



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E PASTAGENS**



**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E GENÉTICA DE  
BACTÉRIAS POTENCIALMENTE DIAZOTRÓFICAS  
ASSOCIADAS A CAPIM BRAQUIÁRIA**

**JOÃO TIAGO CORREIA OLIVEIRA**

**2012**

**JOÃO TIAGO CORREIA OLIVEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E GENÉTICA DE  
BACTÉRIAS POTENCIALMENTE DIAZOTRÓFICAS  
ASSOCIADAS A CAPIM BRAQUIÁRIA**

**Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciência Animal e  
Pastagens da Universidade Federal Rural  
de Pernambuco – Unidade Acadêmica de  
Garanhuns, como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em Ciência  
Animal e Pastagens.**

**Orientador – Prof. Dr. FERNANDO JOSÉ FREIRE**

**GARANHUNS  
PERNAMBUCO – BRASIL  
2012**

Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Setorial UFRPE/UAG

O48b Oliveira, João Tiago Correia  
Caracterização fisiológica e genética de bactérias  
potencialmente diazotróficas associadas a capim braquiária/João Tiago  
Correia

Oliveira.\_Garanhuns, 2012.

143f.

Orientador: Fernando José Freire  
Dissertação (Curso de Mestrado em Ciência Animal e  
Pastagens) – Universidade Federal Rural de  
Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, 2012  
Inclui bibliografia

CDD: 581.1

1. Brachiaria
2. Bioprospecção
3. Nutrição animal
4. Fisiologia Vegetal
5. Genética Vegetal
6. BOX-PCR - Técnica
7. PCR-DGGE - Técnica
- I. Freire, Fernando José
- II. Título

**JOÃO TIAGO CORREIA OLIVEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E GENÉTICA DE  
BACTÉRIAS POTENCIALMENTE DIAZOTRÓFICAS  
ASSOCIADAS A CAPIM BRAQUIÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens da Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal e Pastagens.

**Aprovado em 31 de Julho de 2012**

**Prof. Dr. Mário de Andrade Lira Júnior – UFRPE**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Geane Dias Gonçalves Ferreira– PPGCAP/UFRPE**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Júlia Kuklinsky Sobral– UAG/UFRPE**

**Orientador – Prof. Dr. FERNANDO JOSÉ FREIRE**

**GARANHUNS  
PERNAMBUCO – BRASIL  
2012**



AS VEZES EU ACHO QUE O SINAL MAIS EVIDENTE DE QUE EXISTE VIDA INTELIGENTE EM ALGUM LUGAR DO UNIVERSO, É O DE QUE NINGUÉM ATE AGORA TENTOU ENTRAR EM CONTATO CONOSCO.

Aos meus pais, minhas irmãs, meus tios,  
primos, amigos de laboratório e de pós-graduação e aos  
meus orientadores que tanto me compreenderam e  
incentivaram tornando possível a realização deste  
trabalho!

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me proporcionado mais esta conquista, estando presente e conduzindo minha vida, me fortalecendo e amparando nos momentos de dificuldade.

Aos meus pais, João Correia e Maria de Lourdes, pelo amor, educação, dedicação, paciência e todos os esforços a mim dedicados.

As minhas irmãs, Lara e Jordana que apesar das várias brigas, tanto me apoiaram e contribuíram na minha caminhada.

A meus tios Jorge Bernardo e Maria Sueli, pelo carinho paciência e enorme prestatividade. Aos meus primos irmãos Jorge, Suele, Sueza, Edison, Emerson, Jucilene, Juciene e Karole pelo imenso carinho e a oportunidade de viver em família, contribuindo direta e indireta na realização desta caminhada.

Ao Prof<sup>o</sup> Fernando Freire pela orientação, apresentando um novo mundo acadêmico e uma área da ciência que tanto me apaixonou.

A Prof<sup>a</sup> Dra Júlia Kuklinsky Sobral simplesmente por tudo! Pela orientação e inserção na FAMÍLIA LGBM (Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana). Pelos conselhos e ensinamentos, tornando-se assim referência tanto profissional quanto pessoal.

Ao Prof<sup>o</sup> Alberto Einstein pelo apoio ao LGBM e pelas brincadeiras.

A minha nova família (que passaram ou que integram o LGBM), Adjailton, Aldo, Andresa, Amanda, Arthur, Bruno, Camila, Danúbia, Diogo, Everthon, Geraldo, Gilka, Isaneli, Jacylene, Jéssica, Jesimiel, Luana, Luciano, Narciso, Pedro, Raquel, Sheyla e Williane, que me ajudaram nas análises, isolamentos e condução dos experimentos e nas demais etapas. A estes que tanto me suportaram nos momentos bons e ruins, que me fizeram rir nos nossos muitos momentos de descontração, simplesmente

meus irmãos, companheiros que a mim ofertaram um pouco do seu tempo e me deixaram participar de suas vidas. Enfim, agradeço a todos os momentos incríveis que por mais que o tempo passe não fará me esquecer!

A todos os componentes e amigos que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens pelo suporte e préstimos recebidos em especial para Arthur, Carol, Erickson, Fábria, Ianara, Jadilson, Jucelane, Luciana, Laine, Mábio, Messias, Rodrigo, Tibério por favores prestados, conselhos e compartilhamento do conhecimento através dos grupos de estudos que formávamos para estudar as diferentes disciplinas.

A todos os professores de compõem o programa e Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens, pela prestatividade e disponibilidade de acesso e de repasse de conhecimento.

Ao Prof. Fernando Andreote e ao amigo e mestrando Pedro Avelino pelo auxílio e tempo nos experimentos de DGGE.

Ao Prof. Dubeux Junior pelo auxílio na indicação para coleta do material para análise nos experimentos. A Dra. Maria Carolina Quecine, por ceder a bactéria, *Agrobacterium tumefaciens* NTL4, controle para testar a presença da molécula *Quorum sensing*.

As agências de fomento FACEPE e CAPES pela concessão da Bolsa de estudos e agradeço, também, a todos que contribuíram de forma direta e indireta para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

***Muito obrigado!***

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1	<i>Brachiaria</i> spp. ....	2
2.2	Interação entre bactérias e plantas não leguminosas.....	3
2.3	Fixação biológica de nitrogênio.....	4
2.3.1	Fixação biológica de nitrogênio por bactérias associadas a gramíneas do gênero <i>Brachiaria</i> .....	5
2.4	Diversidade genética de micro-organismos .....	7
2.5	Potencial biotecnológico de bactérias associadas às plantas .....	8
2.5.1	Enzimas extracelulares.....	8
2.5.2	Solubilização de fosfato inorgânico.....	9
2.5.3	Síntese de fitohormônios da classe das auxinas .....	10
2.5.4	Produção de moléculas <i>quorum sensing</i> .....	10
	BIBLIOGRAFIA CITADA .....	11
3	CAPÍTULO 01 - Potencial biotecnológico e diversidade de bactérias potencialmente diazotróficas associadas à <i>Brachiaria</i> .....	17
	RESUMO .....	17
	ABSTRACT.....	19
3.1	Introdução .....	21
3.2	Material e métodos.....	22
3.2.1	Áreas de estudo e material vegetal.....	22
3.2.2	Isolamento de bactérias potencialmente diazotróficas e estocagem bacteriana .....	23
3.2.3	Caracterização fenotípica.....	25
3.2.3.1	Identificação de bactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio atmosférico.....	25
3.2.3.2	Identificação de bactérias produtoras de ácido indol acético (AIA) via dependente e independente do aminoácido L-triptofano .....	25
3.2.3.3	Identificação de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico .....	26
3.2.3.4	Identificação de bactérias produtoras de enzimas extracelulares .....	26
3.2.3.4.1	Atividade celulolítica .....	26
3.2.3.4.2	Atividade pectinolítica .....	27
3.2.3.4.3	Atividade amilolítica.....	27
3.2.3.5	Identificação de bactérias produtoras de moléculas <i>quorum sensing</i> .....	28
3.2.4	Caracterização genotípica .....	28
3.2.4.1	Análise da variabilidade genética bacteriana por BOX-PCR .....	28
3.2.5	Análise estatística.....	29
3.3	Resultados e discussão .....	29
3.3.1	Densidade populacional de bactérias potencialmente diazotróficas associadas às plantas do gênero <i>Brachiaria</i> .....	29

3.3.2	Identificação de bactérias com características de promoção de crescimento vegetal .....	31
3.3.2.1	Bactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio atmosférico.....	34
3.3.2.2	Avaliação de bactérias produtoras de ácido indol acético (AIA).....	35
3.3.2.3	Avaliação de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico .....	37
3.3.2.4	Avaliação da produção de enzimas extracelulares.....	40
3.3.2.5	Bactérias produtoras de moléculas <i>quorum sensing</i> .....	46
3.3.3	Caracterização da diversidade genômica .....	47
3.3.3.1	Diversidade genética de bactérias potencialmente diazotróficas associadas a gramíneas do gênero <i>Brachiaria</i> .....	47
3.3.4	Caracterização dos isolados quanto ao seu genótipo e potencial biotecnológico.....	51
3.4	Conclusões .....	53
	BIBLIOGRAFIA CITADA .....	54
4	CAPÍTULO 02 – Diversidade da comunidade bacteriana cultivável associada às raízes de <i>Brachiaria</i> .....	59
	RESUMO .....	59
	ABSTRACT.....	61
4.1	Introdução .....	63
4.2	Material e métodos.....	64
4.2.1	Áreas de estudo e material vegetal.....	64
4.2.2	Isolamento da comunidade bacteriana cultivável e estocagem bacteriana ..	65
4.2.3	Caracterização fenotípica.....	65
4.2.3.1	Identificação de bactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio atmosférico.....	65
4.2.3.2	Identificação de bactérias produtoras de ácido indol acético (AIA) por diferentes rotas bioquímicas .....	66
4.2.3.3	Identificação de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico .....	66
4.2.3.4	Identificação de bactérias produtoras de enzimas extracelulares .....	66
4.2.3.5	Identificação de bactérias produtoras de moléculas <i>quorum sensing</i> .....	66
4.2.4	Caracterização genotípica .....	67
4.2.4.1	Análise da variabilidade genética bacteriana por BOX-PCR .....	67
4.2.5	Análise estatística.....	67
4.3	Resultados e discussão .....	67
4.3.1	Densidade populacional da comunidade bacteriana cultivável associada às plantas do gênero <i>Brachiaria</i> .....	67
4.3.2	Identificação de bactérias com características de promoção de crescimento vegetal .....	69
4.3.2.1	Bactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio atmosférico .....	72
4.3.2.2	Avaliação de bactérias produtoras de ácido indol acético (AIA).....	75
4.3.2.3	Avaliação de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico .....	77
4.3.2.4	Avaliação da produção de enzimas extracelulares.....	80
4.3.2.5	Bactérias produtoras de moléculas <i>quorum sensing</i> .....	85
4.3.3	Caracterização da diversidade genômica .....	86

4.3.3.1	Diversidade genética da comunidade bacteriana cultivável associadas a gramíneas do gênero <i>Brachiaria</i> .....	86
4.3.4	Caracterização dos isolados quanto ao seu genótipo e potencial biotecnológico.....	88
4.4	Conclusões .....	90
	BIBLIOGRAFIA CITADA .....	91
5	CAPÍTULO 03 - Comunidade bacteriana diazotrófica associada a <i>Brachiaria decumbens</i> sob diferentes tempos de adubação. ....	96
	RESUMO .....	96
	ABSTRACT.....	97
5.1	Introdução .....	98
5.2	Material e métodos.....	99
5.2.1	Áreas de estudo e material vegetal.....	99
5.2.2	Isolamento e estocagem bacteriana.....	100
5.2.3	Caracterização fenotípica.....	100
5.2.3.1	Identificação de bactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio atmosférico.....	100
5.2.4	Caracterização genotípica .....	101
5.2.4.1	Análise da comunidade bacteriana diazotrófica total por DGGE.....	101
5.2.4.1.1	PCR ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> ) do gene <i>nifH</i> .....	101
5.2.4.1.2	Análise por DGGE.....	102
5.2.5	Análise estatística.....	102
5.3	Resultados e discussão.....	103
5.3.1	Densidade populacional da comunidade bacteriana potencialmente diazotróficas associadas a plantas de <i>Brachiaria decumbens</i> .....	103
5.3.2	Características de promoção de crescimento vegetal.....	104
5.3.2.1	Bactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio atmosférico .....	104
5.3.3	Caracterização da diversidade genômica .....	105
5.3.3.1	Diversidade da comunidade bacteriana diazotrófica total associada a plantas de <i>Brachiaria decumbens</i> com diferentes tempos de adubação .....	105
5.4	Conclusão.....	108
	BIBLIOGRAFIA CITADA .....	108
6.	CONCLUSÃO GERAL .....	110

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1. Meio de cultura NFb, livre de fonte nitrogenada, utilizado para o isolamento de bactérias potencialmente diazotróficas. A) Amostra negativa, ausência do halo de crescimento; B) Amostra positiva, apresentando halo de crescimento (flecha)..... 30
- Figura 3.2. Densidade populacional da comunidade bacteriana diazotrófica endofítica de raiz e da rizosfera de plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*. Letras maiúsculas comparam os nichos por espécie vegetal, letras minúsculas os nichos entre si de ambas as espécies vegetais. Letra iguais não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. .... 31
- Figura 3.3. Frequência relativa (%) de isolados positivos para os testes de produção de ácido indol acético (AIA) com e sem a presença do aminoácido precursor L-triptofano *in vitro*, associados a *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* nos nichos endofítico de raiz e rizosfera. .... 37
- Figura 3.4. Placa de Petri evidenciando o crescimento bacteriano em meio contendo fosfato insolúvel, com halo de solubilização ao redor da colônia bacteriana..... 38
- Figura 3.5. Frequência relativa (%) de isolados solubilizadores de fosfato segundo o padrão de classificação de intensidade do índice de solubilização. .... 39
- Figura 3.6. Frequência relativa (%) dos isolados bacterianos associados à rizosfera e raiz de plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* em relação à capacidade de solubilizar fosfato inorgânico *in vitro*..... 39
- Figura 3.7. Placas de Petri evidenciando o crescimento bacteriano e produção de enzimas extracelulares, caracterizada pelo halo de degradação ao redor da colônia. A) Produção de celulase; B) Produção de amilase; C) Produção de pectinase pH 8,0 (pectato liase) e D) Produção de pectinase pH 5,0 (poligalacturonase). .... 40
- Figura 3.8. Frequência relativa (%) dos isolados bacterianos positivos associados à rizosfera e raiz de plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* em relação à produção de celulase, pectinase e amilase *in vitro*..... 43
- Figura 3.9. Produção da molécula *quorum sensing* visualizado através da mudança de coloração da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4), inoculada horizontalmente, utilizada como controle positivo ficando

azulada na presença da molécula *quorum sensing* (ALH) produzida pelo isolado de *Brachiaria*. a) Bactéria negativa; b) Bactéria positiva..... 46

Figura 3.10. Frequência relativa (%) dos isolados bacterianos positivos associados à rizosfera e raiz de plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* em relação à produção da molécula *quorum sensing*.. ..... 47

Figura 3.11. Perfis genômicos gerado pela ampliação do iniciador BOXA1R de parte dos isolados potencialmente diazotróficos. Em gel de agarose a 1,5%. M = marcador 1Kb.; 1 a 16 = isolados bacterianos..... 48

Figura 3.12. Dendrograma obtido pelo agrupamento realizado pelo algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) a partir da matriz de similaridade genética de 80 isolados bacterianos, associados a rizosfera e raiz, de plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*. D/E = *B. decumbens*/endofítico de raiz; D/R = *B. decumbens*/rizosfera; H/E = *B. humidicola*/endofítico de raiz; H/R = *B. humidicola*/rizosfera. O coeficiente de Jaccard foi utilizado para a construção da matriz de similaridade. Os números nos nós do dendrograma indicam o valor da porcentagem de vezes que o grupo ocorreu no mesmo nó durante o *Bootstrap* de 1000 repetições ..... 49

Figura 3.13. Dendrograma obtido pelo agrupamento realizado pelo algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) a partir da matriz de similaridade genética e características fenotípicas dos 80 isolados bacterianos, associados a rizosfera e raiz, de plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*. D/E = *B. decumbens*/endofítico de raiz; D/R = *B. decumbens*/rizosfera; H/E = *B. humidicola*/endofítico de raiz; H/R = *B. humidicola*/rizosfera. O coeficiente de Jaccard foi utilizado para a construção da matriz de similaridade. Os números nos nós do dendrograma indicam o valor da porcentagem de vezes que o grupo ocorreu no mesmo nó durante o *Bootstrap* de 1000 repetições..... 52

Figura 4.1. Densidade populacional da comunidade bacteriana total, isolada em meio de cultura TSA 10%, de bactérias endofíticas de raiz e rizosfera das plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*. Letras maiúsculas comparam os nichos por espécie vegetal, letras minúsculas os nichos entre si de ambas as espécies vegetais. Letras iguais não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott ..... 68

Figura 4.2. Placa de petri com meio de cultura TSA 10% do isolamento total de bactérias associadas a diferentes espécies de gramíneas do gênero *Brachiaria*..... 69

- Figura 4.3. Frequência relativa (%) de isolados bacterianos potencialmente fixadores de nitrogênio associados à rizosfera e raiz de plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*. ..... 73
- Figura 4.4. Frequência relativa (%) de isolados bacterianos associados a rizosfera e raiz de plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* em relação a capacidade de produção de ácido indol acético (AIA) com a presença do aminoácido precursor L-triptofano *in vitro*. ..... 76
- Figura 4.5. Produção de ácido indol acético ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), em meio com e sem o suplementado do aminoácido precursor L-triptofano, por bactérias associadas a *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*. Médias seguidas por letras com números iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ..... 76
- Figura 4.6. Frequência relativa (%) dos isolados bacterianos associados à rizosfera e raiz de plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* em relação a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico *in vitro*. ..... 78
- Figura 4.7. Frequência relativa (%) dos isolados bacterianos positivos associados à rizosfera e raiz de plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* em relação à produção de pectinase e amilase *in vitro*. ..... 83
- Figura 4.8. Frequência relativa (%) dos isolados bacterianos positivos associados à rizosfera e raiz de plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* em relação à produção da molécula *quorum sensing*. ..... 85
- Figura 4.9. Dendrograma obtido pelo agrupamento realizado pelo algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) a partir da matriz de similaridade genética de 100 isolados bacterianos, associados a rizosfera e endofíticos de raiz, de plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*. D/E = *B. decumbens*/endofítico de raiz; D/R = *B. decumbens*/rizosfera; H/E = *B. humidicola*/endofítico de raiz; H/R = *B. humidicola*/rizosfera. O coeficiente de Jaccard foi utilizado para a construção da matriz de similaridade. Os números nos nós do dendrograma indicam o valor da porcentagem de vezes que o grupo ocorreu no mesmo nó durante o *Bootstrap* de 1000 repetições ..... 87
- Figura 4.10. Dendrograma obtido pelo agrupamento realizado pelo algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) a partir da matriz de similaridade genética e características fenotípicas dos 100 isolados bacterianos associados, a rizosfera e endofíticos de raiz, de plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*. D/E = *B. decumbens*/endofítico de raiz; D/R = *B. decumbens*/rizosfera; H/E = *B. humidicola*/endofítico de raiz; H/R = *B. humidicola*/rizosfera. O coeficiente de Jaccard foi utilizado para a construção da matriz de

similaridade. Os números nos nós do dendrograma indicam o valor da porcentagem de vezes que o grupo ocorreu no mesmo nó durante o *Bootstrap* de 1000 repetições ..... 89

Figura 5.1. Densidade populacional da comunidade bacteriana diazotrófica, endofítica de raiz e rizosfera, de plantas de *Brachiaria decumbens* em diferentes tempos sem adubação. Letras maiúsculas comparam os nichos entre si e os períodos de adubação, letras minúsculas os nichos por período de adubação. Letras iguais não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott..... 103

Figura 5.2. Gel de poliacrilamida com perfis obtidos no DGGE do *nifH* das comunidades bacterianas diazotróficas endofíticas de raiz e rizosfera de *Brachiaria decumbens*, sob diferentes tempos de adubação. M = marcador; 2005 = pastagem com última adubação no ano de 2005; 2008 pastagem com última adubação no ano de 2008; SEM = pastagem cultivada a 30 anos e nunca adubada ..... 105

Figura 5.3. Dendrograma de similaridade das comunidades bacterianas diazotróficas associadas às plantas de *Brachiaria decumbens* sob diferentes tempos de adubação. 2005 = plantas com última adubação no ano de 2005; 2008 = plantas com última adubação no ano de 2008; SEM = plantas que nunca foram adubadas em 30 anos de cultivo; 1, 2 ou 3 = repetição por cada amostra; ER = endofítico de raiz; RIZ = rizosfera. Baseadas nos perfis obtidos através da técnica de DGGE do gene *nifH*, e analisados através do coeficiente de Jaccard foi utilizado para a construção da matriz de similaridade. Os números nos nós do dendrograma indicam o valor da porcentagem de vezes que o grupo ocorreu no mesmo nó durante o *Bootstrap* de 1000 repetições ..... 106

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 3.1. Características químicas e físicas dos solos coletados nas áreas de pastagens *Brachiaria decumbens* (BD) e *Brachiaria humidicola* (BH) cultivadas na fazenda Pau Ferro do município das Correntes-PE..... 23
- Tabela 3.2. Avaliação da fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de AIA, via dependente e independente de L-triptofano, de 80 isolados bacterianos associados as gramíneas *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*. Os valores, em cada coluna, seguidos de mesma letra indicam ausência de significância estatística de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ )..... 32
- Tabela 3.3. Produção de enzimas extracelulares (celulase, pectinase pH 5,0, pectinase pH 8,0 e amilase) e produção da molécula *quorum sensing* por 80 isolados bacterianos associados aos nichos rizosfera e endofítico de raiz das gramíneas *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*. Os valores em cada coluna, seguidos de mesma letra indicam ausência de significância estatística de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) ..... 41
- Tabela 4.1. Fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de AIA com acréscimo de L-triptofano no meio de cultura, dos 100 isolados bacterianos associados as gramíneas *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*. Os valores, em cada coluna, seguidos de mesma letra indicam ausência de significância estatística de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) ..... 70
- Tabela 4.2. Seleção de bactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio em meio semi-sólido NFb sob diferentes concentrações de NaCl (0,1; 2,5; 5,0 e 10,0%) ..... 74
- Tabela 4.3. Índice de solubilização (IS) de fosfato inorgânico em diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose e manitol) por bactérias endofíticas de raiz e da rizosfera de plantas de *Brachiaria humidicola* e *Brachiaria decumbens*. Letras maiúsculas comparam a solubilização dos isolados por fonte de carbono, letras minúsculas comparam a solubilização do isolados nas diferentes fontes de carbono. Colunas seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott ..... 79
- Tabela 4.4. Produção de enzimas extracelulares (pectinase pH 5,0, pectinase pH 8,0, amilase e celulase) e produção da molécula *quorum sensing* por 100 isolados bacterianos associados aos nichos rizosfera e endofítico de raiz das gramíneas *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*. Os valores,

em cada coluna, seguidos de mesma letra indicam ausência de significância estatística de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ )... 80

Tabela 5.1. Características químicas e físicas dos solos coletados nas áreas de pastagens de <i>Brachiaria decumbens</i> cultivadas na fazenda Riacho do Papagaio do município de São João-PE .....	100
---	-----

## RESUMO GERAL

OLIVEIRA, João Tiago Correia. **Caracterização fisiológica e genética de bactérias potencialmente diazotróficas associadas a capim braquiária**. 2012. 143p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens – Dissertação) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns, PE.<sup>1</sup>

As gramíneas do gênero *Brachiaria* são largamente utilizadas por todo o Brasil, tolerando uma série de limites e condições restritivas de utilização, o que corrobora para que seja largamente cultivada em todo território nacional. As mudanças ocorridas nos sistemas agrícolas, em sua maioria, têm por finalidade a melhoria da qualidade ambiental, neste sentido conhecer a diversidade microbiana associada a estes sistemas tem sido útil para sustentabilidade dos ecossistemas e o aperfeiçoamento da produção, onde a associação de gramíneas com bactérias diazotróficas pode proporcionar crescimento vegetal e representa uma alternativa promissora para o melhor desenvolvimento e desempenho vegetal. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi isolar bactérias potencialmente diazotróficas associadas as gramíneas *B. decumbens* e *B. humidicola* cultivadas na Região Agreste do Estado de Pernambuco, nos nichos rizosfera e endofítico de raiz, avaliando-se características funcionais e variabilidade genética. Após o isolamento em meio semi seletivo para fixação de nitrogênio atmosférico (meio NFb semi-sólido) e em meio não seletivo ocorreu a seleção funcional dos isolados bacterianos quanto a características envolvidas com a promoção de crescimento vegetal, e a variabilidade genética, através da técnica de BOX-PCR e PCR-DGGE do gene *nifH*. As características fenotípicas analisadas foram: fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de ácido indol acético (AIA) por diferentes rotas bioquímicas, solubilização de fosfato inorgânico, produção de enzimas extracelulares e da molécula *quorum sensing*. Nos resultados obtidos ficou evidente a elevada e variável funcionalidade das bactérias associadas a estas gramíneas em ambos os meios (com destaque para os isolados provenientes do meio NFb, que apresentou maior frequência de isolados positivos para os testes avaliados), espécies vegetais e nichos avaliados. Nas bactérias associadas as gramíneas se observou fixação de nitrogênio atmosférico em diferentes concentrações de sal no meio de cultura, produção de AIA por diferentes rotas bioquímicas com e sem a presença do precursor L-triptofano, solubilização de fosfato inorgânico com a presença de diferentes fontes de carbono, produção de enzimas extracelulares (celulase, pectinase e amilase) e molécula *quorum sensing*. Independente da técnica utilizada para o estudo da variabilidade genética foi observado elevada diversidade genética para os isolados tanto da raiz como do rizoplano das gramíneas *B. decumbens* e *B. humidicola*. Desta forma é possível concluir que tal associação bactéria-planta-solo pode proporcionar vários benefícios à planta, não apenas a fixação biológica do nitrogênio. Portanto, investimentos em pesquisas utilizando a associação gramíneas forrageiras/bactérias são de fundamental importância pelo elevado valor que estas representam na alimentação animal.

