; FABRA, A. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. **Plant Soil**, v. 329, p. 421–431, 2010.
- TIAN, F.; DING, Y.; ZHU, H.; YAO, L.; DU, B. Genetic diversity of siderophore-producing bacteria of tobacco rhizosphere. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 276-284, 2009.
- WACLAWOVSKY, A. J.; SATO, P. M.; LEMBKE, C. G.; MOORE, P. H.; SOUZA, G. M. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, p. 263–276, 2010.

CAPÍTULO II

CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR EM RELAÇÃO A SALINIDADE

RESUMO

A cana-de-açúcar é uma cultura de extrema importância para o Brasil, pois proporciona o primeiro lugar na produção mundial de açúcar e de etanol. Porém, esta produção encontra-se na sua maior parte concentrada na zona da mata do Estado. Um dos motivos que dificultam sua expansão para o semiárido pernambucano é a salinidade dos solos desta região, já que esta causa diversos efeitos tóxicos às plantas. Assim como as plantas, as bactérias simbióticas apresentam variação na tolerância à salinidade. Esta situação pode ser atenuada pela utilização de linhagens halotolerantes. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da salinidade, usando o cloreto de sódio (NaCl), sobre o crescimento bacteriano, a produção de ácido indol acético (AIA) e a solubilização de fosfato *in vitro*, por isolados bacterianos de cana-de-açúcar, e potenciais promotores de crescimento vegetal. Para tanto foram utilizados isolados bacterianos obtidos de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em áreas sem aplicação de vinhaça, com utilização de vinhaça há dois anos e há quatro anos. Colônias dos isolados UAGCV16 (não tolerante à salinidade) e UAGCV68 (tolerante à salinidade), foram inoculadas em meio TSA (*Tryptic Soy Agar*) líquido acrescido de 5 mM de L-triptofano e quatro concentrações de NaCl (0; 2,5; 5 e 7,5%). Os inóculos foram incubados sob agitação (120 rpm) e à 0, 24, 48 e 72 horas, o crescimento bacteriano foi avaliado em espectrofotômetro, através da densidade óptica (DO 600 nm) e a produção de AIA por método colorimétrico, com a leitura da absorbância em 530 nm. Além disso, colônias de 27 bactérias, previamente testadas e positivas para testes de promoção de crescimento vegetal, foram inoculadas em meio de cultura sólido contendo fosfato insolúvel, acrescido de quatro concentrações de NaCl: 0; 2,5; 5 e 7,5%. As placas foram incubadas a 28°C por 72 h. Após esse período, o crescimento bacteriano e a solubilização de fosfato foram avaliados. Como resultados, observou-se que o isolado UAGCV16 foi mais sensível à presença de sal no meio de cultura, não havendo crescimento com 5 e 7,5% de sal. Já o isolado UAGCV68 obteve crescimento em todas as salinidades estudadas. Para a produção de AIA, em ambos os isolados, à medida que a concentração de sal aumentou, a produção de AIA diminuiu. Dos 27 isolados bacterianos testados para solubilização de fosfatos, nenhum isolado conseguiu solubilizar fosfato nas concentrações de 5 e 7,5% de NaCl. E 16 solubilizaram fosfato na presença de 2,5% de NaCl, vale ressaltar que apenas o isolado UAGCV77 não teve redução no potencial de solubilização na presença de 2,5% de sal. Deste modo, conclui-se que o sal afeta negativamente o crescimento bacteriano, a produção de ácido indol acético e a solubilização de fosfato dos isolados avaliados, no entanto, alguns isolados expressaram características de promoção de crescimento vegetal mesmo na presença do sal, tornando-se candidatos a experimentos de interação bactéria/cana/solo salino.

