

FLAVIANA GONÇALVES DA SILVA

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL POR BACTÉRIAS
HALOTOLERANTES E REINOCULAÇÃO EM *Atriplex nummularia* L.**

GARANHUNS, PERNAMBUCO - BRASIL

JULHO - 2014

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

PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL POR BACTÉRIAS
HALOTOLERANTES E REINOCULAÇÃO EM *Atriplex nummularia* L.

FLAVIANA GONÇALVES DA SILVA

ORIENTAÇÃO DA PROFESSORA
DR^a. MARIA BETÂNIA GALVÃO DOS SANTOS FREIRE

CO-ORIENTAÇÃO DA PROFESSORA
DR^a. JÚLIA KUKLINSHY 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
JULHO - 2014

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

PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL POR BACTÉRIAS
HALOTOLERANTES E REINOCULAÇÃO EM *Atriplex nummularia* L.

FLAVIANA GONÇALVES DA SILVA

GARANHUNS
PERNAMBUCO - BRASIL
JULHO – 2014

Ficha Catalográfica

A ficha deve ser solicitada à Biblioteca através do email: fihacatalog.bs@uag.ufrpe.br, para a solicitação é necessário o envio da folha de rosto e do resumo do trabalho (livro, monografia, dissertação e ou tese). O prazo de entrega da ficha é de até 48 horas úteis.

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL POR BACTÉRIAS
HALOTOLERANTES E REINOCULAÇÃO EM *Atriplex nummularia* L.**

FLAVIANA GONÇALVES DA SILVA

APROVADO EM: ____ DE _____ DE 2014

Dr. Jailson Cavalcante Cunha
(PNPD/Solos-UFRPE)

Érika Valente de Medeiros
(UAG/UFRPE)

Júlia Kuklinshy Sobral
(UAG/UFRPE)
Co-orientadora

Maria Betânia Galvão dos S. Freire
(RECIFE/Solos-UFRPE)
Orientadora

"Arrisque-se, cometa erros. Assim é que se cresce. A dor alimenta nossa coragem.
Precisamos falhar para praticar a coragem."

(Mary Tyler Moore).

“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência, e para chegar onde quer que seja,
aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso antes de qualquer coisa,
querer.”

(Amyr Klink)

“ Tudo é do pai, toda honra e toda glória, é dele a vitória alcançada em minha vida.”

(Padre Fábio de Melo)

Dedico,

Aos meus pais, **Francicleide Maria Gomes da Silva e Francisco Gonçalves da Silva**, minha razão de viver... “Que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade; iluminaram meus caminhos com afeto e dedicação, para que trilhasse sem medo e cheio de esperança; e se doaram inteiros renunciando aos seus sonhos, para que muitas das vezes pudesse realizar os meus”. (Autor desconhecido)

Ofereço,

Ao meu amor, **Janivan Fernandes Suassuna**, pelo companheirismo, amor, paciência... Por sempre me apoiar, incentivar e me tranquilizar com palavras sábias.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me fortalecer diante de todas as barreiras, pelo dom da vida, por todas as bênçãos derramadas.

Aos meus pais, Francicleide Maria Gomes da Silva e Francisco Gonçalves da Silva, por simplesmente me apoiarem em todas as decisões e situações, pelo amor, por serem exemplos de pessoas, razão pela qual sempre luto por dias melhores.

Aos meus irmãos, Francisco Gonçalves da Silva Filho e Flávio Gomes da Silva, por me ajudarem em todos os momentos e pela união e força, apesar da distância.

A minha avó, Olindina Maria Gomes, minha rainha, segunda mãe, pelo o amor. Minhas tias e tios, por me acompanharem, durante a minha vida acadêmica, apoiando-me no que for preciso.

As minhas orientadoras Maria Betânia e Júlia Kuklinshky Sobral, sou grata por terem me recebido de braços abertos no grupo de pesquisa, pelas conversas, conhecimentos repassados, carinho, atenção, amizade, enfim, educadoras que não medem esforços para ajudar o próximo.

Ao Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana (LGBM): Isa, Adjailton, Raquel, Tiago, Jesimiel, Jacy, Williane, Gilka, Lucianne, Bruno, Geraldo, Ricardo, Elvis, Jéssica Rafaela, Gessyka Poliana, Aldo, Everthon, Gabriel, Amanda, Danúbia e Claudineide. Cada um com o seu jeitinho diferente, me cativou de forma especial. Jamais esquecerei nossos momentos de alegrias, risos, preocupações, conversas. Agradeço por ter participado dessa família.

Ao laboratório de Química do solo, nas pessoas de: Karina Marie, Anderson, Hidelblandi, Jacy, Henrique, Clarissa, Patrícia, Jhônatha, Maércio, Cíntia, Renisson, Jailson e Guilherme. Obrigada por todo o apoio e conhecimentos compartilhados.

Ao meu noivo, Janivan Fernandes Suassuna, por me apoiar incondicionalmente em todos os momentos, pelas palavras, principalmente nos momentos difíceis, me fortalecendo diante das batalhas. Pelo o amor e carinho, sou grata.

As minhas amigas, irmãs especiais, Adrielle, Isa e Quel: não existem palavras para demonstrar o meu agradecimento durante a convivência que estivemos juntas. Todas as conversas, momentos tristes e felizes, apoio incondicional, despedidas. Jamais esquecerei!

Aos meus amigos e amigas, Gerlani, Salatiel, Luanna, Sebastião Jr., Andrezza, Cidinha, Alexson, Izaac, Nariane, Ellen, que apesar da distância, jamais deixaram de me apoiar. Aos amigos de Garanhuns, Waber, Marcos, Gustavo, por todo o apoio e momentos juntos.

Aos colegas do mestrado, Elenize, Catinha, Jéssica, Apolo, Jairo, Abrãao, Luan, Amanda, Allison e Izabelle, por todos os momentos.

Aos professores do mestrado em Produção Agrícola, por todos os conhecimentos repassados durante essa caminhada.

À professora Josabete, por todo o apoio e atenção nas análises fisiológicas.

À Unidade Acadêmica de Garanhuns/ Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade de cursar o mestrado em Produção Agrícola.

À Capes pela concessão da bolsa.

Sou grata a todos que ajudaram direto ou indiretamente para a realização deste trabalho!

Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

Flaviana Gonçalves da Silva, filha de Francicleide Maria Gomes da Silva e Francisco Gonçalves da Silva, nasceu no dia 22 de agosto de 1991, na cidade de Catolé do Rocha, Paraíba. No ano de 1996, ingressou no Ensino Fundamental na Escola Municipal Padre Cândido de Araújo Barreto, dando continuidade na Escola Municipal Luzia Maia, ambos na cidade de Catolé do Rocha. Em 2006, iniciou o Ensino Médio e Técnico profissionalizante em Agropecuária na Escola Agrotécnica do Cajueiro, concluindo no ano de 2008. No ano de 2009, iniciou o curso de graduação em Licenciatura em Ciências Agrárias na Universidade Estadual da Paraíba, concluindo no ano de 2012. No mesmo ano, ingressou no mestrado em Produção Agrícola na Unidade Acadêmica de Garanhuns da Universidade Federal de Pernambuco, concluindo em Julho de 2014. Em agosto de 2014 dará início ao doutorado em Agricultura e Biodiversidade na Universidade Federal de Sergipe.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL	12
GENERAL SUMMARY.....	13
INTRODUÇÃO GERAL	14

CAPÍTULO I

BIOPROSPECÇÃO, ISOLAMENTO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL POR BACTÉRIAS ASSOCIADAS ÀS PLANTAS DE *Atriplex* *nummularia* L.

RESUMO	23
SUMMARY.....	24
1. INTRODUÇÃO.....	25
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4. CONCLUSÕES.....	55
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

CAPÍTULO II**REINOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS HALOTOLERANTES EM *Atriplex nummularia* L. CULTIVADA EM AMBIENTE PROTEGIDO**

RESUMO.....	61
SUMMARY.....	62
1. INTRODUÇÃO.....	63
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	65
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
4. CONCLUSÕES.....	80
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

RESUMO GERAL

A salinidade constitui um fator limitante à agricultura e tem se tornado um problema frequente em áreas sob clima árido e semiárido, onde as precipitações são reduzidas e mal distribuídas. Nessas áreas, a maioria das plantas não consegue desenvolver, por isso, os solos ficam desprotegidos e são degradados com o tempo. O aproveitamento de bactérias promotoras de crescimento vegetal com certa tolerância ao estresse salino pode indicar alternativa biotecnológica que possibilite o uso desses micro-organismos como inoculantes, podendo proporcionar efeitos benéficos na interação solo-planta. O cultivo da *Atriplex nummularia* L. tem sido realizado com o objetivo de revegetar estes solos, promovendo a melhoria de suas propriedades físicas e químicas, como técnica de fitorremediação de solos afetados por sais. Com isso, objetivou-se isolar e selecionar bactérias promotoras de crescimento vegetal associadas às plantas de *Atriplex nummularia* L. cultivadas em dois experimentos instalados no estado de Pernambuco e avaliar os efeitos da reinoculação destas bactérias em plantas de *Atriplex* cultivadas em ambiente protegido. Foi determinada a densidade populacional das bactérias e em seguida as mesmas foram testadas quanto às características de promoção de crescimento vegetal *in vitro*: solubilização de fosfato inorgânico, fixação biológica de nitrogênio, síntese de ácido indol acético, produção de exopolissacarídeo e molécula *quorum sensing*. Foram também selecionadas algumas bactérias para reinoculação em plantas de *Atriplex* cultivadas em ambiente protegido, analisando-se nas plantas, aspectos como teor de clorofila *a*, *b* e total; condutância estomática (*gs*); temperatura foliar; fitomassa verde, seca e total das partes fracionadas (raiz, caule e folha) das plantas; conteúdos e teores de sódio, potássio, cálcio e magnésio; nitrogênio total, proteína bruta de folhas e carbono orgânico total. Por meio do isolamento, foi possível obter 107 isolados bacterianos halotolerantes, com resultados positivos quanto às características de promoção de crescimento vegetal. Em relação ao teor de clorofila *a*, *b* e total, condutância estomática e proteína bruta nas plantas, não houve efeito dos tratamentos aplicados. A reinoculação com bactérias halotolerantes e promotoras de crescimento vegetal influenciou o crescimento, teor e conteúdo de nutrientes, nitrogênio total e carbono orgânico total em plantas de *Atriplex*. Portanto, é possível afirmar que existem bactérias halotolerantes associadas às plantas de *Atriplex*, capazes de solubilizar fosfato inorgânico; fixar N₂; produzir AIA, EPS e molécula *quorum sensing*, havendo a possibilidade destes micro-organismos, quando associados às plantas, contribuírem de forma positiva em relação à promoção de crescimento vegetal. As linhagens bacterianas são promissoras no desenvolvimento vegetativo e nutritivo da *Atriplex*. No entanto, necessita-se explorar melhor o efeito dos inoculantes bacterianos associados às plantas halófitas, dando condições para melhoria no processo de fitorremediação de solos salinos.

Palavras-chave: Bioprospecção, salinidade, *Chenopodiaceae*.

GENERAL SUMMARY

Salinity is a limiting factor for agriculture and has become a frequent problem in areas under arid and semi-arid region where rainfall is low and poorly distributed. However, the exploitation of plant growth promoting bacteria with some salt tolerance, indicates biotechnological alternatives that allow the use of these microorganisms as inoculants may provide beneficial effects on soil interaction, plant. Salinity is a limiting factor for agriculture and has become a frequent problem in areas under arid and semi-arid region where rainfall is low and poorly distributed. However, the exploitation of plant growth promoting bacteria with some salt tolerance, indicates biotechnological alternatives that allow the use of these microorganisms as inoculants may provide beneficial effects on soil interaction, plant. It also facilitates plant growth in saline soils, contributing to the cultivation of *Atriplex nummularia* L. to assist in phytoremediation of soils with excess salts. With that aimed to isolate and select plant growth promoting bacteria associated with plants *Atriplex nummularia* grown in two experiments carried out in the state of Pernambuco and evaluate the effects of re-inoculation of these bacteria in *Atriplex* plants grown in greenhouse. The population density of the bacteria was determined and then the same were tested in respect to plant growth promotion: solubilization of inorganic phosphate, nitrogen fixation, synthesis of indole acetic acid, exopolysaccharide production and quorum sensing molecule. Were also selected some bacteria to reinoculation in *Atriplex* plants grown in protected environment, analyzing plants, aspects such as content of chlorophyll *a*, *b* and total; stomatal conductance (*gs*); leaf temperature; green matter, dry and total fractional parts (root, stem and leaf) of plants; content and levels of sodium, potassium, calcium and magnesium; Total plant nitrogen, crude protein of leaves and total organic carbon plant. Thus, through the isolation was possible to obtain 107 halotolerant bacterial isolates, obtained positive results in respect to plant growth promotion. Regarding the content of chlorophyll *a*, *b* and total, stomatal conductance and crude protein in plants, there was no effect of treatments. The reinoculation with halotolerant bacteria and plant growth promoters influenced the growth, form and content of nutrients, nitrogen and total organic carbon in plants of *Atriplex*. Therefore, we can say that there are halotolerant bacteria associated with plants of *Atriplex*, able to solubilize inorganic phosphate; N₂ fixation; produce IAA, EPS and quorum sensing molecule, with the possibility of these micro-organisms, when associated with plants, contribute positively in relation to plant growth promotion. Bacterial strains are promising in vegetative and nutritional development of *Atriplex*. However, it requires further explore the effect of bacterial inoculants associated with halophytes, giving improved conditions for phytoremediation process saline soils.

Keywords: Bioprospecting, salinity, *Chenopodiaceae*.

INTRODUÇÃO GERAL

A salinidade é um termo que qualifica uma situação de excesso de sais solúveis no solo ou no ambiente radicular onde as plantas estão crescendo. Este processo é um dos principais causadores de degradação dos solos em regiões de clima árido e semiárido, culminando em sérios prejuízos no rendimento agrícola (LIMA JÚNIOR et al., 2010; MAPELLI et al., 2013). De acordo com a classificação do “United States Salinity Laboratory” (USSL, 1954), solos salinos são os que possuem condutividade elétrica do extrato de saturação (CEes) superior a 4 dS m^{-1} . No entanto para a maioria das culturas, quando a CEes é igual ou superior a 2 dS m^{-1} , já implica em prejuízo ao desenvolvimento das plantas (OLIVEIRA et al., 2010).

Esta problemática vem crescendo em todo o mundo, sendo que no Brasil, acontece especialmente no Nordeste, resultando em abandono das terras por parte dos produtores, principalmente nos perímetros irrigados. Essas áreas tornam-se degradadas, limitando, ou até impedindo o cultivo de plantas de interesse comercial, culminando com a formação de manchas sem cobertura vegetal, por isso, alternativas devem ser estudadas para ajudar a minimizar esses entraves. Selecionar espécies tolerantes para controlar a salinidade dos solos em longo prazo é uma estratégia que vem sendo explorada com efeitos significativos (FREIRE et al., 2010; SANTOS et al., 2011).

A utilização de plantas halófitas tem sido proposta como solução para recuperação de solos afetados por sais pela técnica da fitorremediação (FREIRE et al., 2010; JHA et al., 2011). Neste sentido, tem sido utilizada a *Atriplex nummularia* L., planta halófito adaptada a altos níveis de salinidade, com alta capacidade de acumular elevadas concentrações de sais em seus tecidos, e extraindo-os dos solos (SANTOS et al., 2013). Dessa forma, a fitoextração de sais utilizando a *Atriplex* é uma alternativa de baixo custo na recuperação de solos salinos e de melhoria significativa nas propriedades dos solos (BOUCHENAK et al., 2012).

Para contribuir com a recuperação desses solos degradados, as bactérias promotoras de crescimento vegetal tem se mostrado úteis no desenvolvimento de estratégias para facilitar o crescimento das plantas em solos salinos, com o intuito de melhorar a produção de material vegetal e, com isso, a extração de sais (NIA et al., 2012). Estes micro-organismos podem estar associados ao cultivo da *Atriplex* em solos salinos, promovendo o crescimento vegetal por ajuste de mecanismos diretos, como a solubilização de nutrientes, fixação biológica de nitrogênio, síntese de fitohormônios, produção de exopolissacarídeos, incluindo também a expressão do biofilme pela molécula *quorum sensing* (HLA). Tais características podem atuar na solução de problemas nutricionais e fitossanitários, como também diminuir a utilização de agroquímicos e evitar a salinização dos solos, por excesso de adubos químicos (PEDRINHO, 2009; COMPANT et al., 2010).

Em relação à promoção de crescimento vegetal, essas bactérias podem desempenhar importante papel na ciclagem do fósforo (P) do solo, disponibilizando este nutriente através de meios biológicos, sendo alternativa viável, com a substituição do fertilizante pelas bactérias solubilizadoras de fosfatos (ALIA et al., 2013), podendo proporcionar a disponibilidade de P para as plantas, através da hidrólise de formas orgânicas para formas inorgânicas (PO_4), em decorrência da ação de enzimas hidrolíticas, principalmente fosfatases ácidas (SANTOS et al., 2012).

Além de promover a fixação biológica de nitrogênio, onde as mesmas têm a habilidade de converter o nitrogênio atmosférico em amônia, beneficiando as plantas (AHEMAD et al., 2013), as bactérias podem também sintetizar fitohormônios, principalmente as auxinas que são capazes de exercer função na regulação do crescimento das plantas, afetando a morfologia das raízes, aumentando o comprimento, número de pêlos radiculares e melhorando a absorção de nutrientes. Ressalte-se, que dentre as auxinas, o ácido indol acético é o mais estudado e mais produzido pelas plantas, principalmente no meristema apical (gema) do caule e pelas bactérias por diferentes rotas, tais como, via dependente e independente de triptofano (PEREIRA et al., 2012).

Inúmeros micro-organismos têm a capacidade de produzir uma substância chamada de exopolissacarídeos (EPS), e essa aptidão permite a adaptação a várias situações de estresses ambientais como o salino, variações de temperatura e estresse hídrico. No entanto,

o EPS possibilita vida livre à bactéria, permitindo a aderência e colonização às superfícies sólidas onde os nutrientes se acumulam, ressaltando-se, ainda, que esta substância envolve as membranas das células protegendo-as do dessecação e de outros estresses ambientais, além de poder ajudar na fixação de nutrientes próximos à bactéria (BARRETO et al., 2011; FLEMMING et al., 2010).

Outro mecanismo bastante explorado no campo biotecnológico é aquele em que algumas bactérias regulam a expressão de genes pelo processo de comunicação denominado de *quorum sensing*. Dentre os sistemas existentes, o inicializado pela molécula N-acil homoserina lactona, AHL é o mais estudado, sendo responsável pela produção de biofilme, mecanismo que facilita a colonização dos micro-organismos que possuam tal característica (SILVA, 2012; ROSSELLÓ & BOUZA, 2013). Desse modo, a comunicação do *quorum sensing* está relacionada com a formação de biofilme, havendo uma proteção contra o ambiente, onde as bactérias encontram-se abrigadas em relativa homeostase, graças à presença da matriz exopolissacarídica (RUMJANCK et al., 2004).

Desse modo, com o intuito de incrementar a técnica da fitorremediação, é importante que haja um entendimento da interação planta-solo-micro-organismos, bem como, inoculação em plantas de *Atriplex*, cultivadas a ambientes salinos. No entanto, poucos relatos são disponíveis na literatura, abordando a promoção de crescimento vegetal em plantas de *Atriplex* (SANTOS, 2010) e concentrações de nutrientes (SOUZA et al., 2011; SOUZA et al., 2014), tornando-se escassas as informações, sobretudo quando relacionadas a alterações morfofisiológicas dessas plantas halófitas. Nesse contexto, percebe-se a importância da exploração e desenvolvimento de novas técnicas biotecnológicas que possam contribuir para o melhor entendimento da interação solo e planta em solos salinos, facilitando a compreensão dos mecanismos associados aos micro-organismos nesses ambientes.

Diante do contexto exposto, objetivou-se bioprospectar, selecionar bactérias promotoras de crescimento vegetal associadas às plantas de *Atriplex nummularia* L., em solos salinos e estudar o efeito da reinoculação em plantas cultivadas em ambiente protegido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHEMAD, M., KIBRET, M. A. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Jornaul of King Saud University-Science*. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>.

ALIA, A. A.; KHOKHAR, S. N.; JABEEN, B; ASAD, S. A. Phosphate solubilizing bacteria associated with vegetables roots in different ecologies. *Pakistan Journal of Botany*. n. 45, p. 535-544. 2013.