---

<sup>1</sup>Comitê Orientador: Prof. Dr. Fernando José Freire – UFRPE (orientador); Prof<sup>a</sup>. Dra. Júlia Kuklinsky-Sobral – UAG/UFRPE (co-orientadora); Prof. Carlos Ribeiro Rodrigues – UAG/UFRPE (co-orientador).

## ABSTRACT

OLIVEIRA, João Tiago Correia. **Genetic and physiological characterization of diazotrophic bacteria potentially associated with Brachiaria grasses.** 2012. 143p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens – Dissertação) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns, PE.<sup>1</sup>

The genus *Brachiaria* grasses are widely used throughout Brazil, enduring a series of restrictive limits and conditions of use, which corroborates that it is widely cultivated throughout the country. The changes in agricultural systems, mostly aiming at the improvement of environmental quality, in order to know the microbial diversity associated with these systems has been useful for ecosystem sustainability and improvement of production, where the combination of grasses with diazotrophs can provide plant growth and represents a promising alternative for the better development and plant performance. Given the above, the objective of this study was to isolate diazotrophic bacteria potentially associated grasses *B. decumbens* and *B. humidicola* cultivated in Agreste region of Pernambuco State, niches in the rhizosphere and endophytic root, evaluating functional and genetic variability. After isolation on semi selective fixation of atmospheric nitrogen (NFB semisolid medium) and in a non-functional selection was the selection of bacterial isolates for characteristics involved with the promotion of plant growth and genetic variability, using the technique of BOX-PCR and PCR-DGGE of *nifH*. The phenotypic characteristics were analyzed: biological nitrogen fixation (BNF), production of indole acetic acid (IAA) by different biochemical pathways, inorganic phosphate solubilization, production of extracellular enzymes and the quorum sensing molecule. The results obtained evidenced the high and variable functionality of the bacteria associated with these grasses in both media (especially the ones from the middle NFB, with the highest frequency of positive isolates for the evaluated tests), plant species and niches evaluated. In bacteria associated with the grass was observed fixation of atmospheric nitrogen in different salt concentrations in the culture medium, producing different biochemical pathways by EIA with and without the presence of precursor L-tryptophan, solubilization of inorganic phosphate in the presence of different sources of carbon production of extracellular enzymes (cellulase, pectinase and amylase) and quorum sensing molecule. Regardless of the technique used to study the genetic variability was observed high genetic diversity for isolates from both the root and the rhizoplane of grasses *B. decumbens* and *B. humidicola*. Thus we conclude that this association bacteria-plant-soil can provide several benefits to the plant, not just the biological nitrogen fixation. Therefore, investments in research using the association grasses/bacteria are essential for the high value they represent in animal feed.

---

<sup>1</sup>Comitê Orientador: Prof. Dr. Fernando José Freire – UFRPE (orientador); Prof<sup>a</sup>. Dra. Júlia Kuklinsky-Sobral – UAG/UFRPE (co-orientadora); Prof. Carlos Ribeiro Rodrigues – UAG/UFRPE (co-orientador).

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O nitrogênio apresenta grande relevância na produção agrícola, principalmente em relação ao custo total de implantação e manutenção das culturas (Sala et al., 2005). O preço atual dos fertilizantes nitrogenados está relacionado a vários fatores, tais como: aumento da demanda causada por uma crescente necessidade global de alimentos, dieta mais diversificada e com isso maior quantidade de fertilizantes nitrogenados sendo requerido, aumento da produção vegetal necessária para produção de biocombustível, e aumento dos custos de transporte (Bhattacharjee et al., 2008; Afonso et al., 2011).

O fertilizante é uma *commodity* do mercado mundial sujeito às forças globais de mercado, à volatilidade e aos riscos (Oliveira et al., 2010). De elevada importância, tanto para as plantas como para a nutrição animal, o nitrogênio contribui para o aumento da capacidade de suporte da pastagem, prolongando a capacidade produtiva e melhorando a qualidade da dieta e o desempenho animal (Paris et al., 2009; Hayat et al., 2010; Reis et al., 2010).

Portanto, práticas de manejo que aumentem a eficiência do uso de fertilizantes nitrogenados e, principalmente, que aperfeiçoem os processos biológicos envolvidos no fornecimento deste nutriente para as plantas são de grande importância para a diminuição dos custos de produção das culturas (Bergamaschi et al., 2007; Chubatsu et al., 2011).

Nas gramíneas, o nitrogênio acumulado pode ser proveniente de duas fontes distintas, uma amplamente conhecida que é resultante da absorção do nitrogênio presente no solo de forma natural ou incorporado pela prática da fertilização e, outra, relacionada com a fixação biológica do nitrogênio (FBN), por bactérias, ditas diazotróficas, associadas às plantas. Sendo esta última fonte considerada como de suma

importância e potencialmente promissora para muitas plantas cultivadas no país (Egamberdiyeva et al., 2007; Roesch et al., 2007; Roesch et al., 2010).

É sabido que as bactérias exercem inúmeras funções além da FBN, dentre estas pode-se citar a solubilização de fosfato inorgânico e síntese de fitohormônio (Loredo-Osti et al., 2004; Araújo et al., 2010). Essas bactérias podem estar presentes em diferentes habitats, apresentando elevada diversidade morfológica, fisiológica e genética o que lhes confere enorme interesse como potencialmente promotoras de crescimento vegetal (Moreira et al., 2010; Castro et al., 2011).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos: isolar bactérias potencialmente diazotróficas associadas aos nichos rizosfera e endofítico de raiz de plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* cultivadas no Agreste Meridional do Estado de Pernambuco, estimar a densidade populacional, caracterizar fenotipicamente e quantitativamente os isolados bacterianos para produção de ácido indol acético, solubilização de fosfato inorgânico, produção de enzimas extracelulares e da molécula *quorum sensing*, além de avaliar a diversidade genética bacteriana dependente e independente de cultivo, por meio das técnicas de BOX-PCR e PCR-DGGE, respectivamente.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 *Brachiaria* spp.**

Capins do gênero *Brachiaria* apresentam importante papel na produção de carne e leite, viabilizando a pecuária em diferentes tipos de solos e regiões. Sendo considerado pantropical, esse gênero de gramíneas apresenta seu centro de origem e diversidade no continente africano, sendo suas espécies intensivamente utilizadas na

alimentação de ruminantes nas regiões tropicais por todo o mundo (Reis Junior et al., 2003).

Diversas são as espécies de gramíneas forrageiras tropicais que se apresentam como opções para a formação de pastagens no Brasil, sendo o potencial das *Brachiaria* spp. reconhecido desde a década de 50 (Zimmer et al., 1988; Monteiro et al., 1995; Franco & Rosa, 2003). Das espécies mais utilizadas, destacam-se *B. decumbens*, *B. brizantha*, *B. ruziziensis* e *B. humidicola* (Silva et al., 2010), devido ao elevado valor forrageiro, adaptabilidade e tolerância a solos ácidos e de baixa fertilidade (Franco & Rosa, 2003; Usberti & Martins, 2007). Essas espécies apresentam grande flexibilidade de uso e manejo, tolerando uma série de limitações e/ou condições restritivas de utilização, o que corrobora para que seja cultivada em elevado percentual dos 200 milhões de hectares de pastagens por todo o Brasil (Boddey et al., 2006; Tavares Filho et al., 2011).

## **2.2 Interação entre bactérias e plantas não leguminosas**

Sendo a planta um amplo e diversificado nicho para colonização por bactérias, estas podem ser organizadas, de acordo com o seu habitat de colonização, em três grupos: o primeiro formado por bactérias de vida livre, que habitam a rizosfera; o segundo por bactérias associativas, capazes de colonizar os tecidos vegetais na superfície externa (epifíticas); e o terceiro apresenta-se no interior do tecido vegetal ocupando espaços intra e intercelulares (endofíticas) (Moreira & Siqueira, 2006; Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006; Richardson et al., 2009; Moreira et al., 2010; Castro et al., 2011).

O sistema radicular caracteriza-se como o principal local de colonização das bactérias, tanto endofíticas quanto epifíticas (Richardson et al., 2009; Castro et al., 2011). As bactérias endofíticas podem ser encontradas em raízes, caules, folhas,

sementes, frutos, pólen, e dentro de nódulos de leguminosas (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006; Magnani et al., 2010). Os endófitos podem se translocar do sistema radicular para outros órgãos das plantas através dos vasos do xilema e floema, durante o desenvolvimento do vegetal (Kuklinsky-Sobral et al., 2004; Compant et al., 2008). E por estarem presentes nos mais diversos órgãos vegetais, já foram isolados de uma grande variedade de plantas, tais como: gramíneas forrageiras (Reis Junior et al., 2008), trigo (Silva et al., 2004; Spaepen et al., 2008), milho (Ramos et al., 2010), arroz inundado (Verma et al., 2004), cevada (Silva et al., 2004), uva (Compant et al., 2008), batata (Reiter et al., 2003), morango (Dias et al., 2009), cana-de-açúcar (Magnani et al., 2010; Pereira et al., 2012), café (Vega et al., 2005), banana (Ting et al., 2008), soja (Kuklinsky-Sobral et al., 2004), abacaxi (Baldotto et al., 2010), entre outras.

A espécie vegetal compreende um universo onde diversas espécies podem ser encontradas (Ferng et al., 2011). Como exemplos da associação entre bactérias diazotróficas com gramíneas, pode-se citar a associação entre espécies bacterianas tais como, *Gluconoacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* com plantas de cana-de-açúcar (Barretti et al., 2008).

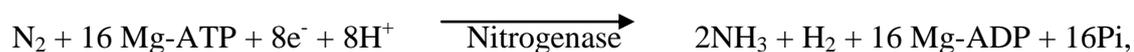
### **2.3 Fixação biológica de nitrogênio**

Os micro-organismos diazotróficos podem colonizar diferentes habitats, como o solo, em associação com plantas, e em ambientes de água doce ou marinha (Moreira & Siqueira, 2006). Em todos os casos é fundamental a presença de redutores, como a ferredoxina e flavodoxina, de ATP (adenosina trifostafa), de uma via assimilatória de amônia (NH<sub>3</sub>), além do complexo nitrogenase (responsável pela conversão do nitrogênio molecular em amônia) (Taiz & Zieger, 2006), sendo o mais frequentemente encontrado nos micro-organismos diazotróficos estudados até o momento, a forma

clássica ou dependente de molibdênio (Mo) e ferro (Fe), codificada por o gene *nif* (Teixeira et al., 1998; Nunes et al., 2003; Franche et al., 2009).

A estabilidade da molécula de nitrogênio atmosférico, resultante de sua estrutura molecular, faz dela um gás não reativo a temperatura ambiente, sendo necessária elevada quantidade de energia para quebra da tripla ligação dessa molécula, para a produção de amônia (Troeh & Thompson, 2007).

No processo de fixação, a redução do substrato pela nitrogenase envolve três tipos básicos de transferência de elétrons: o primeiro ocorre a redução da Fe-proteína por carregadores de elétrons, o segundo a transferência de um único elétron a partir da Fe-proteína para MoFe-proteína, através de um processo dependente de Mg-ATP (no mínimo 2 Mg-ATP/elétron transferidor) e o terceiro a transferência de elétrons para o substrato ligado ao sítio ativo de MoFe-proteína. Portanto, em ótimas condições, a estequiometria a reação catalítica responsável pela redução do N<sub>2</sub> para formação de duas moléculas de amônia é usualmente descrita como abaixo (Teixeira et al., 1998; Nunes et al., 2003; Kerbauy, 2004; Bhattacharjee et al., 2008):



(onde, e<sup>-</sup> simboliza elétron e Pi simboliza o fosfato inorgânico).

A amônia formada é protonada (H<sup>+</sup>), convertendo-se, em amônio ou íon amoniacal (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), constituindo-se na forma de fato encontrada nas células (Kerbauy, 2004).

### **2.3.1 Fixação biológica de nitrogênio por bactérias associadas a gramíneas do gênero *Brachiaria***

A primeira associação estudada detalhadamente entre uma gramínea forrageira tropical e bactérias fixadoras de nitrogênio foi descrita entre *Paspalum notatum* (grama batatais) e *Azotobacter paspali*, em 1966 pela engenheira agrônoma, pioneira em biologia do solo, Dra. Johanna Döbereiner (Baldani & Baldani, 2005). Esta interação

resultou em aproximadamente 10% do nitrogênio assimilado pela planta (20 kg de N/ha/ano) via fixação biológica (Reis Junior et al., 2009).

Mesmo com as observações de perda de N em gramíneas *Brachiaria*, relatos na literatura indicam a não redução significativa em produtividade em alguns genótipos deste gênero, essas perdas de N poderiam estar sendo supridas pela fixação biológica de nitrogênio, que pelos poucos estudos disponíveis, poderia ser responsável pela fixação de 30 a 45 kg de N/ha/ano no sistema solo-planta (Boddey & Victoria, 1986; Loureiro & Boddey, 1988; Reis Junior, 2004).

Diferentes trabalhos, tais como: Brasil et al., (2005) e Reis Junior et al., (2008), entre outros, já haviam comprovado a existência da associação de bactérias diazotróficas com gramíneas do gênero *Brachiaria*, porém diferentes espécies vegetais parecem obter contribuições via FBN de forma diferenciada, como *B. decumbens* e *B. humidicola* com saldo de N via FBN bem mais significativo que aquelas apresentadas por *B. radicans* e *B. ruziziensis* (Loureiro & Boddey, 1988).

Embora estudos tenham mostrado que as contribuições de FBN não ultrapassaram 30% a 40% do N acumulado pelas plantas, a quantidade de N fixado por bactérias diazotróficas e passado à planta pode ser suficiente para proporcionar um balanço nulo ou até positivo de N para o sistema solo-planta, em sistemas de manejo mais extensivos, permitindo, desta forma, maior longevidade da pastagem com produtividade aceitável (Reis Junior, 2003).

Trabalhos vêm demonstrando que diferentes espécies de bactérias estão em associação com gramíneas do gênero *Brachiaria* em diferentes nichos, entre estas estão: *Azospirillum sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizobium sp.*, *Sphingomonas sp.*, *Stenotrophomonas sp.*, e *Xanthomonas sp.* (Silva et al., 2010).

## 2.4 Diversidade genética de micro-organismos

As bactérias apresentam imensa diversidade genética e desempenham funções primordiais na manutenção dos ecossistemas. Apesar da elevada importância dos micro-organismos o número de grupos microbianos conhecidos e descritos que caracteriza a diversidade de espécies, configura uma pequena parcela da elevada diversidade microbiana encontrada na natureza (Pace, 1997; Andreote et al., 2008a).

O grande avanço do conhecimento sobre a diversidade microbiana foi proporcionado graças à evolução das metodologias de biologia molecular, aplicadas ao estudo do meio ambiente (Amann et al., 1995). Anteriormente a diversidade baseava-se em técnicas de cultivo, porém o cultivo de micro-organismos fornece informações limitadas, devido a não existência de meios de cultura que reproduzam com precisão os diferentes nichos ecológicos no ambiente de laboratório (Roesch et al., 2010; Andreote et al., 2009).

Vários benefícios científicos são esperados a partir do melhor conhecimento sobre a diversidade microbiana (Hunter-Cevera, 1998; Loredó-Osti et al., 2004; Torres et al., 2008; Moreira et al., 2010), dentre estes, está o papel desempenhado pelas comunidades microbianas nos ambientes terrestres e o conhecimento de suas interações com as plantas. Neste aspecto, vários estudos têm explorado a diversidade de bactérias associadas às plantas, obtendo-se novas informações para o conhecimento de mecanismos envolvidos na interação bactéria-planta (Kuklinsky-Sobral, et al., 2004; Reis Junior et al., 2006; Andreote et al., 2008a; Castro et al., 2011).

Os avanços na biologia molecular permitiram que o estudo da genética dos micro-organismos progredisse consideravelmente, favorecendo sua classificação e diagnóstico, mas também a melhor compreensão da sua evolução e filogenia e nível de associação com a espécie vegetal e idade fenológica (Andreote et al., 2008b; Silva et al., 2010).

Dentre estas técnicas há a extração do DNA (ácido desoxirribonucléico) genômico, o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polimerase Chain Reaction*), a análise do gene 16S rRNA e outros marcadores de DNA, como o BOX (técnica dependente de cultivo) que identifica os micro-organismos no nível de gênero e espécies, além de permitir as correlações entre ambiente e genótipo (Cheneby et al., 2000). A técnica BOX-PCR amplifica regiões repetidas encontradas no genoma bacteriano (os elementos Box) (Marques et al., 2008) e o PCR-DGGE (PCR-*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (técnica independente do cultivo) que possibilita o acesso à diversidade genética das populações bacterianas de diferentes nichos (Lacava et al., 2006; Andreote et al., 2009), permitindo a análise funcional com a utilização de DGGE para genes específicos como o gene *nifH* (Saito et al., 2007).

## **2.5 Potencial biotecnológico de bactérias associadas às plantas**

De elevada importância para agricultura, a associação micro-organismo/planta pode promover elevados benefícios, reduzindo a necessidade de fertilizantes químicos e promovendo o crescimento vegetal (Egamberdiyeva, 2007; Lira-Cadete et al., 2012; Santos et al., 2012). Entretanto os genótipos dos organismos envolvidos na associação podem determinar os resultados biológicos desta parceria (Loredo-Osti et al., 2004), influenciando nos diferentes mecanismos que estão envolvidos na promoção de crescimento vegetal, tais como, a fixação biológica de nitrogênio, produção de enzimas extracelulares, solubilização de fosfato inorgânico, produção de fitorhônionio, entre outros.

### **2.5.1 Enzimas extracelulares**

As enzimas extracelulares produzidas por micro-organismos são capazes de degradar compostos orgânicos como o amido, a pectina e a celulose (Uenoje & Pastore, 2007), desta forma tornando-se um produto de grande interesse biotecnológico para as

indústrias (tais como, tecido, alimentos, papel, entre outras), por apresentar menor custo e maior facilidade de produção e manipulação (Silva et al., 2006; Oliveira et al., 2007; Souza et al., 2008).

Neste contexto, as enzimas que compõem o complexo enzimático responsável por romper a parede celular vegetal são amplamente estudadas (Signor et al., 2010), sendo utilizada com intuito de propiciar o aumento da digestibilidade de silagens e rações, a extração de amido, pigmentos e óleos vegetais (Pandey et al., 2001; Compestrini et al., 2005; Signor et al., 2010). Além da importância industrial, diversos trabalhos vêm evidenciando a importância de enzimas como a pectinase e a celulase, no processo de penetração e colonização das plantas por parte das bactérias endofíticas (Robledo et al., 2008; Compant et al., 2010).

### **2.5.2 Solubilização de fosfato inorgânico**

Após o nitrogênio, o fósforo é o macronutriente mais limitante do crescimento vegetal, fazendo parte de processos biológicos como a fotossíntese, síntese de ATP e DNA. Os solos podem apresentar deficiência de fósforo por encontrar-se indisponível para as plantas em formas inorgânicas insolúveis (Kang et al., 2002; Souchie & Abboud, 2007; Barroso & Nahas, 2008; Richardson et al., 2009).

Alguns micro-organismos possuem a capacidade de solubilizar fontes de P inorgânico (bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico), disponibilizando-o em forma assimilável à planta, por meio da produção de enzimas, compostos quelantes e complexantes, que vão variar de acordo com as espécies microbianas e as formas químicas de fosfato (Novais et al., 2007), diminuindo e otimizando o uso de fertilizantes fosfatados na agricultura (Rodrigues et al., 2006; Souchie & Abboud, 2007). Segundo Shuimi et al., (2009) as bactérias solubilizadoras de fosfato vêm recebendo a atenção dos pesquisadores pela possibilidade de apresentarem mais de um mecanismo de promoção de crescimento vegetal, como a fixação de nitrogênio atmosférico.

