

FLAVIANA GONÇALVES DA SILVA

**BACTÉRIAS HALOTOLERANTES ASSOCIADAS A PLANTAS DE *Atriplex*
nummularia L. E SUA INOCULAÇÃO EM MUDAS**

GARANHUNS, PERNAMBUCO - BRASIL

JULHO - 2014

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

**BACTÉRIAS HALOTOLERANTES ASSOCIADAS A PLANTAS DE *Atriplex*
nummularia L. E SUA INOCULAÇÃO EM MUDAS**

FLAVIANA GONÇALVES DA SILVA

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

CO-ORIENTAÇÃO DA PROFESSORA
DR^a. JÚLIA KUKLINSKY SOBRAL

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

GARANHUNS
PERNAMBUCO - BRASIL
JULHO - 2014

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

BACTÉRIAS HALOTOLERANTES ASSOCIADAS A PLANTAS DE *Atriplex*
***nummularia* L. E SUA INOCULAÇÃO EM MUDAS**

FLAVIANA GONÇALVES DA SILVA

GARANHUNS
PERNAMBUCO - BRASIL
JULHO – 2014

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

S586b Silva, Flaviana Gonçalves da
Bactérias halotolerantes associadas a plantas de
atriplex nummularia l. e sua inoculação em mudas /
Flaviana Gonçalves da Silva. - Garanhuns, 2014.

89f

Orientador: Maria Betania Galvão dos Santos
Dissertação (Mestrado em Produção agrícola) -
Universidade Federal Rural de Pernambuco - Unidade
Acadêmica de Garanhuns, 2014.
Inclui Bibliografias

CDD: 338.1

1. Produção agrícola
 2. Solo - Bioprospecção
 3. Salinidade – Fitorremediação
 4. Semiárido- Biotecnologia
 5. Estudos qualitativos
- I. Freire, Maria Betânia Galvão dos Santos
 - II. Título

"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, 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): Isaneli, Adijailton, Raquel, Tiago, Camila, Jesimiel, Jacylene, Williane, Gilka, Lucianne, Bruno, Geraldo, Ricardo, Elvis, Jéssica Rafaela, Gessyka Poliana, Aldo, Everthon, Arthur, 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, Madruga, 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, Isaneli e Raquel: 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 Salgueiro (UAG/UFRPE), 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 direta 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 Rural de Pernambuco, concluído 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	13
GENERAL ABSTRACT.....	14
INTRODUÇÃO GERAL	15

CAPÍTULO I

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

RESUMO	23
ABSTRACT.....	24
1. INTRODUÇÃO.....	25
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4. CONCLUSÕES.....	55
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

CAPÍTULO II**CRESCIMENTO DE PLANTAS DE *Atriplex nummularia* L. INOCULADAS
COM BACTÉRIAS HALOTOLERANTES EM AMBIENTE PROTEGIDO**

RESUMO.....	65
ABSTRACT.....	66
1. INTRODUÇÃO.....	67
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	69
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
4. CONCLUSÕES.....	84
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

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 se desenvolver, por isso, os solos ficam desprotegidos e tornam-se degradados com o tempo. A utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal com tolerância ao estresse salino pode indicar alternativa biotecnológica que possibilite o uso de plantas associadas a esses 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 inoculação 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 (SFI), fixação biológica de nitrogênio (FBN), síntese de ácido indol acético (AIA), produção de exopolissacarídeo (EPS) e molécula *quorum sensing*. Foram também selecionadas algumas bactérias para inoculação 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 inoculação com bactérias halotolerantes e promotoras de crescimento vegetal influenciou o 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. Os isolados bacterianos são promissores 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, fitorremediação, *quorum sensing*.

GENERAL ABSTRACT

Salinity is a limiting factor for agriculture and a frequent problem in arid and semi-arid region which rainfall is low and poorly distributed. In these areas most of plants can not grow due soils unprotected and become degraded with time. The use of bacteria with plant growth promoting and tolerance to salt stress may indicate biotechnological alternative that allows the use of plants associated with these microorganisms as inoculants may provide beneficial effects on soil-plant interaction. The cultivation of *Atriplex nummularia* L. has been conducted in order revegetate soils, promoting the improvement of their physical and chemical properties as a phytoremediation technique of salinized soils. In order to isolate and select bacteria promoter of plant growth associated with *Atriplex nummularia* L. plants cultivated in two experiments were carried out in the Pernambuco state and evaluated the effects of its inoculation 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 *in vitro* solubilization of inorganic phosphate (SFI), biological nitrogen fixation (BNF), synthesis of indole acetic acid (IAA), exopolysaccharides production (EPS) and quorum sensing molecule. Some bacteria to plant inoculation *Atriplex* grown in a protected environment were also selected in order to analyses 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 nitrogen, crude protein of leaves and total organic carbon. Through the insulation, it was obtained 107 halotolerant bacterial isolates with positive results 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. Inoculation with halotolerant bacteria and plant growth promoters influenced total nitrogen and total organic carbon in plants of *Atriplex*. Therefore, there are halotolerant bacteria associated with *Atriplex* plants able to solubilize inorganic phosphate, N₂ fixation, IAA production, EPS and quorum sensing molecule, with the possibility of these micro-organisms contribute positively to plant growth. Bacterial isolates are promising on 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 of salinized soils.

Keywords: Bioprospecting, phytoremediation, quorum sensing.

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, 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). Esses 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* (AHL). 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 (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., 2014), 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 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 dessecamento e de outros estresses ambientais, além de poder ajudar na fixação de nutrientes próximos à bactéria (FLEMMING et al., 2010; BARRETO et al., 2011).

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 (ROSSELLÓ & BOUZA, 2013; LEITE et al., 2014). Desse modo, na comunicação do *quorum sensing* existe a 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 em ambientes salinos. No entanto, poucos relatos são disponíveis na literatura, abordando a promoção de crescimento vegetal em plantas de *Atriplex* (BILAL et al., 1990; 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 e inoculação 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 isolar e selecionar bactérias promotoras de crescimento vegetal associadas às plantas de *Atriplex nummularia* L., em solos salinos e estudar o efeito da inoculação 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*, v. 26, p. 1–20, 2014.

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*, v. 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 Agrocência*, v.17, n.2-4, p.221-227, 2011.

BILAL, R.; RASUL, G.; MAHMOOFL, K.; MALIK, K. A. Nitrogenase activity and nitrogen-fixing bacteria associated with the roots of *Atriplex* spp. growing in saline sodic soils of Pakistan. *Biology and Fertility of Soils*, v. 9, p. 315-320, 1990.

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*, 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.

LEITE, M. C. B. S.; FARIAS, A. R. B.; FREIRE, F. J.; ANDREOTE, F. D.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; FREIRE, M. B. G. S. Isolation, bioprospecting and diversity of salt-tolerant bacteria associated with sugarcane in soils of Pernambuco, Brazil. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.18, (Suplemento), p.S73–S79, 2014.

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.13, n. 24, 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.

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, v.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. 2010. 65f. Dissertação de Mestrado em Agronomia-Ciência do Solo, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

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.

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 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. A técnica da fitorremediação é uma alternativa que possibilita a extração de sais por plantas que se adaptam a solos salinos, envolvendo 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* L, tem sido utilizada com esse objetivo, por ser uma halófita 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 de *Atriplex*; 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, 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). Foram obtidos 107 isolados bacterianos halotolerantes, em que a densidade populacional destas bactérias foi proporcionada com maior destaque na rizosfera (10^7 UFC g⁻¹ de solo), solo com cultivo da planta (10^6 UFC g⁻¹ de solo) e sem cultivo da planta (10^5 UFC g⁻¹ de solo) associados à *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 0 e 5% de NaCl. Para as características de FBN, produção de AIA, EPS e molécula *quorum sensing* (AHL), foram positivas para estas variáveis, percentuais de 87; 100; 83,33 e 96,66% das bactérias, respectivamente, e 18 bactérias foram positivas em relação às seis características testadas, nas diferentes condições. Portanto, percebe-se a potencialidade das bactérias halotolerantes associadas às plantas de *Atriplex*, havendo a possibilidade de estes 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 podendo colaborar com o desenvolvimento de outras culturas agrícolas sob salinidade.

Palavras-chave: Salinidade, bactérias halotolerantes, halófitas.

ABSTRACT

Soil salinity is one of the factors that affect plants growth due soils degradation, occurring more frequently in arid and semiarid regions. It is precluding the use of soils in the production process. The phytoremediation technique is an alternative that allows the extraction of salts by plants that are adapted to saline soils, involving low investment, and the use of bacteria with plant growth promoting is useful for facilitating of the plants growth in saline soils. *Atriplex nummularia* L has been used for this purpose being a halophyte and produce high plant biomass, enabling the extraction of significant soil salts. Thus, in order to improve the production of this plant, which may contribute to the phytoremediation of salinized soils, it was aimed to select bioprospect and halotolerant bacteria and promoting plant growth associated with *Atriplex nummularia* L. plants to bioprospection of bacteria. Samples were collected at five niches: 1) soil without plant cultivation (control); 2) soil under cultivation of *Atriplex*; 3) soil adhered to the rhizosphere of *Atriplex*; 4) *Atriplex* roots; and 5) leaves of *Atriplex* in two field experiments, one at Serra Talhada and another at Ibimirim, Pernambuco. Solubilization of inorganic phosphate under salinity (0 and 5% NaCl) and time of culture (3, 6 and 10 days: After collecting the sample, isolation of bacteria and the selection of those on the mechanisms of plant growth promotion was conducted); biological nitrogen fixation (BNF); synthesis of indole acetic acid (IAA); exopolysaccharide (EPS) and expression of quorum sensing molecule (AHL). 107 halotolerant bacterial isolates in the population density of these bacteria was provided with greater emphasis in the rhizosphere (10^7 CFU g^{-1} soil), soil with plant cultivation (10^6 CFU g^{-1} soil) and without cultivation of the plant were obtained (10^5 CFU g^{-1} soil) associated with *Atriplex*. Also was noted that salinity affect the solubilization rate of inorganic phosphate by the bacteria, but did not inhibit this process in high salt concentration yielding 65% and 25 positive isolates and 0 to 5% NaCl. For the characteristics of BNF production of IAA, EPS and quorum sensing molecule (AHL), were positive for these variables, percentage of 87; 100; 83.33 and 96.66% of the bacteria, respectively, and 18 were positive bacteria against the six characteristics tested under different conditions. Therefore, there is potential of halotolerant bacteria associated with plants of *Atriplex* with the possibility of these micro-organisms contribute positively to the promotion of plant growth of *Atriplex*, enhancing the phytoremediation of salty soils, and are alternatives as inoculants may contribute to the development of other agricultural crops under salinity.

Keywords: Salinity, halotolerant bacteria, halophytes.

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* L. 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 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 et al., 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 características, como a solubilização de fosfato inorgânico, fixação biológica de nitrogênio, síntese de fitohormônios, produção de exopolissacarídeos, como também a expressão de moléculas *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 (FARIAS et al., 2012; LIRA-CADETE et al., 2012; PEREIRA

et al., 2012; SANTOS et al., 2012; DAWWAM et al., 2013). 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

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 (RAMADOSS et al., 2013). 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 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 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) (20 cm de profundidade); 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), no sertão do estado de Pernambuco.