BARRETO, M. C. S; FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; SILVA, M. L. R. B.; LIMA-FILHO, J. L. Produção e comportamento reológico de biopolímeros produzidos por rizóbios e caracterização genética. *Revista Brasileira Agrociência*, v.17, n.2-4, p.221-227, 2011.

BOUCHENAK, F.; HENRI, P.; BENREBIHA, F.; REY, P. Differential responses to salinity of two *Atriplex halimus* populations in relation to organic solutes and antioxidant systems involving thiol reductases. *Journal of Plant Physiology*. v.169, p.1445– 1453, 2012.

COMPANT, S; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth promoting bacteria in the rhizo – and endosphere of plans: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v. 30, p. 669-678, 2010.

FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*. v.8, p. 623–633. 2010.

FREIRE, M. B. G. S.; SOUZA, E. R.; FREIRE, F. J. Fitorremediação de solos afetados por sais. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados. Fortaleza, INCTSal, 2010. p.459-471.

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*. 2011. DOI 10.1007/s11104-011-0877-9.

LIMA JÚNIOR, J. A.; SILVA, A. L. P. Estudo do processo de salinização para indicar medidas de prevenção de solos salinos. *Enciclopédia Biosfera*, v. 6, n. 11, p.1-21, 2010.

MAPELLI, F.; MARASCO, R.; ROLLI, E.; BARBATO, M.; CHERIF, H.; AMEL, G.; OUZARI, I.; DAFFONCHIO, D.; BORIN, S. Potential for Plant Growth Promotion of Rhizobacteria Associated with *Salicornia* Growing in Tunisian Hypersaline Soils. *BioMed Research International*. v. 2013, n. 248078, p.1-13. 2013.

NIA, S. H.; ZAREA, M. J.; REJALI, F.; VARMA, A. Yield and yield components of wheat as affected by salinity and inoculation with *Azospirillum* strains from saline or non-saline soil. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, v. 11, p. 113–121, 2012.

OLIVEIRA, A. B.; GOMES-FILHO, E.; ENÉAS-FILHO, J. O problema da salinidade na agricultura e as adaptações das plantas ao estresse salino. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer. v.6, n.11. p. 01-16, 2010.

PEDRINHO, E. A. N. Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays*). IN: Tese, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, 2009. 87 p.

PEREIRA, A. P. A.; SILVA, M. C. B.; 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, p. 112-121, 2012.

ROSSELLÓ, G. A. M.; BOUZA, J. M. E. Quorum sensing en bacterias y levaduras. Medicina Clínica (Barcelona). 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2013.02.031>.

RUMJANCK, N. G.; FONSECA, M. C.C.; XAVIER, G. R. Quorum sensing em sistemas agrícolas. Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento. n.33, p. 35-50, 2004.

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.

SANTOS, K. C. F. Atividade biológica e bioprospecção de bactérias associadas à *Atriplex nummularia* em solo salino sódico no agreste de Pernambuco. IN: Dissertação, Mestrado em Agronomia-Ciência do Solo, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010. 65p.

SANTOS, K. C. F.; SILVA, M. S. L.; SILVA, L. E.; MIRANDA, M. A.; FREIRE, M. B. G. S. Atividade biológica em solo salino sódico saturado por água sob cultivo de *Atriplex nummularia*. Revista Ciência Agronômica, v. 42, n. 3, p. 619-627, 2011.

SANTOS, M. A.; FREIRE, M. B. G. DOS S.; ALMEIDA, B. G.; LINS, C. M. T.; SILVA E. M. Dinâmica de íons em solo salino-sódico sob fitorremediação com *Atriplex nummularia* e aplicação de gesso. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. v.17, n.4, p.397-404, 2013.

SILVA, M. C. B. Bactérias halotolerantes associadas a plantas de cana - de - açúcar em solos da zona da mata de Pernambuco. 2012. 91f. Dissertação de mestrado em Produção Agrícola – Unidade Acadêmica de Garanhuns/Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns. 2012.

SOUZA, E. R.; FREIRE, M. B. G. S.; NASCIMENTO, C. W. A.; MONTENEGRO, A. A. A.; FREIRE, F. J.; MELO, H. F. Fitoextração de sais pela *Atriplex nummularia* Lindl. sob estresse hídrico em solo salino sódico. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v.15, n.5, p.477–483, 2011.

SOUZA, E. R.; FREIRE, M. B. G. S.; MELO, D. V. M.; MONTENEGRO, A. A. A. Management of *Atriplex Nummularia* Lindl. in a Salt Affected Soil in a Semi Arid Region of Brazil. International Journal of Phytoremediation, v.16, n.1, p.73-85, 2014.

United States Salinity Laboratory – USSL. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. Washington, U.S. Department of Agriculture, 1954. 160p. (Handbook 60)

CAPÍTULO I

BIOPROSPECÇÃO, ISOLAMENTO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS A PLANTAS DE *Atriplex nummularia* L

RESUMO

A salinidade do solo é um dos fatores que afeta o crescimento das plantas por promover a degradação de solos, ocorrendo com maior frequência em regiões áridas e semiáridas, impossibilitando o uso dos solos no processo produtivo. Para o retorno da utilização agrícola dos solos, é necessária sua recuperação, que envolve elevados custos e processos de difícil realização. A técnica da fitorremediação é uma alternativa, possibilitando a extração de sais por plantas que se adaptam a solos afetados por sais e envolve baixo investimento e a utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal tem se mostrado útil por facilitar o crescimento de plantas em solos salinos. A *Atriplex nummularia* tem sido utilizada com esse objetivo, por ser uma halófita adaptada a solos salinos e produzir elevada biomassa vegetal, possibilitando a extração significativa de sais dos solos. Assim, com o intuito de melhorar a produção desta planta, podendo contribuir com a fitorremediação de solos afetados por sais, objetivou-se bioprospectar e selecionar bactérias halotolerantes e promotoras de crescimento vegetal associadas às plantas de *Atriplex nummularia* L.. Para a bioprospecção das bactérias, foram coletadas amostras em cinco nichos: 1) solo sem cultivo da planta (testemunha); 2) solo sob cultivo de *Atriplex*; 3) solo aderido à rizosfera da *Atriplex*; 4) raízes; e 5) folhas de plantas de *Atriplex*, em dois experimentos de campo, um no município de Serra Talhada e outro em Ibimirim, Pernambuco. Após a coleta do material de estudo, foi realizado o isolamento das bactérias e a seleção das mesmas em relação aos mecanismos de promoção de crescimento vegetal: solubilização de fosfato inorgânico, submetido à salinidade (0 e 5% NaCl) e tempo de cultivo (3, 6 e 10 dias); fixação biológica de nitrogênio (FBN); síntese de ácido indol acético (AIA); produção de exopolissacarídeos (EPS) e expressão da molécula *quorum sensing* (AHL). Através do isolamento foram obtidas 107 linhagens bacterianas halotolerantes, em que a densidade populacional destas bactérias foi proporcionada com maior destaque na rizosfera da *Atriplex*. Também foi observado que a salinidade afetou o índice de solubilização de fosfato inorgânico pelas bactérias, porém não inibiu tal processo em alta concentração salina, obtendo-se 65 e 25% de isolados positivos para as concentrações de NaCl utilizadas. Para as características de fixação biológica de nitrogênio, produção de AIA, EPS e molécula *quorum sensing* (AHL), foram positivas para estas variáveis, percentuais de 87; 100; 83,33 e 96,33% das bactérias, respectivamente. Portanto, percebe-se a potencialidade das bactérias halotolerantes associadas às plantas de *Atriplex*, havendo a possibilidade destes micro-organismos contribuírem de forma positiva com a promoção de crescimento vegetal da *Atriplex*, potencializando a fitorremediação de solos afetados por sais, além de serem alternativas como inoculantes e colaboradores do desenvolvimento de outras culturas sob salinidade.

Palavras-chave: Salinidade, micro-organismos, FBN.

ABSTRACT

Soil salinity is one of the most important factors affecting plant growth, occurring more frequently in semiarid regions, necessitating the alternatives that minimize this problem. The use of plant growth promoting bacteria have been shown to be useful in developing strategies to facilitate plant growth in saline soils, in order to improve agricultural production, contributing to the cultivation of *Atriplex* and assist in the phytoremediation of soils with excess salts. In this context, the objective was to select bioprospect and halotolerant and plant growth promoting bacteria associated with *Atriplex nummularia* L. plants in saline soils, with the aim of improving their development through the use of micro-organisms. For bioprospecting of bacteria, samples were collected in four niches: soil with and without plant cultivation; rhizosphere soil; roots and leaves in two field experiments with plants of *Atriplex nummularia* L. cultivated in the districts of Sierra Hewn and Ibimirim, Pernambuco. After collecting the study material, isolation of bacteria and selecting the same in relation to the mechanisms of plant growth promotion was conducted: solubilization of inorganic phosphate under salinity (0 and 5 % NaCl) and culture time (3, 6:10 days); biological nitrogen fixation (BNF); production of indole acetic acid (IAA); exopolysaccharide (EPS) and quorum sensing molecule (AHL). 107 halotolerant by isolating bacterial strains in the population density of the bacteria was provided with greater emphasis on rhizosphere associated *Atriplex* were obtained. It was also observed that the salinity affect the rate of solubilization of inorganic phosphate by the bacteria, but did not inhibit this process in high salt concentration yielding 25% and 65 positive isolates for their concentrations of NaCl. For the characteristics of biological nitrogen fixation, production of IAA, EPS and quorum sensing (AHL) molecule, were positive for these variables, percentage of 87; 100; 83.33 and 96.33% of the bacteria, respectively. Therefore, we see the potential of halotolerant bacteria associated with plants of *Atriplex*, with the possibility of these micro-organisms associated with halophytes, contribute positively to the promotion of plant growth, allowing the phytoremediation of saline soils, and are alternatives as inoculants employees and crop development under salinity.

Keywords: Salinity, micro -organisms, FBN.

1. INTRODUÇÃO

A salinidade é um dos fatores abióticos que afeta negativamente o rendimento das culturas, crescente em todo o mundo, especialmente em regiões áridas e semiáridas (SILINI-CHÉRIF et al., 2012). Este processo acontece devido ao manejo incorreto da irrigação e fertilização excessiva, tornando-se contribuintes intensos para o aumento de áreas com altas concentrações salinas. Com o intuito de melhorar esses solos, é importante adotar técnicas de recuperação e, dentre estas, existe a possibilidade do uso de plantas halófitas com a função de fitorremediação, das quais a *Atriplex nummularia* Lindl representa uma espécie de grande importância, devido a sua adaptabilidade à salinidade e escassez hídrica (SOUZA et al., 2011; SANTOS et al., 2013).

O excesso de sais no solo desempenha uma problemática importante, podendo ou não interferir efetivamente nas comunidades microbianas do solo. Deste modo, selecionar linhagens que suportem este tipo de estresse, bem como bioprospectar isolados bacterianos associados à *Atriplex* com características de promoção de crescimento associados a ambientes salinos, vem sendo uma estratégia que possibilita possíveis alternativas para melhorar o desenvolvimento vegetal, além de beneficiar também as características biológicas e químicas do solo (DOOD & PÉREZ-ALFOCEA, 2012; UPADHYAY et al., 2012; DAMODARAN et al., 2013).

Na agricultura sustentável é importante encontrar tecnologias que aumentem o rendimento e reduzam o uso de fertilizantes químicos, portanto, uma alternativa viável são as bactérias halotolerantes com promoção de crescimento vegetal (SALAMONE et al., 2012). Como formas de contribuição para a agricultura, os micro-organismos podem atuar expressando diferentes mecanismos, como a solubilização de fosfato inorgânico, fixação biológica de nitrogênio, síntese de fitohormônio, produção de exopolissacarídeo, como também a expressão da molécula *quorum sensing*. Estes processos são realizados por diversas espécies de bactérias com habilidade em solubilizar o fosfato inorgânico existente no solo, deixando-o disponível para os vegetais, e incluem, também, a conversão de nitrogênio atmosférico em amônia, produção de auxinas capazes de exercer função na regulação do crescimento das plantas, proteção do vegetal contra estresses, como salino,

hídrico, e altas temperaturas. Estas ações dos micro-organismos refletem na diminuição do uso de adubos químicos, representando um benefício econômico e minimizando os impactos de fertilizantes sobre o meio ambiente (FARIAS et al., 2012; LIRA-CADETE et al., 2012; PEREIRA et al., 2012; SANTOS et al., 2012; DAWWAM et al., 2013).

Apesar de se encontrar nos solos a maior biodiversidade microbiana do planeta, os estudos sobre o potencial biotecnológico de bactérias halotolerantes associadas aos vegetais em solos salinos ainda são escassos (FLORES-FERNÁNDEZ et al., 2010). Mapelli et al. (2013) ressaltam que a influência destas bactérias sobre o crescimento das plantas tem sido reconhecida em habitats convencionais e extremos, onde a capacidade das bactérias de facilitar a adaptação das plantas e promover o crescimento e a produtividade tem sido comprovada.

As condições extremas aos quais esses micro-organismos sobrevivem desencadeiam uma curiosidade enorme da parte da comunidade científica no conhecimento da fisiologia destes organismos. No entanto, a grande força impulsionadora destes estudos é o potencial biotecnológico de mecanismos provenientes destas bactérias. Com isso, as interações de solo-planta-micro-organismos desempenham um papel vital na mobilização de nutrientes e substâncias, influenciando positivamente o rendimento de culturas, podendo contribuir positivamente no cultivo da *Atriplex* e ajudando na recuperação de solos salinos.

Nesse contexto, objetivou-se bioprospectar e selecionar bactérias halotolerantes e promotoras de crescimento vegetal associadas às plantas de *Atriplex nummularia* L. em solos salinos, com o intuito de melhorar o desenvolvimento deste vegetal através da utilização de micro-organismos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material de estudo

Para a bioprospecção das bactérias, as amostras foram coletadas em cinco nichos: 1) solo da área sem cultivo de *Atriplex* (testemunha); 2) solo cultivado com *Atriplex* coletado a uma distância de 1 metro da planta; 3) solo sob cultivo da *Atriplex* coletado na rizosfera das plantas; 4) raízes de plantas de *Atriplex*; e 5) folhas de plantas de *Atriplex*. As amostras foram coletadas em dois experimentos de campo, com plantas de *Atriplex nummularia* L. cultivadas em lotes nos perímetros irrigados: Cachoeira II (Serra Talhada) e Moxotó (Ibimirim), estado de Pernambuco.

As amostras coletadas da zona radicular e folhas foram utilizadas para a determinação das bactérias endofíticas do material vegetal e, logo após a coleta do material de estudo, as amostras foram transportadas ao Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana (LGBM) da Unidade Acadêmica de Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco, para que as análises pudessem ser procedidas.

Nas amostras de solo dos três primeiros nichos (solo sem planta, solo com planta e solo da rizosfera da planta) foram realizadas as análises químicas e físicas, no Laboratório de Química do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Foi obtido o extrato de saturação dos solos para a medida da condutividade elétrica (CEes) e do pH, determinando-se os teores de cátions solúveis (Ca^{2+} e Mg^{2+} , por espectrofotometria de absorção atômica; Na^+ e K^+ , por fotometria de emissão de chama), conforme USSL (1954). Nestas amostras de solo mediu-se o pH em água (1:2,5) e determinaram-se os teores de carbono orgânico total (conforme MENDONÇA & MATOS, 2005); de P disponível, extraído por Olsen e dosado por colorimetria; dos cátions trocáveis (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ e K^+), extraídos por acetato de amônio 1 mol L^{-1} , dosando-se o Ca^{2+} e o Mg^{2+} por espectrofotometria de absorção atômica; e o Na^+ e o K^+ por fotometria de emissão de chama (THOMAS, 1982), cujos resultados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização química dos solos utilizados no isolamento das bactérias

Atributo	Serra Talhada			Ibimirim		
	SSC ¹	SCC ²	RIZO ³	SSC ¹	SCC ²	RIZO ³
pH água (1: 2,5)	8,15	9,04	9,4	7,3	7,6	7,6
Ca ²⁺ (cmol _c kg ⁻¹)	6,45	4,99	5,31	26,32	36,62	17,1
Mg ²⁺ (cmol _c kg ⁻¹)	0,15	0,12	0,13	0,64	0,57	0,37
Na ⁺ (cmol _c kg ⁻¹)	10,72	9,93	5,98	7,77	8,32	3,19
K ⁺ (cmol _c kg ⁻¹)	0,53	0,49	0,67	0,72	0,82	0,51
P (mg kg ⁻¹)	6,05	8,04	6,81	11,75	9,85	16,87
CEes (dS m ⁻¹)	41,59	38,73	13,69	59,89	54,44	44,29
pHes	6,8	7,71	8,38	3,65	4,32	6,84
Ca ²⁺ (mmol _c L ⁻¹)	270,32	217,6	160,8	438,5	2298	1481
Mg ²⁺ (mmol _c L ⁻¹)	44,66	19,66	3,83	991,66	904,16	383,33
Na ⁺ (mmol _c L ⁻¹)	160,08	88,6	13,39	263,45	238,62	127,45
K ⁺ (mmol _c L ⁻¹)	0,41	0,44	0,15	0,76	0,85	0,67
COT (dag kg ⁻¹)	0,86	0,82	0,78	1,83	1,36	1,28

¹Solo sem cultivo; ²Solo com cultivo de *Atriplex*; ³ Solos da rizosfera de plantas de *Atriplex*.

2.2. Isolamento das bactérias associadas à *Atriplex*

Para o isolamento de bactérias do solo da área sem cultivo da planta, solo cultivado e rizosférico, foram utilizadas cerca de 5 a 10 g de cada amostra, onde foram transferidos para frascos Erlenmeyers (250 mL) contendo 5 g de pérolas de vidro (0,1cm de diâmetro) e 50 mL de tampão fosfato salino-*Phosphate Buffered Saline*. Estes frascos foram mantidos sob agitação constante a 90 rpm por 1h, em temperatura ambiente (28°C). Em seguida, foram realizadas diluições seriadas em tampão PBS e 100 µL, logo após foram inoculados em placa de Petri contendo o meio de cultura TSA 10% (*Tryptone Soy Agar*) acrescido de 5% de NaCl, suplementado com o fungicida Cercobyn 700 (50 µg ml⁻¹), e incubadas a 28°C para sucessivas avaliações. A população bacteriana total por grama de solo fresco (UFC.g⁻¹) foi estimada pela contagem de colônias cultivadas em meio de cultura de acordo com Santos (2010).

No isolamento das bactérias endofíticas, foi realizada a desinfecção superficial das amostras das raízes e folhas (aproximadamente 3 g), através de lavagem por 1 minuto em etanol 70%; 2 minutos em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% de cloro ativo (v/v) e 30 segundos em etanol 70%, seguido de duas lavagens em água destilada esterilizada. Posteriormente, os tecidos foram cortados em pequenos fragmentos e triturados em 10 mL de tampão *Phosphate Buffered Saline* (PBS) (ARAÚJO et al., 2010; LIMA, 2012). Logo após, todo o material foi transferido para tubos Falcon de 15 mL e mantidos sob agitação constante a 120 rpm por 40 minutos, em temperatura ambiente (28°C). Em seguida, foram realizadas diluições em tampão PBS (100 µL) e sendo inoculados em meio de cultura TSA 10%, da mesma forma que o solo, sendo estimada a densidade populacional bacteriana por grama de tecido vegetal fresco.

Depois da estimativa das colônias bacterianas do solo, rizosféricas e endofíticas, as colônias características de cada tipo morfológico foram repicadas das placas de isolamento, purificadas pela técnica de esgotamento e mantidas a -20°C, em meio TSA 10% líquido suplementado com 60% de glicerol, sendo armazenadas e estocadas, para testes posteriores.

2.3. Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico

Na análise de solubilização de fosfato inorgânico, as bactérias foram inoculadas em meio de cultura sólido contendo fosfato insolúvel, o fosfato de cálcio bibásico, e logo depois incubadas a 28°C. A presença de área clara, ao redor das colônias bacterianas, indicaram a solubilização do fosfato. Foram avaliadas, 107 linhagens bacterianas provenientes do isolamento, referente aos ambientes e nichos: solo com e sem cultivo; endofíticos de raiz e folha, associadas às plantas de *Atriplex* nas duas áreas de coleta. Também foi observada a solubilização de fosfato nas concentrações de 0 e 5 % de NaCl; e em relação ao tempo de cultivo, fazendo leituras aos 3, 6 e 10 dias após a inoculação. Em seguida, foi calculado o índice de solubilização (IS), expresso pela relação do diâmetro médio do halo de solubilização pelo diâmetro médio do halo da colônia (SANTOS et al., 2012; LIMA, 2012).