### 2.5.3 Síntese de fitohormônios da classe das auxinas

O ácido indol acético (AIA) é o fitohormônio que melhor caracteriza a classe das auxinas (Hayat et al., 2010), sendo produzido nos locais de crescimento ativos dos vegetais (como o meristema apical, gemas axilares e folhas jovens) e por bactérias associadas as plantas (Kuss et al., 2007; Berg, 2009),

O AIA é sintetizado por várias rotas bioquímicas, mas a principal utiliza o aminoácido triptofano como precursor (Taiz & Zeiger, 2006; Richardson et al., 2009). Segundo Kuss et al. (2007), alguns gêneros bacterianos são capazes de sintetizar alta concentração de AIA por via metabólica independente do triptofano, como é o caso do gênero *Azospirillum*, que além de fixar o nitrogênio, produz AIA via dependente e independente do triptofano. Não sendo influenciada pelo nicho de colonização bacteriano (Ferreira et al., 2011).

### 2.5.4 Produção de moléculas *quorum sensing*

O mecanismo de monitoramento populacional ou *Quorum Sensing* (QS) pode regular a produção de metabólitos secundários e a formação de biofilme (Choudhary et al., 2009). As moléculas de QS atuam no mecanismo de comunicação microbiana (Nadell et al., 2008) e as bactérias que utilizam essas moléculas estão associadas principalmente a plantas e animais (Kievit & Iglewski, 2000). Acyl lactona homoserina (ALH) é o tipo de molécula sinalizadora dominante (Camilli & Bassler, 2006), sua concentração em função da densidade populacional, ajusta a expressão de genes responsáveis por diferentes fenótipos (Rumjanek et al., 2004).

Segundo Melo et al. (2012), os biofilmes são constituídos de bactérias, estas aderidas a uma determinada superfície e envolvidas por uma matriz de polímeros orgânicos, visando a proteção (Rumjanek et al., 2004) e favorecendo a manutenção da densidade populacional, desta forma facilitando as interações benéficas ou deletérias entre plantas e bactérias (Pinton et al., 2010).

Os biofilmes não apenas apresentam a função de proteção, conferindo vantagens, tais como, a elevação da resistência, aproximação e aderência, além de facilitar o desenvolvimento dos micro-organismos em diferentes partículas suportes (Pereira et al., 1997; Nadell et al., 2008; Andreote et al., 2009; Melo et al., 2012).

## BIBLIOGRAFIA CITADA

- AFONSO, J.R.; ART, O.; COSTA, D.S. et al. Combinações de fontes de nitrogênio no desenvolvimento e rendimento do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.41, p.391-398, 2011.
- AMANN, R.L.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews**, v.59, p.143-169, 1995.
- ANDREOTE, F.D.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.417-432, 2009.
- ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; AZEVEDO, J.L. Diversidade molecular de microorganismos endofíticos. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P. et al. **Microorganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. 1.ed. Guaíba: Agrolivros, 2008a. p.233-258.
- ANDREOTE, F.D.; MENDES, R.; DINI-ANDREOTE, F. et al. Transgenic tobacco revealing altered bacterial diversity in the rhizosphere during early plant development. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.93, p.415-424, 2008b.
- ARAÚJO, W.L.; LACAVA, P.T.; MARCON, J. et al. **Guia prático: isolamento e caracterização de micro-organismos endofíticos**. 1.ed. Piracicaba: CALO, 2010. 167p.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.77, p.549-579, 2005.
- BALDOTTO, L.E.B.; BALDOTTO, M.A.; OLIVEIRA, F.L. et al. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.34, p.349-360, 2010.
- BARRETTI, P.B.; SOUZA, R.M.; POZZA, E.A. Bactérias endolíticas como agentes promotores de crescimento de plantas de tomateiro e de inibição *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, p.731-739, 2008.
- BARROSO, C.B.; NAHAS, E. Solubilização de fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.529-535, 2008.
- BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspective for controlled use of microorganisms in agriculture. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.84, p.11-18, 2009.
- BERGAMASCHI, C.; ROESCH, L.F.W.; QUADROS, P.D. et al. Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de sorgo forrageiro. **Ciência Rural**, v.37, p.727-733, 2007.

- BHATTACHARJEE, R.B.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S.N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for nan-legumes: prospects and challenges. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.80, p.199-209, 2008.
- BODDEY, R.M.; JANTALIA, C.P.; MACEDO, M.O. et al. Potential of carbon Atlantic forest region Brazil. In: Lal, R.; CERRI, C.C.; BERNOUX, M.; ETCHEVERS, J. et al. **Carbon sequestration in soil of Latin American**. The Haworth Press. Binghamton. New York, 2006. p.305-347.
- BODDEY, R.M. & VICTORIA, R.L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using N<sup>15</sup> labelled organic matter and fertilizer. **Plant & Soil**, v.90, p.256-292.1986.
- BRASIL, M.S.; BALDANI, J.; BALDANI, V.L.D. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do pantanal sul matogrossense. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v.29, p.179-190, 2005.
- CAMILLI, A.; BASSELER, B.L. Bacterial small-molecule signaling pathways. **Science**, v.311, p. 1113-1116, 2006.
- CAMPESTRINI, E.; SILVA, V.T.M.; APPELT, M.D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.2, p.259-272, 2005.
- CASTRO, C.B.; KIDD, P.S. FERNANDES, A.P. et al. Endophytic and rhizoplane bactéria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: isolation and characterisation. **Plant Soil**, v.340, p.413-433, 2011.
- CHENEBY, D.; PHILIPPOT, L.; HARTMANN, A. et al. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v.34, p.121-128, 2000.
- CHOUDHARY, D.K.; PRAKASH, A.; WRAY, U. et al. Insights of the fluorescent pseudomonas in plant growth regulation. **Current Science**, v.97, p.170-179, 2009.
- CHUBATSU, L.S.; MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M. et al. Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant Soil**, v.356, p.197-207, 2011.
- COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo-and endosphere of plant: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biotechnology**, v.42, p.669-678, 2010.
- COMPANT, S.; KAPLAN, H.; SESSITSCH, A. et al. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. **Microbiology Ecology**, v.63, p.84-93, 2008.
- DIAS, A.C.F.; COSTA, F.E.C.; ANDREOTE, F.D. et al. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.25, p.189-195, 2009.
- EGAMBERDIYEVA, D. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. **Applied Soil Ecology**, v.36, p.184-189, 2007.
- FERRARA, F.I.S.; OLIVEIRA, Z.M.; GONZALES, H.H.S. et al. Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. **Plant Soil**, v.347, p.381-400, 2011.
- FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and nan-leguminous plants. **Plant Soil**, v.321, p.35-59, 2009.
- FRANCO, J.B.S.; ROSA, R. Metodologia de coleta de dados radiométricos em pastagens do gênero *Brachiaria* com diferentes estágios de degradação. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 10., 2003, Belo Horizonte **Anais...** Belo Horizonte: INPE, 2003. p.2483-2491.

- HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Ann Microbiol**, v.60, p.579-598, 2010.
- HUNTER-CEVERA, J.C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, v.1, p.278-285, 1998.
- KANG, S.C.; HA, C.G. LEE. T.G. et al. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a soil-inhabiting fungus *Fomitopsis* sp. PS 102. **Research Communications**, v.4, p.439-442, 2002.
- KERBAUY, G.B.K. **Fisiologia vegetal**. 1.ed. Guanabara: Koogan, 2004. 452p.
- KIEVIT, T.R.; IGLEWSKI, B.H. Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships. **Infection and Immunity**, v.68, p.4839-4849, 2000.
- KUKLINSKY-SOBRA, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R. et al. Isolation and characterization of soybean associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v.6, p.1244-1251, 2004.
- KUSS, A.V.; KUSS, V.V.; LOVATO, T. et al. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indol acético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1459-1465, 2007.
- LACAVA, P.T.; ANDREOTE, F.D.; ARAÚJO, W.L. et al. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR específico e DGGE. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.637-642, 2006.
- LIRA-CADETE, L.; FARIAS, A.R.B. RAMOS, A.P.S. et al. 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.
- LOREDO-OSTI, C.; LÓPEZ-REYES, L.; ESPINOSA-VICTORIA, D. Bacteria promotoras del crecimiento vegetal asociadas com gramíneas. **TERRA Latinoamericana**, v.22, p.225-239, 2004.
- LOUREIRO, M. F.; BODDEY, R.M. Balanço de nitrogênio em quatro gramíneas de gênero *Brachiaria*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.23, p.1343-1353, 1988.
- MAGNANI, G.S.; DIDONET, C.M.; CRUZ L.M. et al. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetic Molecular Research**, v.9, p.250-258, 2010.
- MARQUES, A.S.A.; MARCHAISON, A.; GARDAN, L. et al. BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae* - P. viridiflava group. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p106-115, 2008.
- MELO, P.C.; FERREIRA, L.M.; NADER-FILHO, A. et al. Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina. **Bioscience Journal**, v.28, p.94-99, 2012.
- MONTEIRO, F.A.; RAMOS, A.K.B.; CARVALHO, D.D. et al. Cultivo de *Brachiaria brizantha* Stapf. cv. Mandaru em solução nutritiva com omissões de macronutrientes. **Science Agriculture**, v.1, p 135-141, 1995.
- MOREIRA, F.M.S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R.S.A. et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicação. **Comunicata Scientiae**, v.2, p.74-99, 2010.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2.ed. UFPA: Lavras, 2006. 729p.
- NADELL, C. D; XAVIER, J. B; LEVIN, S. A et al. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. **Plos Biology**, v.6, p.1-14, 2008.
- NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.V.H.; BARROS, N.F. et al. **Fertilidade do Solo. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 2007. 1017p.
- NUNES, F.S.; RAIMONDI, A.C.; NIEDWIESKI, A.C. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. **Química Nova**, v.26, p.872-879, 2003.

- OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S. et al. Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.61-66, 2007.
- OLIVEIRA, F.C.; ROSA, M.J.; CAIXETA FILHO, J.V. Estimativa da oferta de fertilizantes como carga de retorno no ambiente portuário brasileiro entre 2005 e 2009. **Informações Econômicas**, v.40, p.45-43, 2010.
- PACE, N.R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v.276, p.734-740, 1997.
- PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C.R. et al. Advances in Microbial Amylases. **Biotechnology Applied and Biochemical**, v.31, p.135-152, 2001.
- PARIS, W.; CECATO, U.; SANTOS, G.T. et al. Produção e qualidade de massa de forragem nos estratos da cultivar Coastcross-1 consorciada com *Arachis pintoi* com e sem adubação nitrogenada. **Acta Scientiarum Animal Science**, v.30, p.135-143, 2009.
- PEREIRA, A.P.A.; SILVA, M.C.B.; OLIVEIRA, J.R.S. et al. 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.
- PEREIRA, J.A.R.; CAMPOS, J.R.; GIANOTTI, E.P. et al. Aderência de microorganismos em partículas de carvão utilizadas no tratamento de esgoto sanitário. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 19., 1997, Foz do Iguaçu **Anais...** Foz do Iguaçu: ABCS, 1997. p.552-561.
- PINTON, R.; DIAS, A.; XAVIER, T.F. et al. Caracterização morfocultural, biossíntese de autoindutor e formação de biofilme por rizobactérias de 88 hortaliças. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p.284-293, 2010.
- RAMOS, A.S.; SANTOS, T.M.C.; SANTANA, T.M. Ação do *Azospirillum lipoferum* no desenvolvimento de plantas. **Revista Verde de Agronegócio e Desenvolvimento Sustentável**, v.5, p.113-117, 2010.
- REIS JUNIOR, F.B.; MACHADO, C.T.T.; MACHADO, A.T. et al. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v.32, p.1139-1146, 2008.
- REIS JUNIOR, F.B.; MENDES, I.C.; REIS, V.M. et al. **Fixação Biológica de Nitrogênio: uma revolução na agricultura**, 2009. 32p (EMBRAPA).
- REIS JUNIOR, F.B.; REIS, V.R.; TEIXEIRA, K.R.S. Restrição do 16S-23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria* spp.. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.431-438, 2006.
- REIS JUNIOR, F.B.; TEIXEIRA, K.R.S.; URQUIAGA, S. et al. **Associação de bactérias promotoras de crescimento de plantas do gênero *Azospirillum* com diferentes espécies de *Brachiaria***, 2003. 51p (EMBRAPA).
- REIS, L.G.; REIS, P.R.; FERREIRA, I.C. et al. Avaliação econômica da aplicação de fertilizantes nitrogenados em pastagens destinadas a vacas em lactação. **Revista Agrotecnica**, v.34, p.730-738, 2010.
- REITER, B.; WERMBTER, N.; GYAMFI, S. et al. Endophytic *Pseudomonas* spp. populations of pathogen-infected potato plants analysed by 16S rDNA-and 16S rRNA-based denaturing gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, v.257, p.397-405, 2003.
- RICHARDSON, A.E.; BAREA, J.M.; McNEILL, A.M. et al. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**, v.321, p.305-339, 2009.
- ROBLEDO, M.; JIMENEZ-ZURDO, J.I.; VELAZQUEZ, E. et al. Rhizobium cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic of legume host roots. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.105, p.7064-7069, 2008.

- RODRIGUES, L.S.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M. et al. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inoculado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.275-284, 2006.
- ROESCH, L.F.W.; FULTHORPE, R.R.; JACCQUES, R.J.S. et al. Biogeography of diazotrophic bacteria in soils. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v.26, p.1503-1058, 2010.
- ROESCH, L.F.W.; PASSAGLI, L.M.P.; BENTO, F.M. et al. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.31, p.1367-1380, 2007.
- ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **The American Phytopathological Society**, v.19, p.827-837, 2006.
- RUMJANEK, 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.
- SAITO, A.; IKEDA, S.; EZURA, H.; MINAMISAWA, K. Microbial community analysis of the phytosphere using culture-independent methodologies. **Microbes and Environments**, v.22, p.93-105, 2007.
- SALA, V.M.R.; FREITAS, S.S.; DANZELI, V.P. et al. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.29, p.345-352, 2005.
- SANTOS, I.B.; LIMA, D.R.M.; BARBOSA, J.G. et al. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de-açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância a salinidade. **Bioscience Journal**, v.28, p.142-149, 2012.
- SHIOMI, H.F.; VICENSI, M.; DEDORDI, C. et al. Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico, presentes em líquido ruminal bovino. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.4, p.294-297, 2009.
- SIGNOR, A.A.; BOSCOLO, W.R.; BITTENCOURT, F. Desempenho de juvenis de tilápia-do-nylo alimentados com rações contendo complexo enzimático. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.977-983, 2010.
- SILVA, A.A.O.; FELIPE, T.A.; BACH, E.E. Ação do *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento das plantas de trigo (variedade IAC-24) e cevada (variedade CEV 95033). **Revista Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal**, v.3, p.29-35, 2004.
- SILVA, K.C.; PORTO, A.L.F.; TEIXEIRA, M.F.S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. **Acta Amazonica**, v.36, p.299-306, 2006.
- SILVA, L.L.G.G.; ALVES, G.C.; RIBEIRO, J.R.A. et al. Fixação biológica de nitrogênio em pastagens com diferentes intensidades de corte. **Archivos de Zootecnia**, v.59, p.21-30, 2010.
- SOUCHIE, E.L.; ABOUD, A.C.S. Solubilização de fosfato por micro-organismos rizosféricos de genótipos de Guandu cultivados em diferentes classes de solo. **Ciências Agrárias**, v.28, p.11-18, 2007.
- SOUZA, H.Q.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S. Seleção de basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Revista Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.116-124, 2008.
- SPAEPEN, S.; DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A. et al. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. **Plant Soil**, v.312, p.15-23, 2008.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed. 2006. 719p.
- TAVARES FILHO, J.; FERREIRA, R.R.M.; FERREIRA, V.M. Fertilidade química do solo sob pastagens formadas com diferentes espécies nativas e com *Brachiaria*

- decumbens* manejadas com queimadas anuais. **Ciências Agrárias**, v.32, p.1771-1782, 2011.
- TEIXEIRA, K.R.S.; MARIN, V.A.; BALDANI, J.I. **Nitrogenase: bioquímica do processo de FBN**, 1998. 25p (EMBRAPA).
- TING, A.S.Y.; MEON, S.; KADIR, J. et al. Endophytic microorganisms as potential growth promoters of banana. **BioControl**, v.53, p.541-553, 2008.
- TORRES, A.R.; ARAÚJO, W.L.; CURSINO, L. et al. Diversity of endophytic enterobacteria associated with different host plants. **The Journal of Microbiology**, v.46, p.373-379, 2008.
- TROEH, F.R.; THOMPSON, L.M. **Solos e fertilidade do solo**. 6.ed. São Paulo: Andrei, 2007. 718p.
- UENOJO, M.; PASTORE, G.M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v.30, p.388-394, 2007.
- USBERTI, R.; MARTINS, L. Sulphuric acid scarification effects on *Brachiaria brizantha*, *B. humidicola* and *Panicum maximum* seed dormancy release. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, p.145-147, 2007.
- VEGA, F. E.; PAVA-RIPOLL, M.; POSADA, F. et al. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. **Journal Basic of Microbiology**, v.45, p.371-380, 2005.
- VERMA, S.C.; SINGH, A.; CHOWDHURY, S.P. et al. Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp. using green fluorescent protein reporter. **Biotechnology Letters**, v.26, p.425-429, 2004.
- ZIMMER, A.H.; EUCLIDES, V.B.P.; MACEDO, M.C.M. Manejo de plantas forrageiras do gênero *Brachiaria*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 9., 1988, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1988. p.141-184.

### 3 CAPÍTULO 01

#### Potencial biotecnológico e diversidade de bactérias potencialmente diazotróficas associadas à *Brachiaria*

**Resumo:** Pastagens formadas por gramíneas do gênero *Brachiaria* podem beneficiar-se com o processo de fixação biológica de nitrogênio, garantindo a essas plantas maior longevidade e menor custo com adubos nitrogenados. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivos: avaliar a densidade populacional de bactérias diazotróficas associadas a raízes de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*; verificar a diversidade genética bacteriana e seu potencial biotecnológico. Para tanto, plantas de *B. decumbens* e *B. humidicola* foram coletadas de pastagens estabelecidas no município das Correntes e amostras de raízes e da rizosfera foram utilizadas para o isolamento de bactérias em meio de cultura NFb semi-sólido. Tendo a densidade populacional estimada, 80 isolados bacterianos foram avaliados quanto a capacidade de solubilização de fosfato inorgânico, síntese de ácido indol acético (AIA) por diferentes rotas bioquímicas, produção de enzimas extracelulares (pectinas - pectato liase e poligalacturonase, celulase e amilase) e de moléculas *quorum sensing* do tipo N-acyl lactona homoserina (ALH). A diversidade genética das diazotróficas foi avaliada por meio da técnica de BOX-PCR. Foi observado que as gramíneas forrageiras *B. decumbens* e *B. humidicola* apresentaram associação com bactérias diazotróficas, com elevada densidade populacional, estimada pelo número mais provável variando entre  $10^4$  a  $10^5$  células  $g^{-1}$  de solo ou tecido vegetal fresco, não diferindo entre espécies vegetais e nichos de avaliação. A caracterização fenotípicas dos 80 isolados bacterianos revelou que 95,0% apresentaram halo de crescimento no interior do meio de cultura NFb, livre de fonte nitrogenada, sendo consideradas como diazotróficas. Quanto à produção de AIA, em meio acrescido de L-triptofano, 91,2% foram positivas, com destaque para o isolado UAGB 167 com produção de  $138,6 \mu g mL^{-1}$  de AIA. Com relação às linhagens em meio sem o L-triptofano, 93,7% foram positivas, com a maior produção sendo de  $44,2 \mu g mL^{-1}$  do isolado UAGB 109, evidenciando a produção deste fitohormônio por diferentes rotas bioquímicas, dependente e independente de L-triptofano, e em ambos os testes houve destaque da gramínea *B. humidicola* e o nicho endofítico de raiz. Para a solubilização de fosfato inorgânico, 66,2% das bactérias foram positivas, classificando-se o índice de solubilização (IS) em baixo (IS<2,0), médio (IS de 2,0 a 4,0) e alto (IS>4,0). Essa classificação permitiu observar que 77,3% dos isolados apresentaram IS superior ou igual a 2,0, indicando a existência de elevada frequência de bactérias associadas às gramíneas do gênero *Brachiaria*, com médio e alto potencial de solubilização de fosfato inorgânico, com destaque para linhagem UAGB 138, esta com IS = 6,56. A produção das enzimas extracelulares foi evidenciada em 46,2% dos isolados, com 38,7% produzindo um tipo, 6,2% dois tipos e 1,2% os quatro tipos de enzimas avaliadas. Para todas as enzimas, foram observados valores de índice enzimático superior a 2,0. Para a produção da molécula ALH, 56,2% dos isolados apresentaram-se positivos, não diferenciando entre nichos e espécies vegetais. A análise da variabilidade genética demonstrou elevada diversidade entre os isolados dos diferentes nichos e espécies vegetais, estes em grande parte abaixo de 70,0% de similaridade segundo a matriz genética de Jaccard, porém ao avaliar a formação dos grupos ou *clusters*, é constatado o agrupamento dos isolados por nicho ou espécie

vegetal. Desta forma, pode-se concluir que as gramíneas *B. decumbens* e *B. humidicola* apresentaram elevada colonização bacteriana diazotrófica na região da raiz, esta com grande diversidade genética e com elevado potencial de crescimento vegetal, sendo capaz de solubilizar fosfato inorgânico, sintetizar AIA via dependente e independente do aminoácido precursor L-triptofano, produzir enzimas extracelulares (celulase, pectinase e amilase) e molécula *quorum sensing*.