As amostras da área de Serra Talhada foram coletadas no lote 4D do perímetro Irrigado Cachoeira II, tendo o solo sido irrigado por cerca de trinta anos, quando foi abandonado em decorrência da salinização. Nesta área, foi implantado um experimento de fitorremediação com *Atriplex* em campo em fevereiro de 2010, o solo classificado como Cambissolo Flúvico (SANTOS et al., 2013). A área de Ibimirim também estava abandonada devido à salinidade promovida pelo manejo inadequado da irrigação durante cerca de 30 anos, tendo sido implantado experimento de fitorremediação em campo em fevereiro de 2012, sendo o solo classificado como Neossolo Flúvico (trabalho em condução).

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, 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

¹SSC-Solo sem cultivo; ² SCC-Solo com cultivo de *Atriplex*; ³RIZOSolos da rizosfera de plantas de *Atriplex*.

2.2. Isolamento das bactérias no solo e associadas à *Atriplex*

Para o isolamento de bactérias do solo da área sem cultivo da planta, solo cultivado e rizosférico, foram utilizadas 5 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 (PBS-*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, 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°. A população bacteriana total por grama de solo fresco (UFCg¹) foi estimada pela contagem de colônias cultivadas em meio de cultura de acordo com ARAÚJO, 2010.

No isolamento das bactérias endofíticas, foi realizada a desinfecção superficial das amostras das raízes e folhas (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). Logo após, todo o material foi transferido para tubos de 15 mL e mantidos sob agitação constante a 120 rpm por 40 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas diluições em tampão PBS inoculados em meio de cultura TSA 10%, da mesma forma que o solo, sendo estimada a densidade populacional bacteriana por g de tecido vegetal fresco.

Depois da estimativa das colônias bacterianas do solo, rizosféricas e endofíticas, as colônias foram repicadas, aleatoriamente, nas placas de isolamento, purificadas pela técnica de esgotamento e mantidas a -20°C, em meio TSA 10% líquido suplementado com 20% de glicerol, sendo armazenadas e estocadas, para aos testes posteriores: solubilização de fosfato inorgânico, fixação biológica de nitrogênio, síntese de ácido indol acético, produção de exopolissacarídeos e expressão da molécula AHL (*quorum sensing*).

2.3. Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico

Foram avaliados 107 isolados bacterianos (65 isolados da área de Serra Talhada: 12: solo sem cultivo; 15: solo com cultivo; 14: endofíticos de raiz; 08: endofíticos de folha e 16: rizosfera. 42 isolados da área de Ibimirim: 09: solo sem cultivo; 09: solo com cultivo; 12: endofíticos de folha e 12 da rizosfera), quanto à solubilização de fosfato inorgânico. As bactérias foram inoculadas em meio de cultura sólido contendo fosfato insolúvel, o fosfato de cálcio bibásico (VERMA et al., 2001), suplementado com 0 e 5% de NaCl. As placas foram incubadas a 28°C e as leituras realizadas com 3, 6 e 10 dias após a inoculação. A presença de área clara, ao redor das colônias bacterianas, indicaram a solubilização do fosfato. Foi calculado o índice de solubilização (IS), expresso pela relação do diâmetro médio do halo de solubilização pelo diâmetro médio do halo da colônia. (BERRAQUERO et al., 1976).

2.4. Seleção de bactérias fixadoras de nitrogênio

Para a avaliação de fixação biológica de N₂, foram avaliados 71 bactérias isoladas das áreas de Serra Talhada e Ibimirim, com 43 e 28 isolados, respectivamente, provenientes dos ambientes e nichos do solo sem cultivo, com cultivo, rizosfera, endofíticos de raiz e folhas. Ressaltando-se que, antecedendo a esse teste, essas mesmas bactérias foram caracterizadas como positivas quanto à solubilização de fosfato inorgânico 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 (DOBEREINER et al., 1995).

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

Na seleção e quantificação da produção de ácido 3-indol acético (AIA), foram avaliados 57 bactérias isoladas das áreas de Serra Talhada (38 isolados) e Ibimirim (19 isolados), 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, utilizando-se uma curva padrão de AIA sintético, previamente estabelecida, para a estimativa da produção de AIA (PEREIRA et al., 2012).

2.6. Seleção de bactérias produtoras de Exopolissacarídeos (EPS)

Para a seleção e produção de exopolissacarídeos, os isolados bacterianos foram cultivados em meio líquido (TSA 10%), e logo após realizou-se a inoculação de 5 μ L do inóculo cultivado em discos de papel de filtro comum, de 5 mm de diâmetro em meio de cultura sólido modificado (20 g L⁻¹ de extrato de levedura; 15 g L⁻¹ de K₂HPO₄; 0,2 g L⁻¹ de MgSO₄; 0,015 g L⁻¹ de MnSO₄; 0,015 g L⁻¹ de FeSO₄; 0,03 g L⁻¹ de CaCl₂; 0,015 g L⁻¹ de NaCl; 15 g L⁻¹ de Agar, 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 nos nichos avaliados.

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 \leq 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 \geq 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 material celular 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 AHLs, em bioensaios com as bactérias testes. *A. tumefaciens* NT1 foi inoculada verticalmente nas 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-galacto-pyranoside) 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 AHLs, 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 AHLs pelas bactérias avaliadas. Nesse teste, foram avaliadas 30 bactérias provenientes das áreas de isolamento e nichos avaliados, realizando-se o experimento em duplicata.

2.8. Análise Estatística

Os resultados obtidos para a densidade populacional de bactérias foram submetidos à análise de variância pelo teste F, até 5% de significância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. 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 até 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 isolados solubilizadores de fosfato, fixadores de nitrogênio e produtores de AIA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Isolamento de bactérias

Foi observado que a densidade populacional bacteriana, em ambas as áreas e nichos, apresentaram variação de 10^2 a 10^7 UFC.g⁻¹ de solo ou g⁻¹ de tecido vegetal fresco (UFC – unidades formadoras de colônia). Percebeu-se diferença significativa entre os nichos das áreas estudadas, observando-se que a densidade populacional das bactérias do solo rizosférico, solo sem e com cultivo foram iguais estatisticamente, diferindo do nicho endofítico de folha. A rizosfera 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).

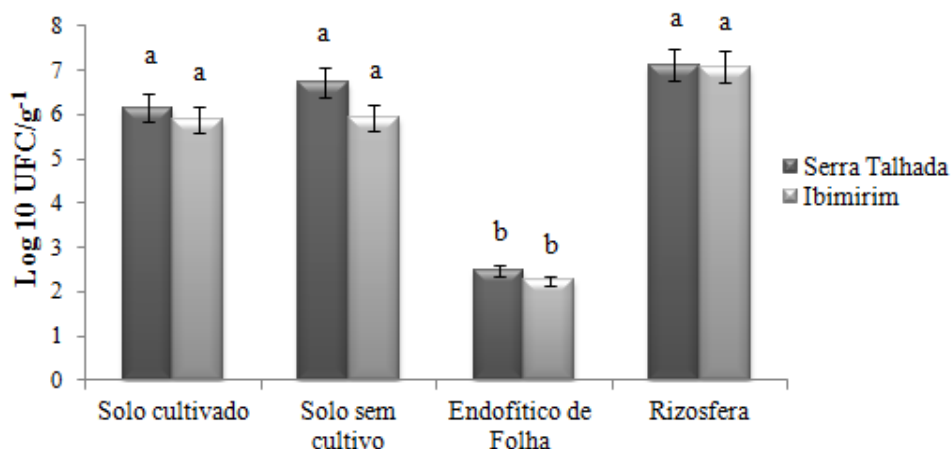


Figura 1. Densidade populacional da comunidade bacteriana (Log10 UFC g⁻¹ de solo ou g⁻¹ de tecido vegetal fresco), de duas áreas com experimentos de *Atriplex nummularia* L. Letras iguais, não diferem entre si dentro de cada área, de acordo com o teste de Tukey (p<0,05).

Em relação à densidade populacional, a rizosfera e os solos com e sem cultivo se destacam em relação ao nicho endofítico de folha. 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 e no solo (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 tolerância a este fator de estresse em cada ambiente 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 em Pesqueira, Agreste de Pernambuco, revelando valores expressivos da densidade populacional no nicho do rizoplano (10^9 UFC g⁻¹ de solo), seguido pela zona radicular (10^8 UFC g⁻¹ de tecido vegetal). Já Mapelli et al. (2013), estudando bactérias associadas à rizosfera da planta *Salicornia* em solos hipersalinos, perceberam valores variando de 10^4 a 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. No caso das bactérias halotolerantes associadas à *Atriplex nummularia* L. neste trabalho, alguns fatores devem ter influenciado na densidade populacional destas bactérias, como as mudanças climáticas, as espécies de plantas, além do tipo do solo ao qual a planta está sendo cultivado, dando condições para resultados variados.

3.2. Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico

Do total de isolados avaliados, 65% das bactérias foram capazes de solubilizar fosfato inorgânico na ausência de NaCl e 25% na concentração de 5% de NaCl, indicando tolerância desses micro-organismos quanto à salinidade (Figura 2). Conseqüentemente, concentração mais elevada de sais, diminui 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*.

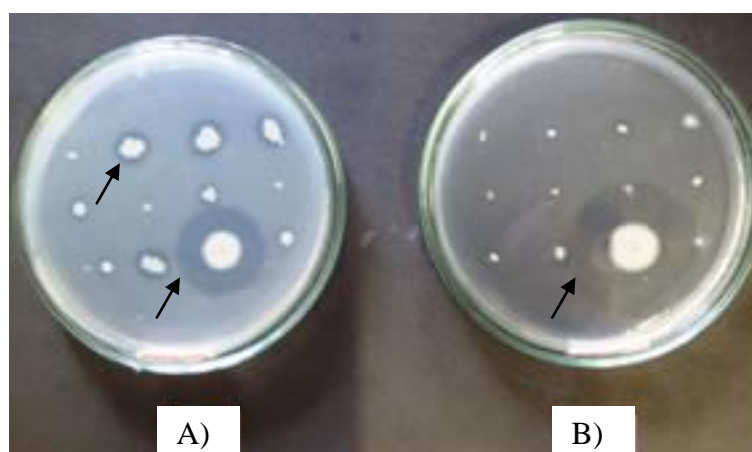


Foto: Flaviana Gonçalves da Silva

Figura 2. Bactérias associadas à *Atriplex* cultivadas em meio de cultura rico em fosfato inorgânico e suplementado com de 0% (A) e 5% (B) de NaCl. As setas sinalizam o halo de solubilização de fosfato em torno das colônias bacterianas.

Após a avaliação da frequência relativa de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico (SFI) entre os nichos em cada área de bioprospecção, foi possível observar que houve diferença significativa pelo teste do qui-quadrado (Figura 3). Assim, na área de Serra Talhada, a frequência relativa de bactérias da SFI teve destaque para as bactérias oriundas da rizosfera com 24,6% de positivos, enquanto que as endofíticas de folha expressaram menor frequência (12,3%) (Figura 3A). Quanto à SFI na área de Ibimirim, observou-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 isolados SFI, quando comparados aos demais nichos. Silva et al. (2011) relatam que a comunidade microbiana do solo é extremamente abundante na rizosfera, e mostram que sua atividade bioquímica pode aumentar a absorção de fósforo pelas plantas. No entanto, os micro-organismos dissolvem o fosfato insolúvel pela produção de ácidos orgânicos e inorgânicos e/ou pela diminuição do pH; conseqüentemente, ocorre a produção de fosfato disponível que pode ser capturado pelas plantas. Deste modo, bactérias solubilizadoras acidificam naturalmente o solo rizosférico por meio da liberação de H^+ e ácidos orgânicos, fazendo com que haja redução do pH e também para que tenha um equilíbrio interno, compensando a absorção de cátions como Na^+ e Ca^{2+} pelas plantas (SOUSA, 2010).