2.4. Seleção de bactérias fixadoras de nitrogênio

Para a avaliação de fixação biológica de N_2 , foram avaliados 71 bactérias isoladas das áreas de Serra Talhada e Ibimirim, com 43 e 28 linhagens, respectivamente, provenientes dos ambientes e nichos supracitados, ressaltando-se que, antecedendo a esse teste, essas mesmas linhagens foram caracterizadas como positivas quanto à solubilização de fosfato na concentração de 0% de NaCl. As bactérias foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura NFb semissólido sem nitrogênio com duas repetições, incubadas a 28°C, sendo avaliadas após 7 dias de crescimento. O resultado positivo foi caracterizado qualitativamente pela formação de película ou halo de crescimento bacteriano de cor clara, no interior do meio de cultura, indicando a capacidade de fixação biológica de nitrogênio (SANTOS, 2010; PEREIRA et al., 2012).

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

Na seleção e quantificação da produção de ácido 3-indol acético (AIA), foram avaliadas 57 linhagens bioprospectadas das áreas de Serra Talhada (38 linhagens) e Ibimirim (19 linhagens), sendo também positivas em relação à solubilização de fosfato inorgânico. As bactérias foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 3 mL do meio líquido TSA suplementado com 5 mM de L-triptofano, utilizando três repetições. Logo após, os tubos foram mantidos em agitação constante a 120rpm por um período de 16h, na ausência de luz. Quando foi constatado o crescimento bacteriano, realizou-se uma reação com o reagente de Salkowski, na relação de 1:1 (ARAÚJO, 2010). A reação foi mantida a temperatura ambiente por 20 minutos, na ausência de luz e logo após foi submetida à leitura da absorbância em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 530nm (PEREIRA et al., 2012).

2.6. Seleção de bactérias produtoras de Exopolissacarídeos (EPS)

Para a seleção e produção de exopolissacarídeos, as linhagens bacterianas foram cultivadas em meio líquido (TSA) 10% e, logo após realizou-se a inoculação de 5 μL do inoculo cultivado em discos de 5 mm de diâmetro em meio de cultura sólido modificado (20 g L^{-1} de extrato de levedura; 15 g L^{-1} de K_2HPO_4 ; 0,2 g L^{-1} de MgSO_4 ; 0,015 g L^{-1} de MnSO_4 ; 0,015 g L^{-1} de FeSO_4 ; 0,03 g L^{-1} de CaCl_2 ; 0,015 g L^{-1} de NaCl ; 15 g L^{-1} de Agar) e, em seguida, foram adicionados 10% da fonte de carbono, a sacarose, em pH 7,3, sendo cultivadas por 24 horas, a temperatura de 28°C. O experimento foi realizado em triplicata, utilizando 30 isolados bacterianos, oriundos das duas áreas de estudo.

A produção do EPS foi caracterizada visualmente pela presença ou ausência do halo de produção do mesmo, caracterizando como positivo ou negativo e, em seguida, foi feita uma classificação de acordo com o tamanho do halo do EPS produzido, correspondendo: (+) para halo com pouca produção - halo de EPS ≤ 10 mm de diâmetro; (++) para halo com média produção - halo de EPS 10-14 mm de diâmetro; (+++) para halo com ótima produção-halo de EPS ≥ 14 mm de diâmetro. Para a medição do halo foi utilizado um paquímetro digital. Posteriormente, foi realizada a confirmação da produção de EPS, coletando-se materiais celulares das colônias bacterianas com alça de platina e colocando-se em tubos com 2 mL de álcool etílico. Quando o EPS precipita é expressa a produção positiva, enquanto que o meio turvo caracteriza a produção negativa (KAVAMURA, 2012).

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

A identificação de bactérias produtoras da molécula *quorum sensing* (N-Acil homoserina lactona, AHL) foi realizada por meio da bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, biossensor de ALHs, em bioensaios com as bactérias testes. *A. tumefaciens* NT1 foi inoculada linearmente na extremidade de placas de Petri contendo meio LB (*Luria Bertani*), acrescido de X-gal (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) por toda a superfície da placa. Os isolados bacterianos foram inoculados transversalmente à *A. tumefaciens*, que contém o promotor TraR (fusão do gene TraG :: LacZ), formando um complexo que regula a expressão do operon da LacZ. Na presença de ALHs, estas se ligam ao promotor TraR, ativando a expressão do gene LacZ, codificando a enzima β -galactosidase, a qual quebra a molécula X-gal, tornando a célula azul (SZENTHE & PAGE, 2002; QUECINE, 2010). Dessa forma, após a inoculação a 28°C por 48 h, a observação de colônias de *A. tumefaciens* com pigmentação azul indicou a produção de ALHs pelas bactérias avaliadas. Nesse teste, foram avaliadas 30 linhagens provenientes das áreas de isolamento, realizando-se o experimento em duplicata.

2.8. Análise Estatística

Os dados obtidos para a densidade populacional de bactérias foram submetidos à análise de variância pelo teste F, a 5% de significância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Para as médias do índice de solubilização de fosfato inorgânico, produção de ácido indol acético e exopolissacarídeos, foi aplicado o teste de Scott-Knott, com probabilidade de 5%, através do programa SISVAR 5.3. Os dados de frequência relativa foram submetidos ao teste do Qui-quadrado (χ^2) para confirmar a influência dos fatores área e nicho de colonização bacteriana sobre a distribuição das linhagens solubilizadoras de fosfato, fixadoras de nitrogênio e produtoras de AIA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Isolamento das bactérias

Observa-se densidade populacional bacteriana, em ambas as áreas e nichos, com uma variação de 10^2 a 10^7 UFC g^{-1} de solo ou g^{-1} de tecido vegetal fresco. Percebe-se diferença significativa entre os nichos, observando-se que a densidade populacional das bactérias do solo rizosférico proporcionou valor médio de 10^7 UFC g^{-1} de solo para as duas áreas estudadas, seguindo com 10^6 e 10^5 UFC g^{-1} de solo, no solo sem e com cultivo nas áreas de Serra Talhada e Ibimirim. Ressalta-se ainda, que no nicho endofítico de folha, foi onde ocorreu menor população de bactérias isoladas (10^2 g^{-1} de tecido vegetal fresco) (Figura 1).

Diante destes resultados, percebe-se que a rizosfera se destaca em relação aos demais nichos, simplesmente pelo fato da grande parte dos micro-organismos evoluírem no sentido de colonizarem a rizosfera das plantas, beneficiando-se assim dos compostos ricos em carbono, que estão ligados aos exsudados das raízes (UPADHYAY et al., 2009). Estes compostos secretados pelas raízes das plantas atuam como atrativos químicos para um grande número de comunidades heterogêneas e diversificadas. Possivelmente, a comunidade microbiana pode variar em função da espécie vegetal e tipo do solo, pois esses influenciarão nos compostos orgânicos exsudados em quantidade e qualidade, os quais, por sua vez, selecionarão ou favorecerão grupos nutricionais de organismos específicos na rizosfera (AHEDMA & KIBRET, 2013). Ressalva-se ainda, que o solo sem o cultivo da *Atriplex*, com cultivo e solo rizosférico associado às plantas, são salinos (Tabela 1) e, conseqüentemente, as bactérias destes ambientes formaram grupos com certa tolerância a este fator de estresse em cada nicho estudado.

Resultados semelhantes ao do presente trabalho foram encontrados por Santos (2010), estudando a bioprospecção de bactérias associadas à *Atriplex nummularia* L. em solo salino-sódico no Agreste de Pernambuco, revelando valores expressivos da densidade populacional no nicho do rizoplano, seguido pela zona radicular. Em outro estudo, Jha et al. (2011), avaliando bactérias halotolerantes e promotoras de crescimento vegetal associadas às raízes da halófito *Salicornia brachiata*, observaram densidade populacional de bactérias,

com até 10^7 UFC g^{-1} de tecido vegetal fresco. Já Mapelli et al. (2013), estudando bactérias associadas à rizosfera da planta *Salicornia* em solos hipersalinos, perceberam valores variando de 9×10^4 a $1,6 \times 10^{10}$ UFC g^{-1} de solo, resultados superiores para densidade populacional, comparando-se com este trabalho. Esses autores ainda relatam que a interação com a planta e a presença de exsudados radiculares podem ser responsáveis pela maior abundância de bactérias halotolerantes detectadas na rizosfera.

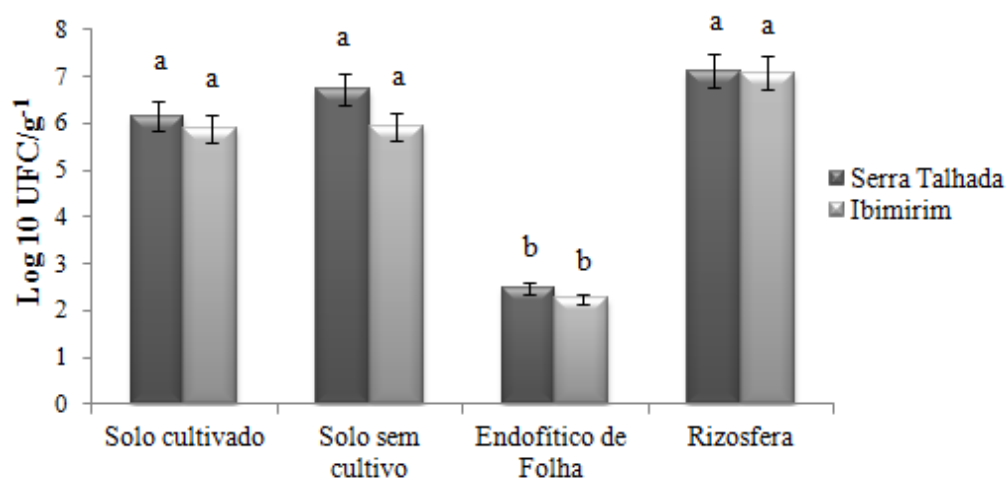


Figura 1. Densidade populacional da comunidade bacteriana (Log₁₀ UFC g^{-1} de solo ou g^{-1} de tecido vegetal fresco), de duas áreas com experimentos de *Atriplex nummularia* L. Letras iguais, não diferem entre si dentro de cada área, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.2. Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico

Quanto à avaliação da solubilização de fosfato inorgânico, foram analisadas 107 bactérias provenientes do isolamento, dentre as duas áreas e nichos. Observa-se a expressão desta característica em duas concentrações de NaCl, 0% e 5%, e tempos de cultivo de 3, 6 e 10 dias após a inoculação (Figura 2).

Com isso, percebe-se que 65% das bactérias avaliadas são capazes de solubilizar fosfato inorgânico na concentração de 0% de NaCl e 25% na concentração de 5%, indicando certa tolerância desses micro-organismos quanto à salinidade. Conseqüentemente, concentrações mais elevadas de sais, afetam o mecanismo de solubilização de fosfato inorgânico (SFI), no entanto, não inibe essa atividade na maior concentração testada nesse trabalho, o que confirma a existência de bactérias solubilizadoras halotolerantes associadas à *Atriplex*.

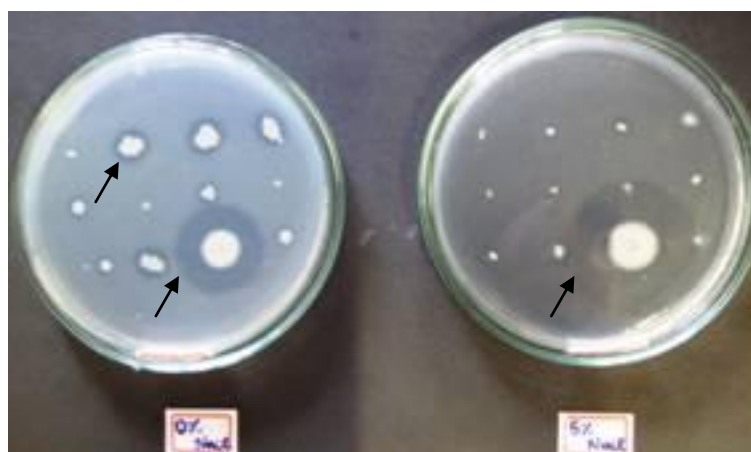


Foto: Flaviana Gonçalves da Silva

Figura 2.1. Solubilização de fosfato inorgânico com meio de cultura acrescido de 0 e 5% de NaCl.

Ao se avaliar a frequência relativa isoladamente entre os nichos em cada área de bioprospecção, quanto à SFI, percebe-se que houve diferença significativa pelo teste do qui-quadrado. Assim na área de Serra Talhada, a frequência relativa da SFI teve destaque para as bactérias oriundas da rizosfera com 24,6% de positivos, enquanto que as endofíticas

de folha expressaram menor intensidade (12,3%) (Figura 3A). Quanto à SFI na área de Ibimirim, observa-se percentuais de 28,57 e 28,56%, para rizosfera e endofítica de folha, respectivamente, se sobressaindo em relação a 21,42% das bactérias do solo com e sem cultivo (Figura 3B).

Destaca-se, que as bactérias da rizosfera dentre as distintas áreas, proporcionaram uma alta frequência relativa de positivos na SFI, quando comparados aos demais. Tal resultado pode ter sido influenciado pela quantidade de fósforo disponível existente na rizosfera, onde as bactérias foram bioprospectadas das distintas áreas (Tabela 1). Silva et al. (2011) relatam que a comunidade microbiana do solo é extremamente abundante na rizosfera, e mostram que sua atividade bioquímica pode aumentar sensivelmente a absorção de fósforo pelas plantas. Dessa forma, o efeito positivo da atividade dos micro-organismos neste nicho geralmente proporciona vantagens, tanto para o crescimento da planta, quanto para a atividade microbiana no solo salino.

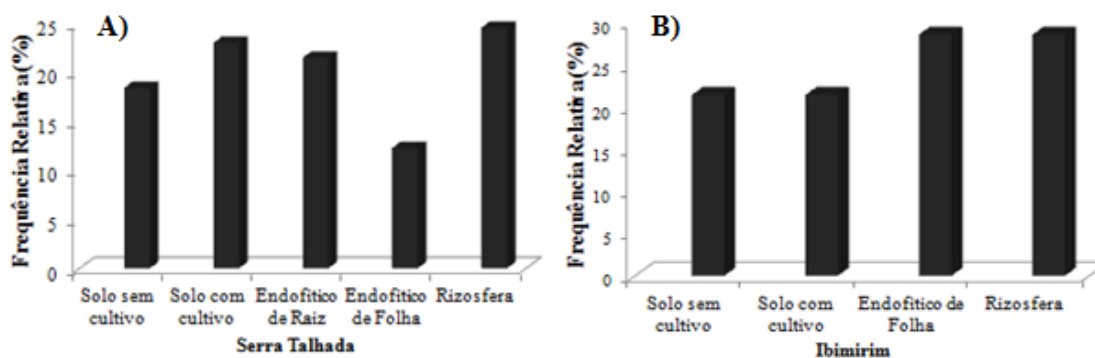


Figura 3.1. Frequência relativa da solubilização de fosfato inorgânico em isolados bacterianos de diferentes nichos associados as plantas de *Atriplex nummularia* L., na área de Serra Talhada (A) e Ibimirim (B). (Análise pelo teste do χ^2 , revelou diferença significativa entre os tratamentos).

Na Tabela 2, estão apresentadas as médias equivalentes à avaliação do índice de solubilização de fosfato inorgânico (IS), quanto aos dias de cultivo e concentrações de NaCl, percebendo-se diferença significativa entre as linhagens testadas.

Evidencia-se que na ausência de NaCl aos 3 dias de cultivo, a linhagem UAGAt 19 (Solo sem cultivo-Serra Talhada) expressou o maior IS (9,0) comparando-se às demais. Já a linhagem UAGAt 21, bioprospectada do solo sem cultivo da área de Serra Talhada, expressou o menor IS (1,16) quando analisada neste tempo. Aos 6 dias de cultivo nessa mesma concentração de NaCl, existiu um maior número de solubilizadoras comparando-se com os 3 dias de cultivo. Deste modo, em torno de 53% das linhagens foram consideradas positivas aos 6 dias de cultivo, tendo destaque as bactérias endofíticas de raiz da área de Serra Talhada, com valor máximo de 9,73 (IS) pela linhagem UAGAt 34, enquanto que o menor índice (1,28) foi obtido pela UAGAt 126 do nicho endofítico de folha na área de Ibimirim.

Na análise do IS aos 10 dias de cultivo, percebe-se um estacionamento na SFI pelas linhagens de ambas as áreas, havendo também agregação dos halos de solubilização de algumas bactérias impossibilitando a leitura dos mesmos. Todavia, analisando-se as demais, pode-se observar variação do IS, com 5,57 e 1,0 para as linhagens UAGAt 01 (Solo sem cultivo-Serra Talhada) e UAGAt 104 (Solo com cultivo-Ibimirim), respectivamente (Tabela 2).

Com a avaliação das bactérias na concentração de 5 % de NaCl em 3 dias de cultivo, observa-se que não ocorreu SF pelas bactérias de nenhuma das áreas e nichos, enquanto que com 6 dias de cultivo, existiu uma solubilização de 15% das linhagens testadas, destacando-se as bactérias UAGAt 101 (Solo sem cultivo -Ibimirim) e UAGAt 01 (Solo sem cultivo-Serra Talhada) com IS equivalente a 4,10 e 3,48, respectivamente, diferindo dos ISs das demais bactérias analisadas neste tempo de cultivo. Aos 10 dias de cultivo, percebe-se um acréscimo do índice de solubilização das bactérias cultivadas nesta concentração de NaCl, obtendo 21,50% dos isolados positivos nessas condições. No entanto, a bactéria que expressou significativamente o maior valor de IS comparando-se com às demais, foi a UAGAt 89 (6,0) associada ao solo sem cultivo da área de Ibimirim,

diferentemente da UAGAt 124 (Endofítico de folha-Ibimirim) que proporcionou o menor IS (1,28) (Tabela 2).

É importante enfatizar que algumas bactérias foram capazes de solubilizar fosfato inorgânico, expressando essa capacidade em maior quantidade quando foram testadas aos 10 dias de cultivo após a inoculação, proporcionando expressivos ISs, principalmente na concentração de 5% de NaCl.

Mediante os resultados obtidos quanto a SFI, percebe-se grande variação dos valores de IS para a avaliação em relação à ausência e presença de NaCl, tempo de cultivo, entre áreas e nichos associados às plantas de *Atriplex*. Evidencia-se que vários fatores podem interferir neste mecanismo. Pelos dados dispostos na Tabela 1 observa-se que o solo sem cultivo da área de Ibimirim tem maior condutividade elétrica (59,89 dS/m), o que confirma ser mais salino do que o solo sem cultivo da área de Serra Talhada (41,59 dS/m). Esses dados podem justificar a predominância de maiores ISs na área de Serra Talhada quando testada na concentração de 0% de NaCl, enquanto que na concentração de 5% as bactérias isoladas da área de Ibimirim se sobressai nessa característica. Isso ocorre devido à formação de grupos mais adaptados a cada ambiente, obtendo-se a variação nos resultados dentro da solubilização de fosfato inorgânico.

Levando em consideração o pH do solo sem cultivo das distintas áreas, utilizado para a bioprospecção das bactérias, percebe-se uma redução desta característica nesse ambiente. Esse fato também pode estar associado aos maiores índices de solubilizações por estes micro-organismos. Marra (2012) reporta que a capacidade de bactérias em solubilizar fosfatos inorgânicos insolúveis, tem sido atribuída à redução do pH ao seu redor, promovendo uma maior solubilização de fosfatos, como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, entre outros.

Diversos micro-organismos são capazes de solubilizar fosfato inorgânico, porém sua capacidade transformadora pode associar-se às condições ecológicas, incluindo as características do solo e a vegetação. Quanto à expressão da solubilização em condições de salinidade associada à *Atriplex*, isto pode ser explicado, pelo fato do sal afetar negativamente o crescimento e a proliferação de células microbianas, resultando numa perda de eficiência deste mecanismo de promoção de crescimento, podendo ser variável

entre as espécies bacterianas. Com isso, as bactérias tendem a se adaptar constantemente a sua fisiologia para mudanças nos fatores físico-químicos do ambiente, que incluem a acumulação de osmoprotetores, expressando mecanismos adaptativos para alcançar ajuste osmótico e garantir a estabilização de certas proteínas ativas. Isso ocorre devido à alteração na sua propriedade eletrostática, diante das condições de salinidade no meio (CHÉRIF-SILINI et al., 2013).