**Palavras chaves:** bactérias endofíticas, BOX-PCR, fixação biológica de nitrogênio, gramíneas forrageiras, variabilidade genética, promoção de crescimento vegetal

**Biotechnological potential and diversity of diazotrophic bacteria potentially associated with *Brachiaria***

**Abstract:** Pastures of grasses of the genus *Brachiaria* can benefit from the process of biological nitrogen fixation, ensuring the longevity of these plants and lower cost nitrogen fertilizers. In this context, this study aimed to assess the population of diazotrophic bacteria associated with roots of *Brachiaria decumbens* and *Brachiaria humidicola* verify the bacterial genetic diversity and biotechnological potential. For this purpose, plants of *B. decumbens* and *B. humidicola* were collected from pastures established in the municipality of Correntes and samples of roots and rhizosphere were used for isolation of bacteria in culture medium NFB semisolid. Dent estimated population density, 80 bacterial isolates were evaluated for the ability to solubilize inorganic phosphate, the synthesis of indole acetic acid (IAA) by different biochemical pathways, production of extracellular enzymes (pectins - pectate lyase and polygalacturonase, cellulase and amylase) and quorum sensing molecules of the type N-acyl homoserine lactone (HLA). Genetic diversity of diazotrophic was assessed by BOX-PCR technique. It was observed that the grasses *B. decumbens* and *B. humidicola* were associated with diazotrophic bacteria with high population density, estimated by most probable number ranging from  $10^4$  to  $10^5$  cells g<sup>-1</sup> fresh soil or plant tissue did not differ between plant species and niches evaluation. Phenotypic characterization of the 80 bacterial isolates revealed that 95.0% had a halo of growth inside the culture medium NFB, free of nitrogen source, being considered diazotrophic. The production of IAA in medium supplemented with L-tryptophan, 91.2% were positive, especially for isolated UAGB 167 with production of 138.6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  EIA. With respect to the strains in medium without L-tryptophan, 93.7% were positive, with most production being 44.2  $\text{mg } \mu\text{L}^{-1}$  isolate UAGB 109, showing the production of this phytohormone by different biochemical pathways, dependent and independent L-tryptophan, and in both tests were highlighted the grass *B. humidicola* and root endophytic niche. For the solubilization of inorganic phosphate, 66.2% of bacteria were positive, ranking the solubilization index (SI) in low (SI <2.0), medium (2.0-4.0 IS) and high (IS > 4.0). This classification allowed us to observe that 77.3% of isolates had IS greater than or equal to 2.0, indicating the existence of high rates of bacteria associated with grasses of the genus *Brachiaria*, medium and high potential for solubilization of inorganic phosphate, especially UAGB line 138, with this IS = 6.56. The production of extracellular enzymes was observed in 46.2% of the isolates, with 38.7% producing a kind, two kinds 6.2% and 1.2% for the four enzymes tested. All enzymes were observed enzymatic index values higher than 2.0. For the production of the HLA molecule, 56.2% of the isolates were positive, not differentiating between niches and plant species. The analysis of genetic variability showed high diversity among isolates of different niches and plant species, these largely below 70.0% similarity according to Jaccard's genetic blueprint, but to evaluate the formation of groups or clusters, is found the cluster analysis by niche or plant species. Thus, it can be concluded that the grasses *B. decumbens* and *B. humidicola* showed high diazotrophic bacterial colonization in the root area, this one with great genetic diversity and high potential for plant growth, being able to solubilize

inorganic phosphate pathway to synthesize IAA dependent and independent of the precursor amino acid L-tryptophan, producing extracellular enzymes (cellulase, pectinase and amylase) and quorum sensing molecule.

**Keywords:** biological nitrogen fixation, BOX-PCR, endophytic bacteria, forage grasses, genetic variability, plant growth promotion

### 3.1 Introdução

Na pecuária brasileira, grandes áreas de pastagens são cultivadas com gramíneas do gênero *Brachiaria*, devido a sua elevada adaptabilidade e resistência aos diferentes tipos de solos (Franco & Rosa, 2003; Silva et al., 2010). O nitrogênio é o mais importante elemento na agricultura, sua ausência torna-se fator limitante ao crescimento vegetal. Tendo em vista o elevado custo dos fertilizantes nitrogenados e que 50% do N aplicado é lixiviado e/ou volatilizado, a fixação biológica vem a fornecer parte do nitrogênio de forma mais econômica (reduzindo os custos com fertilizantes) e eficiente à planta, evitando perdas e contribuindo com o meio ambiente (Silva et al., 2004; Medeiros et al., 2007; Troeh & Thompson, 2007; Adesemoye & Kloepper, 2009; Franche et al., 2009; Roesch et al., 2010).

As bactérias fixadoras de nitrogênio associadas às plantas apresentam diferentes mecanismos de interação, estas podendo ser influenciadas por fatores, como, o genótipo da planta e do micro-organismo e por fatores ambientais (Hardoim et al., 2008). Desta forma é possível constatar que diferentes genótipos de plantas podem influenciar na associação com o micro-organismo e, conseqüentemente, com sua contribuição na fixação biológica de nitrogênio e de outros mecanismos de promoção de crescimento vegetal (Canuto et al., 2003; Reis Junior et al., 2006; Rodrigues et al., 2006).

Atualmente, vêm-se descobrindo grande variedade de micro-organismos que apresentam um elevado potencial biotecnológico, que além de fixar o nitrogênio atmosférico, apresentam a capacidade de sintetizar enzimas extracelulares, solubilizar fósforo inorgânico, produzir fitohormônios, como o ácido indol acético (AIA), que pode ser sintetizado por diferentes rotas bioquímicas, bem como outros fatores de promoção de crescimento (Morgan et al., 2005; Radwan et al., 2005; Baldotto et al., 2010; Merzaeva & Shirokikh, 2010).

Os micro-organismos com potencial de crescimento vegetal podem ser encontrados habitando diferentes nichos no hospedeiro, de forma endofítica (interior da planta) ou epifítica (superfície externa do vegetal) (Zhang et al., 2006; Compant et al., 2010). Entretanto, bactérias de ambos os nichos podem proporcionar benefícios ao hospedeiro (Badri et al., 2009) e a utilização dessas bactérias em pastagens podem representar uma importante alternativa para o estabelecimento e elevação da produção de gramíneas forrageiras (Loredó-Osti et al., 2004).

Neste contexto, o objetivou-se com o presente trabalho, isolar bactérias em meio sem fonte nitrogenada, associadas às gramíneas *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*, nos nichos rizosfera e endofítico de raiz; identificar e quantificar a produção bacteriana de AIA, via dependente e independente de triptofano; identificar e avaliar os isolados solubilizadores de fosfato inorgânico; identificar e avaliar a produção enzimática bacteriana de celulase, amilase e pectinase; analisar a capacidade de produção de moléculas *quorum sensing*; analisar a variabilidade genética de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas as gramíneas estudadas e avaliar viabilidade genética/fenotípica dos isolados avaliados.

## **3.2 Material e métodos**

### **3.2.1 Áreas de estudo e material vegetal**

As coletas foram realizadas em pastagens de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* cultivadas na Fazenda Pau Ferro no município das Correntes, no Agreste Meridional do Estado de Pernambuco, em pastagens estabelecidas com cerca de cinco anos de cultivo e sem adubação.

Os locais foram georreferenciados com o auxílio de um GPS (Sistema de Posicionamento Global), tendo as coordenadas centrais das pastagens: *Brachiaria decumbens* - S 09°06'00" e W 36°21'29" e *Brachiaria humidicola* - S 09°06'53" e W

36°21'29". De cada área da pastagem, aleatoriamente, coletaram-se três amostras vegetais e de solo, a uma profundidade de 0-0,2 m. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e em seguida levadas ao Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana, da Unidade Acadêmica de Garanhuns/Universidade Federal Rural de Pernambuco, para processamento e análises.

As amostras de solo foram encaminhadas para análise das características químicas e físicas no Laboratório de Química do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Características químicas e físicas dos solos coletados nas áreas de pastagens *Brachiaria decumbens* (BD) e *Brachiaria humidicola* (BH) cultivadas na fazenda Pau Ferro no município das Correntes-PE

Análises Químicas										
Área	pH	P mg dm <sup>-3</sup>		K	Ca	Mg	Na	Al <sup>3+</sup>	H+Al	C total dag kg
-----cmol <sub>c</sub> dm <sup>3</sup> -----										
BD	6,26	8,24	0,07	0,35	0,60	0,09	0,10	0,65	0,08	
BH	5,78	3,67	0,11	0,40	0,50	0,05	0,15	1,00	0,09	

Análises Físicas							
Área	Areias (%)			Silte	Argila	Argila dispersa em água	Textura
	Grossa	Fina	Total	-----%-----	----g g <sup>-1</sup> -----		
BD	49,18	24,13	73,31	18,24	08,44	0,016	Areia franca
BH	47,17	20,64	61,81	17,22	14,98	0,025	Franca arenosa

### 3.2.2 Isolamento de bactérias potencialmente diazotróficas e estocagem bacteriana

O isolamento de bactérias da rizosfera e endofítica de raiz foi realizado segundo Döbereiner et al. (1995) e Kuklinsky-Sobral et al. (2004), com algumas modificações. Para isolamento de bactérias potencialmente diazotróficas associadas à rizosfera, 5 g de solo foram colocados em frascos, tipo erlernmeyer, contendo 5 g de pérolas de vidro e 50 mL de tampão fosfato salino (PBS: 1,44 g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,20 g L<sup>-1</sup> de KCl; 8,00 g L<sup>-1</sup> de NaCl; pH 7,4). Estes frascos foram mantidos sob agitação (90 rpm) a temperatura ambiente por 40 min.

Em seguida, diluições seriadas ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ ), em tampão PBS, foram inoculadas, em triplicatas, em meio semi-sólido NFb [5 g L<sup>-1</sup> de ácido málico; 0,5 g L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,1 g L<sup>-1</sup> de NaCl; 0,01 g L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 4 mL L<sup>-1</sup> de Fe.EDTA (solução 1,64%); 2 mL L<sup>-1</sup> de azul de bromotimol (0,5%); 2 mL L<sup>-1</sup> de solução de micronutrientes (0,2 g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,235 g L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; 0,28 g L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,008 g L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O); 1,75 g L<sup>-1</sup> da ágar; pH 6,8] (primeira repicagem), acrescido com 50 µg mL<sup>-1</sup> do fungicida Cercobin 700 (Thiophanate Methyl), por amostra.

Para o isolamento de bactérias endofíticas de raiz, a parte aérea das amostras vegetais foram descartadas e as raízes foram lavadas em água destilada. Cerca de 3 a 5 g de raiz foram submetidas ao processo de desinfecção superficial (1min em álcool 70%; 3 min em hipoclorito de sódio; 30 seg em álcool e duas lavagens em água destilada estéril). Em seguida, procedeu-se a diluição seriada ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ ) em tampão PBS e a inoculação, em triplicatas, em meio semi-sólido NFb (primeira repicagem), acrescido com 50 µg mL<sup>-1</sup> do fungicida Cercobin 700 (Thiophanate Methyl), por amostra.

Todos os inóculos do meio NFb foram incubados a 28 °C por oito dias, sendo observado a formação de um halo de crescimento no interior do meio. Após, transferiu-se 100 µL de cada amostra da cultura para um novo meio semi-sólido NFb (segunda repicagem) e incubou-se por mais oito dias, nas mesmas condições, para uma nova avaliação.

Utilizou-se a tabela de McCrady para determinar o Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas por grama de amostra, segundo Döbereiner et al. (1995). As amostras positivas foram transferidas para placas de Petri contendo NFb sólido acrescido de 20 mg L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, e, posteriormente, selecionados aleatoriamente 80 isolados bacterianos, estes foram purificados por esgotamento e

armazenados em meio TSA (*Trypticase Soy Agar*) líquido com glicerol a 20%, e mantidos em freezer -20 °C.

### **3.2.3 Caracterização fenotípica**

#### **3.2.3.1 Identificação de bactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio atmosférico**

A identificação de bactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio foi realizada segundo Döbereiner et al. (1995). Para tanto, as bactérias foram inoculadas em meio semi-sólido NFb, incubadas a 28 °C por oito dias. O resultado positivo foi determinado pela formação de um halo horizontal de crescimento bacteriano no interior do meio de cultura. Os testes foram feitos em triplicata e o experimento repetido duas vezes, para maior veracidade dos resultados.

#### **3.2.3.2 Identificação de bactérias produtoras de ácido indol acético (AIA) via dependente e independente do aminoácido L-triptofano**

Para avaliação e quantificação da produção de AIA, os isolados bacterianos foram cultivados, a partir de colônias isoladas, em meio TSA líquido, sem e com o suplemento de 5 mM de L-triptofano, incubados sob agitação (120 rpm) a 28 °C, na ausência de luz, por um período de cultivo de 24 h. Em seguida, as culturas foram centrifugadas e o sobrenadante acrescido do reagente de Salkowski (2% de FeCl<sub>3</sub> 0,5 M em 35% de ácido perclórico), na proporção de 1,5:0,5, incubados a 28 °C por um período de 30 min., na ausência de luz. Logo após, foi realizada a quantificação em espectrofotômetro (com comprimento de onda de 530 nm), sendo a concentração de AIA estimada por meio de uma curva padrão previamente estabelecida, utilizando valores conhecidos de AIA sintético (Vetec) 0; 50; 100; 150; 200; 250; 300 e 350 µg mL<sup>-1</sup>, em meio de cultura esterilizado não inoculado (Barbosa, 2010). Os experimentos foram realizados em triplicata para cada isolado.

### **3.2.3.3 Identificação de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico**

A identificação de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico foi realizada segundo Rodriguez et al. (2000) e Verma et al. (2001), com algumas modificações. As bactérias foram inoculadas em meio de cultura sólido contendo fosfato insolúvel (10 g L<sup>-1</sup> de glicose; 5 g L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl; 1 g L<sup>-1</sup> de NaCl; 1 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 4 g L<sup>-1</sup> de CaHPO<sub>4</sub>; 15 g L<sup>-1</sup> de ágar; pH 7,2). As placas foram inoculadas a 28 °C por 72 h e, em seguida, realizadas as leituras. A presença de um halo claro em torno da colônia indicou a solubilização do fosfato. O experimento foi conduzido em triplicata e para as linhagens que apresentaram halo visível, foi estimado o índice de solubilização (IS), que expressa a relação do diâmetro médio do halo de hidrólise e o diâmetro médio da colônia.

### **3.2.3.4 Identificação de bactérias produtoras de enzimas extracelulares**

Os isolados bacterianos foram analisados em triplicata quanto à capacidade de produzir as enzimas celulase, poligalacturonase, pectato liase e amilase. Controles positivos destas enzimas foram inoculados nos meios utilizados para estas caracterizações. A atividade enzimática foi estimada mediante o índice enzimático (IE), que expressa a relação do diâmetro médio do halo de hidrólise e o diâmetro médio da colônia.

#### **3.2.3.4.1 Atividade celulolítica**

A identificação de bactérias produtoras de celulase foi realizada segundo Mariano & Silveira, (2005) em 50 isolados bacterianos (UAGB 101 a UAGB 150) por meio da inoculação de bactérias, a partir de colônias isoladas, em meio de cultura TSA 10%, acrescido com 1% de carboximetilcelulose, em seguida, incubadas por 48 h a 28 °C.

Após o crescimento das colônias, as placas foram cobertas com solução de vermelho congo 1% por 10 min. Em seguida, as placas foram lavadas com solução de

NaCl 5 N. A formação de área clara ao redor das colônias indicou a degradação da celulose.

#### **3.2.3.4.2 Atividade pectinolítica**

A identificação de bactérias produtoras de pectinases foi realizada segundo Suzuki, (2006). Para a determinação da atividade pectinolítica, as bactérias foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura MP (2,0 g L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 4,0 g L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,6 g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 g L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1,0 mg L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>; 10 µg L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 10 µg L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>; 70 µg L<sup>-1</sup> de ZuSO<sub>4</sub>; 50 µg L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub>; 10 µg L<sup>-1</sup> de MoO<sub>3</sub>; 1,0 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura; 5,0 g L<sup>-1</sup> de pectina cítrica; 15 g L<sup>-1</sup> de agar), utilizando pectina cítrica como substrato e pH 8,0 e 5,0, verificando a atividade da pectato liase e poligalacturonase, respectivamente. As placas foram incubadas por 72 h a 28 °C.

Após o crescimento das colônias, as placas foram cobertas com solução de lugol por 10 min. Evidenciou-se a atividade pectinolítica por meio do aparecimento de uma zona esbranquiçada ao redor da colônia, em contraste com a cor marrom do restante do meio.

#### **3.2.3.4.3 Atividade amilolítica**

A identificação de bactérias produtoras de amilase foi realizada segundo Mariano & Silveira (2005), com algumas modificações. As bactérias foram inoculadas em placas de Petri com meio TSA 10% acrescido com 1% de amido de milho solúvel. As placas foram incubadas a 28 °C por 72 h.

Após o crescimento bacteriano foram adicionados 5 mL de solução de Iodo (1%) e mantido por 10 min, em seguida, a solução foi descartada e observado a presença de um halo claro em torno da colônia, indicando secreção de amilase.

### 3.2.3.5 Identificação de bactérias produtoras de moléculas *quorum sensing*

A Identificação de bactérias produtoras de moléculas ALHs (N-acyl lactona homoserina), um tipo de molécula *quorum sensing*, foi realizada por meio da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4), biossensor de ALHs, em bioensaios com as bactérias testes. A *A. tumefaciens* NTL4 foi inoculada linearmente na extremidade de placas de Petri contendo meio LB (*Luria Bertani*), acrescido de X-gal (10 µg mL<sup>-1</sup>) (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 ALHs, estas se ligam ao promotor TraR, ativando a expressão do gene LacZ, codificando a enzima β-galactosidase, a qual quebra a molécula X-gal, tornando a célula azul (Szenthe & Page, 2002; Quecine, 2010). Dessa forma, após a inoculação a 28 °C por 48 h, a observação de colônias de *A. tumefaciens* com pigmentação azul indicou a produção de ALHs pelas bactérias avaliadas.

### 3.2.4 Caracterização genotípica

#### 3.2.4.1 Análise da variabilidade genética bacteriana por BOX-PCR

O DNA genômico das bactérias foi extraído por meio da utilização do Genomic DNA Purification Kit (Fermentas). A reação do PCR foi realizada com o *primer* BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'), em um volume final de 25 µL contendo 0,5 a 10 ng de DNA molde; 1 µM do *primer*; 1 mM de cada dNTPs; 1x de DMSO (dimetilsufoxamida); 1x do tampão da enzima *Taq Buffer*, 3,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,08U da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas). A reação de amplificação foi realizada em termociclador programado para realizar uma desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 2 min, 92 °C por 30 segundos, anelamento a 50 °C por 1 min e extensão de *primer* a 65 °C por 1 min, seguida de

extensão final a 65 °C por 10 min. Após a amplificação, a reação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (1,5% p/v) em tampão 1x TAE (40 mM de Tris-acetato; 1 mM de EDTA) e corado com *Blue green loading dye* (LGC Bio), observado sobre luz ultravioleta e fotodocumentado.

Os perfis de bandas observados foram transformados em uma planilha binária e, em seguida, utilizados para obter um dendrograma de similaridade calculado através do Coeficiente de Jaccard e agrupado utilizando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*), utilizando o software PAST<sup>®</sup> versão 1.90 (Hammer et al., 2001).

### **3.2.5 Análise estatística**

As análises quantitativas de densidade populacional, produção de enzimas, solubilização de fosfato e ácido indol acético foram submetidos à análise de variância (ANOVA) através do programa estatístico SISVAR 5.3<sup>®</sup>, a comparação entre as médias foi realizada pelo Teste de Scott-Knott, ( $p < 0,05$ ). Para verificar a possível influência dos tratamentos: nichos e espécie vegetais, sobre a expressão bacteriana de características fenotípicas (produção de AIA, solubilização de fosfato, produção de enzimas e de molécula *quorum sensing*) foi realizado o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), com probabilidade de até 5%.

## **3.3 Resultados e discussão**

### **3.3.1 Densidade populacional de bactérias potencialmente diazotróficas associadas às plantas do gênero *Brachiaria***

Durante o isolamento em meio NFb semi-sólido, foi observada a formação do halo de crescimento bacteriano característico no interior das amostras (Figura 3.1), de raiz e rizosfera de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*. A densidade

populacional elevada variou entre  $6,63 \times 10^4$  a  $6,07 \times 10^5$  células  $g^{-1}$  de solo ou tecido vegetal fresco (SF ou TVF).

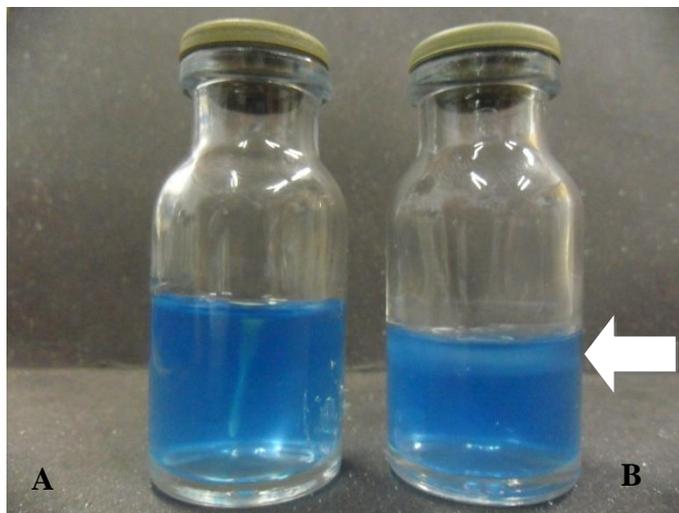


Figura 3.1. Meio de cultura NFb, livre de fonte nitrogenada, utilizado para o isolamento de bactérias potencialmente diazotróficas. A) Amostra negativa, ausência do halo de crescimento; B) Amostra positiva, apresentando halo de crescimento bacteriano (flecha).

Os resultados observados em relação à densidade populacional foram semelhantes aos encontrados por Reis Junior et al. (2004) e Reis Junior et al. (2006) em pastagens de *Brachiaria*, na região do Cerrado goiano, e em plantas de arroz, por Prakamhng et al. (2009), e superiores aos encontrados por Baldotto et al. (2010), nos nichos rizosfera e endofítico de raiz em isolados de abacaxi.

A densidade populacional também foi semelhante ao número encontrado por Garrido et al. (2010) com bactérias diazotróficas associadas a plantas do gênero *Brachiaria*, porém não foi observado diferença estatística entre os nicho e espécies vegetais analisados (Figura 3.2). Estes resultados discordam dos encontrados por Reis Junior et al. (2004), onde estes observaram a influência da espécie vegetal, do local de coleta e da época do ano sobre a densidade bacteriana associada a gramíneas *Brachiaria* spp. e Garrido et al. (2010) que constataram que plantas do gênero *Brachiaria* apresentaram maior população de bactérias diazotróficas associadas a raiz.