SUMMARY

The sugarcane is a culture of extreme importance to Brazil as it provides the first in the world production of sugar and ethanol. However, this production is mostly concentrated in the forest area of the State. One of the reasons that hinder its expansion into the semi-arid Pernambuco is the salinity of soils in this region, since this cause many toxic effects to plants. Like plants, the symbiotic bacteria present variation in salinity tolerance. This situation can be alleviated by the use of halotolerant strains. Given the above, the objective of this study was to evaluate the influence of salinity, using sodium chloride (NaCl) on bacterial growth, production of indole acetic acid (IAA) and phosphate solubilization in vitro by bacterial isolates from sugarcane, and potential plant growth promoters. Therefore, we used bacteria isolated from plants of sugarcane grown in areas without application of vinasse, using vinasse two years ago and four years ago. Isolated colonies of UAGCV16 (not tolerant to salt) and UAGCV68 (salinity tolerant) were inoculated in TSA (*Tripcase Soy Agar*) liquid plus 5 mM L-tryptophan and four concentrations of NaCl (0; 2.5; 5 and 7.5%). The inocula were incubated under stirring (120 rpm) and 0, 24, 48 and 72 hours, the bacterial growth was assessed by spectrophotometer by optical density (OD 600 nm) and the production by IAA colorimetric method, with the reading of absorbance at 530 nm. Furthermore, colonies of bacteria 27, previously tested and testing positive for promoting plant growth, were inoculated in a culture medium containing solid insoluble phosphate plus four NaCl concentrations: 0; 2.5; 5 and 7.5%. The plates were incubated at 28 ° C for 72 h. After this period, the bacterial growth and the phosphate solubilization were evaluated. The results showed that the isolated UAGCV16 was more sensitive to the presence of salt in the culture medium, with no growth at 5 and 7.5% salt. The UAGCV68 isolated growth in all salinities studied. For the production of IAA in both isolated as the salt concentration increased, decreased production of IAA. Of the 27 bacterial isolates tested for phosphate solubilizing, no isolated able to solubilize phosphate at concentrations of 5 and 7.5% NaCl. And 16 solubilized phosphate in the presence of 2.5% NaCl is worth noting that only the isolated UAGCV77 no decrease in the potential of solubilization in the presence of 2.5% salt. Thus, it is concluded that the salt adversely affects bacterial growth, the production of indole acetic acid and the phosphate solubilization of isolates, however, some isolates expressed features for promoting plant growth even in the presence of salt, becoming candidates for interaction experiments bacteria/sugarcane/saline soil.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, sendo esta espécie uma das principais culturas brasileiras, pois proporciona o primeiro lugar na produção mundial de açúcar e de etanol. Segundo dados do Conab (2011), Pernambuco possui uma produção de cerca de 18,4 milhões de toneladas, o que corresponde a 27,29% da produção Nordeste.

Porém, esta produção encontra-se na sua maior parte concentrada na zona da mata do Estado. Um dos motivos que dificultam sua expansão para o semiárido pernambucano é a salinidade dos solos desta região, já que esta causa diversos efeitos tóxicos às plantas (LIMA *et al.*, 1998). Além disso, a cana-de-açúcar é uma cultura exigente quanto à fertilidade, com alta capacidade extratora (LIRA-CADETE *et al.*, 2012), e apresenta-se sensível a aspectos limitantes do solo, como a salinidade.

De acordo com Moradi *et al.* (2011), cerca de 40% dos solos mundiais apresentam problemas com a salinidade. Segundo os mesmos autores, este é um sério problema e vem aumentando nas regiões áridas e semiáridas do planeta. No semiárido, ela deve-se, principalmente, ao clima, relevo e à geologia do terreno. Nesta região, a salinidade alcança cerca de 20% dos 95 milhões de hectares e nas áreas irrigadas, cerca de 300 mil ha, o problema já está presente em 25% da área (XAVIER *et al.*, 2007).

A salinidade dos solos da região semiárida constitui o maior obstáculo para a agricultura nestas áreas (NABTI *et al.*, 2010). O excesso de sais provoca uma redução do potencial hídrico do solo, resultando em menor capacidade de absorção de água pelas plantas. Além disso, os sais têm efeitos tóxicos sobre os vegetais, interferindo deste modo em todo seu desenvolvimento (NÓBREGA *et al.*, 2004).

Assim como as plantas, as bactérias simbióticas apresentam variação na tolerância à salinidade. Portanto, características de promoção de crescimento vegetal, como fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios, solubilização de fosfato inorgânico, entre outros; podem ser afetadas negativamente pelo efeito dos sais presentes nos solos. Esta situação pode ser atenuada pela utilização de linhagens bacterianas tolerantes à salinidade (NÓBREGA *et al.*, 2004). Estas bactérias são conhecidas como halotolerantes, ou seja, não necessitam do sal para o seu metabolismo, mas o toleram, em diferentes concentrações (JHA *et al.*, 2011; MISHRA *et al.*, 2011; OETTERER, 2012).

Diversos trabalhos buscam selecionar isolados bacterianos tolerantes a salinidade e promotores de crescimento, para o desenvolvimento das culturas (NABTI *et al.*, 2010; JHA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2012). De acordo com Pereira *et al.* (2012), é de extrema importância o estudo de isolados bacterianos que apresentem a capacidade de colonizar os tecidos e promover o crescimento vegetal, ainda que submetidos a condições de elevadas concentrações de sais no solo. Para essa seleção, o cloreto de sódio (NaCl) tem sido largamente utilizado como indicador da tolerância de bactérias à salinidade (ABDELMOUMEN *et al.*, 1999).