As bactérias endofíticas solubilizadoras de fosfato inorgânico expressaram alta frequência dessa atividade na área de Ibimirim. Tendo em vista que bactérias endofíticas colonizam o interior da planta hospedeira e o fosfato inorgânico está no solo, conseqüentemente estas bactérias possuem a capacidade de solubilizar este nutriente, durante seu processo inicial de colonização na planta, de forma superficial e em seguida, disponibiliza este mineral essencial para o desenvolvimento vegetal (SILVA et al., 2012).

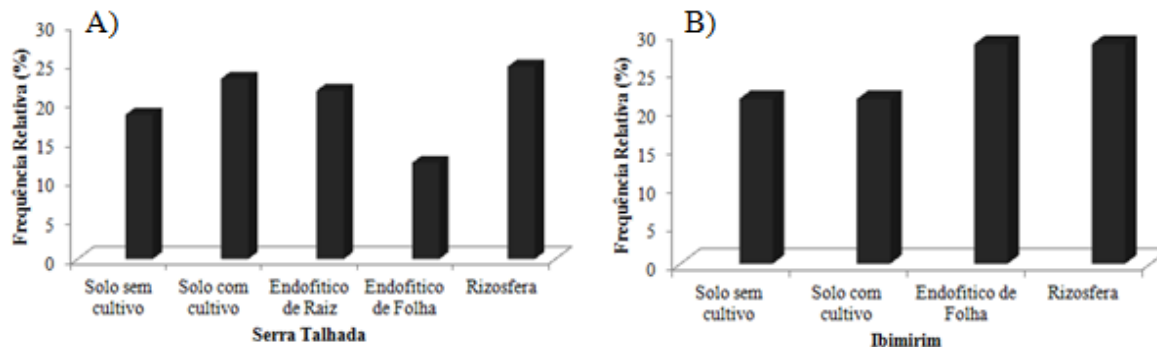


Figura 3. Frequência relativa da solubilização de fosfato inorgânico em isolados bacterianos de diferentes nichos associados as plantas de *Atriplex nummularia* L., na área de Serra Talhada (A) e Ibimirim (B). (Análise pelo teste do χ^2 , revelou diferença significativa entre os tratamentos).

O índice de solubilização de fosfato inorgânico (IS) diferiu entre as bactérias testadas (Tabela 2), quanto aos dias de cultivo e concentrações de NaCl.

Quando analisou-se o índice de solubilização de fosfato inorgânico (IS) pelos os isolados bacterianos em relação a ausência e presença de NaCl (5%), só houve diferença significativa para os isolados UAGAt89 (solo sem cultivo) e UAGAt101 (solo com cultivo), resultando com os valores superiores na concentração de 5% de NaCl, com 3,91 e 4,10 para o IS, respectivamente.

Na análise do IS, em relação aos três tempos de cultivo, evidencia-se que na ausência de NaCl, aos 3 dias de cultivo, o isolado UAGAt19 (solo sem cultivo-Serra Talhada) teve o maior IS (9,53) comparando-se às demais. Já a bactéria UAGAt21, também isolada do solo sem cultivo da área de Serra Talhada, teve o menor IS (1,16) quando analisada neste tempo (Tabela 2). Aos 6 dias de cultivo, na ausência de NaCl, foi observado um maior número de solubilizadoras comparando-se com os 3 dias de cultivo. Deste modo, em torno de 53% das bactérias 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 bactéria UAGAt34, enquanto que o menor índice (1,18) foi encontrado na UAGAt115 do nicho endofítico de folha na área de Ibimirim. Para o IS aos 10 dias de cultivo em ambas as áreas, percebeu-se 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 os isolados UAGAt01 (solo sem cultivo-Serra Talhada) e UAGAt104 (solo com cultivo-Ibimirim), respectivamente (Tabela 2) .

Tabela 2. Médias do índice de solubilização de fosfato inorgânico por bactérias halotolerantes associadas à *Atriplex nummularia* L. em função do nicho, com e sem adição de NaCl e em diferentes tempos de avaliação.

Isolado	Nicho	0% de NaCl			5% de NaCl			Isolado	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	-	1,38Ac ^a	5,57Aa ^a	-	-	3,62Ab ^b	UAGAt 72	RIZO	-	1,45c ^a	-	-	-	-
UAGAt 02	SSC	2,41Ac	2,31Ac ^a	2,26Ac ^a	-	3,48Aa ^a	-	UAGAt 73	RIZO	2,12c	2,52c ^a	-	-	-	-
UAGAt 06	SSC	-	1,84Ac ^a	2,31Ac ^a	-	-	-	UAGAt 75	RIZO	1,84c	2,09c ^a	-	-	-	-
UAGAt 08	SSC	1,88Ac	2,51Ac ^a	2,63Ac ^a	-	-	-	UAGAt 76	RIZO	-	2,68c ^a	-	-	-	-
UAGAt 09	SSC	1,83Ac	2,51Ac ^a	2,63Ac ^a	-	-	-	UAGAt 77	RIZO	-	3,03Ac ^a	-	-	2,79Ab ^a	1,98Ac ^b
UAGAt 13	SSC	1,87Ac	2,80Ac ^a	-	-	-	-	UAGAt 89	SSC	-	2,33Bc ^a	3,916Bb ^a	-	1,81Ac ^a	6,02Aa ^b
UAGAt 14	SSC	1,59Ac	1,57Ac ^a	2,01Ac ^a	-	1,42Ac ^a	-	UAGAt 92	SSC	-	1,88Ac ^a	2,59Ac ^a	-	-	2,26Ac ^b
UAGAt 15	SSC	1,90Ac	2,14Ac ^a	1,96Ac ^a	-	-	-	UAGAt 93	SSC	-	1,93Ac ^a	1,90Ac ^a	-	-	-
UAGAt 19	SSC	9,53a	-	-	-	-	-	UAGAt 94	SSC	-	1,79Ac ^a	1,77Ac ^a	-	-	-
UAGAt 21	SSC	1,16Ac	1,94Ac ^a	-	-	-	1,60Ac ^b	UAGAt 95	SSC	1,47c	1,75c ^a	-	-	-	-
UAGAt 22	SSC	-	2,44Ac ^a	-	-	1,14Ac ^a	-	UAGAt 98	SCC	1,85c	2,09c ^a	-	-	-	-
UAGAt 23	SCC	1,52c	-	-	-	-	-	UAGAt 99	SCC	-	2,20c ^a	2,36c ^a	-	-	-
UAGAt 25	SCC	1,89Ac	2,91Ac ^a	-	-	1,50Ac ^a	1,93Ac ^b	UAGAt 101	SCC	-	1,89Bc ^a	3,15Bb ^a	-	4,10Aa ^a	4,2Ab ^b
UAGAt 33	ER	2,67Ac	1,92Ac ^a	-	-	-	1,45Ac ^b	UAGAt 104	SCC	-	-	1,08c ^a	-	-	-
UAGAt 34	ER	6,82Ab	9,73Aa ^a	-	-	-	-	UAGAt 107	SCC	-	1,836c ^a	-	-	-	-
UAGAt 35	ER	2,17Ac	-	-	-	-	1,59Ac ^b	UAGAt 108	SCC	1,37Ac	1,43Ac ^a	-	-	1,68Ac ^a	-
UAGAt 36	ER	2,04Ac	-	-	-	-	1,48Ac ^b	UAGAt 113	EF	1,67Ac	1,94Ac ^a	-	-	-	-
UAGAt 37	ER	2,15Ac	1,68Ac ^a	-	-	1,13Ac ^a	-	UAGAt 114	EF	1,59Ac	2,49Ac ^a	-	-	2,41Aa ^a	-
UAGAt 38	ER	-	1,99Ac ^a	-	-	-	1,64Ac ^b	UAGAt 115	EF	-	1,18c ^a	-	-	-	-
UAGAt 39	ER	2,72c	3,82b ^a	2,92b ^a	-	-	-	UAGAt 119	EF	1,64Ac	1,87Ac ^a	-	-	-	1,72Ac ^b
UAGAt 40	ER	3,80c	4,83b ^a	4,19b ^a	-	-	-	UAGAt 120	EF	-	1,87Ac ^a	-	-	-	1,53Ac ^b
UAGAt 41	ER	3,75c	4,59b ^a	4,82a ^a	-	-	-	UAGAt 122	EF	1,83Ac	1,69Ac ^a	-	-	-	1,42Ac ^b
UAGAt 42	ER	2,06c	1,96c ^a	-	-	-	-	UAGAt 123	EF	-	1,83Ac ^a	2,17Ac ^a	-	-	1,47Ac ^b
UAGAt 43	ER	3,47c	4,36b ^a	3,75b ^a	-	-	-	UAGAt 124	EF	1,62Ac	1,91Ac ^a	-	-	-	1,28Ac ^b
UAGAt 45	ER	2,43c	2,76c ^a	2,88b ^a	-	-	-	UAGAt 125	EF	-	1,46Ac ^a	1,62Ac ^a	-	-	1,33Ac ^b
UAGAt 51	EF	-	2,19Ac ^a	1,73Ac ^a	-	-	1,65Ac ^b	UAGAt 126	EF	-	1,28c ^a	-	-	-	-
UAGAt 53	EF	-	2,02c ^a	-	-	-	1,686c ^b	UAGAt 127	EF	1,17Ac	-	-	-	-	1,61Ac ^b
UAGAt 54	EF	2,04Ac	1,92Ac ^a	-	-	1,10Ac ^a	-	UAGAt 128	EF	-	-	1,97c ^a	-	-	-
UAGAt 61	EF	-	2,35c ^a	2,90b ^a	-	-	-	UAGAt 133	RIZO	-	1,54Ac ^a	-	-	1,61Ac ^a	-
UAGAt 63	EF	-	-	-	-	-	1,67c ^b	UAGAt 135	RIZO	-	1,37Ac ^a	-	-	1,49Ac ^a	-
UAGAt 69	RIZO	1,74Ac	-	-	-	2,50Ab ^a	1,68Ac ^b	UAGAt 140	RIZO	2,54Ac	1,69Ac ^a	-	-	1,92Ac ^a	-
UAGAt 71	RIZO	1,95c	1,94c ^a	-	-	-	-	UAGAt 141	RIZO	-	1,88Ac ^a	-	-	2,59Ab ^a	2,04Ac ^b
C.V		54,48													

Médias seguidas de letras maiúsculas na linha comparam o índice de solubilização pelos isolados bacterianos em relação às concentrações de NaCl (0 e 5%); letras minúsculas na coluna comparam o índice de solubilização pelos isolados bacterianos em relação aos três tempos de cultivo – 3, 6 e 10 dias; letras exponenciais na linha, comparam o índice de solubilização pelos isolados bacterianos em relação ao tempo e as concentrações de NaCl. Letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

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

Com a avaliação das bactérias na concentração de 5% de NaCl em 3 dias de cultivo, observou-se que não ocorreu SFI pelas bactérias de nenhuma das áreas e nichos, enquanto que com 6 dias de cultivo, existiu uma solubilização de 15% das bactérias testadas, destacando-se as bactérias UAGAt101 (solo sem cultivo -Ibimirim) e UAGAt02 (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, verificou-se um acréscimo do índice de solubilização das bactérias cultivadas nesta concentração de NaCl, obtendo-se 21,50% dos isolados positivos nessas condições. No entanto, a bactéria que expressou significativamente o maior valor de IS foi a UAGAt89 (6,0), associada ao solo sem cultivo da área de Ibimirim, diferentemente da UAGAt124 (endofítico de folha-Ibimirim) que expressou o menor IS (1,28) (Tabela 2).