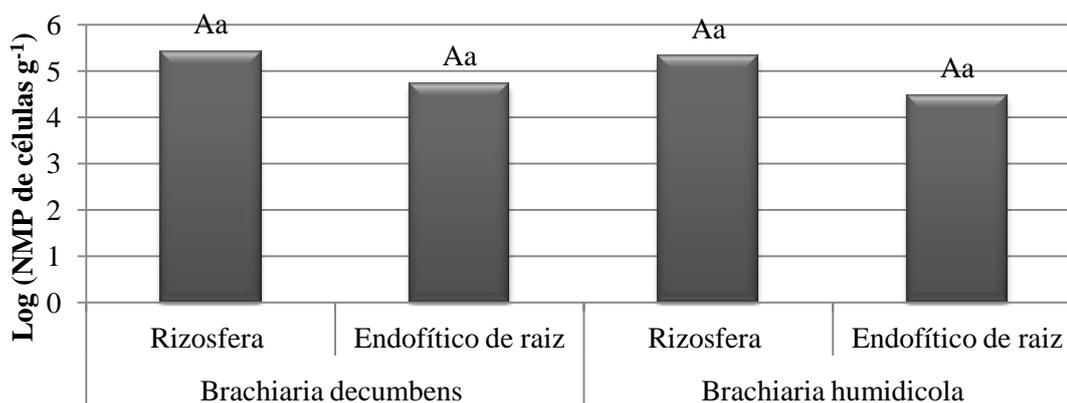


Figura 3.2. Densidade populacional da comunidade bacteriana diazotrófica endofítica de raiz e da rizosfera de plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*. Letras maiúsculas comparam os nichos por espécie vegetal, letras minúsculas os nichos entre si de ambas as espécies vegetais. Letras iguais não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Os dados obtidos nessa pesquisa concordam com os resultados observados por Dias et al. (2009) e Becerra-Castro et al. (2011) analisando raiz e rizoplano de plantas de morango e orquídea, respectivamente, porque não observaram diferenças de densidade populacional entre nichos, porém Castro et al. (2011) afirmaram que elevada densidade de bactérias no rizoplano é esperado. Discordando dos dados de Prakamhang et al. (2009), que observaram haver variação de densidade populacional entre nichos de plantas de arroz. Logo, é extremamente variável a relação da densidade populacional bacteriana com os diferentes nichos de colonização bacteriana em diferentes espécies vegetais.

### 3.3.2 Identificação de bactérias com características de promoção de crescimento vegetal

Moreira et al. (2010), Araújo et al. (2010) e Santos et al. (2012) afirmaram que bactérias diazotróficas associadas as gramíneas podem oferecer, além da fixação biológica de nitrogênio, mais de um mecanismo de promoção de crescimento vegetal, como a produção de ácido indol acético (AIA) e solubilização de fosfato inorgânico.

Das 80 bactérias isoladas, 42 são de *B. humidicola* (14 endofítica de raiz e 28 da rizosfera) e 38 de *B. decumbens* (20 endofítica de raiz e 18 da rizosfera), e seus resultados para os testes de fixação de nitrogênio, produção de AIA com e sem a presença do aminoácido precursor L-triptofano e solubilização de fosfato inorgânico estão na tabela 3.2. Assim, 43,7% dos isolados foram positivos para dois ou três mecanismos de promoção de crescimento e 56,2% apresentaram-se positivos para as quatro análises, tendo como destaque o nicho endofítico de raiz com 60,0% destes. Segundo Richardson et al. (2009), pode-se especular que as bactérias endofíticas apresentam vantagens em relação as epifíticas, por colonizarem o interior do tecido vegetal, estando em íntima relação com a planta, habitando nichos mais propícios (estável e uniforme) para a expressão dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal (Ferrara et al., 2011).

Tabela 3.2. Avaliação da fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato inorgânico e produção de AIA, via dependente e independente de L-triptofano, de 80 isolados bacterianos associados às gramíneas *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*. Os valores, em cada coluna, seguidos de mesma letra indicam ausência de significância estatística de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ )

Isolados	Espécie Vegetal	Nicho	FBN	Produção de AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		IS
				Com L-Trip.	Sem L-Trip.	
UAGB 101	BH	ER	+	16,76 f	12,62 c	3,02 c
UAGB 102	BH	ER	+	7,27 f	2,61 d	2,05 c
UAGB 103	BH	ER	+	5,11 f	4,38 d	1,85 c
UAGB 104	BH	ER	+	131,39 a	37,80 a	4,05 b
UAGB 105	BH	ER	+	51,78 d	23,87 b	3,05 c
UAGB 106	BH	ER	+	49,23 d	26,33 b	3,49 b
UAGB 107	BH	ER	+	83,87 b	35,56 a	3,89 b
UAGB 108	BH	ER	+	99,91 b	4,94 d	5,27 a
UAGB 109	BH	ER	+	86,50 b	44,14 a	3,79 b
UAGB 110	BH	ER	+	2,09 f	0,85 f	3,73 b
UAGB 111	BH	ER	+	67,78 c	35,34 a	1,70 c
UAGB 112	BH	ER	+	90,29 b	42,46 a	3,31 b
UAGB 113	BH	ER	+	92,67 b	39,14 a	-
UAGB 114	BH	ER	+	81,45 b	29,01 b	4,86 a
UAGB 115	BH	RIZ	+	86,19 b	37,93 a	5,90 a
UAGB 116	BH	RIZ	+	73,47 c	4,94 d	-
UAGB 117	BH	RIZ	+	15,98 f	5,07 d	5,20 a
UAGB 118	BH	RIZ	+	20,81 e	9,69 c	3,31 b
UAGB 119	BH	RIZ	+	3,73 f	15,60 c	2,79 c
UAGB 120	BH	RIZ	+	6,66 f	2,53 d	1,50 c
UAGB 121	BH	RIZ	+	9,95 f	3,26 d	2,02 c

(Continuação Tabela 3.2)

Isolados	Espécie Vegetal	Nicho	FBN	Produção de AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		IS
				Com L-trip.	Sem L-trip.	
UAGB 122	BH	RIZ	+	25,64 e	3,42 d	-
UAGB 123	BH	RIZ	+	20,34 e	5,41 d	-
UAGB 124	BH	RIZ	+	15,89 f	5,93 d	4,09 b
UAGB 125	BH	RIZ	+	-	-	1,47 c
UAGB 126	BH	RIZ	+	6,63 f	8,95 c	4,42 b
UAGB 127	BH	RIZ	+	10,94 f	11,28 c	6,07 a
UAGB 128	BH	RIZ	+	10,98 f	8,87 c	3,05 c
UAGB 129	BH	RIZ	+	7,62 f	3,56 d	3,68 b
UAGB 130	BH	RIZ	+	-	7,14 d	4,02 b
UAGB 131	BH	RIZ	+	0,56 f	1,11 d	2,36 c
UAGB 132	BH	RIZ	+	1,36 f	9,93 c	4,61 b
UAGB 133	BD	RIZ	-	31,90 e	9,77 c	-
UAGB 134	BD	RIZ	+	-	6,28 d	-
UAGB 135	BD	RIZ	+	-	5,85 d	-
UAGB 136	BD	RIZ	+	6,76 f	7,83 c	-
UAGB 137	BD	RIZ	+	-	14,30 c	-
UAGB 138	BD	RIZ	+	22,49 e	11,37 c	6,55 a
UAGB 139	BD	RIZ	+	4,72 f	2,53 d	5,48 a
UAGB 140	BD	RIZ	+	25,21 e	10,16 c	3,78 b
UAGB 141	BD	RIZ	-	21,29 e	3,77 d	-
UAGB 142	BD	RIZ	-	16,46 f	6,06 d	-
UAGB 143	BD	RIZ	-	25,43 e	6,67 d	3,85 b
UAGB 144	BD	RIZ	+	4,43 f	2,66 d	2,04 c
UAGB 145	BD	RIZ	+	5,50 f	10,12 c	3,55 b
UAGB 146	BD	RIZ	+	-	0,88 d	3,41 b
UAGB 147	BD	RIZ	+	10,55 f	-	4,26 b
UAGB 148	BD	RIZ	+	3,00 f	2,05 d	3,87 b
UAGB 149	BD	RIZ	+	-	1,02 d	4,55 b
UAGB 150	BD	RIZ	+	5,03 f	3,99 d	3,15 c
UAGB 151	BD	ER	+	46,95 d	9,42 c	1,62 c
UAGB 152	BD	ER	+	120,91 a	14,69 c	1,14 c
UAGB 153	BD	ER	+	6,06 f	-	2,00 c
UAGB 154	BD	ER	+	100,08 b	14,64 c	2,05 c
UAGB 155	BD	ER	+	93,23 b	24,44 b	-
UAGB 156	BD	ER	+	67,17 c	20,80 b	1,37 c
UAGB 157	BD	ER	+	41,94 d	5,89 d	1,46 c
UAGB 158	BD	ER	+	34,83 e	9,04 c	1,84 c
UAGB 159	BD	ER	+	24,30 e	24,52 b	-
UAGB 160	BD	ER	+	62,22 c	21,24 b	-
UAGB 161	BD	ER	+	7,48 f	19,61 b	-
UAGB 162	BD	ER	+	12,79 f	36,85 a	-
UAGB 163	BD	ER	+	78,30 c	20,68 b	-
UAGB 164	BD	ER	+	8,13 f	34,27 a	-
UAGB 165	BD	ER	+	6,75 f	-	-
UAGB 166	BD	ER	+	12,19 f	30,56 a	2,25 c
UAGB 167	BD	ER	+	138,64 a	15,94 c	-
UAGB 168	BD	ER	+	32,18 e	19,48 b	2,58 c
UAGB 169	BD	ER	+	19,65 e	6,88 d	2,57 c
UAGB 170	BD	ER	+	76,54 c	22,36 b	2,07 c
UAGB 171	BH	RIZ	+	19,13 e	20,12 b	-
UAGB 172	BH	RIZ	+	29,91 e	18,39 b	1,64 c
UAGB 173	BH	RIZ	+	31,47 e	10,55 c	-
UAGB 174	BH	RIZ	+	26,94 e	6,71 d	-
UAGB 175	BH	RIZ	+	14,82 f	3,52 d	-
UAGB 176	BH	RIZ	+	23,49 e	11,07 c	-
UAGB 177	BH	RIZ	+	19,04 e	18,18 b	-
UAGB 178	BH	RIZ	+	19,91 e	-	1,70 c
UAGB 179	BH	RIZ	+	4,12 f	2,35 d	1,63 c

(Continuação Tabela 3.2)

Isolados	Espécie Vegetal	Nicho	FBN	Produção de AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		IS
				Com L-trip.	Sem L-trip.	
UAGB 180	BH	RIZ	+	21,16 e	6,06 d	-

IS = Índice de solubilização de fosfato inorgânico

BH = *Brachiaria humidicola* / BD = *Brachiaria decumbens*

RIZ = Rizosfera / ER = Endofítico de raiz

+ = Isolado positivo / - = Isolado negativo

Em relação às espécies de *Brachiaria* avaliadas, ambas apresentaram frequência de isolados positivos semelhantes para os quatro mecanismos de caracterização fenotípica, evidenciando que as bactérias potencialmente diazotróficas associadas às plantas do gênero *Brachiaria* apresentaram elevado percentual de isolados com potencial para o crescimento vegetal.

### 3.3.2.1 Bactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio atmosférico

Os isolados bacterianos potencialmente fixadores foram reinoculadas em meio NFb semi-sólido, com 95,0% sendo positivo (Tabela 3.2). Vários trabalhos isolaram e identificaram a associação de bactérias diazotróficas com gramíneas forrageiras em diferentes nichos de colonização, tais como, Reis Junior et al. (2004) que trabalharam com *B. decumbens*, *B. humidicola* e *B. brizantha*, cultivadas na região do Cerrado brasileiro. Brasil et al. (2005) observaram a associação de bactérias fixadoras de nitrogênio nos nichos solo, raiz e folha da gramínea exótica (*B. humidicola*) e das gramíneas nativas *Elyonurus muticus* (capim corona) e *Axonopus purpusii* (capim mimoso) cultivadas no Pantanal Sul Matogrossense.

Silva et al. (2010), constataram que as gramíneas *B. decumbens*, *B. humidicola* e *Pennisetum purpureum* (capim elefante) cultivadas na Zona da Mata do Estado de Pernambuco, apresentaram associação com bactérias diazotróficas. Garrido et al. (2010) trabalhando com pastagem de *Panicum maximum* (capim mombaça), *Dichanthium aristatum* e *Brachiaria* spp., cultivadas na microrregião do Cesar Valle Sabana na

Colômbia, identificaram a associação das três gramíneas forrageiras com bactérias diazotróficas.

Desta forma, fica evidente a associação entre gramíneas forrageiras e bactérias diazotróficas nos mais diversos nichos (neste trabalho, rizosfera e endofítico de raiz), áreas de cultivos e espécies vegetais.

### **3.3.2.2 Avaliação de bactérias produtoras de ácido indol acético (AIA)**

Quanto à produção bacteriana de AIA, via dependente e independente de L-triptofano, dos 80 isolados avaliados em meio acrescido de L-triptofano, 91,2% foram positivos, valor superior ao encontrado por Prakamhang et al. (2009), que observaram 62,7% dos isolados bacterianos de arroz produzindo AIA. Os dados resultantes da quantificação foram submetidos ao teste de Scott-Knott, levando em consideração as bactérias e suas respectivas produções. O teste agrupou as produções em seis grupos distintos (Tabela 3.2), onde o grupo “f” obteve destaque, contendo aproximadamente 43,6% dos isolados avaliados, estes com as menores produções de 0,56 a 16,76  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , seguido do grupo “e”, com aproximadamente 28,1% dos isolados produzindo entre 19,04 e 34,83  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . No entanto, 28,2% dos isolados é dividido pelos grupos restantes, estes com produção entre 41,94 e 138,64  $\mu\text{g mL}^{-1}$  com o isolado UAGB 167, destacando-se como maior produtor via dependente de triptofano.

As concentrações de AIA obtidas neste trabalho foram superiores as encontradas na literatura em estudo de micro-organismos em associação com gramíneas do gênero *Brachiaria*, onde o pico de produção foi de 110  $\mu\text{g mL}^{-1}$  com a estirpe de *Azospirillum amazonense* em associação com *B. brizantha* (Reis Junior et al., 2004), já as produções de AIA encontrados neste trabalho foram bem superiores as encontradas por Kuss et al. (2007) trabalhando com bactérias diazotróficas associadas a raízes de plantas de arroz, onde a produção variou de 2,79 a 13,47  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Com relação às bactérias avaliadas em meio sem o acréscimo do L-triptofano, Jensen & Bandurski (1994) e Baldotto et al. (2010) afirmaram que bactérias podem apresentar a capacidade de produzir AIA independente do aminoácido precursor L-triptofano, fato este observado em 93,7% dos isolados, evidenciando que bactérias associadas às gramíneas do gênero *Brachiaria* apresentaram mais de uma rota bioquímica para produção de AIA.

O teste de Scott-Knott agrupou as produções em quatro grupos distintos (Tabela 3.2), onde o grupo “d” obteve destaque, contendo o maior percentual, com 41,3% dos isolados avaliados, com os menores valores de produção, tendo variação 0,85 a 7,14  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e o grupo “a” com as maiores produções, com 13,3% dos isolados e variação entre 30,56 a 44,18  $\mu\text{g mL}^{-1}$  com o isolado UAGB 109, destacando-se como maior produtor via independente de triptofano.

Os valores de produção foram superiores aos encontrados por Egamberdiyeva (2007) com bactérias associadas a plantas de milho, que obteve no máximo 7,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Como encontrado em outros trabalhos, o meio acrescido com L-triptofano apresentou produção bem mais acentuada em relação à produção sem a utilização do aminoácido L-triptofano (Asghar et al., 2007; Kuss et al., 2007; Baldotto et al., 2010). Barazani & Friedmam (2000) e Radwan et al. (2005) afirmaram que o L-triptofano, quando acrescido no meio de cultivo bacteriano *in vitro*, proporciona aumento na síntese de AIA.

Kuklinsky-Sobral et al. (2004) avaliando a comunidade bacteriana produtora de auxina associada a plantas de soja constataram que o genótipo da planta e nicho de colonização podem influenciar a produção desse fitohormônio. No presente trabalho, também foi observado que a produção de AIA, com e sem o acréscimo do L-triptofano, os nichos e as espécies vegetais apresentaram influência, segundo o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), com os maiores percentuais de isolados tendo associação com a gramínea

*B. humidicola* e pertencente ao nicho endofítico de raiz (Figura 3.3), destacando-se os isolados de maiores produções via independente do aminoácido L-triptofano.

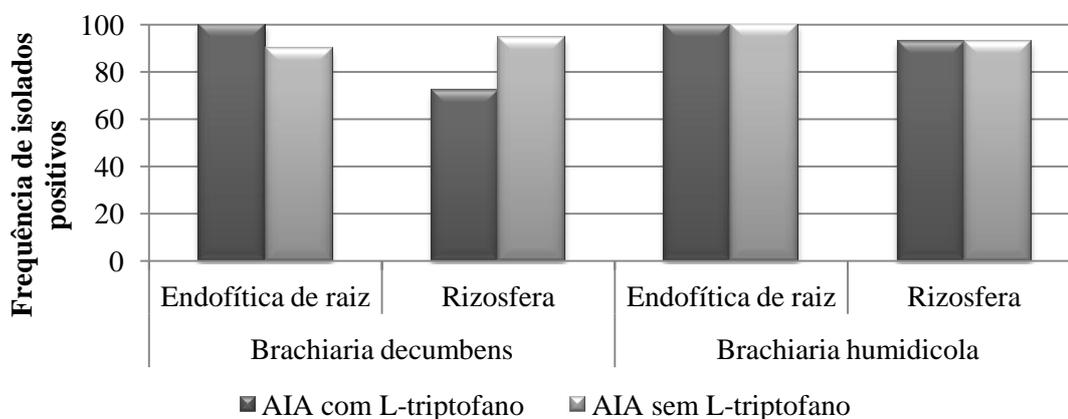


Figura 3.3. Frequência relativa (%) de isolados positivos para os testes de produção de ácido indol acético (AIA) com e sem a presença do aminoácido precursor L-triptofano *in vitro*, associados a *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* nos nichos endofítico de raiz e rizosfera.

Tais resultados foram semelhantes aos encontrados por Kuklinsky-Sobral et al. (2004), onde o nicho endofítico de raiz apresentou maior percentual de linhagens produtoras de AIA e discordam do trabalho de Ali et al. (2008) e Araújo et al. (2010), onde o nicho com maior produção foi a rizosfera.

### 3.3.2.3 Avaliação de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico

Foi observado que 66,2% das bactérias foram capazes de solubilizar fosfato inorgânico, maior percentual que o encontrado por Taurian et al. (2010) e Naik et al. (2008), trabalhando com isolados de amendoim e arroz, respectivamente. Os dados dessa pesquisa concordam com os de Barroti & Nanhas, (2000) que constataram a associação de bactérias solubilizadoras de fosfato em associação com gramíneas do gênero *Brachiaria*, onde os autores afirmam que as bactérias solubilizadoras de fosfato são favorecidas pelo plantio da braquiária sem adubação.

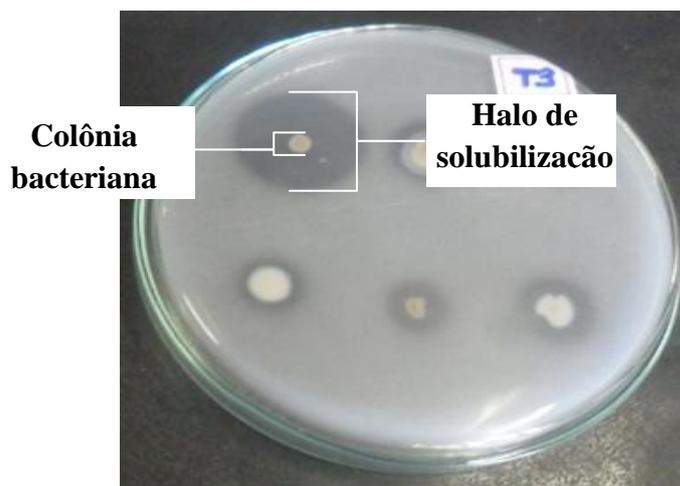


Figura 3.4. Placa de Petri evidenciando o crescimento bacteriano em meio contendo fosfato insolúvel, com halo de solubilização ao redor da colônia bacteriana.

De acordo com a análise estatística do teste de Scott-Knott, pode-se observar a divisão dos isolados em três grupos (Tabela 3.2), onde o grupo “c” variou com índice de solubilização (IS) de 1,14 a 3,15, com 50,9% dos isolados, o grupo “b” com 35,8% dos isolados, com IS variando de 3,31 a 4,61 e o grupo “a” com 13,2% dos isolados positivos com variação entre 4,86 a 6,55 do IS.

Classificando-se os IS segundo a recomendação de Berraquero et al. (1976), Hara & Oliveira, (2004) e Chagas Junior, (2007) em baixo ( $IS < 2,0$ ), médio (IS de 2,0 a 4,0) e alto ( $IS > 4,0$ ). Observou-se que 77,3% dos isolados positivos apresentaram IS de médio a alto (Figura 3.5), indicando a existência de elevada frequência de bactérias associadas às gramíneas do gênero *Brachiaria*, com elevado potencial de solubilização de fosfato inorgânico, destacando-se o isolado UAGB 138, com  $IS = 6,55$ , o que concorda com Alam et al. (2002) e Lira-Cadete et al. (2012) que encontraram maior percentual de isolados com IS mediano, em bactérias associadas ao milho e cana-de-açúcar, respectivamente.

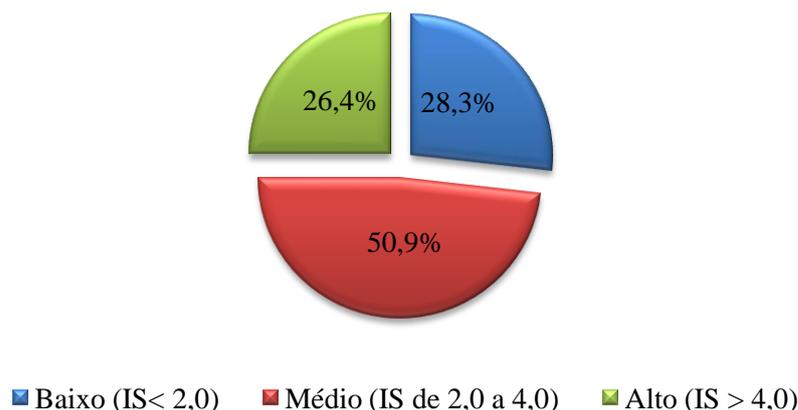


Figura 3.5. Frequência relativa (%) de isolados solubilizadores de fosfato segundo o padrão de classificação de intensidade do índice de solubilização.

Considerando a espécie e o nicho de origem dos isolados bacterianos analisadas pelo teste do  $\chi^2$ , o qual revelou que as mesmas sofreram influência, a espécie vegetal *B. humidicola* e o nicho endofítico de raiz, obtiveram destaque, ambos com os maiores percentuais dos seus isolados positivos, 73,8 e 70,6%, respectivamente. Não foi observado diferença segundo o teste de  $\chi^2$ , quando analisado o nicho rizosfera entre as espécies vegetais e entre os nichos da gramínea *B. decumbens* (Figura 3.6). Inúmeros fatores interferem na interação bactéria/planta, como por exemplo, o genótipo do hospedeiro, idade do mesmo, entre outros (Compant et al., 2010).