Outros estudos envolvendo análise de bactérias quanto à solubilização de fosfato inorgânico e salinidade já foram desenvolvidos, a exemplo do trabalho realizado por Santos et al. (2012), que, ao estudarem este mecanismo em bactérias diazotróficas associadas às raízes de cana-de-açúcar, obtiveram valores do IS entre 1,00 a 2,33 para bactérias endofíticas de raiz e 1,21 a 3,48 com bactérias da rizosfera. Neste aspecto, valores superiores foram encontrados no presente trabalho quanto ao IS em bactérias halotolerantes associadas as plantas de *Atriplex*. Em outra pesquisa, Nakbanpote et al. (2013), abordando a tolerância de bactérias promotoras de crescimento vegetal quanto à salinidade, observaram bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico em condições de 8% de NaCl, confirmando a halotolerância desses micro-organismos. Ao estudarem bactérias solubilizadoras de fosfato associadas às raízes de legumes, Alia et al. (2013) observaram IS variando entre 1,8 e 5,0.

Pode-se perceber que os ISs encontrados com as bactérias associadas à *Atriplex* neste trabalho proporciona potencialidade para promoção de crescimento vegetal, o que demonstra a eficiência desses micro-organismos oriundos de solos salinos. No entanto, para a maximização do processo de solubilização de fosfato inorgânico, ainda há necessidade de aprofundamento no conhecimento destes micro-organismos associados às plantas hálofitas, como à *Atriplex* em solos salinos, para que esse processo seja indicado com segurança na fitorremediação de solos e na agricultura sustentável.

Tabela 2. Médias do índice de solubilização de fosfato inorgânico por bactérias halotolerantes associadas à *Atriplex nummularia* L.

Linhagem	Nicho	0% de NaCl			5 % de NaCl			Linhagem	Nicho	0% de NaCl			5 % de NaCl		
		3 dias	6 dias	10 dias	3 dias	6 dias	10 dias			3 dias	6 dias	10 dias	3 dias	6 dias	10 dias
UAGAt 01	SSC	-	1,383 d	5,573 a	-	-	3,623 b	UAGAt 72	RIZO	-	1,453 d	-	-	-	-
UAGAt 02	SSC	2,410 e	2,310 c	2,260 c	-	3,486 a	-	UAGAt 73	RIZO	2,126 e	2,520 c	-	-	-	-
UAGAt 06	SSC	-	1,840 d	2,316 c	-	-	-	UAGAt 75	RIZO	1,843 e	2,090 d	-	-	-	-
UAGAt 08	SSC	1,880 e	2,513 c	2,636 c	-	-	-	UAGAt 76	RIZO	-	2,686 c	-	-	-	-
UAGAt 09	SSC	1,836 e	2,516 c	2,633 c	-	-	-	UAGAt 77	RIZO	-	3,036 c	-	-	2,796 b	1,986 c
UAGAt 13	SSC	1,870 e	2,806 c	-	-	-	-	UAGAt 89	SSC	-	2,330 c	2,683 c	-	1,813 c	6,020 a
UAGAt 14	SSC	1,596 e	1,576 d	2,016 d	-	1420 c	-	UAGAt 92	SSC	-	1,883 d	2,590 c	-	-	2,266 c
UAGAt 15	SSC	1,903 e	2,140 d	1,963 d	-	-	-	UAGAt 93	SSC	-	1,933 d	1,900 d	-	-	-
UAGAt 19	SSC	9,570 a	-	-	-	-	-	UAGAt 94	SSC	-	1,796 d	1,773 d	-	-	-
UAGAt 21	SSC	1,166 e	1,943 d	-	-	-	1,600 c	UAGAt 95	SSC	1,470 e	1,753 d	-	-	-	-
UAGAt 22	SSC	-	2,446c	-	-	1,146 c	-	UAGAt 98	SCC	1,853 e	2,096 d	-	-	-	-
UAGAt 23	SCC	1,523 e	-	-	-	-	-	UAGAt 99	SCC	-	2,203 c	2,360 c	-	-	-
UAGAt 25	SCC	1,896 e	2,913 c	-	-	1,503 c	1,933 c	UAGAt 101	SCC	-	1,893 d	2,013 d	-	4,103 a	4,290 b
UAGAt 33	ER	2,670 d	1,920 d	-	-	-	1,453 c	UAGAt 104	SCC	-	-	1,080 d	-	-	-
UAGAt 34	ER	6,823 b	9,730 a	-	-	-	-	UAGAt 107	SCC	-	1,836 d	-	-	-	-
UAGAt 35	ER	2,176 e	-	-	-	-	1,596 c	UAGAt 108	SCC	1,373 e	1,430 d	-	-	1,683 c	-
UAGAt 36	ER	2,043 e	-	-	-	-	1,480 c	UAGAt 113	EF	1,676 e	1,946 d	-	-	-	-
UAGAt 37	ER	2,156 e	1,680 d	-	-	1,136 c	-	UAGAt 114	EF	1,590 e	2,496 c	-	-	2,410 b	-
UAGAt 38	ER	-	1,996 d	-	-	-	1,643 c	UAGAt 115	EF	-	1,180 d	-	-	-	-
UAGAt 39	ER	2,720 d	3,826 b	2,920 c	-	-	-	UAGAt 119	EF	1,646 e	1,870 d	-	-	-	1,726 c
UAGAt 40	ER	3,803 c	4,833 b	4,193 b	-	-	-	UAGAt 120	EF	-	1,873 d	-	-	-	1,533 c
UAGAt 41	ER	3,750 c	4,593 b	4,823 a	-	-	-	UAGAt 122	EF	1,830 e	1,690 d	-	-	-	1,420 c
UAGAt 42	ER	2,060 e	1,963 d	-	-	-	-	UAGAt 123	EF	-	1,830 d	2,170 d	-	-	1,470 c
UAGAt 43	ER	3,473 c	4,363 b	3,753 b	-	-	-	UAGAt 124	EF	1,620 e	1,910 d	-	-	-	1,280 c
UAGAt 45	ER	2,436 e	2,763 c	2,886 c	-	-	-	UAGAt 125	EF	-	1,463 d	1,626 d	-	-	1,333 c
UAGAt 51	EF	-	2,193 c	1,730 d	-	-	1,650 c	UAGAt 126	EF	-	1,287 d	-	-	-	-
UAGAt 53	EF	-	2,020 d	-	-	-	1,686 c	UAGAt 127	EF	1,176 e	-	-	-	-	1,610 c
UAGAt 54	EF	2,046 e	1,920 d	-	-	1,103 c	-	UAGAt 128	EF	-	-	1,976 d	-	-	-
UAGAt 61	EF	-	2,353 c	2,906 c	-	-	-	UAGAt 133	RIZO	-	1,546 d	-	-	1,610 c	-
UAGAt 63	EF	-	-	-	-	-	1,673 c	UAGAt 135	RIZO	-	1,373 d	-	-	1,496 c	-
UAGAt 69	RIZO	1,746 e	-	-	-	2,503 b	1,686 c	UAGAt 140	RIZO	2,546 d	1,693 d	-	-	1,926 c	-
UAGAt 71	RIZO	1,950 e	1,946 d	-	-	-	-	UAGAt 141	RIZO	-	1,883 d	-	-	2,593 b	2,043 c
C.V		26,80	24,22	19,45		34,39	28,08	C.V		26,80	24,22	19,45		34,39	28,08

Letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de significância.

(SSC: Solo sem cultivo; SCC: Solo com cultivo; ER: Endofítica de raiz; EF: Endofítica de folha; RIZO: Rizosfera; Linhagens de nomenclatura de 01 á 80-Serra Talhada; Linhagens de nomenclatura de 82 á 141- Ibimirim).

3.3. Seleção de bactérias fixadoras de nitrogênio

Para a fixação biológica de nitrogênio (FBN), foram avaliados as 71 linhagens bacterianas, correspondente aos 65% de linhagens positivas na ausência de NaCl, em relação à solubilização de fosfato inorgânico. Com isso, percebe-se que 87% das bactérias analisadas são positivas quanto à fixação biológica de nitrogênio *in vitro* (Figura 4), tendo destaque com alta frequência, as bactérias do nicho de endofítico de raiz (Serra Talhada) e folha (Ibimirim).

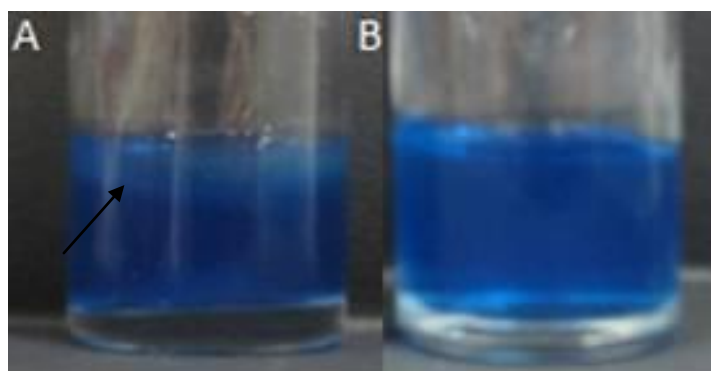


Foto: Flaviana Gonçalves da Silva

Figura 4. Teste de fixação de nitrogênio em meio nfb, livre de fonte nitrogenada. A) Linhagem positiva, apresentando um halo de crescimento; B) Linhagem negativa, ausência de halo de crescimento.

Ao se analisar a FBN das linhagens bioprospectadas da área de Serra Talhada, percebe-se frequência relativa superior de 27,9% para as bactérias no nicho endofítico de raiz, comparando com os demais, porém as bactérias endofíticas de folha expressam frequência inferior (13,94%) em relação às linhagens positivas (Figura 5A). Com isso, observa-se variação deste mecanismo de promoção de crescimento entre os diferentes nichos associados às plantas de *Atriplex* nesta área de estudo. Quando analisada esta frequência para as linhagens da área de Ibimirim, observam-se respostas distintas, evidenciando-se valor expressivo no nicho endofítico de folha (42,85%), enquanto que na rizosfera foi observado percentual de 6,28% na frequência relativa da FBN (Figura

5B). Ao se comparar esta característica entre as áreas, observa-se que Serra Talhada se sobressaiu em relação à Ibimirim, com valores de 60,55 e 39,43%, respectivamente (Figura 5C).

Mediante os resultados, ressalta-se que a existência de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas aos diferentes nichos e áreas é bastante variável. Alguns autores (SANTI et al., 2013; ESPOSITO-POLESI, 2011) relatam que as bactérias endofíticas podem ter vantagens sobre as bactérias rizosféricas, porque elas colonizam o interior das raízes das plantas, e conseqüentemente podem se estabelecer em nichos que ofereçam condições mais apropriadas para a efetiva fixação de nitrogênio, sofrendo menos competição do que as bactérias presentes no solo e, possivelmente, excretam parte do nitrogênio, ocorrendo a transferência do nitrogênio fixado para a planta. Tal fato pode ter ocorrido com as bactérias endofíticas de raiz testadas neste trabalho, destacando-se no mecanismo de fixação biológica de nitrogênio.

No trabalho realizado por Santos (2010) é mencionada a existência de bactérias halotolerantes fixadoras de nitrogênio associadas às plantas de *Atriplex*, em que se observou maior número de bactérias com esta característica no nicho endofítico de raiz, resultado semelhante ao encontrado descrito no presente trabalho. Pereira et al. (2012) estudando bactérias endofíticas de cana-de-açúcar em relação à salinidade, observaram a fixação biológica de nitrogênio nas linhagens testadas, expondo a importância de explorar bactérias tolerantes à salinidade, para que possam ser usadas como inoculantes, com o intuito de minimizar o uso de fertilizantes químicos e, conseqüentemente, crescente salinização de solos.

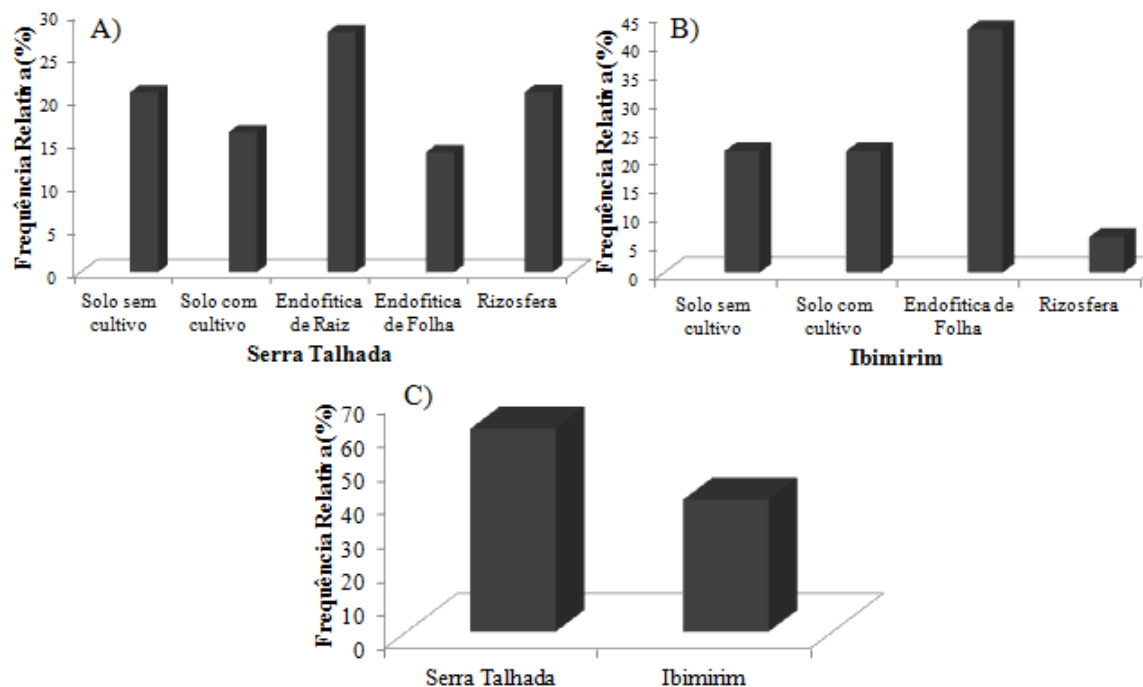


Figura 5. Frequência relativa da fixação biológica de nitrogênio em isolados bacterianos dentro dos nichos em Serra Talhada (A); Ibimirim (B) e entre as áreas (C), associados às plantas de *Atriplex nummularia* L. (Análise pelo teste do χ^2 , revelou diferença significativa entre os tratamentos).

3.4. Seleção de bactérias produtoras de Ácido indol acético (AIA)

Em relação à produção de ácido indol acético (AIA), observa-se que 100% das linhagens bacterianas testadas são capazes de sintetizar este fitormônio (Figura 7). Os valores da produção de AIA, variaram entre $61,10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ correspondente as linhagens UAGAt 21 (Solo com cultivo-Serra Talhada) e UAGAt 119 (Endofítico de folha-Ibimirim) respectivamente, existindo diferença significativa entre as bactérias avaliadas (Tabela 3). No entanto, evidencia-se que as linhagens do solo cultivado com a planta e endofíticas de raiz, proporcionaram um maior número de produtoras de AIA comparando-se com os demais nichos. Já para as linhagens do solo sem cultivo e da rizosfera foi quantificada baixa produção deste fitohormônio.



Foto: Flaviana Gonçalves da Silva

Figura 7. Indicativo da síntese de ácido indol acético por bactérias associadas à *Atriplex nummularia* L (Coloração rósea indica maior produção de AIA).

Tabela 3. Médias da produção de ácido indol acético inorgânico por bactérias halotolerantes associadas à *Atriplex nummularia* L.

Linhagem bacteriana	AIA $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Linhagem bacteriana	AIA $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Linhagem bacteriana	AIA $\mu\text{g.mL}^{-1}$
UAGAt 01	3,82 e	UAGAt 37	3,22 e	UAGAt 75	10,72 d
UAGAt 02	15,38 d	UAGAt 38	24,62 c	UAGAt 89	2,91 e
UAGAt 06	3,13 e	UAGAt 39	11,88 d	UAGAt 90	6,79 e
UAGAt 08	1,36 e	UAGAt 40	21,80 d	UAGAt 92	21,76 d
UAGAt 09	3,04 e	UAGAt 41	16,67 d	UAGAt 95	2,40 e
UAGAt 12	4,42 e	UAGAt 42	1,23 e	UAGAt 99	1,23 e
UAGAt 13	3,73 e	UAGAt 43	14,77 d	UAGAt 101	1,49 e
UAGAt 14	18,35 d	UAGAt 45	39,19 b	UAGAt 107	2,39 e
UAGAt 15	11,67 d	UAGAt 51	1,83 e	UAGAt 113	6,19 e
UAGAt 19	7,57 e	UAGAt 53	31,77 c	UAGAt 114	2,52 e
UAGAt 21	61,10 a	UAGAt 54	2,40 e	UAGAt 115	1,10 e
UAGAt 22	6,15 e	UAGAt 61	27,41 c	UAGAt 119	1,01 e
UAGAt 23	21,72 d	UAGAt 63	14,95 d	UAGAt 120	1,10 e
UAGAt 25	53,25 a	UAGAt 66	1,79 e	UAGAt 122	1,58 e
UAGAt 27	4,42 e	UAGAt 74	4,38 e	UAGAt 123	1,96 e
UAGAt 34	41,64 b	UAGAt 77	7,14 e	UAGAt 124	1,58 e
UAGAt 33	2,14 e	UAGAt 93	9,94 d	UAGAt 125	16,33 d
UAGAt 35	42,59 b	UAGAt 71	3,34 e	UAGAt 126	15,25 d
UAGAt 36	2,05 e	UAGAt 73	11,45 d	UAGAt 127	5,63 e
				UAGAt 128	42,68 b

(C.V: 23,84%) Letras iguais nas mesmas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de significância.

Ao se observar a produção de AIA na Figura 6A, percebe-se pela frequência relativa que, 31,57% das linhagens positivas para esta característica da área de Serra Talhada são pertencentes ao nicho endofítico de raiz, destacando-se em relação aos demais ambientes estudados. Observa-se em seguida valores de 23,68; 15,78; 15,78 e 13,15%, para solo sem cultivo, rizosfera, solo com cultivo e endofítica de folha, respectivamente. Na figura 6B, correspondente à área de Ibimirim, ocorreu o oposto da outra área estudada, havendo destaque para as bactérias endofíticas de folha, que tiveram frequência relativa de linhagens positivas de 63,15%. Quando observado esta produção entre as áreas, percebe-se o maior número de linhagens positivas (66,66%) em Serra Talhada, em relação à Ibimirim (33,33%).

Em relação à intensa associação das raízes de *Atriplex* com a comunidade bacteriana, esta ação pode estar relacionada com os compostos exsudados pelo sistema radicular, ricos em açúcares, polissacarídeos, compostos fenólicos e alifáticos que atraem estes micro-organismos, havendo consequentemente maior interação dessas bactérias com a planta. Dessa forma, há maiores condições para a síntese do fitohormônio ácido indol acético (COMPANT et al., 2010; AHMAD ET AL., 2013).

Sobre este aspecto, Kuklinsky- Sobral et al. (2004), mencionam que o habitat associado à planta é um ambiente dinâmico, podendo acontecer interferência de alguns fatores na composição da comunidade bacteriana, o qual coloniza os nichos associados às plantas. Existem evidências de que os micro-organismos podem selecionar uma via metabólica diferenciada, dependendo do ambiente, e consequentemente pode revelar resultados interessantes.

Em consonância com outros resultados obtidos por Jha et al. (2011), em estudo com bactérias halotolerantes e promotoras de crescimento vegetal, foi observado que todos os isolados testados produziram o ácido indol acético em quantidades que variam de 30 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Em outro trabalho, Ashraf et al. (2011) observaram o potencial da produção de ácido indol acético em bactérias da rizosfera associada à cana-de-açúcar, obtendo produção máxima de AIA de 4,49 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com o isolado A17. Já Sgroy et al. (2009), estudando bactérias endofíticas associadas à halófito *Prosopis strombulifera*, obtiveram os maiores valores para a produção de AIA de 2,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Nesse contexto,

os resultados encontrados neste trabalho, são expressivos para a produção de ácido indol acético por bactérias halotolerantes com via dependente de triptofano.