Quanto ao índice de solubilização de fosfato em relação ao tempo de cultivo na ausência e presença de NaCl (5%), percebeu-se que aos 6 dias de cultivo não houve diferença significativa em relação aos isolados, enquanto que aos 10 dias de cultivo os Is dos isolados foram superiores na ausência de NaCl comparando-se com a concentração de 5% de NaCl.

Mediante os resultados obtidos quanto à SFI, percebeu-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*. Vários fatores podem interferir neste mecanismo, pelos atributos expressos na Tabela 1, observa-se que o solo sem cultivo da área de Ibimirim tem maior condutividade elétrica ($59,89 \text{ dS m}^{-1}$), sendo mais salino que o solo sem cultivo da área de Serra Talhada ($41,59 \text{ dS m}^{-1}$). Esses dados podem justificar a predominância de maiores ISs na área de Serra Talhada quando testada na ausência de NaCl, enquanto que na concentração de 5% as bactérias isoladas da área de Ibimirim se sobressaíram nessa característica. Isso pode ser justificado pela possível formação de grupos de bactérias mais adaptadas a cada ambiente, promovendo a variação nos resultados de solubilização de fosfato inorgânico.

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 e 2,33 para bactérias endofíticas de raiz e 1,21 a 3,48 com bactérias da rizosfera. Em outra pesquisa, Nakbanpote et al. (2013), abordando a tolerância de bactérias promotoras de crescimento vegetal 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. Neste aspecto, valores superiores de até 9,73 para o IS, foram encontrados no presente trabalho, com bactérias halotolerantes associadas às plantas de *Atriplex*.

Pode-se perceber que os ISs encontrados com as bactérias associadas à *Atriplex* neste trabalho proporcionam potencialidade para promoção de crescimento vegetal, o que indica a eficiência desses micro-organismos oriundos de solos salinos, contribuindo para o crescimento da planta. No entanto, para a potencialização 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.

3.3. Seleção de bactérias fixadoras de nitrogênio

Para a fixação biológica de nitrogênio (FBN), foram avaliados 71 isolados bacterianos, correspondente aos 65% de bactérias positivas na ausência de NaCl, em relação à solubilização de fosfato inorgânico. Foi observado que 87% das bactérias analisadas foram capazes de crescer em meio de cultura sem fonte nitrogenada, indicando a potencialidade para a 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).

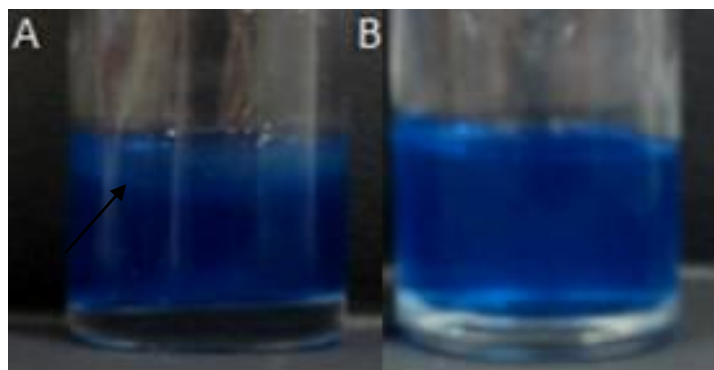


Foto: Flaviana Gonçalves da Silva

Figura 4. Teste de fixação de nitrogênio em meio NFb, livre de fonte nitrogenada. A) Isolado positivo, apresentando um halo de crescimento; B) Isolado negativo, ausência de halo de crescimento.

Ao se analisar a FBN das bactérias bioprospectadas da área de Serra Talhada, foi verificada frequência relativa superior a 27,9% para as bactérias no nicho endofítico de raiz, porém, as bactérias endofíticas de folha tiveram frequência inferior (13,94%) em relação aos isolados positivos (Figura 5A). Com isso, observou-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 bactérias da área de Ibimirim, foram observadas 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).

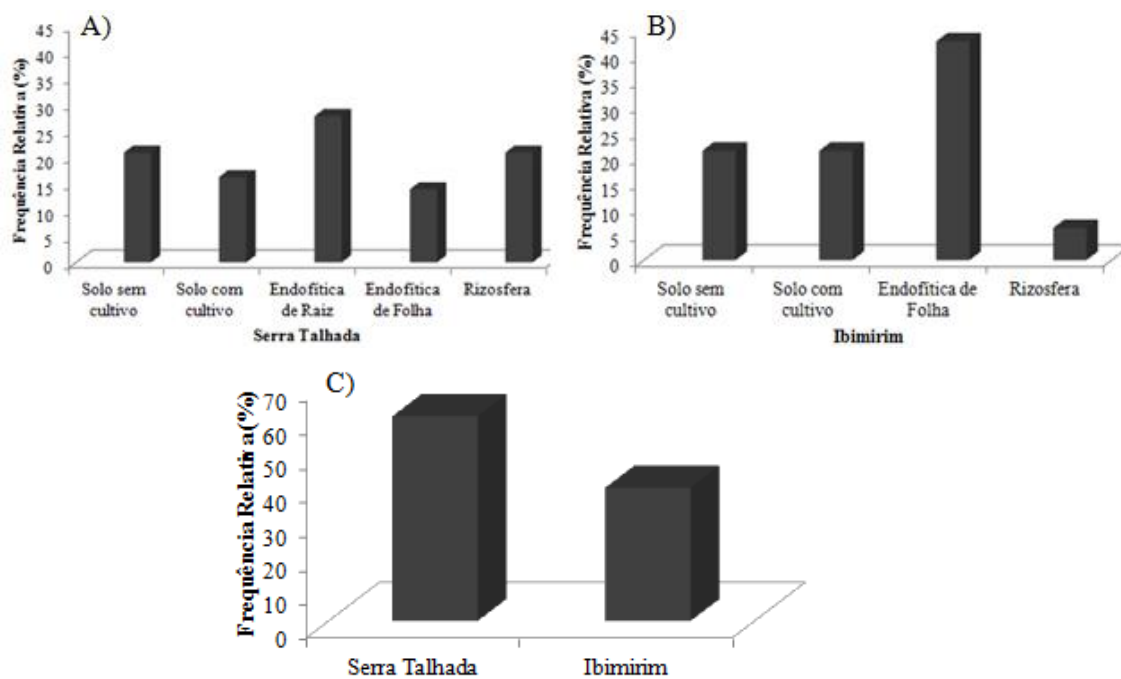


Figura 5. Frequência relativa da fixação biológica de nitrogênio em isolados bacterianos dentro dos nichos em em Serra Talhada (A); Ibimirim (B) e entre as áreas (C), associados às plantas de *Atriplex nummularia* L. (Análise pelo teste do χ^2 , revelou diferença significativa entre os tratamentos).

Mediante os resultados, ressalta-se que a existência de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas aos diferentes nichos e áreas é bastante variável. Alguns autores (POLESI, 2010; SANTI et al., 2013) relatam que as bactérias endofíticas podem ter vantagens sobre as bactérias rizosféricas, porque elas colonizam o interior dos tecidos 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 no solo de Serra Talhada.

Pereira et al. (2012), estudando bactérias endofíticas de cana-de-açúcar em relação à salinidade, observaram a fixação biológica de nitrogênio nas linhagens testadas, destacando 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, a crescente salinização dos solos.

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

Em relação à produção de ácido indol acético (AIA), observou-se que de 57 bactérias avaliadas, 100% foram capazes de sintetizar este fitohormônio (Figura 6). 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 bactérias UAGAt21 (solo com cultivo-Serra Talhada) e UAGAt119 (endofítico de folha-Ibimirim), respectivamente, existindo diferença significativa entre as bactérias avaliadas (Tabela 3). No entanto, foi observado que as bactérias do solo cultivado com a planta e as endofíticas de raiz proporcionaram um maior número de produtoras de AIA comparando-se com os demais nichos. Já para as bactérias do solo sem cultivo e da rizosfera foi quantificada baixa produção deste fitohormônio.

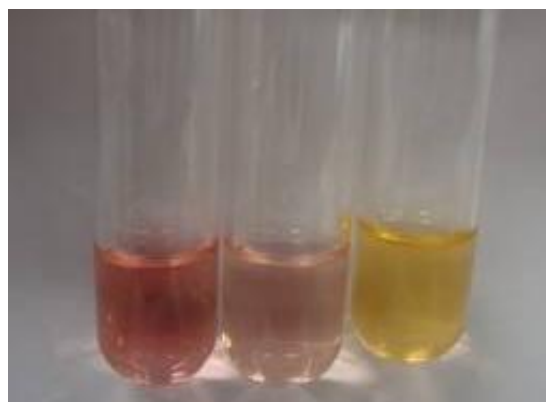


Foto: Flaviana Gonçalves da Silva

Figura 6. Indicativo da síntese de ácido indol acético por bactérias associadas à *Atriplex nummularia* L. (Coloração rósea indica produção de AIA).

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

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

Para a produção de AIA na área de Serra Talhada (Figura 7A), percebeu-se que 31,57% das bactérias positivas para esta característica são pertencentes ao nicho endofítico de raiz, destacando-se em relação aos demais ambientes estudados. Na área de Ibimirim (Figura 7B) as bactérias endofíticas de folha, tiveram frequência relativa de isolados positivos de 63,15%. Quando observado esta produção entre as áreas, percebeu-se o maior número de bactérias positivas (66,66%) em Serra Talhada, em relação à Ibimirim (33,33%) (Figura 7C). De acordo com estes resultados, é possível perceber o destaque das bactérias endofíticas para este mecanismo de promoção de crescimento vegetal.

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, conseqüentemente, maior interação dessas bactérias com a planta. Dessa forma, há maiores condições para a síntese do fitohormônio ácido indol acético (COMPANT et al., 2010; AHMED e KIBRET, 2013).

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, conseqüentemente, podem revelar resultados interessantes.

Em consonância com outros resultados obtidos por Jha et al. (2011), em estudo com bactérias halotolerantes e promotoras de crescimento vegetal associadas a *Salicornia brachiata*, foi observado que todos os isolados testados produziram o ácido indol acético em quantidades que variaram 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 halófita *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.