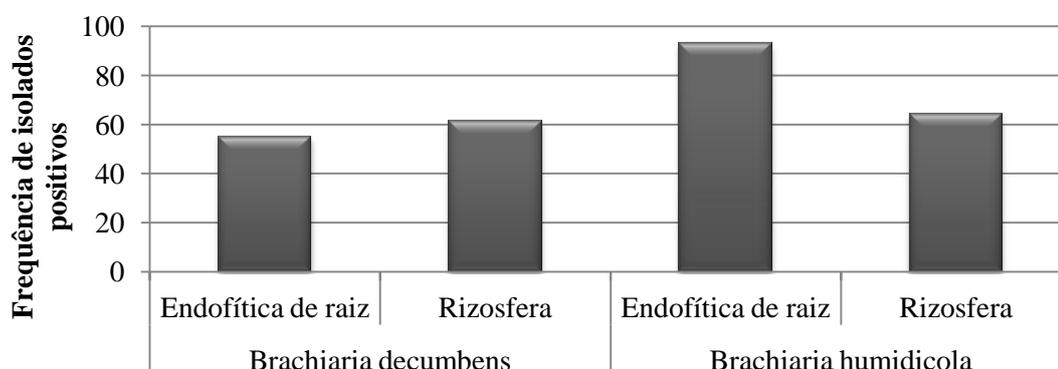


Figura 3.6. Frequência relativa (%) dos isolados bacterianos associados à rizosfera e raiz de plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* em relação à capacidade de solubilizar fosfato inorgânico *in vitro*.

Observou-se, no entanto, que as bactérias da rizosfera de ambas as espécies vegetais apresentaram os maiores valores de IS. Neste âmbito, Barea et al. (2005) descreveram que no nicho da rizosfera é onde se encontra as maiores concentrações de micro-organismos solubilizadores de fosfato (fato não observado neste trabalho), estes mais metabolicamente ativos que os encontrados nos demais nichos em associação com o vegetal. Já Moreira et al. (2010) afirmaram que a performance das bactérias solubilizadoras de fosfato apresenta variação de acordo com a planta hospedeira.

#### 3.3.2.4 Avaliação da produção de enzimas extracelulares

Os resultados do índice enzimático (IE), que expressa a relação do diâmetro médio do halo de produção enzimática e o diâmetro médio da colônia bacteriana (Figura 3.7), estão apresentados na tabela 3.3.

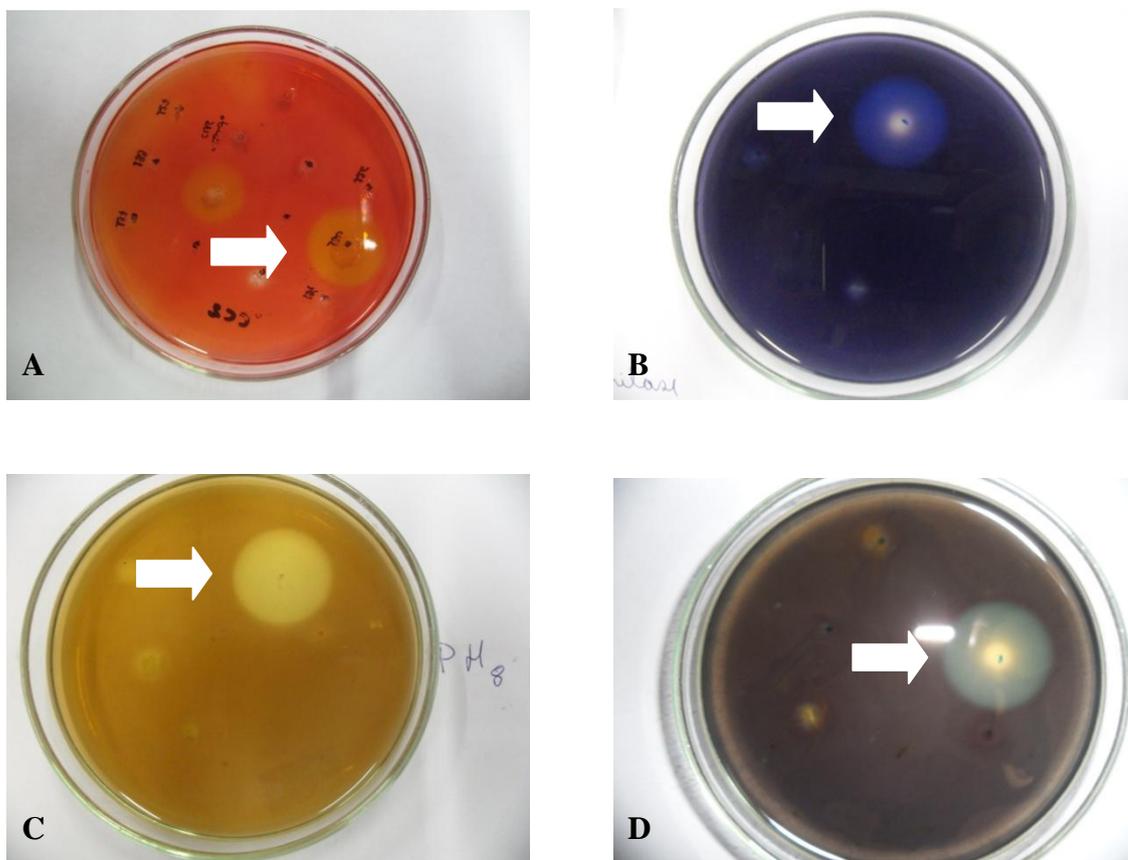


Figura 3.7. Placas de Petri evidenciando o crescimento bacteriano e produção de enzimas extracelulares, caracterizada pelo halo de degradação ao redor da colônia. A) Produção de celulase; B) Produção de amilase; C) Produção de

pectinase pH 8,0 (pectato liase) e D) Produção de pectinase pH 5,0 (poligalacturonase).

Tabela 3.3. Produção de enzimas extracelulares (celulase, pectinase pH 5,0, pectinase pH 8,0 e amilase) e produção da molécula *quorum sensing* por 80 isolados bacterianos associados aos nichos rizosfera e endofítico de raiz das gramíneas *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*. Os valores, em cada coluna, seguidos de mesma letra indicam ausência de significância estatística de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ )

Isolados	Espécie Vegetal	Nichos	QS	Índice Enzimático			
				Celulase	Pect. pH 5,0	Pect. pH 8,0	Amilase
UAGB 101	BH	ER	+	-	-	-	-
UAGB 102	BH	ER	-	-	-	2,73 c	1,91 c
UAGB 103	BH	ER	-	-	-	3,80 b	2,34 b
UAGB 105	BH	ER	+	1,68 c	-	-	-
UAGB 106	BH	ER	+	1,65 c	-	-	-
UAGB 109	BH	ER	+	-	-	-	-
UAGB 110	BH	ER	+	6,71 a	-	-	-
UAGB 111	BH	ER	-	-	-	-	3,65 a
UAGB 113	BH	ER	-	-	-	-	2,29 b
UAGB 115	BH	RIZ	+	-	-	-	-
UAGB 116	BH	RIZ	+	-	-	5,48 a	-
UAGB 117	BH	RIZ	-	-	-	-	2,25 b
UAGB 118	BH	RIZ	-	1,28 c	-	-	-
UAGB 119	BH	RIZ	+	1,23 c	-	-	-
UAGB 120	BH	RIZ	+	-	-	-	-
UAGB 121	BH	RIZ	+	-	-	-	-
UAGB 122	BH	RIZ	-	3,11 b	-	-	-
UAGB 123	BH	RIZ	+	-	-	-	-
UAGB 124	BH	RIZ	-	-	-	-	1,76 c
UAGB 125	BH	RIZ	+	-	-	-	-
UAGB 126	BH	RIZ	+	-	-	-	-
UAGB 128	BH	RIZ	+	-	-	-	-
UAGB 129	BH	RIZ	+	-	-	-	-
UAGB 130	BH	RIZ	+	3,37 b	-	-	-
UAGB 132	BH	RIZ	+	3,30 b	-	-	-
UAGB 134	BD	RIZ	+	-	-	-	-
UAGB 135	BD	RIZ	+	-	-	-	-
UAGB 136	BD	RIZ	+	-	-	-	-
UAGB 137	BD	RIZ	+	-	-	-	-
UAGB 138	BD	RIZ	+	-	-	-	-
UAGB 139	BD	RIZ	+	-	-	2,98 c	-
UAGB 141	BD	RIZ	+	-	-	-	-
UAGB 143	BD	RIZ	-	-	-	-	1,37 c
UAGB 144	BD	RIZ	-	3,88 b	-	-	-
UAGB 145	BD	RIZ	-	-	5,34 a	-	2,96 a
UAGB 146	BD	RIZ	+	-	-	-	-
UAGB 147	BD	RIZ	+	-	4,76 a	3,74 b	-
UAGB 148	BD	RIZ	+	-	-	-	-
UAGB 149	BD	RIZ	+	-	-	-	-
UAGB 150	BD	RIZ	-	1,03 c	6,27 a	4,39 b	2,47 b
UAGB 152	BD	ER	+	*	-	-	-
UAGB 153	BD	ER	+	*	-	-	-
UAGB 154	BD	ER	-	*	-	1,09 d	-
UAGB 155	BD	ER	-	*	-	1,19 d	-
UAGB 156	BD	ER	+	*	-	1,17 d	-
UAGB 158	BD	ER	+	*	-	1,22 d	-

(Continuação Tabela 3.3)

Isolados	Espécie Vegetal	Nicho	QS	Índice Enzimático			
				Celulase	Pect. pH 5,0	Pect. pH 8,0	Amilase
UAGB 160	BD	ER	-	*	-	1,58 d	-
UAGB 161	BD	ER	-	*	-	1,58 d	-
UAGB 162	BD	ER	+	*	-	2,53 c	-
UAGB 163	BD	ER	+	*	-	-	-
UAGB 165	BD	ER	+	*	2,33 b	-	-
UAGB 167	BD	ER	+	*	-	-	-
UAGB 168	BD	ER	+	*	-	-	-
UAGB 169	BD	ER	+	*	-	-	-
UAGB 170	BD	ER	+	*	-	-	-
UAGB 172	BH	RIZ	+	*	-	-	-
UAGB 173	BH	RIZ	+	*	-	-	-
UAGB 174	BH	RIZ	+	*	3,64 b	-	-
UAGB 175	BH	RIZ	+	*	-	-	-
UAGB 176	BH	RIZ	+	*	-	-	-
UAGB 177	BH	RIZ	-	*	-	5,81 a	1,08 c
UAGB 178	BH	RIZ	+	*	-	-	-
UAGB 179	BH	RIZ	+	*	-	-	-

QS = *quorum sensing*

BH = *Brachiaria humidicola* / BD = *Brachiaria decumbens*

RIZ = Rizosfera / ER = Endofítico de raiz

+ = Isolado positivo / - = Isolado negativo / \* = Isolados não testados

O teste de produção enzimática demonstrou que do total de isolados testados, 38,75% foram capazes de produzir pelo menos um tipo de enzima, 6,2% foram capazes de produzir dois tipos de enzimas, 1,2% os quatro tipos de enzimas, como o isolado UAGB 150. Dos isolados positivos, 64,5% apresentaram valores de IE superior a 2,0. O IE superior ou igual a 2,0 é considerado para caracterizar uma bactéria como boa produtora de enzimas extracelulares em meio sólido *in vitro* (Alves et al., 2002), este apresentando-se como ferramenta que vem a facilitar e selecionar isolados, além de permitir uma comparação de diferentes produções (Carrim et al., 2006).

O teste de produção de celulase demonstrou, que dos 50 isolados testados, 20,0% foram capazes de produzir celulase *in vitro*, valor bem inferior ao encontrado por Prakamhang et al. (2009) de 96,1% dos isolados bacterianos de arroz. O teste de Scott-Knott para produção de celulase identificou três grupos, o grupo “c” com 50,0% dos isolados positivos com valores de IE inferiores a 2,0, e os demais grupos com variação de IE de 3,11 a 6,71 (Tabela 3.3).

Analisando a espécie vegetal e nicho segundo o teste do  $\chi^2$ , foi observado que os mesmos influenciaram os resultados, sendo observada a maior percentagem dos isolados positivos associados a *Brachiaria humidicola* e o nicho endofítico de raiz com 25,0 e 21,4%, respectivamente, tendo destaque o isolado UAGB 110 com IE de 6,71. Quando analisados os nichos por espécie (Figura 3.8) o teste de  $\chi^2$  apontou significância tanto entre nichos dentro da espécie vegetal como nichos por espécie vegetal, tendo se sobressaído a rizosfera da espécie *B. humidicola*.

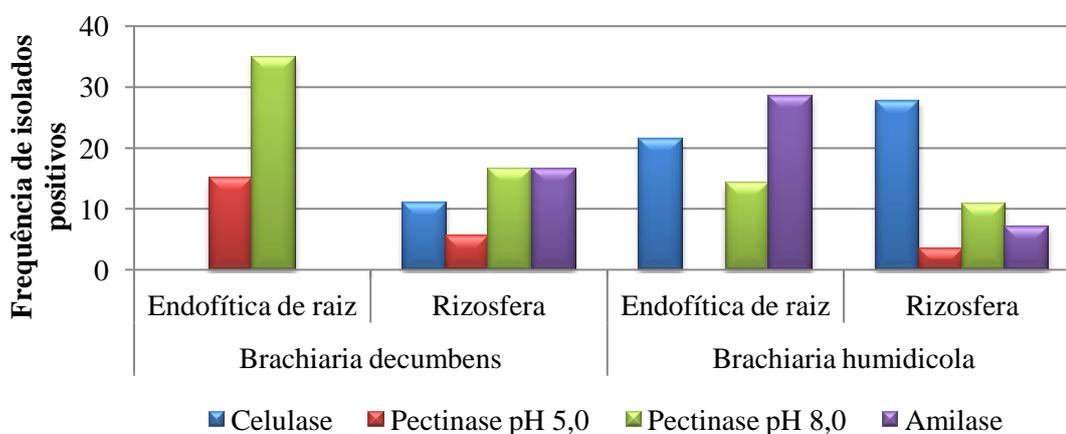


Figura 3.8. Frequência relativa (%) dos isolados bacterianos positivos associados à rizosfera e raiz de plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* em relação à produção de celulase, pectinase e amilase *in vitro*.

Ainda não foram elucidadas todas as formas de penetração das bactérias endofíticas, entretanto sabe-se que algumas cepas de bactérias epifíticas podem penetrar na planta tornando-se endofítica (Compant et al., 2010). Uma das possíveis formas de penetração e permanência dos isolados endofíticos na planta, é a síntese da enzima celulase, facilitado o processo de colonização, entretanto de forma regulada esta enzima apenas é sintetizada no início da colonização (Verma et al., 2001; Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006; Compant et al., 2010). Elevados valores de IE também foram observados em isolados do nicho rizosfera, com os isolados UAGB 144 e UAGB 130 com IE de 3,88 e 3,37, respectivamente.

O teste de produção de pectinases, em pH 5,0 (poligalacturonase) e 8,0 (pectato liase) demonstrou que dos 80 isolados testados, 6,2 e 18,7% foram positivos, respectivamente, valor bem inferior ao encontrado por Prakamhang et al. (2009) de 60,8% dos isolados bacterianos de arroz. O teste de Scott-Knott para a pectinase pH 5,0 identificou dois grupos, o grupo “b” com 40,0% dos isolados positivos e variação do IE de 2,33 a 3,64 e o grupo “a” com 60,0% dos isolados positivos, este variando o IE de 4,76 a 6,27 (Tabela 3.3), ressaltando que em ambos os grupos os valores de IE foram superiores a 2,0. Quando analisada a espécie vegetal e nichos de colonização, o teste do  $\chi^2$  revelou que os mesmos influenciaram os resultados, destacando-se a *B. decumbens* e o nicho endofítico de raiz, este se sobressaindo quando analisado os nichos dentro das espécies vegetais (Figura 3.8). Porém, foi no nicho rizosfera com o isolado UAGB 150 que se observou o maior IE, com 6,27.

Para produção de pectinase a pH 8,0 (pectato liase), o teste de Scott-Knott identificou quatro grupos, onde o grupo “d” com 40,0% de isolados positivos, teve variação do IE de 1,09 a 1,77 e os demais grupos com 60,0% dos isolados positivos, todos com valores de IE superiores a 2,0 (com variação de IE 2,25 a 5,81) (Tabela 3.3). Quando analisada a espécie vegetal e nichos de colonização, o teste do  $\chi^2$  revelou que os mesmos influenciaram os resultados, tendo destaque os isolados do nicho endofítico de raiz e da espécie *B. decumbens* (Figura 3.8), porém o nicho rizosfera foi o que apresentou os isolados com os maiores valores de IE, UAGB 177, UAGB 116 e UAGB 150, estes com produção de 5,81; 5,48 e 4,39, respectivamente.

A celulase e a pectinase compreendem a classe de enzimas denominadas de degradadoras de parede celular vegetal, que são produzidas pelos micro-organismos com intuito de romper a parede celular das plantas hospedeiras, como forma de facilitar a penetração e conseqüentemente a colonização vegetal (Silveira & Freitas, 2007; Prakamhang et al., 2009).

Atualmente, vêm-se descobrindo grande variedade de micro-organismos que apresentam um elevado potencial biotecnológico e vivem em íntima interação com as plantas. Com destaque para as bactérias endofíticas, que colonizam um ambiente de menor competitividade por nutrientes e por apresentarem potencial produção de enzimas extracelulares com capacidade de degradar compostos orgânicos como celulose, pectina, entre outros (Krause et al., 2006).

O teste de produção de amilase por bactérias isoladas de braquiária demonstrou que dos 80 isolados testados, 11,2% são positivos (Tabela 3.3), valor este inferior ao encontrado por Oliveira et al. (2007) de 36,8% dos isolados positivos. De acordo com teste de Scott-Knott, os isolados foram subdivididos em três grupos, onde o grupo “c” teve variação do IE entre 1,08 a 1,91 com 44,4% dos isolados positivos, os demais grupos tiveram variação de IE entre 2,29 a 3,65 com 55,5% dos isolados positivos. Os isolados bacterianos produtores de amilase associados a plantas do gênero *Brachiaria* apresentaram IE superior ao encontrado por Oliveira et al. (2007) trabalhando com isolados de rizóbios, estes com IE máximo de 3,1.

Comparando as espécies vegetais e nichos, o teste do  $\chi^2$  revelou que os mesmos influenciaram os resultados, pode-se observar a prevalência da *B. humidicola* e o nicho endofítico de raiz (Figura 3.8), com destaque para o isolado UAGB 111 com IE de 3,65. A produção enzimática por micro-organismos apresenta elevado interesse industrial, entre estas a amilase que se caracteriza como de elevada importância e utilização biotecnológica (Uenojo & Pastore, 2007). Dentre as diferentes fontes em que as enzimas amilases podem ser obtidas (plantas, animais e micro-organismos), as provenientes dos micro-organismos apresentam vantagens, como a fácil manipulação e a capacidade de produção de forma econômica (Souza & Magalhães, 2010).

### 3.3.2.5 Bactérias produtoras de moléculas *quorum sensing*

A produção de ALH, molécula *quorum sensing*, foi constatada em 56,2% dos isolados de *Brachiaria* analisados (Tabela 3.3), valor este bem inferior ao encontrado por Pinton et al. (2010) com 96,0% dos isolados positivos, analisando rizobactérias de hortaliças, para formação de biofilme, onde pode ser regulado pelo mecanismo de monitoramento populacional *quorum sensing* (Choudhary et al., 2009). Na figura 3.9 podemos observar um isolado positivo para a produção da molécula *quorum sensing*, que apresentou coloração azulada da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4), biossensor de ALHs, distribuída horizontalmente.

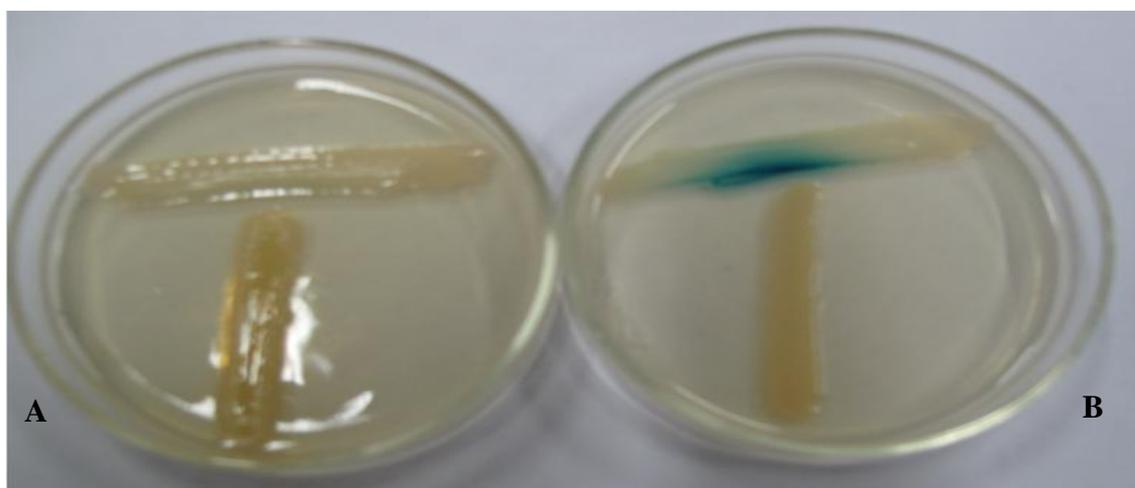


Figura 3.9. Produção da molécula *quorum sensing* visualizado através da mudança de coloração da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4), inoculada horizontalmente, utilizada como controle positivo ficando azulada na presença da molécula *quorum sensing* (ALH), produzida pelo isolado bacteriano de *Brachiaria*. A) Bactéria negativa; B) Bactéria positiva.

Ambas as espécies vegetais analisadas obtiveram mais de 50,0% dos isolados positivos (*B. decumbens* 55,2% e *B. humidicola* 57,1%), para os nichos os isolados de rizosfera foram os que apresentaram o maior percentual de positivos com 65,2% (Tabela 3.3). Entretanto, segundo o teste do  $\chi^2$ , não houve influência entre os nichos e espécies vegetais. Quando analisado os nichos dentro das espécies vegetais, o nicho rizosfera de *B. humidicola* obteve destaque, segundo o teste de  $\chi^2$  (Figura 3.10).

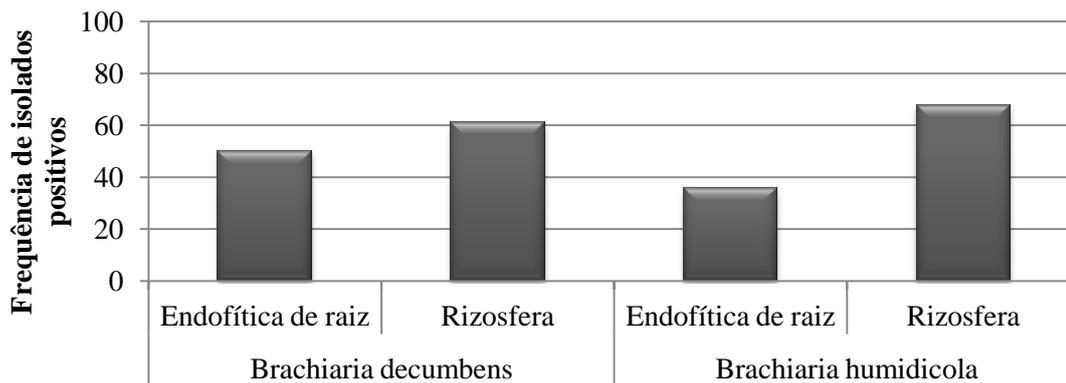


Figura 3.10. Frequência relativa (%) dos isolados bacterianos positivos associados à rizosfera e raiz de plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* em relação à produção da molécula *quorum sensing*.