De acordo com Nabti *et al.* (2010), rizobactérias promotoras de crescimento podem aumentar o desenvolvimento vegetal, especialmente em condições limitantes, como estresses. E, segundo Nóbrega *et al.* (2004), estas linhagens em conjunto com a seleção de hospedeiros adaptados a condições de estresse salino, podem aumentar o desempenho da simbiose e manter a produtividade vegetal de forma sustentada mesmo em condições de salinidade dos solos.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da salinidade, usando o cloreto de sódio (NaCl), sobre o crescimento bacteriano, a produção de ácido indol acético e a solubilização de fosfato *in vitro*, por isolados bacterianos de cana-de-açúcar, potenciais promotores de crescimento vegetal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolados bacterianos

Foram utilizados isolados bacterianos obtidos de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em áreas sem aplicação de vinhaça, com utilização de vinhaça há dois anos e há quatro anos, conforme o Capítulo I. As características dos isolados utilizados nos testes de tolerância a salinidade estão descritos na Tabela 1. Os isolados analisados apresentaram-se distribuídos de forma diversa no dendograma da análise da variabilidade genética pela técnica da ARDRA, descrito no Capítulo I.

Tabela 1. Características de 27 isolados bacterianos provenientes de cana-de-açúcar cultivada em solo sem aplicação de vinhaça, e com aplicação de vinhaça há dois ou quatro anos, no Estado de Pernambuco.

Isolado bacteriano	FBN	Produção de AHL	Solubilização de fosfato	Produção de AIA	Halotolerante
UAGCV4	+	+	+	+	Não
UAGCV11	+	+	+	+	Não
UAGCV14	+	+	+	+	Não
UAGCV16	+	+	+	+	Não
UAGCV17	+	+	+	+	Não
UAGCV18	+	+	+	+	Não
UAGCV32	+	+	+	+	Não
UAGCV33	+	+	+	+	Não
UAGCV50	+	+	+	+	Não
UAGCV51	+	+	+	+	Não
UAGCV56	+	+	+	+	Sim
UAGCV59	+	+	+	+	Sim
UAGCV61	+	+	+	+	Sim
UAGCV62	+	+	+	+	Sim
UAGCV64	+	+	+	+	Sim
UAGCV68	+	+	+	+	Sim
UAGCV77	+	+	+	+	Sim
UAGCV86	+	+	+	+	Sim
UAGCV88	+	+	+	+	Sim
UAGCV89	+	+	+	+	Sim
UAGCV94	+	+	+	+	Sim
UAGCV102	+	+	+	+	Sim
UAGCV104	+	+	+	+	Sim
UAGCV105	+	+	+	+	Sim
UAGCV114	+	+	+	+	Não
UAGCV117	+	+	+	+	Não
UAGCV118	+	+	+	+	Sim

2.2. Avaliação da influência da salinidade sobre o crescimento bacteriano e a produção de ácido indol acético (AIA) *in vitro*

Colônias dos isolados UAGCV16 (não tolerante à salinidade) e UAGCV68 (tolerante à salinidade), foram inoculadas em meio de cultura líquido TSA e incubadas a 28°C por 24h sob agitação (120 rpm). Após esta etapa, 10 µL da cultura bacteriana foram inoculados em frascos de 50 mL, contendo 20 mL de meio líquido TSA suplementado com L-triptofano (5 mM) e acrescido de quatro concentrações de cloreto de sódio (NaCl), sendo elas 0; 2,5; 5 e 7,5%, ou seja, 0; 34,31; 68,63 e 102,94 dS m⁻¹ (MORADI *et al.*, 2011). Após a inoculação, os tubos foram incubados a 28°C sob agitação (120 rpm). As leituras do crescimento bacteriano (densidade ótica, DO) foram realizadas a 0, 24, 48 e 72 horas, em espectrofotômetro (600 nm). O teste foi realizado em triplicata.

Para a verificação da produção de AIA, foram utilizadas as mesmas amostras da leitura da densidade ótica. Dois mililitros da cultura bacteriana foram centrifugados a 12.000 g por 5 min. Do sobrenadante obtido, foram retiradas amostras e acrescidas do reagente de Salkowski (2% de FeCl₃ 0,5 M em 35% de ácido perclórico), na proporção de 1,5:0,5, esta reação foi incubada por 30 min na ausência de luz. Após esta etapa, a leitura da absorbância foi realizada, em espectrofotômetro (530 nm), a 0, 24, 48 e 72 horas. O teste foi realizado em triplicata. Para a conversão dos resultados foi utilizada uma curva padrão, obtida através de concentrações da AIA (Vetec) conhecidas, sendo elas: 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 µg L⁻¹ (BARBOSA, 2010).