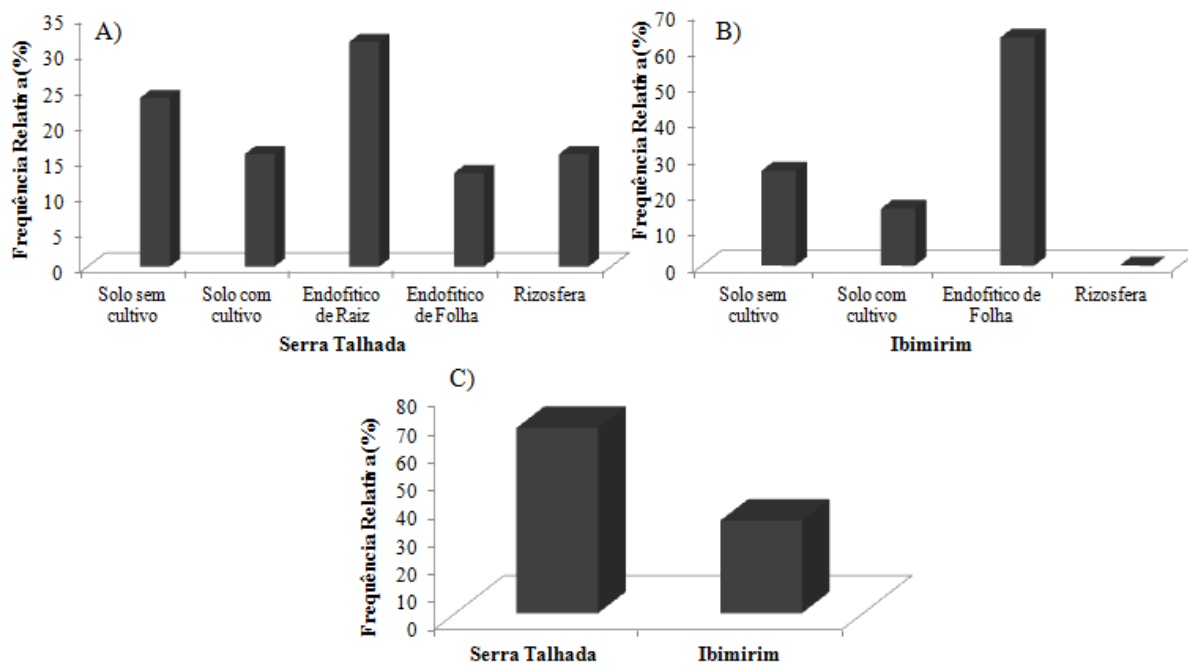


Figura 6. Frequência relativa da produção de ácido indol acético em isolados bacterianos dentro dos nichos em Serra Talhada (A); Ibimirim (B) e entre as áreas (C), associados às plantas de *Atriplex nummularia* L. (Análise pelo teste do χ^2 , revelou diferença significativa entre os tratamentos).

3.5. Seleção de bactérias produtoras de Exopolissacarídeo (EPS)

Foram testadas 30 linhagens bacterianas quanto à produção EPS, sendo 14 bactérias da área de Serra Talhada e 16 de Ibimirim, obtendo-se 83,33% isolados positivos e apenas 16,66% isolados negativos para esta característica. Com este resultado, foi possível confirmar a produção de EPS pelas bactérias halotolerantes associadas à *Atriplex* (Figura 8).

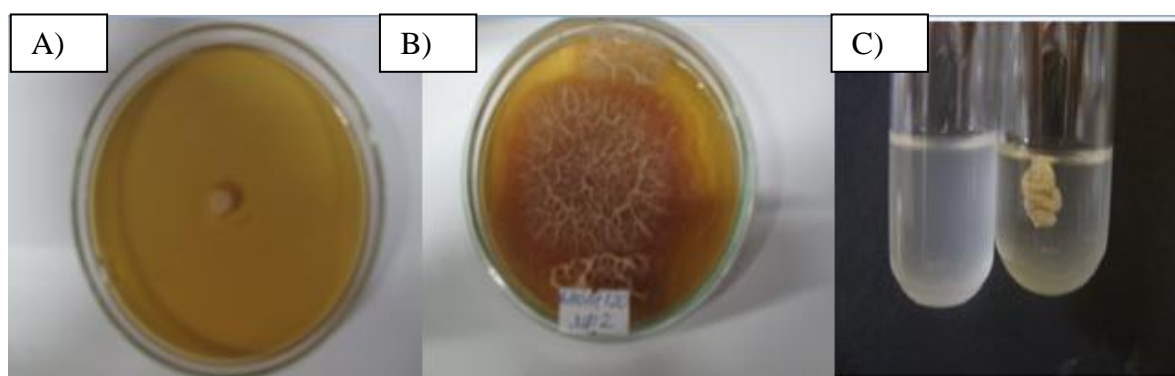


Foto: Flaviana Gonçalves da Silva

Figura 8. Bactéria negativa (A); Bactéria positiva (B); Confirmação da produção de EPS (negativo: turvo/ tubo à esquerda; positivo: precipitado/tubo à direita) (C).

De acordo com a classificação descrita na Tabela 4, observa-se que cinco linhagens (16,66%), mostraram-se negativos quanto à produção de EPS, enquanto 13,33% proporcionaram pouca produção, 10% média e 60% ótima produção de EPS. Dessa forma, é importante destacar que a observação de ótima produção dessa substância é mais visível nas bactérias bioprospectadas da área de Ibimirim. Por conseguinte, isso se deve ao fato das bactérias estarem associadas a ambientes mais estressantes, em relação à salinidade do solo, e desse modo, existe a possibilidade desses micro-organismos se expressarem de forma mais acentuada, com o intuito de proteger o vegetal ali cultivado contra o estresse e também contribuir com a agregação das partículas do solo, melhorando os fatores físico-químicos do solo.

Tabela 4. Classificação da produção de exopolissacarídeo pelas bactérias promotoras de crescimento vegetal associadas à *Atriplex*.

Produção de Exopolissacarídeo							
Linhagem bacteriana	Pouca	Média	Ótima	Linhagem bacteriana	Pouca	Média	Ótima
UAGAt 08	-	-	-	UAGAt 71			+++
UAGAt 09			+++	UAGAt 75			+++
UAGAt 14	+			UAGAt 77		++	
UAGAt 21		++		UAGAt 89			+++
UAGAt 22	-	-	-	UAGAt 90			+++
UAGAt 25		++		UAGAt 92			+++
UAGAt 33			+++	UAGAt 93	+		
UAGAt 35			+++	UAGAt 95	-	-	-
UAGAt 37			+++	UAGAt 99			+++
UAGAt 51			+++	UAGAt 101			+++
UAGAt 53	+			UAGAt 107			+++
UAGAt 54	+			UAGAt 114			+++
UAGAt 63			+++	UAGAt 122			+++
UAGAt 66	-	-	-	UAGAt 125			+++
UAGAt 69	-	-	-	UAGAt 128			+++

(+ para halo com pouca produção - halo de EPS ≤ 10 mm de diâmetro; ++ para halo com média produção - halo de EPS 10-14 mm de diâmetro; +++ para halo com ótima produção-halo de EPS ≥ 14 mm de diâmetro).

Pelas médias apresentadas na Tabela 5, percebe-se diferença significativa entre as linhagens, quanto à produção de EPS. A linhagem UAGAt 89, bioprospectada do solo sem cultivo da área de Ibimirim proporcionou o maior valor médio, com o halo de produção de 60,33 mm, diferindo dos demais, com exceção de UAGAt 90 e 128. Percebe-se ainda, que os isolados que proporcionaram maior diâmetro do halo são provenientes do solo sem cultivo e endofíticos de folha da área de Ibimirim, o que confirma o resultado exposto na classificação disposta na Tabela 4.

Por estes resultados, acredita-se que as bactérias tenham sido induzidas a produzir o EPS em grandes quantidades, pois a acumulação ou formação desta substância tende a aumentar a partir do momento em que o estresse salino ou outro tipo de estresse se expressa de forma mais pronunciada no ambiente (BARRETO et al., 2011). Deste modo

a bactéria produz essa substância com a finalidade de proteger a planta contra fatores causadores de estresse, como estresse salino, hídrico, térmico, entre outros, beneficiando o crescimento e desenvolvimento vegetal, sobretudo em solos salinos, no qual ocorre a *Atriplex*.

Sobre a produção de EPS, Qurashi et al. (2012) ao estudarem esse mecanismo sob a influência de estresse salino, relataram que o aumento da produção de EPS em níveis mais elevados de salinidade, favorece a formação de biofilme e protege o vegetal por meio da manutenção de uma camada de água ao redor das células, contribuindo significativamente para a melhoria da fertilidade do solo e o crescimento vegetal. Ashraf et al. (2005) avaliando bactérias produtoras de EPS, observaram aumento na agregação do solo ao redor das raízes das plantas de trigo inoculadas, cultivadas em solo salino, afetando positivamente suas características físico-químicas. Os autores perceberam ainda que para compensar o estresse imposto pela salinidade, a produção de exopolissacarídeos são estratégias significativas para auxiliar no metabolismo do sal nas bactérias tolerantes.

Tabela 5. Médias da produção de exopolissacarídeo pelas bactérias promotoras de crescimento vegetal associadas à *Atriplex*.

Linhagem	Nicho	Halo de EPS (mm)	Linhagem	Nicho	Halo de EPS (mm)
UAGAt 09	SSC	16,78 g	UAGAt 77	RIZO	10,67 g
UAGAt 14	SSC	7,46 g	UAGAt 89	SSC	60,33 a
UAGAt 21	SSC	10,65 g	UAGAt 90	SSC	57,08 a
UAGAt 25	SCC	10,86 g	UAGAt 92	SSC	18,42 f
UAGAt 33	ER	23,26 e	UAGAt 93	SSC	8,00 g
UAGAt 35	ER	27,76 d	UAGAt 99	SCC	41,00 c
UAGAt 37	ER	20,30 e	UAGAt 101	SCC	25,66 e
UAGAt 51	EF	18,05 f	UAGAt 107	SCC	50,38 b
UAGAt 53	EF	9,83 g	UAGAt 114	EF	14,12 f
UAGAt 54	EF	7,72 g	UAGAt 122	EF	17,67 e
UAGAt 63	EF	39,75 c	UAGAt 125	EF	53,96 b
UAGAt 71	RIZO	29,83 d	UAGAt 128	EF	60,28 a
UAGAt 75	RIZO	31,63 d			
C.V (%)	14, 54				

Letras iguais nas mesmas colunas não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de significância.

3.6. Seleção de bactérias produtoras da molécula *quorum sensing* (N – acil homoserina lactona/AHL)

Para a produção da molécula *quorum sensing* (AHL), foi constatado que as linhagens testadas mostraram-se positivas, pois as colônias da bactéria *A. Tumefaciens* apresentaram a pigmentação azul (Figura 9), exceto a bactéria UAGAt 77 pertencente à rizosfera da área de Serra Talhada. Com isso, pode ser destacado o alto índice de bactérias produtoras da molécula AHL, ficando em torno de 96,33%, fato que evidencia a adaptação das bactérias testadas ao ambiente salino com o cultivo da *Atriplex*.

Associando-se os resultados encontrados neste trabalho aos dispostos na literatura, percebe-se um percentual superior de bactérias produtoras da molécula *quorum sensing* (AHL). Leite (2012), estudando bactérias halotolerantes associadas à cana-de-açúcar e analisando a produção de *quorum sensing*, entre 102 isolados testados, obteve 49% positivos para essa característica. Já Bhattacharyya et al. (2008) afirmam que, as condições ambientais muitas vezes mudam rapidamente e as bactérias precisam responder muito rápido a essa mudança, a fim de sobreviver. Estas respostas podem ser de diferentes formas, incluindo a adaptação, disponibilidade de nutrientes e defesa contra outros micro-organismos. No entanto, a comunicação *quorum sensing* ajuda as bactérias a coordenar o seu comportamento diante de condições adversas existentes no ambiente.

Assim, a importância da detecção de *quorum sensing*, especialmente a molécula AHL, na adaptação de micro-organismos em geral, e particularmente em ambientes salinos, é indispensável. Porém o papel desta molécula na biosfera microbiana ainda é relativamente desconhecido, necessitando de mais estudos para fins biotecnológicos na agricultura.

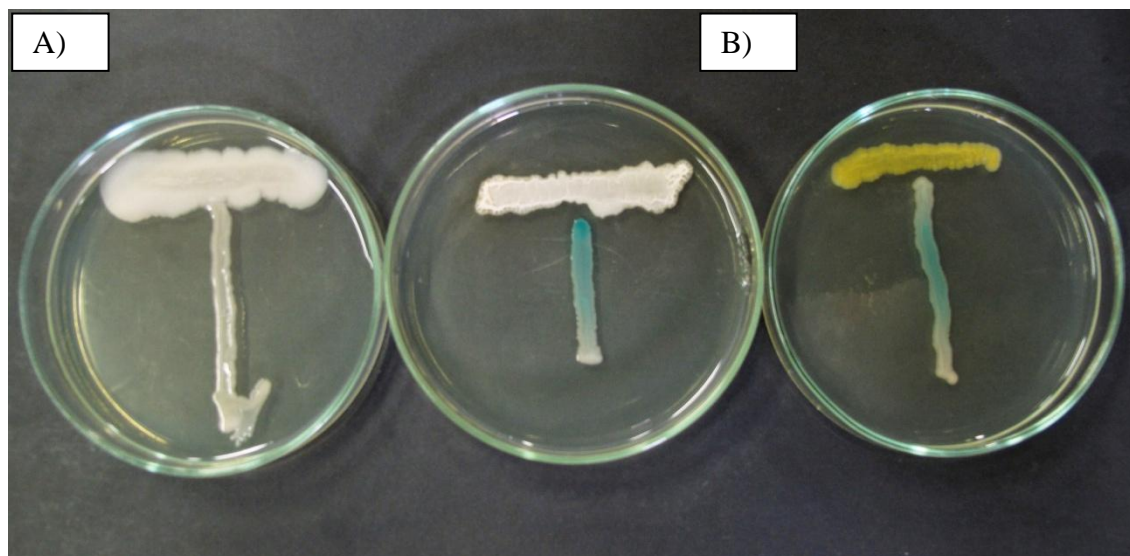


Foto: Andreza Raquel Barbosa de Farias

Figura 9. A) Ausência da coloração azul (negativo); B) Presença da coloração azul indicadora da expressão da molécula *quorum sensing* (AHL).

De acordo com as características de promoção de crescimento vegetal das bactérias descritas na tabela 6, vale ressaltar que das 107 linhagens estudadas neste trabalho, 18 bactérias foram positivas em relação às seis características testadas. Convém relatar, também, que existiu uma quantidade acentuada de bactérias que expressaram capacidade de fixação biológica de nitrogênio, produção de ácido indol acético e solubilização de fosfato inorgânico (0% de NaCl), simultaneamente, resultando em 53 bactérias que atuaram com os mesmos mecanismos, equivalente à 49,53% dos isolados testados.

A utilização de micro-organismos promotores de crescimento vegetal é uma das alternativas para a agricultura moderna, com o intuito de enfrentar o desafio de promover o aumento da produção de culturas gerando sustentabilidade e melhorando as propriedades dos solos agrícolas. Portanto, não só os mecanismos responsáveis pela promoção do crescimento devem ser investigados, mas também uma compreensão completa de todas as etapas envolvidas na colonização destes micro-organismos em plantas e solos deve viabilizar a eficiência e confiabilidade das bactérias como potenciais inoculantes.

Tabela 6. Características de promoção de crescimento vegetal de bactérias halotolerantes associadas à *Atriplex nummularia* L.

Linhagem bacteriana	FBN	Solubilização de Fosfato		Produção EPS	Produção de HLA	Linhagem bacteriana	FBN	Solubilização de Fosfato		Produção EPS	Produção de HLA
		de AIA	0% NaCl					de AIA	5% NaCl		
UAGAt 01	-	+	+	-		UAGAt 70		-	-		
UAGAt 02	-	+	+	+		UAGAt 71	+	+	+	+	+
UAGAt 04			-	-		UAGAt 72	+	+	-		
UAGAt 05			-	-		UAGAt 73	+	+	-		
UAGAt 06	-	+	+	-		UAGAt 74	+	+	-		
UAGAt 07			-	-		UAGAt 75	+	+	-	+	+
UAGAt 08	+	+	+	-	+	UAGAt 76	+	+	-		
UAGAt 09	+	+	+	+	+	UAGAt 77	+	+	+	+	+
UAGAt 12	-	+	+	-		UAGAt 78		-	-		
UAGAt 13	-	+	+	-		UAGAt 79		-	-		
UAGAt 14	+	+	+	+	+	UAGAt 80		-	-		
UAGAt 15	+	+	+	-		UAGAt 82		-	-		
UAGAt 17			-	-		UAGAt 84		-	-		
UAGAt 18			-	-		UAGAt 88		-	-		
UAGAt 19	+	+	+	-		UAGAt 89	+	+	+	+	+
UAGAt 20			-	-		UAGAt 90	+	+	-	+	+
UAGAt 21	+	+	+	+	+	UAGAt 92	+	+	+	+	+
UAGAt 22	+	+	+	+	-	UAGAt 93	+	+	-	+	+
UAGAt 23	+	+	+	-		UAGAt 94	+	+	+		
UAGAt 24			-	-		UAGAt 95	+	+	-	-	-
UAGAt 25	+	+	+	+	+	UAGAt 98	+	+	-		
UAGAt 26			-	-		UAGAt 99	+	+	-	+	+
UAGAt 27	+	+	+	-		UAGAt 101	+	+	+	+	+
UAGAt 28	+		+	-		UAGAt 104		-	-		
UAGAt 29			-	-		UAGAt 105		-	-		
UAGAt 30			-	-		UAGAt 107	+	+	+	+	+
UAGAt 32			-	-		UAGAt 108	+	+	+		
UAGAt 33	+	+	+	+	+	UAGAt 111		-	-		
UAGAt 34	+	+	+	-		UAGAt 112	-	+	-		
UAGAt 35	+	+	+	+	+	UAGAt 113	+	+	-		
UAGAt 36	+	+	+	-		UAGAt 114	+	+	+	+	+
UAGAt 37	+	+	+	+	+	UAGAt 115	+	+	-		
UAGAt 38	+	+	+	-		UAGAt 119	+	+	-		

Continuação da tabela 6. Características de promoção de crescimento vegetal de bactérias halotolerantes associadas à *Atriplex nummularia* L.

Isolado bacteriano	Produção FBN de AIA	Solubilização de Fosfato		Produção EPS	Produção de HLA	Isolado bacteriano	Produção FBN de AIA	Solubilização de Fosfato		Produção EPS	Produção de HLA
		0% NaCl	5% NaCl					0% NaCl	5% NaCl		
UAGAt 39	+	+	+	-		UAGAt 120	+	+	+	-	
UAGAt 40	+	+	+	-		UAGAt 122	+	+	+	-	+
UAGAt 41	+	+	+	-		UAGAt 123	+	+	+	-	
UAGAt 42	+	+	+	-		UAGAt 124	+	+	+	-	
UAGAt 43	+	+	+	-		UAGAt 125	+	+	+	+	+
UAGAt 44			-	-		UAGAt 126	+	+	+	-	
UAGAt 45	+	+	+	-		UAGAt 127	+	+	+	-	
UAGAt 46			-	-		UAGAt 128	+	+	+	-	+
UAGAt 49	-		+	-		UAGAt 129			-	-	
UAGAt 51	+	+	+	+	+	UAGAt 130			-	-	
UAGAt 53	+	+	+	+	+	UAGAt 131			-	-	
UAGAt 54	+	+	+	+	+	UAGAt 132			-	-	
UAGAt 61	+	+	+	-		UAGAt 133			+	+	
UAGAt 62			-	-		UAGAt 135	-		+	+	
UAGAt 63	+	+	+	+	+	UAGAt 137			-	-	
UAGAt 64			-	-		UAGAt 138			-	-	
UAGAt 65			-	-		UAGAt 139			-	-	
UAGAt 66	+	+	+	-	-	UAGAt 140	+		+	+	
UAGAt 67			-	-		UAGAt 141	-		+	+	
UAGAt 68			-	-		UAGAt 142	+		+	+	
UAGAt 69	+		+	+	-						

4. CONCLUSÕES

A existência de bactérias halotolerantes associadas às plantas de *Atriplex* com características de promoção de crescimento vegetal foi confirmada no presente estudo.

A maior densidade populacional de bactérias foi encontrada na rizosfera associada às plantas de *Atriplex*.

A salinidade do meio de cultivo afetou o índice de solubilização de fosfato inorgânico pelas bactérias, porém não inibiu essa característica para algumas bactérias avaliadas na concentração de 5% de NaCl.