A produção da molécula *quorum sensing* pode regular a formação de biofilme no interior e exterior da planta, ocorrem pela colonização vertical através do aumento progressivo de bactérias, o crescimento e a dispersão das células microbianas com subsequente aumento na produção do biofilme pelas inúmeras espécies bacterianas (Xavier & Fosten, 2007), tendo diferentes funções, tais como, proteção, resistência, aderência, entre outras (Melo et al., 2012).

### 3.3.3 Caracterização da diversidade genômica

#### 3.3.3.1 Diversidade genética de bactérias potencialmente diazotróficas associadas a gramíneas do gênero *Brachiaria*

A análise da diversidade genética por meio do BOX-PCR permitiu observar o perfil das bandas geradas (Figura 3.11), sendo avaliadas por meio do dendrograma construído com base na matriz de similaridade de Jaccard (Figura 3.12).

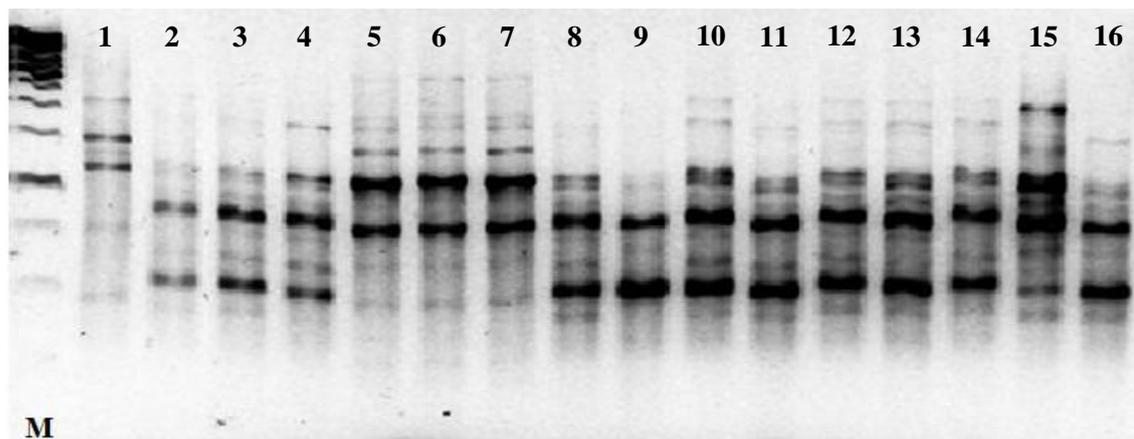


Figura 3.11. Perfis genômicos gerado pela amplificação do iniciador BOXA1R de parte dos isolados potencialmente diazotróficos. Em gel de agarose a 1,5%. M = marcador 1 Kb.; 1 a 16 = isolados bacterianos.

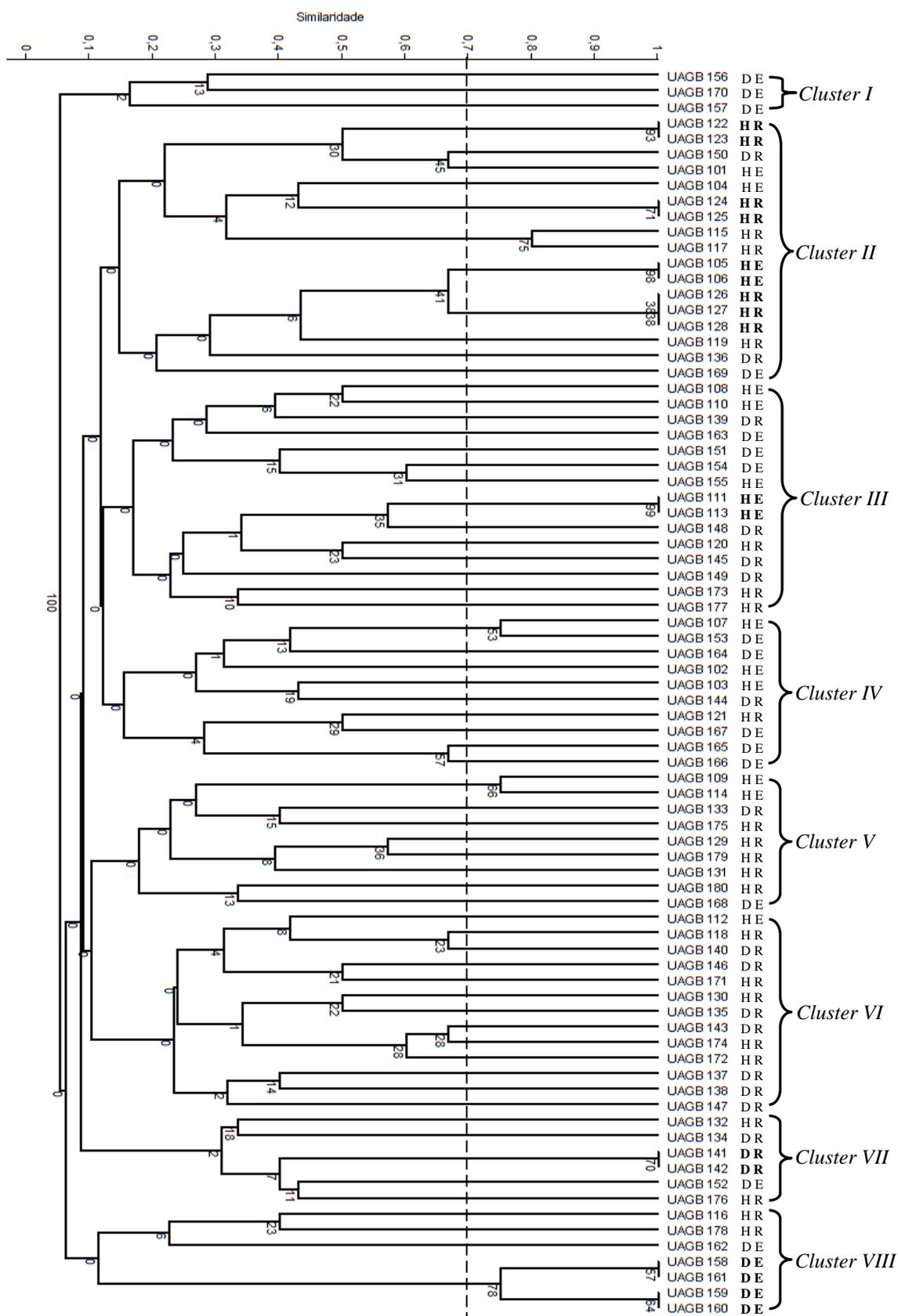


Figura 3.12. Dendrograma obtido pelo agrupamento realizado pelo algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) a partir da matriz de similaridade genética de 80 isolados bacterianos, associados a rizosfera e raiz, de plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*. D/E = *B. decumbens*/endofítico de raiz; D/R = *B.*

*decumbens*/rizosfera; H/E = *B. humidicola*/endofítico de raiz; H/R = *B. humidicola*/rizosfera. O coeficiente de Jaccard foi utilizado para a construção da matriz de similaridade. Os números nos nós do dendrograma indicam o valor da porcentagem de vezes que o grupo ocorreu no mesmo nó durante o *Bootstrap* de 1000 repetições.

O coeficiente de similaridade de Jaccard evidenciou oito grupos (*clusters*) com alta variabilidade entre os isolados, porém entre nichos e plantas hospedeiras, foi observado que 21,2% dos isolados apresentaram 100% de similaridade, oriundos da mesma espécie vegetal e nicho, não havendo isolados com tal semelhança entre plantas ou nichos. Elevada diversidade de bactérias cultiváveis foram encontradas por Rocha et al. (2010), trabalhando com plantas de batata (*Solanum tuberosum*), com isolados com 100 e 90,0% de similaridade encontrados no nicho rizosfera.

Os dados desta pesquisa concordam com os dados encontrados por Reis Junior et al. (2006), analisando isolados de *Brachiaria*, que apresentaram 28,7% similaridade acima de 70,0%, evidenciando que bactérias diazotróficas associadas a gramíneas do gênero *Brachiaria* apesar de sua elevada diversidade, apresentam grupos similares.

Ao analisar os *clusters*, foi constatado o agrupamento por nichos e espécies vegetais, com elevada dissimilaridade, corroborando com Prakamhang et al. (2009), onde os tecidos das plantas de arroz influenciaram na comunidade bacteriana e com Velázquez et al. (2008), observaram que espécies de cana-de-açúcar influenciaram na diversidade dos micro-organismos associados. Resultados semelhantes foram encontrados por Moreira et al., (2008), onde foi observado alta dissimilaridade entre os isolados diazotróficos das gramíneas *Brachiaria* e *Andropogon* e Rodrigues et al. (2006), que afirmaram que o genótipo da planta pode influenciar a diversidade populacional de bactérias.

Recentemente a FBN tem sido bastante estudada em diferentes espécies de gramíneas, tais como cana-de-açúcar, milho e arroz, tendo-se encontrado elevada diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas nos nichos avaliados

(Bhattacharjee et al., 2008). Em gramíneas *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* os isolados potencialmente diazotróficos associados a rizosfera e endofiticamente na raiz, apresentam elevada diversidade genética, sendo observado a formação de grupos de isolados em relação ao nicho e espécie vegetal.

#### **3.3.4 Caracterização dos isolados quanto ao seu genótipo e potencial biotecnológico**

A partir das bandas geradas pelo BOX-PCR e as características fenotípicas de cada isolado foi construído um dendrograma com base na matriz de similaridade de Jaccard. Analisando a caracterização genotípica e fenotípica dos 80 isolados bacterianos é possível observar que a elevada diversidade bacteriana encontrada no dendrograma genotípico é alterada quando incluídos as características biotecnológicas, ocorrendo um aumento na similaridade e um reposicionamento dos isolados, gerando a formação de dez *clusters*, estes agrupando isolados de mesmo nicho e espécie vegetal (Figura 3.13).

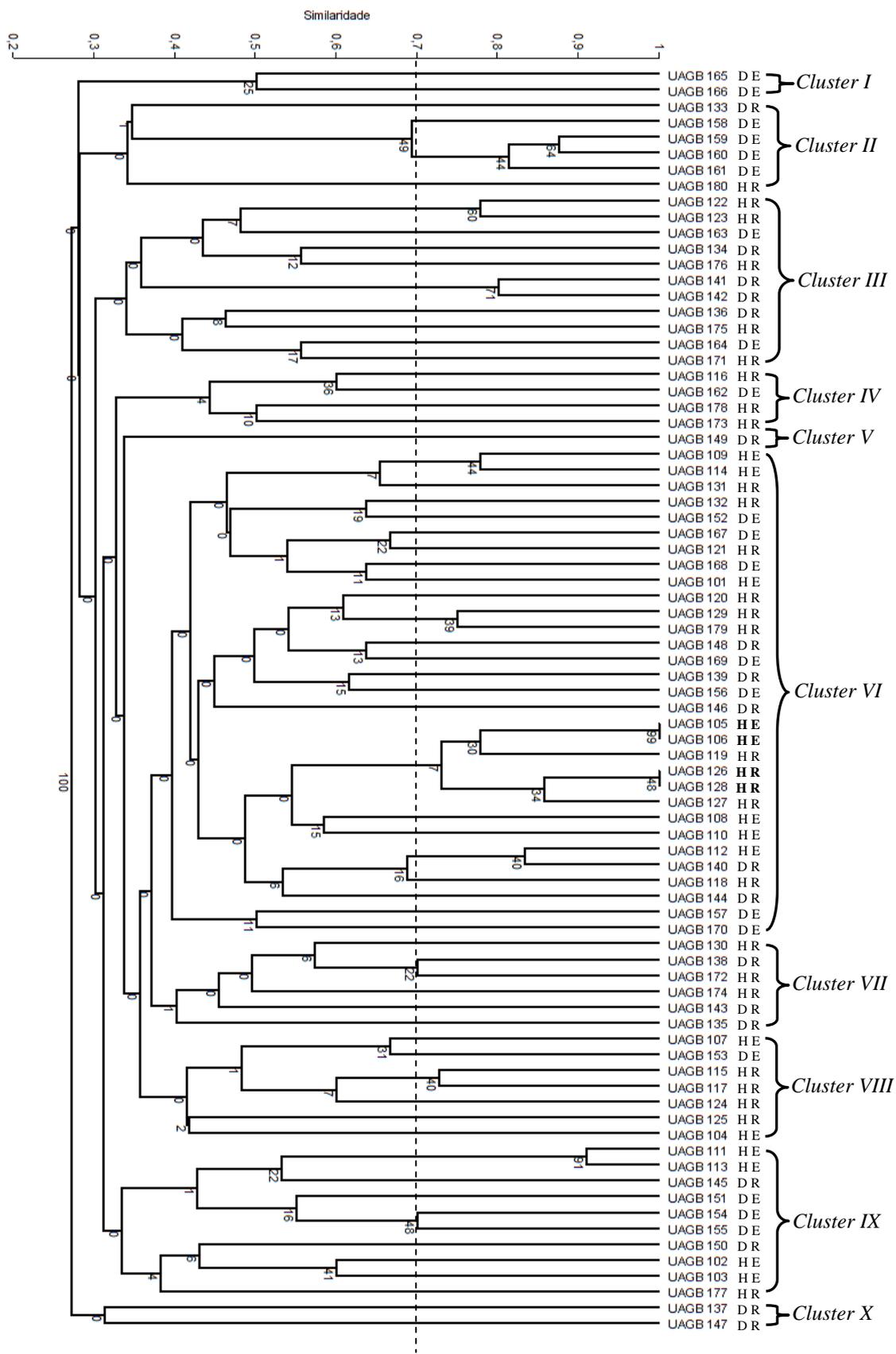


Figura 3.13. Dendrograma obtido pelo agrupamento realizado pelo algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) a partir da matriz de similaridade genética e características fenotípicas dos 80 isolados bacterianos, associados à rizosfera e raiz, de plantas de *Brachiaria*

*decumbens* e *Brachiaria humidicola*. D/E = *B. decumbens*/endofítico de raiz; D/R = *B. decumbens*/rizosfera; H/E = *B. humidicola*/endofítico de raiz; H/R = *B. humidicola*/rizosfera. O coeficiente de Jaccard foi utilizado para a construção da matriz de similaridade. Os números nos nós do dendrograma indicam o valor da porcentagem de vezes que o grupo ocorreu no mesmo nó durante o *Bootstrap* de 1000 repetições.

Os micro-organismos diazotróficos apresentam uma elevada diversidade fenotípica e genética (Moreira et al., 2010). Os isolados bacterianos com 100% de similaridade de acordo com matriz de similaridade de Jaccard para a caracterização genética, como os isolados UAGB 158 e UAGB 161, UAGB 111 e UAGB 113 (Figura 3.12), quando acrescentado as características, há uma alteração no dendrograma, indicando que isolados com 100% de similaridade genética não demonstram mesmo potencial fisiológico dos seus pares em ambiente de laboratório, pela avaliação fisiológica de genes específicos.

### 3.4 Conclusões

As gramíneas forrageiras, *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*, apresentaram elevada colonização bacteriana potencialmente diazotrófica na região da raiz e rizosfera, com os 80 isolados testados exibindo varias características fisiológicas, fixando nitrogênio atmosférico, solubilizando fosfato inorgânico e sintetizando ácido indol acético (AIA) por mais de uma rota metabólica, com e sem a presença do aminoácido precursor L-triptofano. Além de produzirem moléculas *quorum sensing*, enzimas extracelulares (celulase, pectinases e amilases), ambas com valores de índice enzimático superiores a 2,00.

O teste de BOX-PCR identificou elevada diversidade entre os isolados das diferentes espécies vegetais e nichos de colonização, porém é observado isolados com 100% de similaridade entre si e a formação de grupos ou *clusters* entre nichos e

espécies vegetais. Isolados com 100% de similaridade genética apresentaram-se positivos para diferentes características fenotípicas.

### BIBLIOGRAFIA CITADA

- ADESEMOYE A.O.; KLOPPER J.W. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.85, p.1-12, 2009.
- ALAM, S.; KHALIL, S.; AYUB, N.; RASHID, M. *In vitro* solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize Rhizosphere. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.4, p.454-458, 2002.
- ALI, B.; SABRI, A.N.; LJUNG, K. et al. Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L.. **Letters in Applied Microbiology**, v.48, p.542-547, 2008.
- ALVES, M.H; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; PORTO, A.L.F. et al. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase e protease. **Brazilian Journal de microbiology**, v.33, p.225-230, 2002.
- ARAÚJO, A.E.S.; ROSSETTO, C.A.V.; BALDANI, V.L.D. et al. Germinação e vigor de sementes de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas. **Ciência Agrotecnologica**, v.34, p.932-939, 2010.
- ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A. ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in Brassica juncea L. **Biology Fertil Soils**, v.35, p.231-237, 2007.
- BADRI, D.V.; WEIR, T.L.; VAN DER LELIE, D. et al. Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. **Curr Opin Biotechnol**, v.20, p.642-650, 2009.
- BALDOTTO, M.A.B.; BALDOTTO, M.A.; OLIVEIRA, F.L. et al. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar vitória durante a climatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, p.349-360, 2010.
- BARAZANI, O.; FRIEDMAN, J. Effect of exogenously applied L-tryptophan on allelochemical activity of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). **Journal Chemical Ecology**, v.26, p.343-34, 2000.
- BARBOSA, M.V. **Interação entre bactérias produtoras de auxina e diferentes variedades de cana-de-açúcar (Saccharum spp.) cultivadas em Pernambuco**. 2010. 60f. Monografia (Engenheira Agrônoma) – Unidervidade Federal Rural de Pernambuco-Unidade Acadêmica de Garanhuns, Garanhuns.
- BAREA, J.M.; POZO, M.J.; AZCÓN, R. et al. Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v.56, p.1761-1778, 2005.
- BARROTI, G.; NANHAS, E. População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.2043-2050, 2000.
- BECERRA-CASTRO, C.; KIDD, P.S.; PRIETO-FERNÁNDEZ, Á. et al. Endophytic and rhizoplane bacteria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: isolation and characterisation. **Plant Soil**, v.340, p.413-433, 2011.

- BERRAQUERO, F.R.; BAYA, A.M.; CORMENZANA, A.R. Establecimiento de índices para el estado de La subilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, v.17, p.399-406, 1976.
- BHATTACHARJEE, R.B.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S.N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertilisers for non-legumes: prospects and challenges. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.80, p.199-209, 2008.
- BRASIL, M.S.; BALDANI, J.; BALDANI, V.L.D. Ocorrência e diversidade de bacterias diazotróficas asociadas a gramíneas forrageiras do pantanal sul matogrossense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.179-190, 2005.
- CANUTO, E.L.; OLIVEIRA, A.L.M.; REIS, V.M. et al. Evaluation of the biological nitrogen fixation contribution in sugarcane plants originated from seeds inoculated with nitrogen-fixing endophytes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.62-64, 2003.
- CARRIM, A.J.J.; BARBOSA, E.C.; VIEIRA, J.D.G. Endophytic nitrogen fixation in bacterial isolate of *Jacaranda decurrens* Cham. (carobinha-de-campo). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, p.359-359, 2006.
- CASTRO, C.B.; KIDD, P.S. FERNANDES, A.P. et al. Endophytic and rhizoplane bacteria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: isolation and characterisation. **Plant Soil**, v.340, p.413-433, 2011.
- CHAGAS JUNIOR, A.F. **Características agronômicas e ecológicas de rizóbios isolados de solo ácido e de baixa**. 2007. 172f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Amazonas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia, Manaus.
- CHOUDHARY, D.K.; PRAKASH, A.; WRAY, U. et al. Insights of the fluorescent pseudomonas in plant growth regulation. **Current Science**, v.97, p.170-179, 2009.
- COMPANT, S.; CLÉMENT, S.; 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.
- DIAS, A.C.F.; COSTA, F.E.C.; ANDREOTE, F.D. et al. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v.25, p.189-195, 2009.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. 1995. 60p (EMBRAPA).
- EGAMBERDIYEVA, D. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. **Applied Soil Ecology**, v.36, p.184-189, 2007.
- FERRARA, F.I.S.; OLIVEIRA, Z.M.; GONZALES, H.H.S. et al. Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. **Plant Soil**, v.353, p.409-417, 2011.
- FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant Soil**, v.321, p.35-59, 2009.
- FRANCO, J.B.S.; ROSA, R. Metodologia de coleta de dados radiométricos em pastagens do gênero *Brachiaria* com diferentes estágios de degradação. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 10., 2003, Belo Horizonte **Anais...** Belo Horizonte: INPE, 2003. p.2483-2491.
- GARRIDO, M.F.; CARDENAS, D.M.; BONILLA, R.R. et al. Effect of the edaphoclimatic factors and pasture species on the diversity of diazotrophic bacteria. **Pastos y Forrajes**, v.33, p.1-11, 2010.
- HAMMER, O.; DAT, H.; RYAN, P.D. 2001. **PAST: Pacote de Software Paleontológico Estatísticas da Educação e Análise de Dados**. *Palaeontologia Electronica*, 4 (1):. 9pp.

- HARA, F.A.S.; OLIVEIRA, L.A. Características fisiológicas e cológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álidos de Pesidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazonica**, v.34, p.343-357, 2004.
- HARDOIM, P.R.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends Microbiol**, v.16, p.463-471, 2008.
- KRAUSE, A.; RAMAKUMAR, A.; BARTELS, D. et al. Complete genome of the mutualistic, N<sub>2</sub>-Fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. Strain BH72. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1459-1465, 2006.
- KUKLINSKY-SOBRA, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R. et al. Isolation and characterization of soybean associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v.6, p.1244-1251, 2004.
- KUSS, A.V.; KUSS, V.V.; LOVATO, T. et al. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indol acético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. **Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1459-1465, 2007.
- LIRA-CADETE, L.; FARIAS, A.R.B. RAMOS, A.P.S. et al. 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.
- LOREDO-OSTI, C.; LÓPEZ-REYES, L.; ESPINOSA-VICTORIA, D. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas. **Terra Latino American**, v.22, p.225-239, 2004.
- JENSEN, P.J.; BANDERSKI, R.S. Metabolism and synthesis of indole-3-acetic acid (IAA) in *Zea mays*. Levels of IAA during kernel development and the use of *in vitro* endosperm systems for studying IAA biosynthesis. **Plant Physiol**, v.106, p.343-351, 1994.
- MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 2.ed. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005.158p.
- MEDEIROS E.V.; SILVA, K.J.P.; MARTINS, C.M. et al. Tolerância de bactérias fixadoras de nitrogênio provenientes de municípios do Rio Grande do Norte à temperatura e salinidade. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, v.7, 2007.
- MELO, P.C.; FERREIRA, L.M.; NADER-FILHO, A. et al. Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina. **Bioscience Journal**, v.28, p.94-99, 2012.
- MERZAEVA, O.V.; SHIROKIKH, I.G. The production of auxins by the endophytic bacteria of winter rye. **Appl Biochem Microbiol**, v.46, p.44-50, 2010.
- MOREIRA, F.M.S.; LANGE, A.; KLAUBERG-FILHO, O. et al. Associative diazotrophic bacteria in grass roots and soils from heavy metal contaminated sites. **Brazilian Academy of Sciences**, v.80, p.749-761, 2008.
- MOREIRA, F.M.S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R.S.A. et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicação. **Comunicata Scientiae**, v.2, p.74-99, 2010.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2006.729p.
- MORGAN, J.A.W.; BENDING, G.D.; WHITE, P.J. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v.56, p.1729-1739, 2005.
- NAIK, P.R.; RAMAN, G.; NARAYANAN, K. et al. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. **BMC Microbiology**, v.8, p.230-240, 2008.
- OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S. et al. Produção e amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.61-66, 2007.