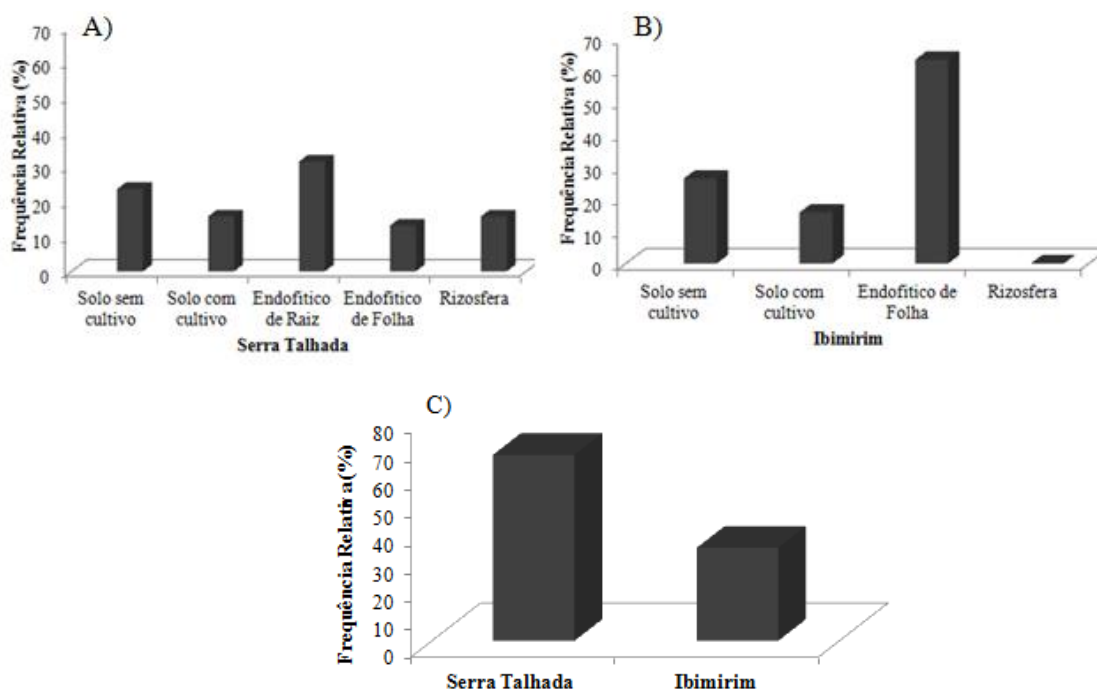


Figura 7. Frequência relativa da produção de ácido indol acético em isolados bacterianos dentro dos nichos em Serra Talhada (A); Ibimirim (B) e entre as áreas (C), associados às plantas de *Atriplex nummularia* L. (Análise pelo teste do χ^2 , revelou diferença significativa entre os tratamentos).

3.5. Seleção de bactérias produtoras de Exopolissacarídeo (EPS)

Foram testados 30 isolados bacterianos 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).

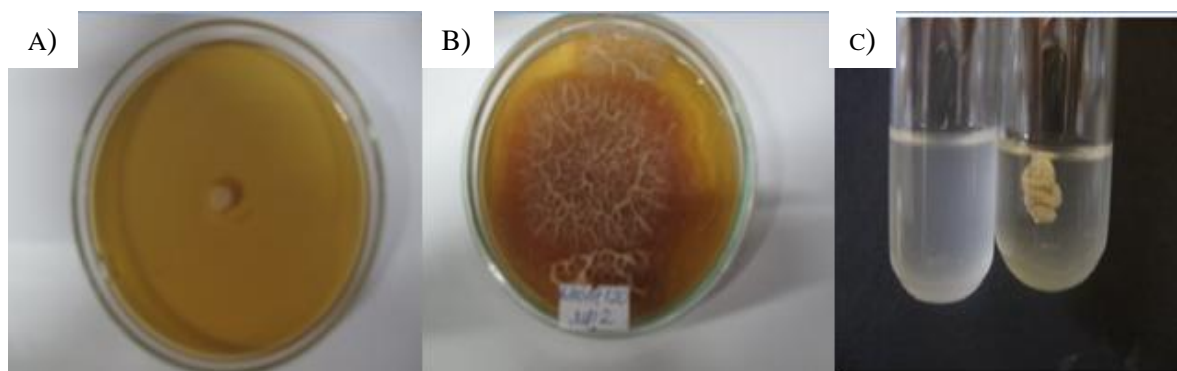


Foto: Flaviana Gonçalves da Silva

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 bactérias (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 (QURASHI et al., 2012).

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

Produção de exopolissacarídeos							
Isolado bacteriano	Pouca	Média	Ótima	Isolado bacteriano	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 \leq 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 \geq 14 mm de diâmetro).

Também foi observada diferença entre as linhagens quanto à produção de EPS (Tabela 5). A bactéria UAGAt89, isolada 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 UAGAt90 e UAGAt128. Além disso, os isolados que proporcionaram maior diâmetro do halo foram 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 a *Atriplex* é cultivada.

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 de tolerância aos sais pelas bactérias adaptadas a este ambiente.

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

Isolado bacteriano			Isolado Bacteriano		
Isolado bacteriano	Nicho	Halo de EPS (mm)	Bacteriano	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.

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 30 bactérias testadas mostraram-se positivas, pois as colônias da bactéria *A. tumefaciens* apresentaram a pigmentação azul (Figura 9), exceto a bactéria UAGAt77 pertencente à rizosfera da área de Serra Talhada, que não expressou a produção da molécula. Com isso, pode ser destacado o alto índice de bactérias produtoras da molécula AHL, ficando em torno de 96,66%, 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, percebeu-se um percentual superior de bactérias produtoras da molécula *quorum sensing* (AHL). Leite et al. (2014), 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.

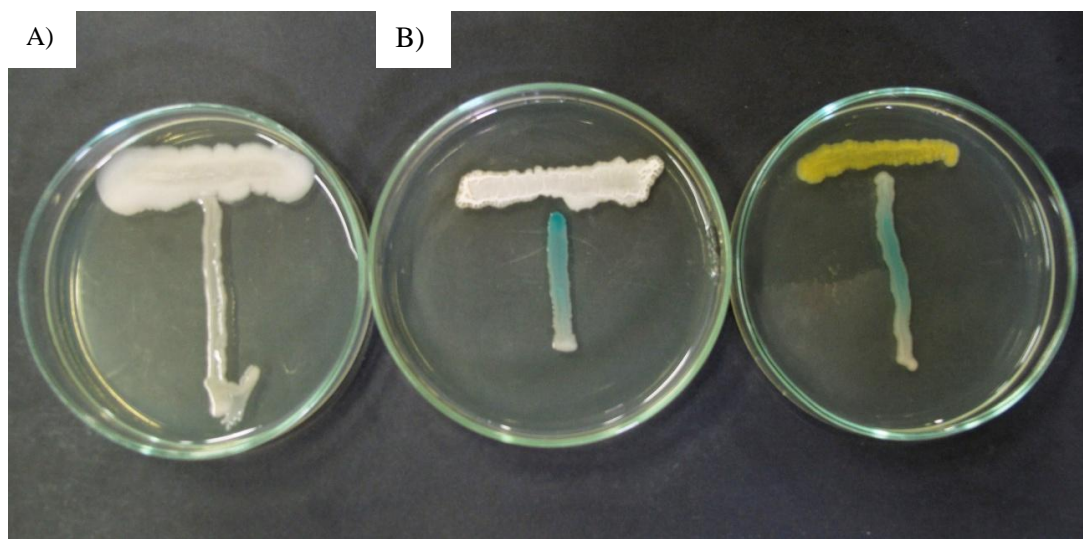


Foto: Flaviana Gonçalves da Silva

Figura 9. A) Ausência da coloração azul (negativo); B) Presença da coloração azul indicadora da expressão da molécula *quorum sensing* (AHL). *A. tumefaciens* está repicada na vertical e as bactérias teste na horizontal.

3.7. Avaliação geral das características de promoção de crescimento vegetal de bactérias associadas à *Atriplex*

De acordo com as características de promoção de crescimento vegetal das bactérias descritas na Tabela 6, vale ressaltar que das 107 bactérias 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 devem 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

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

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

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

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

4. CONCLUSÕES

A existência de bactérias halotolerantes associadas às plantas de *Atriplex nummularia* L. com características de promoção de crescimento vegetal foi confirmada nas áreas de Serra Talhada e Ibimirim estudadas.

A maior densidade populacional de bactérias foi encontrada no solo sem; com o cultivo e rizosfera associada às plantas de *Atriplex* nas áreas de Serra Talhada e Ibimirim.

Os isolados UAGAt 89 (solo sem cultivo-Ibimirim) e UAGAt 101 (solo com cultivo- Ibimirim) expressaram altos índices de solubilização de fosfato inorgânico na concentração de 5% de NaCl.

As bactérias endofíticas tiveram a maior proporção de fixadoras biológicas de nitrogênio e produtoras de ácido indol acético, tendo destaque os isolados UAGAt 61 (endofítico de folha – Serra Talhada) e UAGAt 25 (endofítico de raiz – Serra Talhada) com a produção deste fitohormônio.

As bactérias halotolerantes da área de Ibimirim proporcionaram alta produção de exopolissacarídeos pelos isolados UAGAt 89 (solo sem cultivo), UAGAt 90 (solo sem cultivo) e UAGAt 128 (endofítico de folha).

Os isolados bacterianos têm alto potencial para expressão da molécula N-acil homoserina lactona pelo sistema de comunicação quorum sensing.

Os isolados UAGAt 89 e UAGAt 101 expressaram maior tolerância à salinidade, tornando-se isolados promissores para futuros estudos, podendo contribuir com o desenvolvimento de plantas de *Atriplex* e recuperação de solos afetados por sais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHEMAD, M., KIBRET, M. A. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University-Science*, v. 26, p.1–20, 2014.

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*, v. 45, p. 535-544, 2013.

ASHRAF, M.; HASNAIN, S.; HUSSAIN, F. Exo-polysaccharides (eps) producing biofilm bacteria in improving physico-chemical characteristics of the saltaffected soils. *Proc. Int. Conf. Environmentally Sustainable Development*, v. 12, p. 26-29, 2005.

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.

BERRAQUERO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. *Ars Pharmaceutica*, v. 17, p. 399-406, 1976.

BHATTACHARYYA, I.; CHOUDHURY, M. Quorum Sensing- Let Bacteria Talk. *Advanced Biotechnologies*, v. 28, n. 12, p. 30-33, 2008.

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.

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

DAMODARAN, T.; SAH, V.; RAI, R. B.; SHARMA, D. K.; MISHRA, V.K.; JHA, S. K.; KANNAN, R. Isolation of salt tolerant endophytic and rhizospheric bacteria by natural selection and screening for promising plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and growth vigour in tomato under sodic environment. *African Journal of Microbiology Research*, v. 7, n.44, p. 5082-5089, 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.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Como isolar e identificar as bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: Embrapa-SPI: Itaguaí: RJ (EMBRAPA-CNPAB), 1995. 60 p.

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.; 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.

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.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. Environmental Microbiology, v. 6, n.12, p. 1244–1251, 2004.

LEITE, M. C. B. S.; FARIAS, A. R. B.; FREIRE, F. J.; ANDREOTE, F. D.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; FREIRE, M. B. G. S. Isolation, bioprospecting and diversity of salt-tolerant bacteria associated with sugarcane in soils of Pernambuco, Brazil. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v.18 (Suplemento), p.S73–S79, 2014.

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.13, n. 248078, p.1-13, 2013.

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

NAKBANPOTE, A.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*, v. 32, 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-SOBRA, 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.