2.3. Avaliação da influência da salinidade sobre a solubilização de fosfato inorgânico *in vitro*

Colônias de 27 bactérias, positivas para todos os testes de promoção de crescimento vegetal (Capítulo I), foram inoculadas em meio de cultura sólido contendo fosfato insolúvel, segundo metodologia do item 4.2.6. (Capítulo II), acrescido de quatro concentrações de cloreto de sódio (NaCl): 0; 2,5; 5 e 7,5%, ou seja, 0; 34,31; 68,63 e 102,94 dS m⁻¹ (MORADI *et al.*, 2011).

Após a inoculação, as placas foram incubadas a 28°C por 72 h. Após esse período, o crescimento bacteriano e a solubilização de fosfato foram avaliados. O teste foi realizado em triplicata e na leitura foram medidos: o diâmetro das colônias e dos

halos de solubilização, a partir dessas medidas foram obtidos os Índices de Solubilização (IS) de cada isolado por meio da fórmula: $IS = \phi \text{ Halo (cm)} / \phi \text{ Colônia (cm)}$ (BERRAQUERO *et al.*, 1976; HARA & OLIVEIRA, 2004; CHAGAS JUNIOR, 2007).

2.4. Análise estatística

Os resultados da densidade ótica (DO), quantificação do ácido indol acético e do Índice de Solubilização de Fosfato foram avaliados pelo teste de Scott-Knott, com probabilidade de 5%, através do programa SISVAR 5.3.

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação da influência da salinidade sobre o crescimento bacteriano e a produção de AIA *in vitro*

Como pode ser observado, na Figura 1 o isolado UAGCV16 foi mais sensível à presença de sal no meio de cultura, não havendo crescimento com 5 e 7,5% de sal. Já o isolado UAGCV68 obteve crescimento em todas as salinidades estudadas.

No entanto, o crescimento do isolado UAGCV16 foi expressivo atingindo 0,608 de DO a 0% de sal. Enquanto que o UAGCV68 atingiu apenas 0,227. Este último isolado não apresentou diferença estatística entre o crescimento a 0 e a 2,5% de sal no meio de cultura. Ambos os isolados, tenderam a estabilidade de crescimento às 72h.

Com relação à produção de AIA, a influência do sal promoveu resultados semelhantes para ambos os isolados (Figura 2), à medida que a concentração de sal aumenta, a produção de AIA diminui.

Apesar do menor valor absoluto de crescimento, o isolado UAGCV68 apresentou maior produção de AIA, chegando a $157,27 \mu\text{g mL}^{-1}$. No entanto, após as 48 h, em todos os valores de salinidade, a produção caiu consideravelmente. Já para o isolado UAGCV16, a queda da produção, após as 48 h, foi praticamente nula.