As bactérias endofíticas de raiz proporcionaram o maior número de fixadoras biológicas de nitrogênio e produtoras de ácido indol acético.

As bactérias halotolerantes têm alto potencial para produção de exopolissacarídeos e molécula *quorum sensing* (HLA).

As bactérias halotolerantes são promissoras para uso como inoculantes e eficientes no auxílio do desenvolvimento vegetal da *Atriplex* e na recuperação de solos salinos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIA, A. A.; KHOKHAR, S. N.; JABEEN, B.; ASAD, S. A. Phosphate solubilizing bacteria associated with vegetables roots in different ecologies. *Pakistan Journal of Botany*. n. 45, p. 535-544. 2013.

AHEMAD, M., KIBRET, M. A. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Jornaul of King Saud University-Science*. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>.

AGRAWAL, D. P. K.; AGRAWAL, S. Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) for their use as potential plant growth promoting rhizobacteria. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. v.2, n.10, p 406-417. 2013.

ASHRAF, M. A.; RASOOL, M.; MIRZA, M. S. Nitrogen Fixation and Indole Acetic Acid Production Potential of Bacteria Isolated from Rhizosphere of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Advances in Biological Research*, v. 5, n. 6, p. 348-355, 2011.

ARAÚJO, W. L. Guia Prático: Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos. Piracicaba: Calo, 2010. 167 p.

BARRETO, M. C. S; FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; SILVA, M. L. R. B.; LIMA-FILHO, J. L. Produção e comportamento reológico de biopolímeros produzidos por rizóbios e caracterização genética. *Revista Brasileira Agrociência*, v.17, n.2-4, p.221-227, 2011.

CHERIF-SILINI, H.; SILINI, A.; GHOUL, M.; YAHIAOUI, B.; ARIF, F. Solubilization of phosphate by the *Bacillus* under sal stress and in the presence of osmoprotectant compounds. *African Journal of Microbiology Research*. v. 7, n. 13, p. 4562-4571, 2013.

- DAWWAM, G. E.; ELBELTAGY, A.; EMARA, H. M.; ABBAS, I. H.; HASSAN, M. M. Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. *Annals of Agricultural Science*. v. 58, n. 2, p.195–201. 2013.
- DODD, I. C.; PÉREZ-ALFOCEA, F. Microbial amelioration of crop salinity stress. *Journal of Experimental Botany*. v. 63, n. 9, p. 3415–3428, 2012.
- FARIAS, A. R. B. LIMA, D. R. M.; LIRA-CADETE, LUANA.; RAMOS, A. P. S. SILVA, M. C. DE B., FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Promoção de crescimento vegetal de feijão comum por bactérias isoladas de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Pernambucana*, v. 17, n. único, p. 101-104, 2012.
- FLORES-FERNÁNDEZ, M. L.; ZAVALETA, A. I.; CHÁVEZ-HIDALGO, E. L. Bacterias halotolerantes con actividad lipolítica aisladas de las salinas de Pilluana San Martín. *Ciência e Investigación*, v.13, n.2, p. 87-91. 2010.
- HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S. V.; ELSAS, J. D. V. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*. v.16, n.10. p. 463-471. 2008.
- 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*, 2011. DOI 10.1007/s11104-011-0877-9.
- KAVAMURA, V. N. Bactérias associadas às cactáceas da Caatinga: Promoção de crescimento de plantas sob estresse hídrico. 2012. 224 f. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.
- LIMA, D. R. M. Bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a plantas de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco. 2012. 110f. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

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, p. 122-129, 2012.

MAPELLI, F.; MARASCO, R.; ROLLI, E.; BARBATO, M.; CHERIF, H.; AMEL, G.; OUZARI, I.; DAFFONCHIO, D.; BORIN, S. Potential for Plant Growth Promotion of Rhizobacteria Associated with *Salicornia* Growing in Tunisian Hypersaline Soils. *BioMed Research International*. v. 2013, n. 248078, p.1-13. 2013.

MENDONÇA, E. de S.; MATOS, E. da S. Matéria orgânica do solo: Métodos de análises. Viçosa: UFV, 2005. 107 p.

NAKBANPOTEA, W.; PANITLURTUMPAIA, N.; SANGDEEA, A.; SAKULPONEA, N.; SIRISOMA, P.; PIMTHONG, A. Salt-tolerant and plant growth-promoting bacteria isolated from Zn/Cd contaminated soil: identification and effect on rice under saline conditions. *Journal of Plant Interactions*, p. 37-41, 2013.

PEREIRA, A. P. A.; SILVA, M. C. B.; 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, p. 112-121, 2012.

QUECINE, M. C. Aspectos biotecnológicos da interação entre bactérias e cana-de-açúcar (*Saccharum* sp., L.). 2010. 196f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

SALAMONE, I. E. G.; FUNES, J. M.; SALVO, L. P. D.; ESCOBAR-ORTEGA, J. S.; D’AURIA, F.; FERRANDO, L.; FERNANDEZ-SCAVINO, A. Inoculation of paddy rice with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact of plant genotypes on

rhizosphere microbial communities and field crop production. *Applied Soil Ecology*, n.61, p.196– 204. 2012.

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.

SANTOS, M. A.; FREIRE, M. B. G. S.; ALMEIDA, B. G.; LINS, C. M. T.; SILVA, E. M. Dinâmica de íons em solo salino-sódico sob fitorremediação com *Atriplex nummularia* e aplicação de gesso. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. v.17, n.4, p.397– 404, 2013.

SANTOS, K. C. F. Atividade biológica e bioprospecção de bactérias associadas à *Atriplex nummularia* em solo salino sódico no agreste de Pernambuco. 2010. 65 f. Dissertação, Mestrado em Agronomia-Ciência do Solo, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

SGROY, V.; CASSÁN, F.; MASCIARELLI, O.; PAPA, M. F. D.; LAGARES, A.; LUNA, V. Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 85, p. 371–381, 2009.

SILINI-CHÉRIF H.; SILINI, A.; GHOUL, M.; YADAV, S. Isolation and characterization of plant growth promoting traits of a rizobactéria: *Pantoea agglomerans* Ima 2. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. v.15, n. 6, p 267-276, 2012.

SOUZA, E. R.; FREIRE, M. B. G. S.; NASCIMENTO, C. W. A.; MONTENEGRO, A. A. A.; FREIRE, F. J.; MELO, H. F. Fitoextração de sais pela *Atriplex nummularia* Lindl. sob estresse

hídrico em solo salino sódico. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.15, n.5, p.477–483, 2011.

SZENTHE, A.; PAGE, W. J. *Quorum sensing* in *Agrobacterium tumefaciens* using N-oxo-Acylhomoserine lactone chemical signal. In: Workshop/Conference of the association for biology laboratory education. 24., 2002, Louisiana. Anais... Louisiana: ABLE. p.145-152. 2002.

THOMAS, G. W. Exchangeable cations. In: Page, A. L. (ed). *Methods of soil analysis. Part-2 chemical methods*. Madison: American Society of Agronomy, 1982, p.159-165.

UPADHYAY, S. K.; SINGH, D. P.; SAIKIA, R. Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from rhizospheric soil of wheat under saline condition. *Current Microbiology*. v. 59, p. 489–496, 2009.

UPADHYAY, S. K.; MAURYA, S. K.; SINGH, D. P. Salinity tolerance in free living plant growth promoting Rhizobacteria. *Indian Journal of Scientific Research*. v. 3, n.2, p.73-78, 2012.

CAPÍTULO II

REINOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS HALOTOLERANTES EM *Atriplex nummularia* L. CULTIVADA EM AMBIENTE PROTEGIDO

RESUMO

Altas concentrações de sais se constituem em um dos maiores fatores causadores de estresse ambiental, requerendo alternativas viáveis para reduzir seus efeitos negativos na produção agrícola. Com isso, a exploração de bactérias promotoras de crescimento vegetal com certa tolerância ao estresse salino, traz um leque de aplicações biotecnológicas que possibilitam o uso desses micro-organismos como inoculantes, podendo proporcionar efeitos benéficos na interação solo-planta. Nesse contexto, objetivou-se analisar os efeitos da reinoculação de bactérias halotolerantes com promoção de crescimento vegetal em plantas de *Atriplex nummularia* L. cultivadas em ambiente protegido. As bactérias utilizadas foram isoladas de plantas de *Atriplex* cultivadas em solos salinos, e caracterizadas previamente como bactérias halotolerantes, e os tratamentos consistiram em T1: Testemunha, sem inoculação; T2: UAGAt22; T3: UAGAt25; T4: UAGAt35; T5: UAGAt53 e T6: Mix de todas as bactérias. O experimento foi realizado em ambiente protegido, na UAG/UFRPE, adotando-se o delineamento estatístico inteiramente casualizado, com 6 tratamentos e 5 repetições, totalizando 30 unidades experimentais. As variáveis analisadas foram: Teor de clorofila *a*, *b* e total; condutância estomática (*gs*); temperatura foliar; fitomassa verde, fitomassa seca total e das partes fracionadas (raiz, caule e folha) das plantas; conteúdos e teores de sódio, potássio, cálcio e magnésio; nitrogênio total, proteína bruta de folhas e carbono orgânico total vegetal. Não houve influência dos tratamentos de inoculação para os teores de clorofila *a*, *b*, total e condutância estomática. A reinoculação incrementou a massa verde das folhas, com expressividade do tratamento 4 (inóculo UAGAt 35). Os teores dos nutrientes analisados nas folhas das plantas não sofreram influência, enquanto que nas partes fracionadas de raiz e caule, os teores de Na, K, Mg aumentaram significativamente. Os conteúdos de Na e Mg tiveram acréscimo nas raízes da *Atriplex* a partir da reinoculação. Em relação ao nitrogênio total vegetal, ocorreu diferença significativa entre os tratamentos apenas no caule das plantas, sendo proporcionado pelo mix das bactérias. O carbono orgânico total teve aumento significativo no caule e folhas da *Atriplex*. A reinoculação com bactérias halotolerantes e promotoras de crescimento vegetal contribuíram com o crescimento e nutrição das plantas de *Atriplex*, demonstrando a viabilidade destas linhagens bacterianas como inoculantes, tornando-se alternativa promissora para aplicação em campo, com o princípio de colaboração no desenvolvimento vegetal e fitorremediação de solos salinos.

Palavras-chave: Promoção de crescimento, hálofita, nutriente.

ABSTRACT

High concentrations of salts constitute one of the major causes of environmental stress, requiring viable alternatives to reduce its negative effects on agricultural production. Thus, the exploitation of plant growth promoting bacteria with some salt tolerance, brings a range of biotechnological applications that enable the use of these microorganisms as inoculants may provide beneficial effects on soil-plant interaction. In this context, the objective was to analyze the effects of reinoculation of halotolerant bacteria with plant growth promotion in plants of *Atriplex nummularia* L. grown in a greenhouse. The bacteria used were isolated from *Atriplex* plants grown in saline soils, and previously characterized as halotolerant bacteria, and the treatments consisted of T1: control without inoculation; T2: UAGAt22; T3: UAGAt25; T4: UAGAt35; T5: T6 UAGAt53: Mix all bacteria. The experiment was conducted in greenhouse at UAG/UFRPE, adopting the completely randomized design with 6 treatments and 5 replications, totaling 30 experimental units. The variables analyzed were: content of chlorophyll *a*, *b* and total; stomatal conductance (*gs*); leaf temperature; green biomass, total dry biomass and fractional parts (root, stem and leaf) of plants; content and levels of sodium, potassium, calcium and magnesium; total nitrogen, crude protein of leaves and total organic carbon plant. No influence of the inoculation treatments for the contents of chlorophyll *a*, *b*, and total stomatal conductance. The re-inoculation increased the mass of green leaves, with expression of the 4 treatment (inoculum UAGAt 35). The nutrient content analyzed in leaves were not affected, while the fractional parts of roots and stems, the levels of Na, K, Mg significantly increased. The contents of Na and Mg were increased in roots of *Atriplex* from reinoculation. In relation to total plant nitrogen, significant difference between treatments only in the stems of plants, being provided by the mix of bacteria. The total organic carbon increased significantly in the stem and leaves of *Atriplex*. The reinoculation with halotolerant bacteria and promoting plant growth contributed to the growth and nutrition of plants of *Atriplex*, demonstrating the viability of these bacterial strains as inoculants, making it a promising alternative for application in the field, with the principle of collaboration in plant growth and phytoremediation saline soils.

Keywords: Promotion of growth, halophyte, nutrient

1. INTRODUÇÃO

A utilização dos micro-organismos na forma de inoculantes biológicos podem ajudar o mercado agrícola, se destacando como uma das tecnologias mais eficientes em substituir métodos tradicionais de adubação. Entre a diversidade desses micro-organismos, existem as bactérias halotolerantes, capazes de viver na presença de sais, habitando ambientes salinos e também associadas à plantas halófitas. Essas bactérias podem possuir características de promoção de crescimento vegetal, com múltiplas aplicações biotecnológicas (FLORES-FERNANDEZ et al., 2012; HEIDARI et al., 2012; SALAMONE et al., 2012).

As bactérias halotolerantes isoladas da mesma variedade da planta que se deseja inocular são mais eficientes, especialmente quando a população nativa está presente. Aliado a isso, há necessidade de selecionar micro-organismos promissores, capazes de fixar nitrogênio, solubilizar fosfato inorgânico e produzir substâncias promotoras de crescimento de plantas para serem reinoculados na planta hospedeira (ROESH et al., 2005). Estas bactérias podem colonizar diferentes órgãos das plantas e exercer efeitos benéficos sobre elas, podendo promover aumento na taxa de crescimento, no desenvolvimento de órgãos, contribuir com a nutrição, favorecendo o rendimento das culturas. Com isso, torna-se uma rentável estratégia para promover o crescimento das plantas sob estresse salino, sendo cultivadas em casa de vegetação e no campo (AAMIR et al., 2013).

Para incrementar o estudo destas bactérias em ambientes salinos, juntamente com plantas tolerantes, é importante analisar aspectos agronômicos, fisiológicos e nutricionais, que possam contribuir satisfatoriamente com a produção de biomassa vegetal. Dessa forma, este pode ser um caminho promissor, criando-se novas possibilidades na exploração biotecnológica de inoculantes (FARISSI et al., 2014). É relevante enfatizar ainda, que a *Atriplex nummuralia* L., se destaca com sua abundante produção de fitomassa foliar, apresentando teores elevados de proteína e tendo um bom rendimento forrageiro, além de tolerar déficit hídrico e ambientes altamente salinos, representando uma fonte de alimentação complementar para animais (FREIRE et al., 2010).

Diante disto, alguns trabalhos têm tornado evidente que em várias culturas, como cana-de-açúcar (BENEDUZI et al., 2013), milho (CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2013), feijão (FARIAS et al., 2012), arroz (ARAÚJO et al., 2013) e outras, há respostas positivas à inoculação com linhagens bacterianas. Todavia, informações sobre o uso de inoculantes com bactérias halotolerantes, ainda são escassas, assim como são restritos os trabalhos com plantas de *Atriplex nummularia* L.

Dessa forma, torna-se necessário o estudo da reinoculação e de seus efeitos no cultivo desta planta halófito, com a finalidade de aprimorar seu manejo cultural, dando condições para beneficiar o processo de fitorremediação em solos salinos e colaborar com a sustentabilidade socioambiental.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido em ambiente protegido durante o período de fevereiro a setembro do ano de 2013, em instalações pertencentes à Unidade Acadêmica de Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no município de Garanhuns – PE, situado a 8° 53' 27'' de latitude S e 36° 48' de longitude, a uma altitude de 841 m. O clima da região é classificado como subtropical, com regime de chuvas de outono-inverno, segundo classificação de Köppen, com temperatura média anual de 21,2 °C.

2.1. Tratamentos e delineamento estatístico

Os tratamentos consistiram em: T1: Testemunha, sem inoculo; T2: Inoculo 1 (UAGAt 22); T3: Inoculo 2 (UAGAt 25); T4: Inoculo 3 (UAGAt 35); T5: Inoculo 4 (UAGAt 53); e T6: Inoculo 5 (Mix de todas as bactérias: UAGAt 22, 25, 35 e 53). O delineamento estatístico adotado foi inteiramente casualizado com 6 tratamentos e 5 repetições, totalizando 30 unidades experimentais.

2.2. Preparo dos inoculos

Antecedendo a reinoculação das bactérias nas plantas de *Atriplex*, foram realizadas análises microbiológicas no Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana (UAG/UFRPE) das linhagens para a posterior reinoculação, sendo utilizadas para este procedimento 4 linhagens bacterianas isoladas de plantas de *Atriplex nummularia* L., associadas ao solo com cultivo da planta e os nichos, endofítico de raiz e folha. As bactérias possuem características comprovadas de promoção de crescimento vegetal, tais como fixadoras de nitrogênio biologicamente, solubilizadoras de fosfato em meio rico com sal (5% NaCl), produtoras de ácido indol acético, exopolissacarídeos e expressão da molécula de *quorum sensing* (Tabela 1). Dessa forma, colônias bacterianas isoladas, foram repicadas em meio TSA líquido acrescido de 5% de NaCl. Depois do crescimento bacteriano, as culturas bacterianas

foram diluídas em solução salina e em seguida foi realizada a densidade ótica dos isolados bacterianos em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm.

Tabela 1. Características de promoção de crescimento vegetal das bactérias halotolerantes utilizadas para a reinoculação nas plantas de *Atriplex nummularia* L.

Linhagem bacteriana	Nicho	FBN	Produção de AIA	Solubilização de Fosfato		Produção de EPS	Produção de HLA
				0% NaCl	5% NaCl		
UAGAt 22	SSC	+	+	+	+	-	+
UAGAt 25	SCC	+	+	+	+	+	+
UAGAt 35	ER	+	+	+	+	+	+
UAGAt 53	EF	+	+	+	+	+	+

(SSC: Solo sem cultivo; SCC: Solo com cultivo; ER: Endofítica de raiz; EF: Endofítica de folha)

2.3. Instalação e condução do experimento

Para a instalação do experimento, foram formadas mudas de *Atriplex* a partir de estacas provenientes de plantas matrizes coletadas em um experimento instalado na cidade de Ibimirim-PE (Figura 1). Para o preparo das mudas, foi utilizado como substrato, húmus comercial (100% natural) em sacos de polietileno. Quando a planta obteve altura aproximada de 20 cm de altura, realizou-se o transplante das mesmas para vasos com capacidade volumétrica de 10 L, os quais foram preenchidos com substrato composto de húmus comercial e um material de solo na proporção de 1:1, cuja caracterização físico-química do solo encontra-se na Tabela 2.

A reinoculação foi realizada 3 meses após a formação de mudas, sendo distribuídos 200 mL do inoculo equivalente a cada tratamento, em pontos equidistantes próximos à planta em cada vaso. A irrigação foi realizada diariamente durante o experimento, utilizando uma quantidade de 200 mL da solução salina, com condutividade elétrica equivalente a 5 dSm^{-1} , preparada com NaCl.

Tabela 2. Caracterização química e física do solo utilizado para o cultivo da *Atriplex nummularia* Lindl.