POLESI, N. P. E. *Investigação da microbiota endofítica onipresente em microplantas "axênicas"*. 2010, 120f. Dissertação (mestrado), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

QURASHI, A. W.; SABRI, A. N. Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 30, n.2, p.1183-1191, 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.

RAMADOSS, D.; LAKKINENI, V. K.; BOSE, P.; ALI, S.; ANNAPURNA, K. Mitigation of salt stress in wheat seedlings by halotolerant bacteria isolated from saline habitats. *Springer Open Journal*, v. 2, p. 02-07, 2013.

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.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany*, v.48, n. 02, p-01-25, 2013.

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.

SILVA, A. C. S.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; CHAGAS, L. F. B. Ocorrência de bactérias solubilizadoras de fosfato nas raízes de plantas de importância econômica em Manaus e Rio Preto da Eva, Amazonas. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v. 2. n. 1, p. 37-42, 2011.

SILVA, M. O.; FREIRE, F. J.; LIRA JUNIOR, M. A.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; COSTA, D. P.; LIRA-CADETE, L. Isolamento e prospecção de bactérias endofíticas e epifíticas na cana-de-açúcar em áreas com e sem cupinicida. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.36, p.1113-1121, 2012.

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.

SOUSA, C. A. Solubilização de fósforo por bactérias endofíticas. 2010. 49f. Dissertação, Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

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.; 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.

USSL - United States Salinity Laboratory-Staff. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. Washington: Department of Agriculture, 1954. 160p. Handbook 60

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. Journal of Biotechnology, v. 91, p. 127-141, 2001.

CAPÍTULO II

CRESCIMENTO DE PLANTAS DE *Atriplex nummularia* L. INOCULADAS COM BACTÉRIAS HALOTOLERANTES EM AMBIENTE PROTEGIDO

RESUMO

Altas concentrações de sais em solos se constituem em um dos fatores causadores de estresse ambiental, requerendo alternativas viáveis para reduzir seus efeitos negativos na produção agrícola. Dentre estas, destaca-se o cultivo de espécies de plantas capazes de extrair os sais em excesso dos solos e técnicas que incrementem este cultivo devem ser estimuladas para aumentar a extração de sais. Com isso, a exploração de bactérias promotoras de crescimento vegetal e com 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 inoculação 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, caracterizadas previamente como bactérias halotolerantes e promotoras de crescimento vegetal, e os tratamentos consistiram em T1: Testemunha, sem inoculação; T2: inoculação com o inóculo UAGAt22; T3: inoculação com o inóculo UAGAt25; T4: inoculação com o inóculo UAGAt35; T5: inoculação com o inóculo UAGAt53 e T6: inoculação com o mix de todas as bactérias anteriores. O experimento foi realizado em ambiente protegido, 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. Não houve influência dos tratamentos de inoculação para os teores de clorofila a, b e total e condutância estomática. A inoculação incrementou a massa verde das folhas, com maior expressão do tratamento 4 (inóculo UAGAt35). Os teores e conteúdos dos nutrientes analisados nas partições da folha, caule e raiz das plantas não foram influenciados pela inoculação das plantas. Em relação ao nitrogênio total, ocorreu diferença significativa entre os tratamentos apenas no caule das plantas, sendo proporcionado pelo mix das bactérias e o carbono orgânico total teve aumento significativo no caule e folhas da *Atriplex*. A inoculação com bactérias halotolerantes e promotoras de crescimento vegetal contribuiu em alguns aspectos para o crescimento e nutrição das plantas de *Atriplex*, demonstrando a viabilidade destas bactérias como inoculantes, tornando-se alternativa promissora para aplicação em campo, com o princípio de colaboração no desenvolvimento vegetal e fitorremediação de solos afetados por sais.

Palavras-chave: Promoção de crescimento, halófito, erva-sal.

ABSTRACT

High concentrations of salts in the soils constitute one factors of environmental stress, requiring viable alternatives to reduce its negative effects on agricultural production. Among these, there is the cultivation of plant species able to extract the excess salts in the soil and cultivation techniques that enhance this should be encouraged to increase the salts extraction. Thus, the exploitation of bacteria with plant growth promoting and 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 inoculation of halotolerant bacteria with plant growth promotion in *Atriplex nummularia* L. cultivated in a greenhouse. The bacteria used were isolated from *Atriplex* plants grown in saline soils, previously characterized as halotolerant bacteria and plant growth promoters. The treatments consisted of T1: control without inoculation; T2: inoculation with inoculum UAGAt22; T3: inoculation with inoculum UAGAt25; T4: inoculation with inoculum UAGAt35; T5: UAGAt53 inoculated with the inoculum and T6: inoculating the mix with all of the above bacteria. The experiment was carried out in a protected environment, using a completely randomized design with 6 treatments and 5 replications, totaling 30 experimental units. 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 were evaluated. There was no influence of inoculation treatments on the content of chlorophyll *a*, *b* and total stomatal conductance. Inoculation increased the mass of green leaves, with higher expression of the 4 treatment (inoculum UAGAt35). Concentration and content of nutrients analyzed in the leaf, stem and roots plants were not affected by inoculation. Total nitrogen had significant difference between treatments only in the plants stems being provided by the mix of bacteria and total organic carbon increased significantly in the stem and leaves of *Atriplex*. Inoculation with halotolerant bacteria and plant growth promoters contributed in some ways to the growth and nutrition of *Atriplex* plants. There are viability of these bacteria as inoculants making it a promising alternative for application in the field in order improve plant development and phytoremediation of salty soils.

Keywords: Promotion of growth, halophyte, saltbush.

1. INTRODUÇÃO

A utilização dos micro-organismos na forma de inoculantes biológicos pode ajudar o mercado agrícola, destacando-se como uma das tecnologias 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 a plantas halófitas. Essas bactérias podem possuir características de promoção de crescimento vegetal, com múltiplas aplicações biotecnológicas (FLORES-FERNANDEZ et al., 2012; HEIDARI & GOLPAYEGANI, 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 realizar ações que auxiliem no desenvolvimento das plantas e sua efetividade na fitorremediação, como fixar nitrogênio, solubilizar fosfato inorgânico e produzir substâncias promotoras de crescimento, para serem inoculados 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, que a *Atriplex nummularia* 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, pesquisas 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 inoculação 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 afetados por sais e colaborar com a sustentabilidade ambiental.

Nesse contexto, objetivou-se analisar os efeitos da inoculação de bactérias halotolerantes com promoção de crescimento vegetal em plantas de *Atriplex nummularia* L. cultivadas em ambiente protegido.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido em ambiente protegido durante o período de fevereiro a setembro de 2013, nas instalações da Unidade Acadêmica de Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no município de Garanhuns – PE, situado a 8° 53' 27" de latitude e 36° 29' 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 (COELHO & SONCIN, 1982).

2.1. Tratamentos e delineamento estatístico

Os tratamentos consistiram em: T1: Testemunha, sem inoculação; T2: Inóculo 1 (UAGAt 22); T3: Inóculo 2 (UAGAt 25); T4: Inóculo 3 (UAGAt 35); T5: Inóculo 4 (UAGAt 53); e T6: Inóculo 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 inóculos

Foram utilizadas quatro bactérias isoladas de plantas de *Atriplex nummularia* L., com características de promoção de crescimento vegetal, como fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de ácido indol acético, exopolissacarídeos e expressão da molécula de *quorum sensing* (Tabela 1). Estes isolados fazem parte da coleção de culturas bacterianas do Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana, da Unidade Acadêmica de Garanhuns – LGBM/UAG da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Para a preparação dos inóculos, colônias isoladas, foram repicadas em meio TSA líquido acrescido de 5% de NaCl, mantidos sob agitação constante (120rpm) a temperatura ambiente, por até 48h. Depois do crescimento bacteriano, as culturas foram diluídas em solução salina (0,85%) até atingir uma densidade óptica em torno de 0,002 a 0,004 (600 nm).

Tabela 1. Características de promoção de crescimento vegetal das bactérias halotolerantes utilizadas na inoculação nas plantas de *Atriplex nummularia* L

Isolado bacteriano	Nicho	FBN ¹	Produção de AIA ²	Solubilização de Fosfato 0% NaCl	Solubilização de Fosfato 5% NaCl	Produção de EPS ³	Produção de HLA ⁴
UAGAt22	SSC ⁵	+	+	+	+	-	+
UAGAt25	SCC ⁶	+	+	+	+	+	+
UAGAt35	ER ⁷	+	+	+	+	+	+
UAGAt53	EF ⁸	+	+	+	+	+	+

¹Fixação biológica de nitrogênio; ²Ácido indol acético; ³Exopolissacarídeo; ⁴ N-Acil homoserina lactona; ⁵Solo sem cultivo;

⁶Solo com cultivo; ⁷Endofítica de raiz; ⁸Endofítica 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 em campo em Ibimirim-PE. Para o preparo das mudas, foi utilizado como substrato, húmus comercial (100% natural) em sacos (1 kg) de polietileno. Quando as mudas alcançaram 20 cm de altura, realizou-se o transplântio das mesmas para vasos com capacidade de 10 L, os quais foram preenchidos com substrato composto de húmus comercial e solo na proporção de 1:1. A caracterização química e física do solo encontra-se na Tabela 2.

A inoculação foi realizada 60 dias após o transplântio das mudas, sendo aplicados 200 mL do inóculo equivalente a cada tratamento, em pontos equidistantes próximos à planta em cada vaso. A irrigação foi realizada diariamente durante o experimento, com 200 mL de solução salina, de condutividade elétrica a 5 dS m⁻¹, preparada com água e NaCl.

Tabela 2. Caracterização química e física do solo utilizado para o cultivo da *Atriplex nummularia* L inoculada com bactérias halotolerantes

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	0,80	0,50	0,30	3,51	7,84	
Atributos físicos									
Areia		Silte	Argila	Dp ⁴	Ds ⁵				
Fina	Grossa								
		kg kg ⁻¹		g cm ⁻³					
0,153	0,698	0,028	0,129	2,70	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.

Ao final do experimento (90 dias após a inoculação), foram coletadas amostras do substrato no qual as plantas de *Atriplex* foram cultivadas, para avaliar os atributos químicos após o cultivo. Determinou-se o fósforo disponível, extraído conforme Olsen et al. (1954) e dosado por colorimetria; o nitrogênio total pelo método do semi-micro Kjeldahl e o carbono orgânico total (COT) por digestão úmida, conforme métodos descritos em Mendonça & Matos (2005). A partir dos resultados de nitrogênio total e carbono orgânico total, foi obtida a relação C/N do solo (Tabela 3).

Tabela 3. Atributos químicos do substrato solo:composto cultivado com plantas de *Atriplex nummularia* L. inoculadas com bactérias halotolerantes

Atributos químicos	Teor de P mg kg ⁻¹	Nitrogênio Total g kg ⁻¹	COT	Relação C/N
T1-Testemunha	37,93	3,64	5,55	1,525
T2- Isolado UAGAt22	39,29	5,74	5,08	0,885
T3- Isolado UAGAt25	35,15	2,66	4,07	1,529
T4-Isolado UAGAt35	37,01	3,50	4,15	1,186
T5- Isolado UAGAt53	29,23	3,08	4,38	1,422
T6- MIX	44,54	4,34	4,98	1,147

2.4. Variáveis analisadas

2.4.1. Análises fisiológicas e morfológicas

Aos dois meses após a inoculação, entre 08:00 e 09:00 h da manhã foram mensurados os índices de clorofila *a*, *b* e total em folhas intermediárias das plantas, através do medidor eletrônico de índice de clorofila, CLOROFILOG CFL1030, da marca FALKER. Na mesma ocasião, foram realizadas as leituras da condutância estomática (*gs*) e temperatura foliar, com o uso de um porômetro de equilíbrio dinâmico (LICOR, modelo LI-1600).