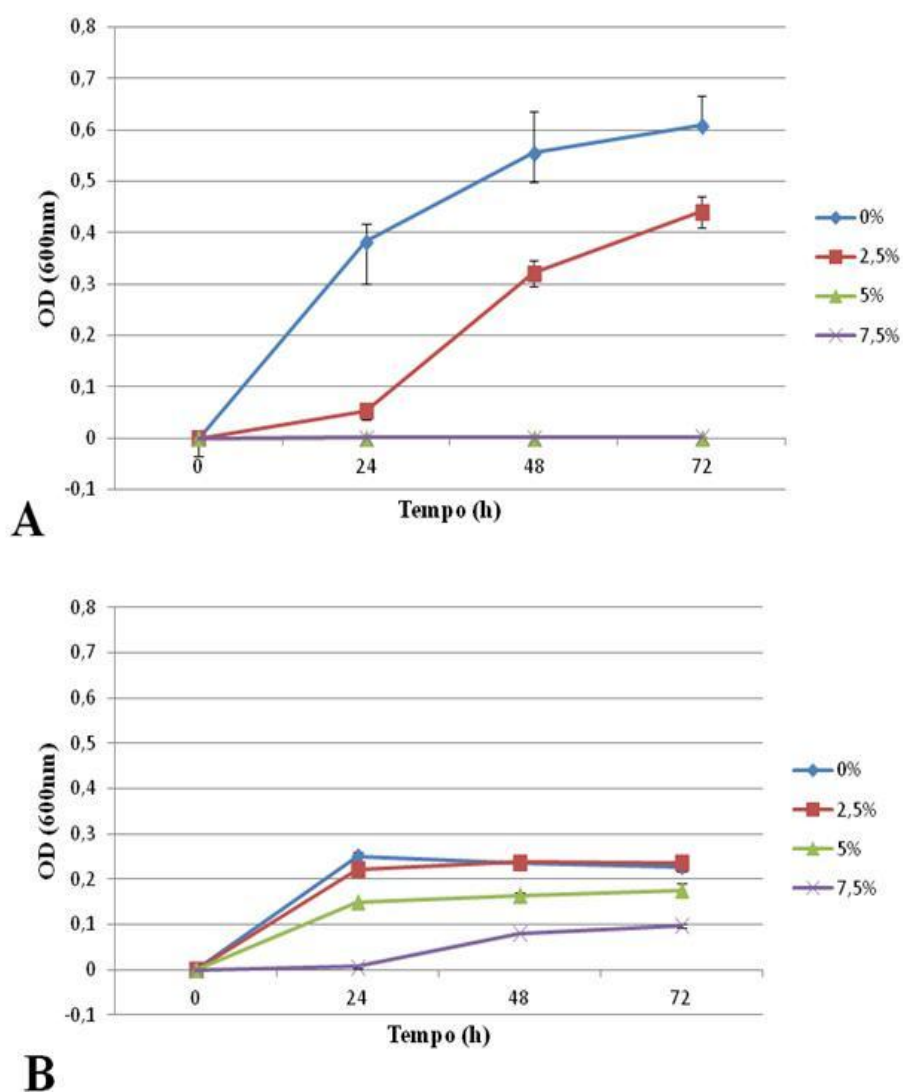


Figura 1. Curvas de crescimento (densidade ótica - DO) de bactérias endofíticas de raiz, associadas a cana-de-açúcar, em meio líquido TSA acrescido de 0; 2,5; 5 e 7,5% de NaCl. A) Isolado UAGCV16; B) Isolado UAGCV68. Os pontos que não apresentam sobreposição das barras indicam que as médias diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

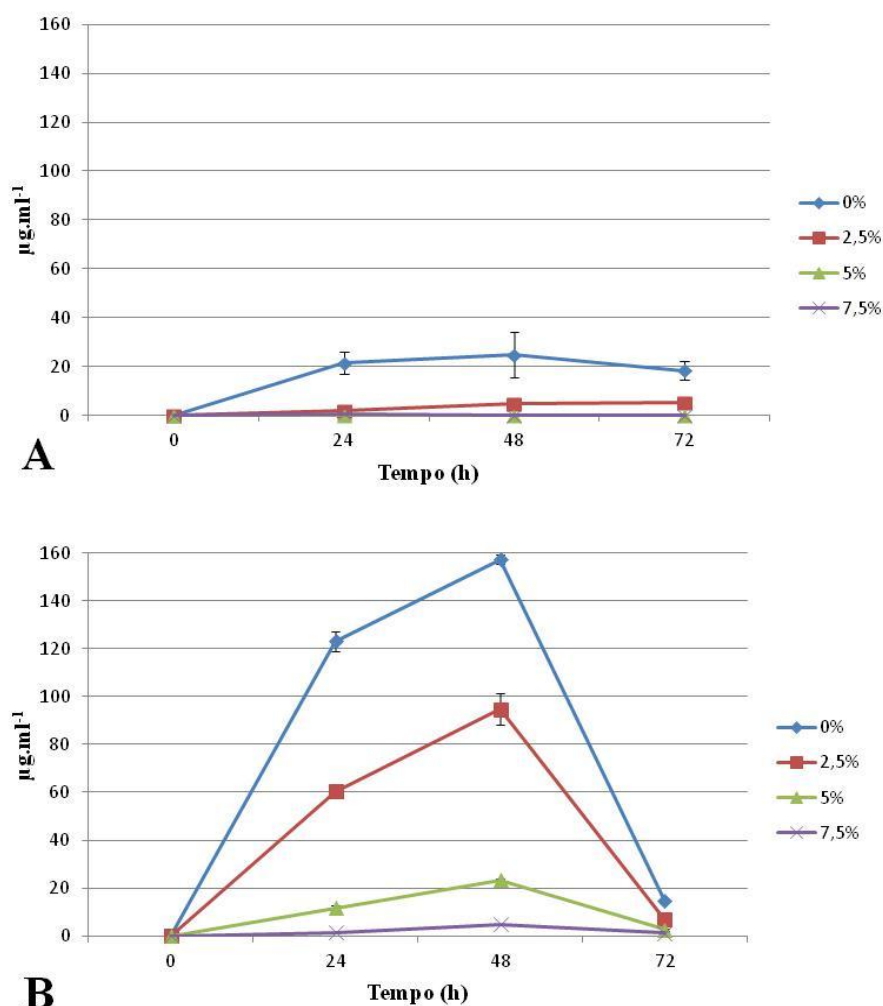


Figura 2. Curvas de produção de ácido indol acético por bactérias endofíticas de raiz, associadas à cana-de-açúcar, em meio líquido TSA acrescido de L-triptofano e de 0; 2,5; 5 e 7,5% de NaCl. A) Isolado UAGCV16; B) Isolado UAGCV68. Os pontos que não apresentam sobreposição das barras indicam que as médias diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