Atributos químicos								
pH ¹	P ²	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	COT ³
	mg dm ⁻³			cmol _c dm ⁻³				g kg ⁻¹
5,11	45,26	0,11	0,06	0,8	0,5	0,3	3,51	7,84
Atributos físicos								
Areia		Silte	Argila	Dp ⁴	Ds ⁵			
Fina	Grossa							
kg kg ⁻¹				g cm ⁻³				
0,1534	0,6984	0,0283	0,1295	2,7	1,55			

¹ pH em água (1:2,5); ² Fósforo disponível (Mehlich-1); ³ Carbono orgânico total; ⁴ Densidade das partículas; ⁵ Densidade do solo

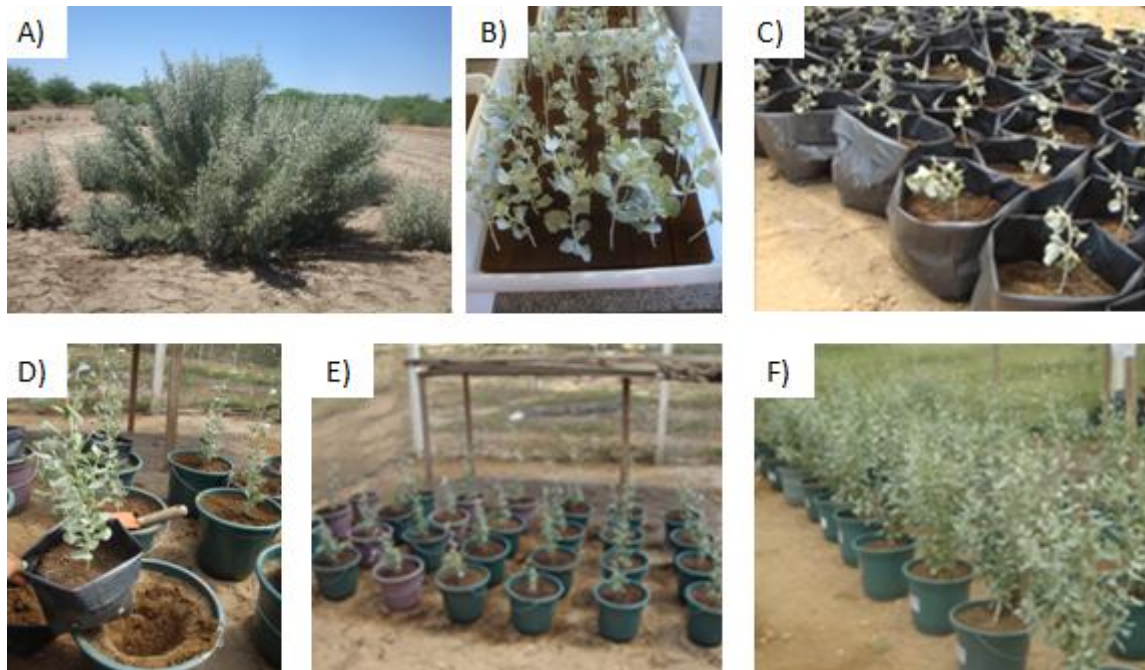


Foto: Flaviana Gonçalves da Silva

Figura 1. Planta matriz (A), estacas da *Atriplex* (B), formação de mudas (C), transplântio para vasos (D), plantas formadas (E), plantas podadas para posterior reinoculação das bactérias halotolerantes (F).

Ao final do experimento (90 dias após a reinoculação), foram coletadas amostras de solo, no qual as plantas de *Atriplex* foram cultivadas, a fim de se avaliar os atributos químicos após o cultivo. Avaliou-se fósforo disponível no solo, nitrogênio total e carbono orgânico total do solo. Para a determinação de fósforo, foi utilizada a metodologia descrita por Olsen et al. (1954). O nitrogênio total e carbono orgânico total foram analisados a partir da metodologia proposta por Mendonça e Matos (2005). A partir dos resultados de nitrogênio e carbono orgânico, foi obtida a relação C/N do solo (Tabela 3).

Tabela 3. Atributos químicos do solo cultivado com *Atriplex nummularia* Lindl reinoculadas com bactérias halotolerantes.

Atributos químicos	Teor de P mg/kg ⁻¹	Relação C/N
T1-Testemunha	37,93	1,525
T2- Isolado UAGAt 22	39,29	0,885
T3- Isolado UAGAt 25	35,15	1,529
T4-Isolado UAGAt 35	37,01	1,186
T5- Isolado UAGAt 53	29,23	1,422
T6- MIX	44,54	1,147

2.4. Variáveis analisadas

2.4.1. Análises fisiológicas e morfológicas

Aos 2 meses após a reinoculação, no horário das 08:00 às 09:00 da manhã foram mensurados o teor de clorofila *a*, *b* e total, em folhas intermediárias das plantas, através do medidor eletrônico de teor de clorofila, CLOROFILOG CFL1030, da marca FALKER. Na mesma ocasião foram realizadas as leituras da condutância estomática (*gs*) e temperatura foliar, sendo determinadas com o uso de um porômetro de equilíbrio dinâmico (LICOR, modelo LI-1600).

Ao final do experimento, aos 90 dias após reinoculação, foram analisadas a fitomassa verde de raiz, caule, folha e total das plantas, utilizando uma balança de precisão e em seguida foi feita a determinação da fitomassa seca, através da secagem do material vegetal em estufa a 60 °C até alcançar a massa constante (SANTOS, 2012).

2.4.2. Teor de nutrientes

Após a obtenção da massa seca de todas as plantas, as partes fracionadas (raiz, caule e folha), foram utilizadas para a análise de nutrientes. A fitomassa correspondente às três partes do vegetal foram moídas em moinho (Willey) e realizada a digestão nitroperclórica (SILVA, 2009). Logo após a determinação dos teores de sódio e potássio foi efetuada por fotometria de emissão de chama; e os teores de cálcio e magnésio, por absorção atômica (SOUSA et al., 2011). Com os dados de produção de fitomassa seca e dos teores dos elementos na folha, caule e raiz, foram calculados os conteúdos extraídos pela planta (SILVA, 2009).

Para a determinação do nitrogênio total vegetal, as amostras passaram pela digestão sulfúrica a quente e a determinação foi realizada pelo método semi-micro-Kjeldahl de acordo com a metodologia descrita por Silva (2009). O teor de proteína bruta das folhas (PB) foi estimado a partir dos dados de nitrogênio pelo fator de conversão de 6,25 (GALVANI & GAERTNER, 2006).

2.4.3 Determinação de Carbono Orgânico vegetal

O carbono orgânico vegetal das amostras de raiz, caule e folha foi determinado através da oxidação da matéria orgânica em presença de ácido sulfúrico e dicromato de potássio, seguindo a metodologia descrita por Bezerra Neto & Barreto (2011).

3. Análise estatística

Os dados obtidos para cada variável foram submetidos à análise de variância pelo teste F, até 5% de significância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey utilizando o programa estatístico SISVAR 5.3.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises fisiológicas e morfológicas

A reinoculação de plantas utilizando micro-organismos com promoção de crescimento é umas das alternativas que possibilita o incremento da biomassa vegetal, teor e conteúdo de nutrientes entre outras características fisiológicas ou morfológicas. Dessa forma, na Tabela 4, encontram-se as médias das variáveis analisadas, percebendo-se que não ocorreu efeito entre os tratamentos, em relação à clorofila *a*, *b* e total; condutância estomática (*gs*) e temperatura foliar em plantas de *Atriplex nummularia* L.

Desse modo, provavelmente, não houve influência da inoculação sobre a produção dos pigmentos avaliados, o que conseqüentemente, manteve os teores constantes de clorofila, havendo uma maior presença de pigmentos da clorofila *a* do que de *b*. De acordo com Gomes et al. (2013), pode ter acontecido degradação da clorofila *b*, aumentando relativamente a quantidade da clorofila *a*. Kappes et al. (2013) estudando inoculação de bactérias diazotróficas observaram um maior índice de clorofila quando aplicou o tratamento com inoculação na cultura do milho, relatando ainda que essa possível reposta tem relação com os mecanismos de promoção do crescimento das bactérias, incrementando a capacidade das plantas em absorver nutrientes do solo.

Na condutância estomática (*gs*), é importante ressaltar que no tratamento 3 (UAGAt 25) apesar de não ser diferente estatisticamente dos demais, percebe-se valor mínimo para a *gs* e máximo para a temperatura foliar. Dessa forma, este processo pode ter acontecido pela indução ao fechamento estomático, reduzindo a transpiração e conseqüentemente minimizando a perda de água para o ambiente. Com o fechamento estomático, a diminuição na transpiração pode

também causar insuficiente resfriamento da folha que leva ao aumento da temperatura da foliar (ALVES et al., 2011).

Dessa forma, observa-se no presente trabalho que a bactéria UAGAt 25 destacou-se quanto a essa característica. Possivelmente, ocorreu a colaboração dessa bactéria, caracterizada como promotora de crescimento vegetal, ajudando no crescimento e desenvolvimento vegetal, com prováveis contribuições no comportamento fisiológico desta halófito. Todavia, mais estudos devem ser realizados buscando compreender a relação da fisiologia e inoculantes bacterianos interagindo com plantas de *Atriplex*.

Tabela 4. Médias da clorofila *a*, *b*, total (mg g^{-1}), condutância estomática ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e temperatura foliar ($^{\circ}\text{C}$) de plantas de *Atriplex nummularia* L., reinoculadas com bactérias halotolerantes.

Tratamento	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila total	<i>gs</i>	Temp. foliar
T1-Testemunha	37,70 a	14,4 a	52,11 a	0,0748 a	26,90 a
T2- Isolado UAGAt 22	37,48 a	13,70 a	51,18 a	0,0953 a	26,18 a
T3- Isolado UAGAt 25	35,76 a	11,94 a	47,70 a	0,0559 a	27,00 a
T4-Isolado UAGAt 35	37,36 a	13,30 a	50,66 a	0,0951 a	25,60 a
T5- Isolado UAGAt 53	35,56 a	11,30 a	46,86 a	0,0863 a	26,58 a
T6- MIX	35,86 a	12,32 a	48,18 a	0,0951 a	26,98 a
C.V. (%)	9,6	23,88	13,11	25,24	3,88

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Na tabela 5, estão dispostas as médias das variáveis analisadas para a fitomassa verde, seca e total das plantas de *Atriplex*, onde as mesmas não tiveram diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) em função dos tratamentos de reinoculação, exceto para a fitomassa verde das folhas.

Para a análise da fitomassa verde das folhas, o tratamento 4 (inoculo UAGAt 35), expressou o maior valor médio ($123,87 \text{ g planta}^{-1}$) em relação aos demais, enquanto a testemunha ficou em torno de $104,65 \text{ g planta}^{-1}$. Para as demais análises, mesmo não sendo significativo estatisticamente, pode-se observar que os maiores valores foram expressos quando aplicados os tratamentos com os inoculos bacterianos.

Diante dos resultados ressalta-se, que as linhagens bacterianas que foram inoculadas nas plantas de *Atriplex* são eficientes na fixação biológica de nitrogênio, síntese de ácido indol acético e solubilizadores de fosfato inorgânico (0 e 5% de NaCl), produtoras de EPS e *quorum sensing* (Tabela 1). Deste modo, tal resposta pode ser justificada pelas características de promoção de crescimento associadas às plantas halófitas. No entanto, bactérias promotoras de crescimento vegetal podem estimular o crescimento influenciando no rendimento e na absorção de nutrientes pela planta, e assim disponibilizando alguns nutrientes como, nitrogênio e fósforo, além de sintetizar fitohormônios e proteger o vegetal contra estresses ambientais (HEIDARI et al., 2012). Ressalva-se ainda que de acordo à análise química do solo cultivado com *Atriplex*, percebe-se maiores valores para teor de fósforo e relação C/N no solo quando foi submetido a reinoculação das bactérias, dessa forma, esses resultados podem ter contribuído com a maior disponibilidade de nutrientes contribuindo com o crescimento da planta (Tabela 3).

No entanto, neste trabalho é importante ressaltar também que os menores valores para produção de fitomassa verde das raízes das plantas consistiram nos tratamentos com os inóculos, UAGAt 25 ($53,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e UAGAt 53 ($31,77 \mu\text{g.mL}^{-1}$), com as respectivas produções de AIA *in vitro*. Contudo, a resposta das plantas às auxinas liberadas pelas bactérias pode variar do efeito benéfico ao inibitório, dependendo da concentração. Quando são produzidas altas quantidades de auxinas exógenas, pode ocorrer inibição do desenvolvimento das raízes, provocando efeitos negativos de crescimento das plantas (BIANCHET et al., 2013). Este fato pode ter ocasionado uma redução da fitomassa nas plantas de *Atriplex* quando submetidas à reinoculação com estas linhagens, o que aconteceu ao contrário com a bactéria UAGAt 22 ($6,15 \mu\text{g.mL}^{-1}$), que apesar de diferir estatisticamente das demais, proporcionou a maior formação de fitomassa verde da raiz (Tabela 5).

Tabela 5. Médias da fitomassa verde de folhas (FVF), fitomassa verde de caule (FVC), fitomassa verde de raiz (FVR), fitomassa verde total (FVT), fitomassa seca de folhas (FSF), fitomassa seca de caule (FSC), fitomassa seca de raiz (FSR), fitomassa seca total (FST) de plantas de *Atriplex nummularia* L., reinoculadas com bactérias halotolerantes.

TRATAMENTO	FVF(g)	FVC (g)	FVR (g)	FVT (g)	FSF (g)	FSC (g)	FSR (g)	FST (g)
T1-Testemunha	104,65 ab	167,19 a	70,97 a	287,52 a	34,88 a	51,17 a	18,70 a	86,05 a
T2- Isolator UAGAt 22	102,19 ab	171,92 a	90,61 a	279,30 a	34,63 a	48,84 a	23,02 a	83,47 a
T3- Isolado UAGAt 25	99,85 ab	150,70 a	65,34 a	287,52 a	33,99 a	50,32 a	27,35 a	84,31 a
T4-Isolado UAGAt 35	123,87 a	161,70 a	89,43 a	305,15 a	38,86 a	53,59 a	21,35 a	92,46 a
T5- Isolado UAGAt 53	82,97 b	149,88 a	63,09 a	246,54 a	30,12 a	39,73 a	21,97 a	69,86 a
T6- MIX	109,65 ab	185,96 a	82,064 a	310,45 a	36,18 a	51,744 a	19,14 a	87,92 a
C.V. (%)	15,02	19,58	37,52	15,22	16,45	16,18	31,25	15,91

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.2. Teor de nutrientes

Os teores médios de cálcio, magnésio, sódio e potássio nas partes fracionadas das plantas de *Atriplex* (folha, caule e raiz), encontram-se discriminados na Tabela 6. Não ocorreu efeito significativo (Tukey, $p < 0,05$) dos tratamentos reinoculados sobre os teores dos elementos analisados na fitomassa seca da fração folha das plantas avaliadas.

Quanto aos teores de nutrientes no caule em função dos tratamentos, percebe-se que não houve diferença para os teores de cálcio, sódio e potássio. No entanto, para o magnésio, constatou-se resultado superior no tratamento 5 (UAGAt 53), destacando-se em relação aos demais com valor de $0,430 \text{ dag/kg planta}^{-1}$ para este elemento, enquanto que nas plantas testemunha esse valor foi da ordem de $0,408 \text{ dag/kg}^{-1}$.

Na fração raiz, não foi verificado efeito significativo em relação ao teor de cálcio, porém, observou-se diferença significativa para os demais elementos. A reinoculação

conseguiu incrementar o teor de sódio nas plantas de *Atriplex*, destacando-se o tratamento 5 (UAGAt 53) com valor de 34,40 dag/kg⁻¹. Isso pode ter ocorrido, por ser a *Atriplex* uma halófito, necessitando de concentrações satisfatórias de sais no seu metabolismo (SOUSA et al., 2013), fato que justifica a maior concentração de sódio na raiz da planta. Destaque-se, que esta linhagem utilizada no tratamento, é oriundo do nicho endofítico de folha e produtora do fitormônio, ácido indol acético; com isso acredita-se, que esta bactéria contribuiu, incrementando o crescimento da raiz, por meio da elongação celular e melhorando a absorção dos nutrientes, e conseqüentemente ocorrendo um maior acúmulo de sódio nos tecidos radiculares da planta, diferentemente da testemunha. Como esta bactéria é endofítica, pode ter acontecido uma interação mais rápida desta com a planta, facilitando a promoção de crescimento, diante das outras linhagens testadas neste experimento.

Em relação à concentração de potássio na raiz, a testemunha resultou no valor de 52,20 dag/kg⁻¹, não diferindo dos tratamentos 2-UAGAt 22 (50,20 dag/kg planta⁻¹), 3-UAGAt 25 (40,20 dag/kg planta⁻¹), 4-UAGAt 35 (49,60 dag/kg planta⁻¹) e 5-UAGAt 53 (51,80 dag/kg planta⁻¹), reinoculados com bactérias halotolerantes. Para o teor de magnésio na raiz, percebe-se efeito significativo entre os tratamentos, de modo, que o valor de 0,642 dag/kg planta⁻¹ da testemunha foi o maior, porém não diferiu dos tratamentos 2-UAGAt 22 (0,638 dag/kg planta⁻¹) e 3-UAGAt 25 (0,636 dag/kg planta⁻¹), enquanto o Mix de bactérias proporcionou o menor teor deste nutriente (0,384 dag/kg planta⁻¹).

Mediante aos resultados expostos, ressalta-se ainda que conhecimentos dos teores de Ca, Mg, Na e K na folha, caule e raiz da *Atriplex nummularia* L, fornece informações importantes para um programa de manejo em áreas salinizadas, contribuindo com a extração de sais nos solos. Outros autores avaliando teores de nutrientes nas culturas de cafeeiro (PIMENTEL et al., 2008), abacaxizeiro (BALDOTTO et al., 2010) e tomateiro (BARRETTI et al., 2008) inoculadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal, perceberam que as bactérias promoveram elevadas concentrações de Ca, K e Mg, influenciando positivamente o desenvolvimento destas culturas.

Diante da importância destas bactérias como inoculantes, percebe-se a contribuição destas para a eficiência nutricional e rendimento das plantas. No entanto, alguns microorganismos participam ativamente na captação de nutrientes através da rizosfera, fato este que

beneficia a mobilização de elementos minerais, disponibilizando para a planta. Os mesmos são capazes de captar nutrientes em sítios de forma moleculares que as raízes não conseguem. Conseqüentemente com a reinoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal nas plantas de *Atriplex*, a tendência é fornecer nutrientes para este vegetal e a atividade microbiana se beneficiar através do exsudados radiculares da mesma (HIRATA et al., 2011). Já Pereira et al. (2004), abordam a importância do cultivo da *Atriplex* em solo salino, concluindo que a presença desta halófito influencia positivamente a atividade microbiana do solo associada às plantas e indiretamente contribui para a recuperação do mesmo.

Tabela 6. Teores de nutrientes das frações de plantas de *Atriplex nummularia* Lindl reinoculadas com bactérias halotolerantes.

TRATAMENTO	FOLHA				CAULE				RAIZ			
	Ca	Na	K	Mg	Ca	Na	K	Mg	Ca	Na	K	Mg
	dag/kg											
T1-Testemunha	8,086 a	91,600 a	40,000 a	1,718 a	6,122 a	43,200 a	85,400 a	0,408 ab	2,514 a	31,800 a	52,200 a	0,642 a
T2- Isolado UAGAt 22	7,952 a	93,000 a	38,600 a	1,460 a	5,912 a	43,400 a	80,000 a	0,422 ab	2,444 a	32,600 a	50,200 a	0,638 a
T3- Isolado UAGAt 25	7,620 a	87,200 a	32,800 a	1,414 a	5,858 a	38,200 a	70,200 a	0,346 b	2,596 a	30,600 a	40,200 a	0,636 ab
T4- Isolado UAGAt 35	7,862 a	93,400 a	39,400 a	1,426 a	6,026 a	40,600 a	82,000 a	0,410 ab	1,742 a	17,000 b	27,200 b	0,410 c
T5- Isolado UAGAt 53	7,708 a	93,000 a	36,600 a	1,388 a	5,926 a	43,600 a	82,000 a	0,430 a	1,768 a	34,400 a	49,600 a	0,424 bc
T6- MIX	7,788 a	96,200 a	40,200 a	1,448 a	5,936 a	44,600 a	77,200 a	0,384 ab	1,628 a	31,400 a	51,800 a	0,384 c
C.V. (%)	5,34	5,15	16,99	15,53	3,0	14,52	10,71	10,0	79,24	13,53	14,59	20,88

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Em relação aos conteúdos de nutrientes, observa-se na Tabela 7, que ocorreu efeito significativo entre os tratamentos, apenas para os nutrientes, Na e Mg na fração raiz. As maiores extrações de Na, ocorreram com o tratamento 3 (inóculo UAGAt 25), chegando a acumular 8,20 g-planta⁻¹ de sódio, enquanto que o conteúdo de Mg na raiz, também se expressou de forma acentuada com o inoculo UAGAt 25, com valor máximo de 0,016 g-planta⁻¹. Este inoculo (UAGAt 25), proporcionou os resultados mais relevantes para os conteúdos de Na e Mg nas plantas de *Atriplex*, conseqüentemente por ser um promotor de crescimento, estimulando o desenvolvimento de plantas pela síntese de fitohormônio, como a auxina.

Sousa et al. (2011) estudando a fitoextração de sais pela *Atriplex nummularia* L. sob estresse hídrico, cultivada em ambiente protegido, observaram valores elevados dos teores de nutrientes nas partes fracionadas desta planta, mostrando o potencial desta planta como fitoextratora. Lúcio et al. (2013), relatam no estudo com inoculação de fungos micorrízicos arbusculares em meloeiro, aumento nas concentrações e conteúdos dos elementos, N, P e K em plantas inoculadas com FMA sob condições de salinidade, tanto em condições controladas como no campo.