Aos 90 dias após a inoculação, as plantas foram coletadas e fracionadas em raiz, caule e folha, sendo pesadas para a obtenção da produção de massa fresca. Posteriormente, o material vegetal foi seco em estufa a 60°C até a massa seca.

2.4.2. Teores de nutrientes

As frações da planta foram moídas em moinho (Willey) e realizada a digestão nitroperclórica (SILVA, 2009) para a determinação dos teores de sódio e potássio, por fotometria de emissão de chama; de cálcio e magnésio, por espectrofotometria de absorção atômica. Com os dados de produção de massa 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, as amostras passaram pela digestão sulfúrica a ar quente e a determinação foi realizada pelo método semi-micro Kjeldahl, de acordo com método descrito 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 por meio da oxidação da matéria orgânica em presença de ácido sulfúrico e dicromato de potássio, seguindo método descrito por Bezerra Neto & Barreto (2011).

3. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F até 5% de significância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey até 5% de probabilidade, com o programa estatístico SISVAR 5.3.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises fisiológicas e morfológicas

A inoculação de plantas utilizando micro-organismos promotores de crescimento vegetal é umas das alternativas que possibilita o incremento da produção de biomassa, teor e conteúdo de nutrientes, entre outras características fisiológicas ou morfológicas. No entanto, neste trabalho não foi verificado efeito dos tratamentos de inoculação em relação à clorofila *a*, *b* e total; condutância estomática (*gs*) e temperatura foliar nas plantas de *Atriplex* (Tabela 4).

É importante salientar que o número de isolados utilizados para a inoculação no presente trabalho foi relativamente pequeno e, conseqüentemente, esse número pode ter sido insuficiente para detectar efeitos significativos sobre os aspectos analisados nas plantas de *Atriplex*. Esses resultados evidenciam a necessidade de mais pesquisas relacionadas à inoculação, realizando novos ensaios com maior número de isolados, visando avaliar a eficiência dos mesmos, em relação à interação solo-planta com *Atriplex*. A inconstância de resultados é bastante citada por alguns autores, pois nem sempre as bactérias conseguem expressar a promoção de crescimento, mesmo em testes realizados em condições semelhantes (SANTOS et al., 2005; ASSUMPÇÃO et al., 2009).

É possível que o substrato utilizado neste trabalho, na proporção 1:1 de solo e composto, sendo o solo de pH ácido e baixos teores de sais (Tabela 1), não tenha possibilitado o adequado desenvolvimento das bactérias adaptadas à alcalinidade e salinidade do solo de onde foram isoladas, de pH acima de 8 e sendo salino-sódico (SOUZA et al., 2014).

Tabela 4. Valores médios de clorofila *a*, *b* e total, condutância estomática e temperatura foliar de plantas de *Atriplex nummularia* L., inoculadas com bactérias halotolerantes

Tratamento	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila total	gs^1 $\mu mol m^{-2}s^{-1}$	Temp.
					foliar °C
T1-Testemunha	37,70 a	14,40 a	52,11 a	0,0748 a	26,90 a
T2- Isolado UAGAt22	37,48 a	13,70 a	51,18 a	0,0953 a	26,18 a
T3- Isolado UAGAt25	35,76 a	11,94 a	47,70 a	0,0559 a	27,00 a
T4- Isolado UAGAt35	37,36 a	13,30 a	50,66 a	0,0951 a	25,60 a
T5- Isolado UAGAt53	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

¹Condutância estomática. Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

Quanto às variáveis de produção de massa fresca e seca das frações da planta de *Atriplex*, os tratamentos de inoculação, em geral, não influíram nestas produções, exceto quanto à massa fresca de folha (Tabela 5).

Tabela 5. Valores médios de produção de massa fresca de folhas, massa fresca de caule, massa fresca de raiz, massa fresca total, massa seca de folhas, massa seca de caule, massa seca de raiz, massa seca total de plantas de *Atriplex nummularia* L., inoculadas com bactérias halotolerantes

TRATAMENTO	MFF ¹	MFC ²	MFR ³	MFT ⁴	MSF ⁵	MSC ⁶	MSR ⁷	MST ⁸
	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- Isolador UAGAt22	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 UAGAt25	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 UAGAt35	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 UAGAt53	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	82,06 a	310,45 a	36,18 a	51,74 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

¹Massa fresca de folha; ²Massa fresca de caule; ³Massa fresca de raiz; ⁴Massa fresca total; ⁵Massa seca de folhas; ⁶Massa seca de caule; ⁷Massa seca de raiz; ⁸Massa seca total. Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05).

O tratamento 4 (inóculo UAGAt35) possibilitou o maior valor de produção de massa fresca de folha ($123,87 \text{ g planta}^{-1}$), enquanto no tratamento 5 com a inoculação do isolado UAGAt53, foi verificada a menor produção de massa fresca de folhas, com valor de $82,97 \text{ g planta}^{-1}$ (Tabela 5). Para as demais variáveis de produção de massa fresca e seca não foram encontradas diferenças entre os tratamentos.

É importante ressaltar, também, que os menores valores para produção de fitomassa fresca das raízes das plantas consistiram nos tratamentos com os inóculos UAGAt25 ($53,25 \mu\text{g mL}^{-1}$) e UAGAt53 ($31,77 \mu\text{g mL}^{-1}$), com as respectivas produções de ácido indol acético *in vitro*, que foram determinadas anteriormente á inoculação nas plantas de *Atriplex*. 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).

Canuto et al. (2003), estudando inoculação com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas em cana-de-açúcar, observam que a inoculação individualizada da bactéria *G. diazotrophicus* promoveu efeito negativo no acúmulo de massa fresca de colmos quando comparado com o controle não inoculado. Os autores ressaltaram que a resposta da inoculação foi bastante variável e dependente de vários fatores, incluindo o genótipo vegetal e o ambiente.

Deste modo, os resultados obtidos neste trabalho reforçam a ideia de que a promoção de crescimento de plantas é um fenômeno complexo que é alcançado pela atividade simultânea de vários micro-organismos e fatores. Entretanto, deve ser esclarecido que, apesar das vantagens que as bactérias promotoras de crescimento vegetal podem fornecer às plantas, sua expressão pode ser prejudicada pelo fato de estarem associadas livremente ao vegetal, no interior dos tecidos ou na rizosfera (ASSUMPÇÃO et al., 2009).

Com isso, esses micro-organismos tornam-se vulneráveis ao ambiente, como também em relação às características do solo, que podem proporcionar ausência de resposta à inoculação, como é o caso destas bactérias que foram isoladas de solos salinos. Considera-se, ainda, que a atividade e sobrevivência da comunidade bacteriana podem sofrer influência em relação à temperatura, umidade e competição com micro-organismos nativos do solo (DARTORA et al., 2013), que neste caso foi um substrato obtido pela mistura de solo e composto orgânico. Por ser um substrato com 50% de composto orgânico, a microbiota nativa deve ter elevada população microbiana que tenham dominado o meio em detrimento dos que foram aplicados via inoculação, controlando a efetividade destes na promoção do crescimento das plantas.

Seria o caso de se realizar novos estudos, visando aprimorar a seleção e avaliação das bactérias halotolerantes, de modo a definir aquelas que possuem maior potencial para serem usadas na inoculação de plantas de *Atriplex* utilizando solo de áreas degradadas pela salinidade, com as características próprias.

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 inoculados sobre os teores dos elementos analisados na fitomassa seca da fração folha, caule e raiz das plantas avaliadas, com exceção para o teor de sódio na partição da raiz.

Tabela 6. Teores de nutrientes das frações de plantas de *Atriplex nummularia* L inoculadas com bactérias halotolerantes

TRATAMENTO	FOLHA				CAULE				RAIZ			
	Ca	Na	K	Mg	Ca	Na	K	Mg	Ca	Na	K	Mg
	-1 dag kg											
T1-Testemunha	3,612 a	5,673 a	2,783 a	1,072 a	0,866a	0,665 a	1,630 a	0,270 a	2,343 a	0,978 b	2,206 a	0,542 a
T2- Isolado UAGAt 22	3,195 ab	5,788 a	2,385 a	0,973 ab	0,721 a	0,683 a	1,592 a	0,258 a	2,400 a	1,099 ab	2,340 a	0,704 a
T3- Isolado UAGAt 25	2,742 ab	7,115 a	2,319 a	0,838 b	0,568 a	0,561 a	1,362 a	0,237 a	2,227 a	0,943 b	1,765 a	0,604 a
T4- Isolado UAGAt 35	2,603 b	5,759 a	2,252 a	1,072 a	0,600 a	0,613 a	1,631 a	0,226 a	2,351 a	1,220 ab	2,570 b	0,609 a
T5- Isolado UAGAt 53	3,257 ab	6,509 a	2,650 a	1,021 ab	0,686 a	0,544 a	1,707 a	0,259 a	2,533 a	1,654 a	2,647 a	0,661 a
T6- MIX	3,407 a	7,317 a	2,252 a	1,066 a	0,691 a	0,596 a	1,669 a	0,244 a	2,822 a	1,220 ab	2,350 a	0,704 a
C.V. (%)	10,56	22,54	27,86	9,41	25,97	25,79	14,1	10,56	20,9	21,83	22,73	29,03

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

Na fração raiz verificou-se efeito significativo da inoculação em relação a teor de sódio, o tratamento 5 com o isolado UAGAt53 proporcionou o maior teor deste nutriente ($1,654 \text{ dag kg}^{-1}$), enquanto a testemunha proporcionou o menor teor de sódio com $0,978 \text{ dag kg}^{-1}$.

Mediante aos resultados expostos, ressalta-se que conhecimentos dos teores de cálcio, magnésio, sódio e potássio na folha, caule e raiz da *Atriplex*, fornecem 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 cálcio, potássio, magnésio, influenciando positivamente o desenvolvimento destas culturas. Souza 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.

4.2.2. Conteúdo de nutrientes

Em relação aos conteúdos de nutrientes, observa-se na Tabela 7, que não ocorreu efeito significativo entre os tratamentos aplicados. No entanto, mesmo não sendo significativo estatisticamente, observou-se que os maiores dos teores de nutrientes foram expressos quando aplicados os tratamentos com os inoculos bacterianos, relacionando com a testemunha, exceto para o teor de cálcio e potássio na folha; cálcio, sódio e magnésio no caule.