3.2. Avaliação da influência da salinidade sobre a solubilização de fosfato inorgânico *in vitro*

Dos 27 isolados bacterianos testados para solubilização de fosfatos, nenhum isolado conseguiu solubilizar fosfato nas concentrações de 5 e 7,5% de NaCl no meio de cultura utilizado, assim foram apresentados apenas os resultados de solubilização de fosfato nos meios com 0 e 2,5% de NaCl. Nestes, dos 27 isolados avaliados, 16 solubilizaram fosfato na presença de 2,5% de NaCl (Figura 3) e pode-se observar que,

de modo geral, a presença de sal diminuiu o Índice de Solubilização, em que apenas o isolado UAGCV77 não teve redução no potencial de solubilização na presença de 2,5% de sal (Figura 3).

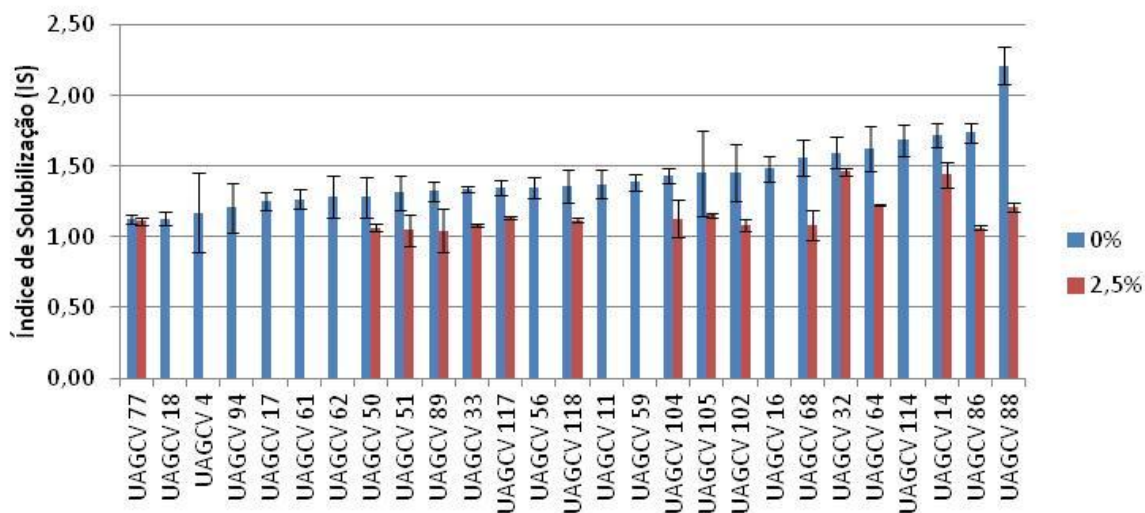


Figura 3. Índice de solubilização de fosfato inorgânico por bactérias da rizosfera e endofíticas de raiz, de cana-de-açúcar, após três dias de cultivo em meio rico em fosfato insolúvel acrescido de 0 e 2,5% de NaCl. As barras que não apresentam sobreposição das barras indicam que as médias diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

4. DISCUSSÃO

De acordo com Pereira *et al.* (2012), estudos que avaliem os efeitos da salinidade na população bacteriana associada às plantas de cana-de-açúcar, poderão auxiliar o manejo desta cultura em solos salinos. Por isso, é essencial entender essas interações, para que isolados eficientes sejam identificados e utilizados para o desenvolvimento da cultura.

Em trabalho realizado por Campos *et al.* (2010), os isolados de nódulos de raiz e caule de *Discolobium* spp. tiveram crescimento na concentração avaliada de 3% (30 g L⁻¹) de sal, esse comportamento também foi observado por Nóbrega *et al.* (2004) e por Xavier *et al.* (2007), em linhagens de rizóbios de feijão-caupi. Enquanto que no presente trabalho, o isolado UAGCV16 conseguiu crescer apenas na concentração máxima de 2,5% de sal, confirmando que este apresenta-se mais sensível à salinidade do meio. Já o isolado UAGCV68, obteve crescimento em todas as salinidades estudadas, apesar de que nas concentrações de 5 e 7,5% este crescimento foi menor, isto demonstra que este isolado, por ter sido proveniente de um meio de cultura com o acréscimo de sal, apresenta-se mais tolerante, pois passou por um processo de seleção.