Tabela 7. Conteúdos de Ca, Mg, Na, e K em folha, caule e raiz de plantas de *Atriplex nummularia* Lindl, reinoculadas com bactérias halotolerantes.

TRATAMENTO	FOLHA				CAULE				RAIZ			
	Ca	Na	K	Mg	Ca	Na	K	Mg	Ca	Na	K	Mg
	g-planta ⁻¹											
T1-Testemunha	2,83 a	31,94 a	13,60 a	0,60 a	3,13 a	22,59 a	44,01 a	0,20 a	0,52 a	5,89 ab	9,51 a	0,011 ab
T2- Isolado UAGAt 22	2,75 a	32,3 a	13,25 a	0,50 a	2,88 a	21,21 a	39,05 a	0,20 a	0,49 a	7,49 ab	11,56 a	0,014 ab
T3- Isolado UAGAt 25	2,59 a	29,71 a	11,12 a	0,47 a	2,95 a	19,41 a	35,54 a	0,17 a	0,70 a	8,20 a	11,06 a	0,016 a
T4- Isolado UAGAt 35	3,05 a	36,48 a	15,14 a	0,56 a	3,22 a	22,07 a	44,28 a	0,22 a	0,38 a	3,77 b	5,95 a	0,0090 b
T5- Isolado UAGAt 53	2,32 a	27,92 a	11,00 a	0,41*	2,35 a	17,27 a	32,74 a	0,17 a	0,037 a	7,10 ab	10,32 a	0,0086 b
T6- MIX	2,81 a	34,88 a	14,54 a	0,52 a	3,06 a	22,91 a	39,95 a	0,19 a	0,31 a	5,86 ab	9,74 a	0,0073 b
C.V. (%)	18,63	18,14	20,29	25,85	16,96	26,51	22,4	18,12	24,05	32,56	35,26	32,99

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Na Tabela 8, apresentam-se os valores médios para o nitrogênio total nas partes fracionadas das plantas de *Atriplex* e teor de proteína bruta nas folhas. Quanto à análise de nitrogênio total das partes fracionadas das plantas, a reinoculação incrementou essa característica influenciando positivamente no teor deste nutriente apenas no caule das plantas, não havendo, entretanto, diferença estatística para folha e raiz.

De acordo com a Tabela 8, percebe-se que o tratamento Mix, composto de todas as bactérias proporcionou 0,198 g/kg de nitrogênio total para o caule das plantas, obtendo o maior valor em relação aos demais. Já o tratamento T3, referente ao inoculo UAGAt 25 expressou o valor mínimo equivalente a 0,053 g/kg de nitrogênio total. Esses dados sugerem,

em parte, a contribuição da fixação biológica de N_2 e do aumento de volume do sistema radicular promovido pelas bactérias halotolerantes, permitindo assim que a planta explore maior volume de solo, conseqüentemente aumentando a concentração de N no caule das plantas de *Atriplex*.

A inoculação com misturas de bactérias pode ser uma estratégia para a melhoria na associação planta-bactéria, promovendo o crescimento e desenvolvimento vegetal. Dessa forma, Pereira et al. (2013), analisando o teor de nitrogênio total em variedades de cana-de-açúcar cultivadas em campo, observaram respostas positivas quanto a inoculação com bactérias diazotróficas, tendo destaque a mistura de bactérias, expressando valor máximo de $5,16 \text{ kg ha}^{-1}$ de N, na variedade RB867515. Em outro trabalho, Moreira et al. (2103), relatam que as bactérias também assimilam as formas inorgânicas de N tornando-as constituintes orgânicos de suas células e tecidos. Então, os compostos sintetizados pelos micro-organismos podem então ser parcialmente mineralizados tornando-se disponível para as plantas.

O teor de proteína bruta, não diferiu estatisticamente entre os tratamentos, porém observa-se valores elevados deste teor nas folhas da *Atriplex*, variando de 15,19 a 19,46% (Tabela 8). Esses valores podem ter sido incrementados também com a promoção de crescimento vegetal dos inoculos bacterianos utilizados na reinoculação das plantas. Barroso et al. (2006), observaram teor de proteína bruta médio em folhas de *Atriplex* de 15,11%. Santos (2012) obtiveram resultados de 14,44 a 15,31% de proteína bruta em folhas e ramos de *Atriplex*. Portanto, é importante relatar que as folhas são detentoras de bons teores de proteína bruta, que podem ser comparados ao de algumas leguminosas e outras espécies utilizadas frequentemente na alimentação animal. Silva (2010) relata que essa planta pode apresentar teores de proteína bruta oscilando entre 8,8 a 25%, mas que dependem do tipo de tecido, da idade da planta e estação do ano.

Tabela 8. Teor de nitrogênio total e proteína bruta de plantas de *Atriplex nummularia* Lindl, reinoculadas com bactérias halotolerantes.

Tratamentos	Teor de N Total			Teor de Proteína Bruta
	-----g/kg ⁻¹ -----			%
	Raiz	Caule	Folha	Folhas
T1-Testemunha	0,131 a	0,154 ab	2,43 a	15,19 a
T2- Isolado UAGAt 22	0,131 a	0,156 ab	2,73 a	17,09 a
T3- Isolado UAGAt 25	0,126 a	0,053 b	3,13 a	19,46 a
T4-Isolado UAGAt 35	0,168 a	0,137 ab	3,10 a	19,42 a
T5- Isolado UAGAt 53	0,173 a	0,176 ab	2,81 a	17,57 a
T6- MIX	0,173 a	0,198 a	2,73 a	17,06 a
C.V	27,32	29,2	23,27	23,26

4.3. Carbono orgânico total vegetal

Os resultados obtidos para a concentração de carbono orgânico vegetal (COT) nas plantas de *Atriplex* demonstraram a influência dos tratamentos de reinoculação apenas para as partes fracionadas de folha e caule. Quanto à análise do COT nas folhas de *Atriplex*, percebe-se que o tratamento correspondente a linhagem bacteriana UAGAt 35 se destacou em relação aos demais, proporcionando valor de 14,40 dag/kg⁻¹, seguindo o isolado UAGAt 22 (13,68 dag/kg⁻¹), enquanto a testemunha obteve valor mínimo de 3,2 dag/kg⁻¹ de COT (Figura 3).

Na parte fracionada do caule da planta, observa-se que a testemunha e os tratamentos 2-UAGAt 22 e Mix proporcionaram valores significativamente iguais (24,36; 17,16 e 16,56 dag/kg⁻¹) respectivamente, diferindo dos demais (Figura 4) para a concentração de carbono orgânico total vegetal. O maior acúmulo de carbono nas folhas e caule foi diretamente associado com a maior alocação de biomassa das folhas e parte aérea para esse componente. Mediante a isto, é importante salientar que as folhas e raízes desempenham importante função no processo de acumulação de carbono, através da fotossíntese e pela liberação de carbono via exsudados das raízes.

Todavia, as bactérias aqui estudadas, atuaram com os mecanismos de promoção de crescimento vegetal, e em troca, ocorreu a troca de benefícios entre as plantas e microrganismos, permitindo o acúmulo de carbono orgânico nos tecidos vegetais. Caldeira et al. (2003) relatam também que nas folhas encontra-se a maioria das células vivas, que tendem

acumular maiores quantidades de nutrientes em função dos processos transpiração e fotossíntese. Corroborando com estes resultados, Sausen (2011), estudando o estoque de carbono orgânico em *Eucalyptus saligna*, observaram a maior concentração deste, no caule das plantas, representando um dos principais componentes de estoque de carbono.

Portanto, para promover o crescimento das plantas sob condições salinas, uso direto de bactérias tolerantes ao sal tem atraído interesse de pesquisa considerável tanto na produção agrícola como na indústria. Fica evidente pelo exposto, a importância destes micro-organismos na interação com as plantas, bem como em ambientes salinos, salientando-se a importância de realização de futuros estudos, que visem aprimorar ainda mais o conhecimento da relação entre plantas halófitas e bactérias, quanto ao desenvolvimento vegetal, acúmulo de nutrientes e carbono orgânico vegetal no tecidos vegetais.

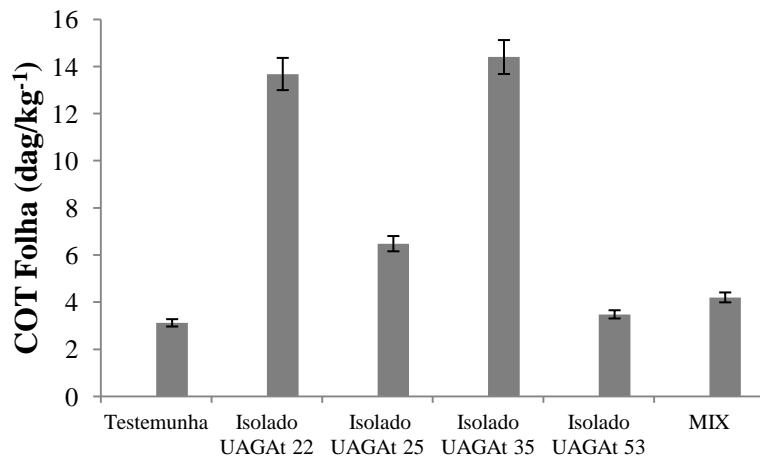


Figura 3. Carbono orgânico total de folhas de plantas de *Atriplex nummularia* L. reinoculadas com bactérias halotolerantes.

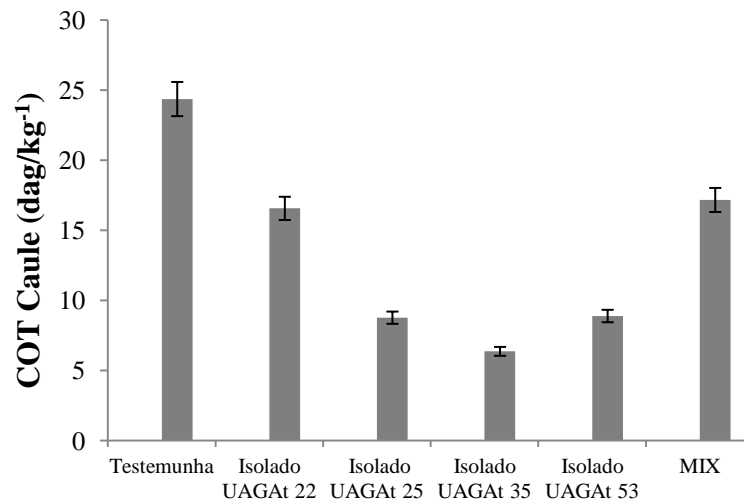


Figura 4. Carbono orgânico total de caule de plantas de *Atriplex nummularia* L. reinoculadas com bactérias halotolerantes.

5. CONCLUSÕES

A reinoculação com bactérias halotolerantes não influenciou nos aspectos fisiológicos das plantas de *Atriplex*, sem alterações nos teores de clorofila e condutância estomática.

Os teores dos nutrientes, sódio, magnésio e potássio nas plantas de *Atriplex* aumentaram devido à inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal.

O mix de bactérias e a linhagem UAGAt 35 se destacaram proporcionando valores expressivos em teores de nitrogênio e carbono orgânico total vegetal nas plantas de *Atriplex*.

As linhagens bacterianas são promissoras no desenvolvimento vegetativo e nutritivo da *Atriplex*, podendo serem explorados como inoculantes bacterianos associados a plantas halófitas.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAMIR, M.; ASLAM, A.; KHAN, M. Y.; JAMSHAD, M. U.; AHMAD, M.; ASGHAR, H. N.; ZAHIR, Z. A. Co-inoculation with rhizobium and plant growth promoting rhizobacteria (pgpr) for inducing salinity tolerance in mung bean under field condition of semi-arid climate. *Asian J. Agri. Biol.* v.1, n.1, p. 07-12, 2013.

ALVES, E. C.; OLIVEIRA, T. B.; LUZ, L. M.; VILHENA, N. Q.; COSTA, R. C. L. Fotossíntese, transpiração e condutância estomática de plantas de pimentão submetidas a diferentes doses de N. In: *Anais do 9º Seminário Anual de Iniciação Científica*, 2011.

ARAÚJO, A. E. S.; BALDANI, V. L. D.; GALISA, P. S.; PEREIRA, J. A.; BALDANI, J. I. Response of traditional upland rice varieties to inoculation with selected diazotrophic bacteria isolated from rice cropped at the Northeast region of Brazil. *Applied Soil Ecology.* v. 64. p. 49–55, 2013.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; OLIVARES, F. L.; VIANA, A. P.; SMITH, R. B. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar vitória durante a aclimatização. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.34, p. 349-360, 2010.

BARRETTI, P. B.; SOUZA, R. M.; AZIZ, A.; POZZA, A.; POZZA, E. A.; CARVALHO, J. G.; SOUZA, J. T. Aumento da eficiência nutricional de tomateiros inoculados com bactérias endofíticas promotoras de crescimento. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 32, p.1541-1548, 2008.

BEZERRA NETO, E. & BARRETO, L. P. *Análises químicas e bioquímicas em plantas*. Recife: UFRPE, Editora Universitária da UFRPE, 2011.261p.

BENEDUZI, A.; MOREIRA, F.; COSTA, P. B.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; FAVRETO, R.; BALDANI, J. I.; PASSAGLIA, L. M. P. Diversity and plant growth promoting

evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Applied Soil Ecology*, v. 63, p. 94–104, 2013

BIANCHET, P.; SANGOI, L.; KLAUBERG FILHO, O.; MIQUELLUTI, D. J.; FERREIRA, M. A.; VIEIRA, J. Formulações simples e mista de inoculantes com bactérias diazotróficas, sob diferentes doses de nitrogênio na cultura do arroz irrigado. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 34, n. 6, p. 2555-2566, 2013.

CALDEIRA, M. V. W.; SCHUMACHER, M. V.; BARICHELLO, L. R.; VOGUE, H. L. M. Determinação de carbono orgânico em povoamentos de *Acacia mearnsii* de wild. plantados no Rio Grande do Sul. *Revista Acadêmica: Ciências agrárias e ambientais*, Curitiba, v.1, n.2, p. 47-54. 2003.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; AMARAL, F. P.; FALEIRO, A. C.; HUERGO, L. F.; ARISI, A. C. M. Identification of six differentially accumulated proteins of *Zea mays* seedlings (DKB240 variety) inoculated with *Azospirillum brasilense* strain FP2. *European Journal of Soil Biology* v.58, p. 45-50, 2013.

FARIAS, A. R. B.; LIMA, D. R. M.; LIRA-CADETE, L.; RAMOS, A. P. S.; SILVA, M. C. de B., FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRA, J. Promoção de crescimento vegetal de feijão comum por bactérias isoladas de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Pernambucana*, v. 17, p. 101-104, 2012.

FARISSI, M.; FAGHIRE, M.; BARGAZ, A.; BOUIZGAREN, A.; MAKOUDI, B.; SENTENAC, H.; GHOULAM, C. Growth, Nutrients Concentrations, and Enzymes Involved in Plants Nutrition of Alfalfa Populations under Saline Conditions. *J. Agr. Sci. Tech.* v. 16, p. 301-314. 2014.

FLORES-FERNÁNDEZ, M. L.; ZAVALA, A. I.; CHÁVEZ-HIDALGO, E. L. Bacterias halotolerantes con actividad lipolítica aisladas de las salinas de Pilluana San Martín. *Ciencia e Investigación*. v.13, n.2. p 87-91. 2010.

FREIRE, M. B. G. S.; SOUZA, E. R.; FREIRE, F. J. Fitorremediação de solos afetados por sais. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados. Fortaleza, INCTSal, 2010. p.459-471.

GALVANI, F.; GAERTNER, E. Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta. EMBRAPA, 2006. (Circular técnica).

GOMES, U. D.; ORLANDELLI, R. C.; SANTOS, M. S.; POLONIO, J. C.; PAMPHILE, J. A.; RUBIN FILHO, C. J. Avaliação do desenvolvimento de plantas de milho (*zea mays* L.) após colonização pelo fungo endofítico *Fusarium verticillioides*. CESUMAR . v. 15, n. 2, p. 131-137. 2013.

HEIDARI, M.; GOLPAYEGANI, A. Effects of water stress and inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on antioxidant status and photosynthetic pigments in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. v.11, p. 57–61, 2012.

KAPPES, C.; ARF, O.; ARF, M. V.; FERREIRA, J. P.; DAL BEM, E. A.; PORTUGAL, J. R.; VILELA, R. G. Inoculação de sementes com bactéria diazotrófica e aplicação de nitrogênio em cobertura e foliar em milho. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 34, n. 2, p. 527-538, 2013.

LÚCIO, W. S.; LACERDA, C. F.; MENDES FILHO, P. F.; HERNANDEZ, F. F. F.; NEVES, A. L. R.; GOMES-FILHO, E. Crescimento e respostas fisiológicas do meloeiro inoculado com fungos micorrízicos arbusculares sob estresse salino. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 34, n. 4, p. 1587-1602, 2013.

MENDONÇA, E.S. & MATOS, E.S. Matéria orgânica do solo; métodos de análises. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 2005. 107p.

MOREIRA, A. L. L.; ARAÚJO, F. F. Bioprospecção de isolados de *bacillus* spp. como potenciais promotores de crescimento de *Eucalyptus urograndis*. Revista *Árvore*, v.37, n.5, p.933-943, 2013.

OLSEN S.; COLE C.; WATANABE F.; DEAN L. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. USDA Circular Nr 939, US Gov. Print. Office, Washington, D.C. 1954.

PEREIRA, S.V.; MARTINEZ, C. R.; PORTO, E. R.; OLIVEIRA, B. R. B.; MAIA, L. C. Atividade microbiana em solo do Semi-Árido sob cultivo de *Atriplex nummularia*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.39, p.757-762, 2004.

PEREIRA, M. F. S.; NOVO JÚNIOR, JOSÉ.; SÁ, J. R.; LINHARES, P. C. F.; BEZERRA NETO, F.; PINTO, J. R. S. Ciclagem do carbono do solo nos sistemas de plantio direto e convencional. v. 9, n. 2, p. 21- 32, 2013.

PIMENTEL, M. S.; RICCI, M. S. F.; COSTA, J. R.; REIS, V. M.; SANTOS, V. L. S.; SILVA, M. F. Development and nutrition of coffee seedlings inoculated with growth promoting bacteri. Revista Brasileira de Agrociência, Pelotas, v.14, p.221-230, 2008.

ROESCH, L. F.; CAMARGO, F. O.; SELBACH, P. A.; SÁ, E. S. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. Ciência Rural. Santa Maria, v.35. n. 5, p. 1201-1205, 2005.

SALAMONE, I. E. G.; FUNES, J. M.; SALVO, L. P. D.; ESCOBAR-ORTEGA, J.S.; D'AURIA, F.; FERRANDO, L.; FERNANDEZ-SCAVINO, A. Inoculation of paddy rice with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact of plant genotypes on rhizosphere microbial communities and field crop production. Applied Soil Ecology. v.6. p196– 204. 2012.

SANTOS, M. A. Recuperação de solo salino-sódico por fitorremediação com *Atriplex nummularia* ou aplicação de gesso. 2012. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2012.

SAUSEN, T. L. Estoque e dinâmica de carbono em plantas subtropicais de *Eucalyptus saligna* e mediterrâneos de *Eucalyptus globulus*. 2011, 129 f. Tese de doutorado. Programa de pós-graduação em Botânica. Universidade Federal do Rio grande do Sul. 2011.

SILVA, F. C. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. 2.ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 627p.

SILVA, J. R. R. Produção e características estruturais da erva-sal, submetida a diferentes densidades de plantio e intervalos de cortes. 2010. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animal) – Campus de Ciência Agrárias, Petrolina-PE - Universidade Federal do Vale do São Francisco. 2010.

SOUZA, E. R.; FREIRE, M. B. G. S.; NASCIMENTO, C. W. A.; MONTENEGRO, A. A. A.; FREIRE, F. J.; MELO, H. F. Fitoextração de sais pela *Atriplex nummularia* Lindl. sob estresse hídrico em solo salino sódico. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v.15, p.477–483, 2011.

SOUZA, E. R.; FREIRE, M. B. G. S.; MELO, D. V. M.; MONTENEGRO, A. A. A. Management of *Atriplex Nummularia* Lindl. in a Salt Affected Soil in a Semi Arid Region of Brazil. International Journal of Phytoremediation, v.16, p.73-85, 2013.

THOMAS, G. W. Exchangeable cations. In: Page, A. L. (ed). Methods of soil analysis. Part-2 chemical methods. Madison: American Society of Agronomy, 1982, p.159-165.