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

TRATAMENTO	FOLHA				CAULE				RAIZ			
	Ca	Na	K	Mg	Ca	Na	K	Mg	Ca	Na	K	Mg
	g planta ⁻¹											
T1-Testemunha	1,268 a	2,020 a	0,956 a	0,373 a	0,448 a	0,349 a	0,838 a	0,137 a	0,438 a	0,183 a	0,399 a	0,097 a
T2- Isolado UAGAt 22	1,105 a	1,999 a	0,815 a	0,336 a	0,351 a	0,334 a	0,775 a	0,126 a	0,545 a	0,259 a	0,540 a	0,160 a
T3- Isolado UAGAt 25	0,935 a	2,402 a	0,771 a	0,285 a	0,286 a	0,281 a	0,688 a	0,118 a	0,604 a	0,265 a	0,499 a	0,157 a
T4- Isolado UAGAt 35	1,012 a	2,327 a	0,897 a	0,416 a	0,324 a	0,335 a	0,883 a	0,119 a	0,515 a	0,267 a	0,562 a	0,133 a
T5- Isolado UAGAt 53	0,983 a	1,951 a	0,803 a	0,308 a	0,271 a	0,217 a	0,679 a	0,103 a	0,520 a	0,326 a	0,537 a	0,131 a
T6- MIX	1,244 a	2,617 a	0,804 a	0,388 a	0,360 a	0,303 a	0,861 a	0,126 a	0,538 a	0,226 a	0,446 a	0,106 a
C.V. (%)	21,92	20,48	29,91	21,76	26,66	15,41	24,43	23,7	24,05	23,49	27,83	25,83

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

Conseqüentemente, os resultados expostos neste trabalho refletem que não houve influência dos tratamentos da inoculação em relação aos conteúdos dos nutrientes nas plantas de *Atriplex*. Mahmood et al. (2010) observaram em plântulas de banana inoculadas com rizobactérias, que não houve efeito significativo dos tratamentos inoculados nos conteúdos de Ca, explicando ainda que o aumento mineral depende também ao acréscimo da absorção de acordo com o volume do sistema radicular.

4.2.3. Nitrogênio total e proteína bruta

Na Tabela 8 são apresentados 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 inoculação incrementou essa característica influenciando positivamente no teor deste nutriente apenas no caule das plantas, não havendo, entretanto, diferença estatística para folha e raiz. O mesmo ocorreu para o teor de proteína bruta das folhas, não havendo efeito significativo dos tratamentos nesta variável.

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

Tratamento	Teor de N Total			Teor de Proteína Bruta
	Raiz	Caule	Folha	Folha
	g kg ⁻¹			%
T1-Testemunha	0,131 a	0,154 ab	2,43 a	15,19 a
T2- Isolado UAGAt22	0,131 a	0,156 ab	2,73 a	17,09 a
T3- Isolado UAGAt25	0,126 a	0,053 b	3,13 a	19,46 a
T4-Isolado UAGAt35	0,168 a	0,137 ab	3,10 a	19,42 a
T5- Isolado UAGAt53	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

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

De acordo com a Tabela 8, percebeu-se que o tratamento Mix, composto de todas as bactérias proporcionou 0,198 g kg⁻¹ de nitrogênio total para o caule das plantas, enquanto o tratamento T3, referente ao inóculo UAGAt25 proporcionou valor mínimo (0,053 g kg⁻¹) de nitrogênio total 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 kg ha⁻¹ de N, na variedade RB867515. Em outro trabalho, Moreira & Araújo (2013), 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 ser parcialmente mineralizados tornando-se disponível para as plantas.

É válido relatar que as folhas são detentoras de altos teores de proteína bruta, que podem ser comparados ao de algumas leguminosas e outras espécies utilizadas frequentemente na alimentação animal. Silva (2010) relata que as plantas de *Atriplex* podem 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. Em outro trabalho, Barroso et al. (2006) observaram teor de proteína bruta médio em folhas de *Atriplex* de 15,11%. Já Santos (2012), obtiveram resultados de 14,44 a 15,31% de proteína bruta em folhas e ramos de *Atriplex*, respectivamente. Ressalta-se que o teor de proteína bruta das folhas de *Atriplex*, no trabalho em questão proporcionou valores elevados, variando de 15,19 a 19,46% (Tabela 8), comparando-os com outros trabalhos.

4.3. Carbono orgânico total vegetal

A concentração de carbono orgânico total (COT) nas plantas de *Atriplex* foi influenciada pelos tratamentos de inoculação apenas nas frações de folha e caule. Quanto ao COT nas folhas de *Atriplex*, percebeu-se que o tratamento correspondente ao isolado bacteriano UAGAt35 se destacou em relação aos demais, proporcionando valor de 14,40 dag kg⁻¹, seguindo o isolado UAGAt22, enquanto a testemunha foi o tratamento de valor mínimo de COT, com 3,12 dag kg⁻¹ (Figura 3).

Na fração caule da planta, a testemunha e os tratamentos 2-UAGAt22 e Mix proporcionaram valores significativamente iguais, respectivamente, diferindo dos demais para a concentração de carbono orgânico total vegetal (Figura 4). 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. 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 exsudatos das raízes.

Caldeira et al. (2003) relatam também que nas folhas encontra-se a maioria das células vivas, que tendem a acumular maiores conteúdos 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.

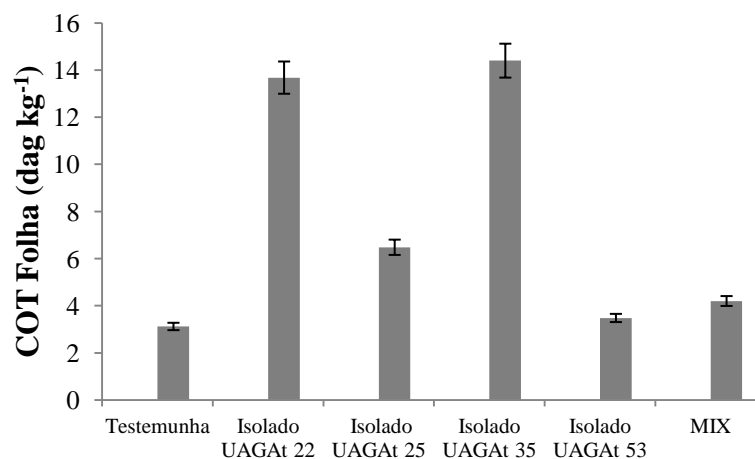


Figura 3. Carbono orgânico total de folhas de plantas de *Atriplex nummularia* L. inoculadas com bactérias halotolerantes.

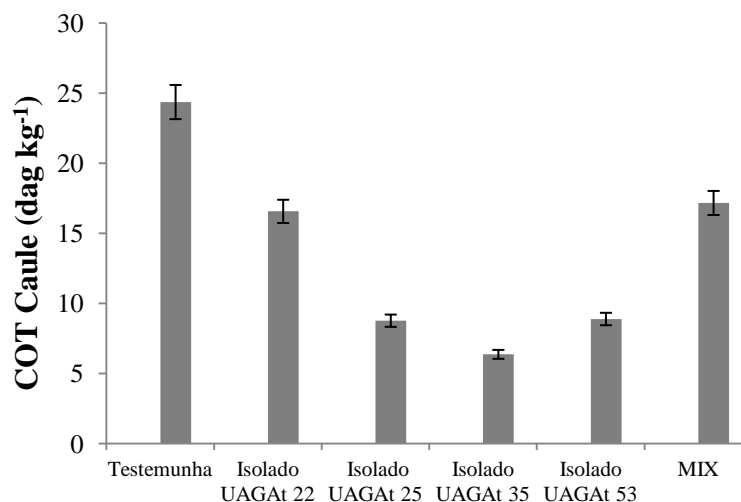


Figura 4. Carbono orgânico total de caule de plantas de *Atriplex nummularia* L. inoculadas com bactérias halotolerantes.

Para promover o crescimento das plantas sob condições salinas, o uso direto de bactérias tolerantes a sais tem atraído interesse de pesquisa tanto na produção agrícola como na indústria. Fica evidente a importância destes micro-organismos na interação com as plantas, bem como em ambientes salinos, salientando-se a importância de realização de futuros estudos. Contudo, visando o aprimoramento do conhecimento em relação as plantas halófitas e bactérias, é necessário selecionar isolados bacterianos com potencial quanto ao desenvolvimento vegetal e acúmulo de nutrientes nos tecidos vegetais. Ressaltando também a importância de analisar estes micro-organismos quanto a diferentes ambientes e condições de cultivo associados as plantas de *Atriplex*.

Estudos em campo ou em ambiente controlado com solos já salinos e sódicos ainda precisam ser incrementados no intuito de encontrar micro-organismos adaptados ao meio, que possam ser testados na inoculação das plantas de *Atriplex* e que possam melhorar as condições para a obtenção de mudas de boa qualidade e que venham a atuar na fitorremediação de solos degradados pela salinidade.

A avaliação de uma gama maior de micro-organismos também poderia ampliar os resultados da efetividade destes no desenvolvimento das plantas, auxiliando na recuperação de solos afetados por sais em ambiente semiárido.

5. CONCLUSÕES

A inoculação com bactérias halotolerantes não influenciou nos índices de clorofila, condutância estomática e temperatura foliar das plantas de *Atriplex nummularia* L.

Os teores dos nutrientes nas plantas de *Atriplex* não foram influenciados pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal utilizadas.

O mix de bactérias e a bactéria UAGAt35 se destacaram proporcionando valores expressivos apenas quando analisado os teores de nitrogênio e carbono orgânico total vegetal nas plantas de *Atriplex*.

6. REFERÊNCIAS 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 Journal of Agriculture and Biology*, v.1, n.1, p. 07-12, 2013.

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.

ASSUMPCÃO, L. C.; LACAVAL, P. T.; DIAS, A. C. F.; AZEVEDO, J. L.; MENTEN, J. O. M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.44, n.5, p.503-510, 2009.

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.

BARROSO, D. D.; G. G. L.; PORTO, E. R.; PORTO, F. R. Produtividade e valor nutritivo das frações forrageiras da erva-sal (*Atriplex nummularia*) irrigada com quatro

diferentes volumes de efluentes da criação de tilápia em água salobra. *Agropecuária Técnica*, v.27, n.1, p. 43-48, 2006.

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*, v. 34, n. 6, p. 2555-2566, 2013.

CALDEIRA, M. V. W.; SCHUMACHER, M. V.; BARICHELLO, L. R.; VOGEL, 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*, 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.

CANUTO, E. L.; SALLES, J. F.; OLIVEIRA, A. L. M.; PERIN, L.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Respostas de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. *Agronomia*, v. 37, n 2, p. 67 - 72, 2003.

COELHO, M. A.; SONCIN, N. B. Geografia do Brasil. São Paulo: Moderna. 1982. 368 p.

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D.; SANDER, G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v.17, n.10, p.1023–1029, 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-SOBRAL, 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. Journal of Agricultural Science and Technology, v. 16, p. 301-314, 2014.

FLORES-FERNÁNDEZ, M. L.; ZAVALETA, 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, 2012.

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.

MAHMOOD, M.; RAHMAN, Z. A.; SAUD, H. M.; SHAMSUDDIN, Z. H.; SUBRAMANIAM, S. Influence of Rhizobacterial and Agrobacterial Inoculation on Selected Physiological and Biochemical Changes of Banana Cultivar, Berangan (AAA) Plantlets. *Journal of Agricultural Science*, v. 2, n.1, p. 115-137.

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, M. F. S.; NOVO JÚNIOR, J.; 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 bacteria. *Revista Brasileira de Agrociência*, 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*, 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 brasilenses* 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.

SANTOS, M. H. L. C.; MARIANO, R. L. R.; CAMARA, T. R.; ANDRADE, A. G; WILLADINO, L.; LIMA, G. P. P. Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f. *Hoehnea*, v.32, p.1-8, 2005.

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.