Diversos trabalhos mostram a influência do sal sobre características de promoção de crescimento vegetal (SADEGHI *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2012). No presente trabalho, a produção de AIA foi influenciada negativamente pela presença do sal, resultado semelhante foi descrito por Pereira *et al.* (2012).

Segundo Radwan *et al.* (2005), a acréscimo de NaCl ao meio de cultura inibiu a produção de auxina nas linhagens de *Azospirillum* sp. e *Herbaspirillum seropedicae*, em concentrações superiores a 0,5%. Enquanto que, no presente trabalho, o isolado UAGCV16 conseguiu produzir AIA na concentração de 2,5% e o isolado UAGCV68 produziu até 5% de sal no meio de cultura, mesmo que a produção tenha diminuído à medida que o acréscimo de sal aumentava, demonstrando o potencial *in vitro* destes isolados. Em contrapartida, Sadeghi *et al.* (2011) observaram que isolados de *Streptomyces* aumentavam a produção de AIA a medida que a concentração de sal também aumentava.

Outra característica de grande importância para a promoção de crescimento vegetal é a solubilização de fosfato. A presença do sal no meio de cultura a influenciou negativamente, pois dos 27 isolados avaliados, apenas 16 conseguiram solubilizar o

fosfato *in vitro* com o acréscimo de 2,5% de sal no meio de cultura. Resultado semelhante foi observado por Sadeghi *et al.* (2011), onde isolados de *Streptomyces* diminuíram a solubilização de fosfato, ao passo que a concentração de sal no meio de cultura aumentava.

Apenas o isolado UAGCV77 não apresentou redução no potencial de solubilização, evidenciando que este isolado pode ser melhor estudado para uso em programas de manejo da cultura da cana-de-açúcar em solos salinos.

Vale ressaltar que os isolados UAGCV16 e UAGCV68 testados para produção de AIA em meio salino, também foram influenciados negativamente pelo sal na característica de solubilização de fosfato. Sendo que o isolado UAGCV16 teve esta característica totalmente inibida, mostrando-se mais sensível à salinidade, assim como no teste de produção de AIA em meio salino. Enquanto o isolado UAGCV68, por ser halotolerante, parece ser mais resistente à presença de sal, com relação a estas duas características de promoção de crescimento vegetal.

Medeiros *et al.* (2008) demonstraram que a nodulação em feijão-caupi é altamente sensível a salinidade dos solos, prejudicando futuramente a fixação biológica de nitrogênio, confirmando o fato que encontramos no presente trabalho, onde a presença de sal afetou diretamente características de promoção de crescimento vegetal. Além disso, Santos *et al.* (2012) observaram que bactérias diazotróficas endofíticas de raiz e da rizosfera de cana soca apresentam diferentes níveis de tolerância em relação à capacidade de crescer em meio de cultura livre de fonte nitrogenada sob diferentes concentrações de NaCl.

Nóbrega *et al.* (2004), Xavier *et al.* (2007) e Campos *et al.* (2010) demonstraram que bactérias podem crescer em condições com 3% de sal, porém não se sabe o efeito sobre as funcionalidades destas bactérias. Assim, os efeitos da salinidade devem ser mais amplamente estudados para que a interação bactéria/planta se torne mais eficaz e a promoção de crescimento vegetal seja desempenhada de forma mais eficiente, mesmo em ambientes limitantes, como os solos salinos.

5. CONCLUSÕES

Diante do exposto, conclui-se que:

- A salinidade afetou negativamente o crescimento bacteriano dos isolados avaliados, apesar de um deles ser halotolerante;
- O isolado UAGCV68 apresentou maior tolerância, com crescimento até a concentração de 7,5% de sal;
- O sal afetou negativamente a produção de ácido indol acético e a solubilização de fosfato;
- O isolado UAGCV68 produziu AIA até a concentração de 5% de sal;
- O isolado UAGCV77 não apresentou redução no potencial de solubilização na presença de 2,5% de sal;
- O isolado UAGCV68 expressou as características de promoção de crescimento vegetal, produção de AIA e solubilização de fosfato, na presença de altas concentrações de NaCl, tornando-se candidato a experimentos de interação bactéria/cana/solo salino;
- Os isolados UAGCV68 e UAGCV77 devem ser mais estudados, pois apresentaram maior tolerância a salinidade, indicando o seu potencial para programas de manejo da cultura da cana-de-açúcar em solos salinos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELMOUMEN, H.; FILALI-MALTOUF, A.; NEYRA, M.; BELABED, A.; IDRISSEI, M.M. Effect of high salts concentration on the growth of rhizobia and responses to added osmotica. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 889-898, 1999.
- BARBOSA, M.V. **Interação entre bactérias produtoras de auxinas e diferentes variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) cultivadas em Pernambuco**. Garanhuns: Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, 2010. 73p. Monografia.
- BERRAQUERO, F.R.; BAYA, A.M.; CORMENZANA, A.R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, v. 17, n. 4, p. 399-406, 1976.
- CAMPOS, L.L.; MARTINS, M.E.; ELIAS NETO, N.; LOUREIRO, M.F. Caracterização fisiológica de rizóbios isolados de nódulos de raiz e caule de *Discolobium spp.* **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 9, n. 3, p. 75-84, 2010.
- CHAGAS JUNIOR, A.F. **Características agronômicas e ecológicas de rizóbios isolados de solos ácidos e de baixa fertilidade da Amazônia**. Universidade Federal do Amazonas - UFAM/ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, 2007. 157p. Tese de Doutorado.
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira cana-de-açúcar Safra 2011/2012, terceiro levantamento, dezembro/2011/Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília: **Conab**, 2011.
- HARA, F.A.S.; OLIVEIRA, L.A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 343-357, 2004.
- JHA, B.; GONTIA, I.; HARTMANN, A. The roots of the halophyte *Salicornia brachiata* are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potential. **Plant Soil**, DOI 10.1007/s11104-011-0877-9, 2011.
- LIMA, G.P.P.; FERNANDES, A.A.H.; CATÂNEO, A.C.; CEREDA, M.P.; BRASIL, O.G. Alterações na atividade da peroxidase e do conteúdo de carboidratos em

- mandioca cultivada *in vitro* sob estresse salino. **Scientia Agricola**, v. 55, n. 3, 1998.
- LIRA-CADETE, L.; FARIAS, A.R.B.; RAMOS, A.P.S.; COSTA, D.P.; FREIRE, F.J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Variabilidade genética de bactérias diazotróficas associadas a plantas de cana-de-açúcar capazes de solubilizar fosfato inorgânico. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 122-129, 2012.
- MEDEIROS, R.; SANTOS, V.; ARAÚJO, A.; FILHO, C.O. Estresse salino sobre a nodulação em feijão-caupi. **Caatinga (Mossoró, Brasil)**, v. 21, n. 5, p. 202-206, 2008.
- MISHRA, R.R.; PRAJAPATI, S.; DAS, J.; DANGAR, T.K.; DAS, N.; THATOI, H. Reduction of selenite to red elemental selenium by moderately halotolerant *Bacillus megaterium* strains isolated from *Bhitarkanika* mangrove soil and characterization of reduced product. **Chemosphere**, v. 84, p. 1231–1237, 2011.
- MORADI, A.; TAHMOURESPOUR, A.; HOODAJI, M.; KHORSANDI, F. Effect of salinity on free living-diazotroph and total bacterial populations of two saline soils. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 2, p. 144-148, 2011.
- NABTI, E.; SAHNOUNE, M.; GHOUL, M.; FISCHER, D.; HOFMANN, A.; ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. Restoration of growth of durum wheat (*Triticum durum* var. waha) under saline conditions due to inoculation with the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* NH and extracts of the marine alga *Ulva lactuca*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 29, p. 6-22, 2010.
- NÓBREGA, R.S.A.; MOTTA, J.S.; LACERDA, A.M.; MOREIRA, F.M.S. Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 4, p. 899-905, 2004.
- OETTERER, M. O processo de fermentação do pescado (Anchovamento). USP/ESALQ. LAN. 662. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/Fermentacao%20do%20pescado.pdf>>. Acesso em: 27 mar. 2012.
- PEREIRA, A.P.A.; BARROS, M.C.S.; OLIVEIRA, J.R.S.; RAMOS, A.P.S.; FREIRE, M.B.G.S.; FREIRE, F.J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Influência da salinidade sobre o crescimento e a produção de ácido indol acético de *Burkholderia* spp.

- endofíticas de cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 112-121, 2012.
- RADWAN, T.E.E.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 10, p. 997-1004, 2005.
- SADEGHI, A.; KARIMI, E.; DAHAJI, P.A.; JAVID, M.G.; DALVAND, Y.; ASKARI, H. Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, DOI 10.1007/s11274-011-0952-7, 2011.
- SANTOS, I.B.; LIMA, D.R.M.; BARBOSA, J.G.; OLIVEIRA, J.T.C.; FREIRE, F.J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de-açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 142-149, 2012.
- XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M.; RUMJANEK, N. G.; NEVES, M.C.P. Tolerância de rizóbio de feijão-caupi à salinidade e à temperatura em condição *in vitro*. **Caatinga (Mossoró, Brasil)**, v. 20, n. 4, p. 01-09, 2007.