- PINTON, R.; DIAS, A.; XAVIER, T.F. et al. Caracterização morfocultural, biossíntese de autoindutor e formação de biofilme por rizobactérias de hortaliças. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p.284-293, 2010.
- PRAKAMHANG, J.; MINAMISAWA, K.; TEAMTAISONG, K. et al. The communities of endophytic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). **Applied Soil Ecology**, v.42, p.141-149, 2009.
- QUECINE, M.C. **Aspectos biotecnológico 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.
- RADWAN, T.E.E.; MOHAMED, Z.K; REIS, V.M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.997-1004, 2005.
- REIS JUNIOR, F.B.; REIS, V.R.; TEIXEIRA, K.R.S. Restrição do 16S-23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria* spp.. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.431-438, 2006.
- REIS JUNIOR, F.B.; SILVA, M.F.; TEIXEIRA, K.R.S. et al. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.28, p.103-113, 2004.
- RICHARDSON, A.E.; BAREA, J., MCNEILL, A.M. et al. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant Soil**, v.321, p.305-339, 2009.
- ROCHA, U.N.; ANDREOTE, F.D.; AZEVEDO, J.L. et al. Cultivation of hitherto-uncultured bacteria belonging to the Verrucomicrobia subdivision 1 from the potato (*Solanum tuberosum* L.) rhizosphere. **Journal Soils Sediments**, v.10, p.326-339, 2010.
- RODRIGUES, L.S.; BALDONI, V.L.D.; REIS, V.M, et al. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gênero *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.275-284, 2006.
- RODRIGUEZ, H.; GONZALESZ, T.; SELMAN, G. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. **Journal of Biotechnology**, v.84, p.155-161, 2000.
- ROESCH, W.F.L.; FULTHORPE, R.R. JACCQUES R.J.S. et al. Biogeography of diazotrophic bacteria in soils. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v.26, p.1503-1508, 2010.
- ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **The American Phytopathological Society**, v.19, p.827-837, 2006.
- SANTOS, I.B.; LIMA, D.R.M.; BARBOSA, J.G. et al. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de-açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância a salinidade. **Bioscience Journal**, v.28, p.142-149, 2012.
- SILVA, A.A.O.; FELIPE, T.A.; BACH, E.E. Ação do *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento das plantas de trigo (variedade IAC-24) e cevada (variedade CEV 95033). **Revista Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal**, v.3, p.29-35, 2004.
- SILVA, L.L.G.G.; ALVES, G.C.; RIBEIRO, J.R.A. et al. Fixação biológica de nitrogênio em pastagens com diferentes intensidades de corte. **Archivos de Zootecnia**, v.59, p.21-30, 2010.
- SILVEIRA, A.P.P.; FREITAS, S.S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. 1.ed., São Paulo: Instituto Agrônomo de Campinas, 2007. 317p.
- SOUZA, P.M.; MAGALHÃES, P.O. Application of microbial  $\alpha$ -amilase in industry – a review. **Brazilian Journal of microbiology**, v.41, p.850-861, 2010.

- SUZUKI, M.T. **Isolamento, indentificação e caracterização de linhagens de *Bacillus truringiensis* de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. 2006. 86f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SZENTHE, A.; PAGE, W.J. *Quorum sensing* in *Agrobacterium tumefaciens* using N-oxo-Acyl-homoserine lactone chemical signal. In: Workshop/Conference of the association for biology laboratory education. 24., 2002, Louisiana. **Anais...** Louisiana: ABLE. 2002. p.145-152.
- TAURIAN, T.; ANZUAY, M. S.; ANGELINI, J. et al. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. **Plant Soil**, v. 329, p.421-431, 2010.
- TROEH, F.R.; THOMPSON, L.M. **Solos e fertilidade do solo**. São Paulo: Andrei, 2007, 718p.
- UENOJO, M.; PASTORE, G.M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v.30, p.388-394, 2007.
- VELÁRQUEZ, E.; ROJAS, M.; LORITE, M.J. et al. Genetic diversity os endophytic bacteria which could be find in the apoplastic sap of the medullary parenchyma of the stem os healthy sugarcane plants. **Journal of Basic microbiology**, v.48, p.118-124, 2008.
- 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.
- XAVIER, J.B.; FOSTER, K.R. Cooperation and conflict in microbial biofilms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.104, p.876-881, 2007.
- ZHANG, H.W.; SONG, Y.C.; TAN, R.X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, v.91, p.753-771, 2006.

## 4 CAPÍTULO 02

### **Diversidade da comunidade bacteriana cultivável associada às raízes de *Brachiaria***

**Resumo:** Na busca por alternativas que venham minimizar impactos ambientais causados pelo uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) por bactérias associadas a gramíneas forrageiras tem se tornado uma alternativa inovadora. A comunidade bacteriana associada aos vegetais apresenta elevada diversidade genética e pode apresentar diferentes mecanismos de promoção de crescimento vegetal. Neste contexto, objetivou-se isolar e avaliar a densidade populacional total de bactérias cultiváveis associadas às gramíneas *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*, cultivadas no município das Correntes, Agreste Meridional do Estado de Pernambuco, além de verificar sua diversidade genética e fisiológica. Para tanto, plantas de *B. decumbens* e *B. humidicola* foram coletadas de pastagens estabelecidas e amostras de raízes e da rizosfera foram utilizadas para o isolamento de bactérias em meio de cultura TSA 10% (*Trip-case Soy Agar*). Dos isolados obtidos, 100 bactérias foram avaliadas quanto a capacidade de fixação de nitrogênio, em diferentes concentrações de NaCl, solubilização de fosfato inorgânico, sob diferentes fontes de carbono, síntese de ácido indol acético (AIA) por diferentes rotas bioquímicas, produção de enzimas extracelulares (pectinas - pectato liase e poligalacturonase - celulase e amilase) e de moléculas *quorum sensing* do tipo N-acyl lactona homoserina (ALH). A diversidade genética dos isolados bacterianos foi avaliada por meio da técnica de BOX-PCR. Foi observado que as gramíneas forrageiras *B. decumbens* e *B. humidicola* apresentaram elevada associação com bactérias, com densidade populacional com valores de unidade formadora de colônia por grama de tecido vegetal fresco ou solo entre  $10^3$  a  $10^4$ , não diferindo entre espécies vegetais e nichos de avaliação. Em relação à caracterização fenotípicas, 57,0% dos isolados apresentaram halo de crescimento no interior do meio de cultura NFb, livre de fonte nitrogenada, com a espécie *B. decumbens* se sobressaindo com o maior frequência de isolados positivos. Dezoito isolados diazotróficos foram avaliados quanto a fixação de nitrogênio sob o aumento da concentração de sal no meio. Os isolados diazotróficos provenientes da rizosfera apresentaram crescimento com níveis de 10,0% de sal. Quanto à produção de AIA, 66,0% dos isolados foram positivos, com destaque para o isolado UAGB 69 com produção de  $162,10 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AIA, além de ter sido observado influência do nicho (endofítico de raiz ou rizosfera) na produção do fitohormônio. Estes isolados também apresentaram mais de uma rota bioquímica para produção deste fitohormônio (via independente de L-triptofano), porém com valores de produção inferiores. Para o teste de solubilização de fosfato inorgânico, 34,0% dos isolados responderam positivamente, com 58,8% destes apresentando índices de solubilização (IS) entre médio e alto. Quando se comparou às espécies vegetais e nichos, a *B. humidicola* se destacou juntamente com o nicho endofítico de raiz. Estes isolados bacterianos também foram capazes de crescer e solubilizar fosfato em meios de cultura com manitol e sacarose como fontes de carbono, apresentando maiores valores IS no meio contendo sacarose. A produção das enzimas extracelulares (pectinase em pH 5,0 e em 8,0 e amilase) foi evidenciada em 41,0% dos isolados, com 22,0% produzindo um tipo, 21,0% dois tipos e 4,0% três tipos de enzimas. Para todas as enzimas foi observado isolados com valores de índice enzimático (IE) superior a 2,0, valor considerado adequado para caracterizar um isolado como bom produtor enzimático em meio sólido.

Para o teste da produção de celulase, apenas 36 isolados foram avaliados, sendo observado que 52,8% foram positivos, porém os valores de IE não foram superiores a 2,0. Quando analisada a produção da molécula ALH, 60,0% dos isolados apresentaram-se positivos, porém não foi observado influência entre os nichos e espécies vegetais. A análise da variabilidade genética pela técnica do BOX-PCR demonstrou elevada diversidade entre os isolados dos diferentes nichos e espécies vegetais, a maioria com similaridade inferior a 70,0%, segundo a matriz genética de Jaccard, porém ao avaliar a formação dos grupos ou *clusters*, foi constatado o agrupamento dos isolados por nicho ou espécie vegetal. Desta forma, pode-se concluir que as gramíneas *B. decumbens* e *B. humidicola* apresentaram elevada colonização bacteriana cultivável total na região da raiz, com elevada diversidade genética e potencial de crescimento vegetal, fixando biologicamente o nitrogênio atmosférico, inclusive sob alta concentração de sal no meio, produzindo AIA, por diferentes rotas bioquímicas, solubilizando fosfato inorgânico, utilizando diferentes fontes de carbono no meio, produzindo enzimas extracelulares (pectinase, amilase e celulase) e molécula *quorum sensing*.

**Palavras chaves:** BOX-PCR, fixação biológica de nitrogênio, gramíneas forrageiras, potencial de crescimento vegetal, variabilidade genética

### **Diversity of cultivable bacterial community associated with roots of *Brachiaria***

**Abstract:** In the search for alternatives that will minimize environmental impacts caused by the indiscriminate use of nitrogenous fertilizers, biological nitrogen fixation (BNF) for bacteria associated with grasses has become an innovative alternative. The bacterial community associated with plant exhibits high genetic diversity and may have different mechanisms of plant growth promotion. In this context, the objective was to isolate and evaluate the total population density of culturable bacteria associated with *Brachiaria decumbens* and *Brachiaria humidicola*, cultivated in the city of Correntes, South Agreste of Pernambuco, and investigate its physiological and genetic diversity. For this purpose, plants of *B. decumbens* and *B. humidicola* pastures were established and collected samples of roots and rhizosphere were used for isolation of bacteria in medium TSA 10% (Trip-case Soy Agar). Of the isolates, 100 bacteria were evaluated for the ability to fix nitrogen in different NaCl concentrations, solubilization of inorganic phosphate under different carbon sources, synthesis of indole acetic acid (IAA) by different biochemical pathways, production of extracellular enzymes (pectins - pectate lyase and polygalacturonase - cellulase and amylase) and quorum sensing molecules like N-acyl homoserine lactone (ALH). Genetic diversity of bacterial isolates was assessed by BOX-PCR technique. It was observed that the grasses *B. decumbens* and *B. humidicola* showed strong association with bacteria, with density values of colony forming unit per gram of fresh plant tissue or soil from  $10^3$  to  $10^4$ , with no differences between plant species and niches evaluation. Regarding the phenotypic characterization, 57.0% of the isolates showed a halo of growth inside the culture medium NFB, free of nitrogen source, with the species *B. decumbens* jutting with the highest frequency of positive isolates. Diazotroph eighteen isolates were evaluated for the fixation of nitrogen in the concentration of salt in the medium. The isolates from the rhizosphere diazotroph showed levels of growth with 10.0% salt. The production of IAA, 66.0% of the isolates were positive, especially for isolated UAGB 69 with production of  $162.10 \mu\text{g mL}^{-1}$  EIA, and has been observed influence of the niche (endophytic root or rhizosphere) the production of the phytohormone. These isolates also had more than one biochemical pathway for the production of the phytohormone (independent pathway of L-tryptophan), but with lower production values. To test for solubilization of inorganic phosphate, 34.0% of the isolates responded positively, with 58.8% of those presenting rates of solubilization (IS) between medium and high. When compared to plant species and niches, *B. humidicola* stood out along with the root endophytic niche. These bacterial isolates were also able to grow and solubilize phosphate in the culture medium with mannitol and sucrose as carbon sources, with higher values in the IS medium containing sucrose. The production of extracellular enzymes (pectinase at pH 5.0 and 8.0 and amylase) was observed in 41.0% of the isolates, with 22.0% producing a kind, two types 21.0% and 4.0% three types of enzymes. For all the isolated enzymes was

observed with values of enzymatic index (EI) greater than 2.0, considered adequate to characterize a good producer as isolated enzyme on solid medium. For test production of cellulase isolated, only 36 were evaluated and found that 52.8% were positive but the values of the IE did not exceed 2.0. When we analyzed the production of the HLA molecule, 60.0% of the isolates were positive, but no influence was observed between the niches and plant species. The analysis of genetic variability by BOX-PCR technique showed high diversity among isolates of different niches and plant species, most with less than 70.0% similarity according to Jaccard's genetic blueprint, but to evaluate the formation of groups or clusters was found to cluster analysis by niche or plant species. Thus, it can be concluded that the grasses *B. decumbens* and *B. humidicola* had high total cultivable bacterial colonization in the root area with high genetic diversity and potential for plant growth, biologically fixing atmospheric nitrogen, even under high salt concentration in the middle, producing IAA by different biochemical pathways, solubilizing inorganic phosphate, using carbon sources in the medium, to produce extracellular enzymes (pectinase, cellulase and amylase) and quorum sensing molecules.

**Keywords:** biological nitrogen fixation, BOX-PCR, forage grasses, genetic variability, potential for plant growth

## 4.1 Introdução

É necessário uma maior atenção para mudanças nos sistemas agrícolas que tenham por finalidade a melhoria da qualidade ambiental, neste sentido a exploração da diversidade microbiana associada às plantas pode ser utilizada para dar mais efetivamente sustentabilidade aos ecossistemas para aperfeiçoamento da produção, em que a associação de gramíneas e bactérias promotoras de crescimento vegetal representem uma alternativa promissora para o melhor desenvolvimento e desempenho vegetal (Roesch et al., 2007; Dias et al., 2009; Piromyot et al., 2011), contribuindo para produção agrícola, proporcionando mais alimento para o gado (Espinoza et al., 2011) e redução de custos com a diminuição da utilização de fertilizantes industriais (Lindstrom et al., 2010).

A diversidade de bactérias cultiváveis associadas às plantas, como as gramíneas forrageiras, pode ser influenciada por vários fatores, como genótipo da planta e do hospedeiro, fatores ambientais e interações bactéria-planta (Schloter et al., 2001; Tripathi et al., 2002; Garrido et al., 2010). Diversos estudos vêm demonstrando os diferentes mecanismos de interação em bactérias e plantas, entre estes mecanismos há os negativos (patogenicidade), positivos (simbiose) e neutros (Moreira et al., 2010; Castro et al., 2011; Loredano-Osti et al., 2011).

As bactérias associativas apresentam diversas características de interesse para as plantas, como a fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de fitohormônios, enzimas, entre outras (Kuss et al., 2007; Dias et al., 2009; Prakamhang et al., 2009; Araújo et al., 2010), podendo habitar diferentes nichos, como solo, rizosfera e o interior dos tecidos vegetais, ou seja, endofiticamente (Moreira et al., 2008; Dias et al., 2009).

O conhecimento da diversidade microbiana e de características envolvidas com a promoção de crescimento vegetal em programas de forragicultura contribui para programas de manejo integrado que promovam o melhor desenvolvimento das

pastagens, podendo representar uma importante opção para o estabelecimento e a produção de gramíneas forrageiras (Loredó-Osti et al., 2004; Reis Junior et al., 2004; Espinoza et al., 2011).

Neste contexto, objetivou-se com o presente trabalho: isolar a comunidade bacteriana cultivável em meio de cultura não seletivo, associada às gramíneas *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*, nos nichos rizosfera e endofítico de raiz; selecionar bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico e analisar a influência do sal sobre esta função; selecionar bactérias produtoras de ácido indol acético e quantificar a produção de AIA via dependente e independente de L-triptofano; selecionar bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico e analisar a influência de diferentes fontes de carbono sobre esta função; identificar e avaliar a produção enzimática (celulase, amilase e pectinase), nas bactérias isoladas; analisar os isolados bacterianos quanto a produção de moléculas *quorum sensing*; analisar a variabilidade genética de bactérias associadas as gramíneas estudadas e comparar a viabilidade genética com a variabilidade fenotípica encontrada dos isolados.

## **4.2 Material e métodos**

### **4.2.1 Áreas de estudo e material vegetal**

As coletas foram realizadas em pastagens de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* cultivadas na Fazenda Pau Ferro no município das Correntes, no Agreste Meridional do Estado de Pernambuco, em pastagens estabelecidas com cerca de cinco anos de cultivo e sem adubação.

Os locais foram georreferenciados com o auxílio de um GPS, tendo as coordenadas centrais das pastagens: *Brachiaria decumbens* - S 09°06'00" e W 36°21'29" e *Brachiaria humidicola* - S 09°06'53" e W 36°21'29". De cada área de pastagem, aleatoriamente, coletaram-se três amostras vegetais e de solo, a uma

profundidade de 0-0,2 m. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e em seguida levadas ao Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana, da Unidade Acadêmica de Garanhuns/Universidade Federal Rural de Pernambuco, para processamento e análises.

Amostras do solo foram encaminhadas para análise das características químicas e físicas no Laboratório de Química do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Tabela 3.1 – Capítulo 1).

#### **4.2.2 Isolamento da comunidade bacteriana cultivável e estocagem bacteriana**

O isolamento em *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* nos nichos rizosfera e endofítico de raiz foi realizado segundo Kuklinsky-Sobral et al. (2004) com algumas modificações, utilizando o meio rico TSA (*Trypticase Soy Agar*) 10% e os demais procedimentos ocorrendo como descrito no subitem 3.2.2 (Capítulo I).

A densidade populacional bacteriana por grama de tecido vegetal fresco (TVF) ou solo (unidade formadora de colônia – UFC g<sup>-1</sup> TVF ou SF) foi estimada pela contagem de colônias no oitavo dia após plaqueamento. Foram selecionadas 100 colônias bacterianas de diferentes cores, formas e textura, e estas transferidas das placas de isolamento para placas contendo meio TSA 10%, sendo purificadas por esgotamento, armazenadas em meio TSA 10% sólido em geladeira e em meio líquido com 20% de glicerol e mantidas em freezer a uma temperatura de -20 °C.

#### **4.2.3 Caracterização fenotípica**

##### **4.2.3.1 Identificação de bactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio atmosférico**

Para os 100 isolados a identificação ocorreu como descrito no subitem 3.2.3.1 (Capítulo I). Para os 36 isolados do UAGB 1 a UAGB 36 (sendo 18 de cada espécie vegetal, destes 9 de cada nicho) os positivos para o teste de fixação foram inoculados

em meio NFb com diferentes concentrações de NaCl: 0,1; 2,5; 5,0 e 10,0% e, posteriormente, incubadas a 28 °C por oito dias.

#### **4.2.3.2 Identificação de bactérias produtoras de ácido indol acético (AIA) por diferentes rotas bioquímicas**

Para os 100 isolados a identificação para produção de AIA com o acréscimo do L-triptofano ocorreu como descrito no subitem 3.2.3.2 (Capítulo I). Para os isolados UAGB 1 a UAGB 36 positivos para produção de AIA com L-triptofano realizou-se o teste de produção de AIA, em meio de cultura sem o acréscimo do L-triptofano.

#### **4.2.3.3 Identificação de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico**

Para os 100 isolados a identificação das bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico ocorreu como descrito no subitem 3.2.3.3 (Capítulo I). Para os isolados UAGB 1 a UAGB 36 positivos para solubilização de fosfato realizou-se o teste de solubilização de fosfato com diferentes fontes de carbono (sacarose e manitol) 10 g L<sup>-1</sup>.

#### **4.2.3.4 Identificação de bactérias produtoras de enzimas extracelulares**

Para os 100 isolados a identificação das bactérias produtoras de enzimas extracelulares (pectinase em ambos os pHs (pH 8,0 da enzima pectato liase) e (pH 5,0 da enzima poligalacturonase) e amilase) ocorreu como descrito no subitem 3.2.3.4.2 e 3.2.3.4.3, respectivamente (Capítulo I). Para os 36 isolados do UAGB 1 a UAGB 36 foi realizado o teste de produção de celulase como descrito no subitem 3.2.3.4.1(Capítulo I).

#### **4.2.3.5 Identificação de bactérias produtoras de moléculas *quorum sensing***

Para os 100 isolados a identificação das bactérias produtoras de moléculas *quorum sensing* ocorreu como descrito no subitem 3.2.3.5 (Capítulo I).

#### **4.2.4 Caracterização genotípica**

##### **4.2.4.1 Análise da variabilidade genética bacteriana por BOX-PCR**

O teste de variabilidade genética por BOX-PCR ocorreu como descrito no subitem 3.2.4.1 (Capítulo I).

##### **4.2.5 Análise estatística**

As análises quantitativas de densidade populacional, produção de enzimas, solubilização de fosfato e ácido indol acético foram submetidos à análise de variância (ANOVA) através do programa estatístico SISVAR 5.3<sup>®</sup>, a comparação entre as médias foi realizada pelo Teste de Scott-Knott, ( $p < 0,05$ ). Para verificar a possível influência dos tratamentos: nichos e espécie vegetais, sobre a expressão bacteriana de características fenotípicas (FBN, produção de AIA, solubilização de fosfato, produção de enzimas e de molécula *quorum sensing*) foi realizado o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ), com probabilidade de até 5%.

#### **4.3 Resultados e discussão**

##### **4.3.1 Densidade populacional da comunidade bacteriana cultivável associada às plantas do gênero *Brachiaria***

A densidade populacional de bactérias cultiváveis totais associadas à rizosfera e endofiticamente as raízes de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* variou de  $1,60 \times 10^3$  a  $2,90 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup> de TVF ou SF. Segundo o teste de Scott-Knott não houve diferença estatística entre espécies vegetais e nichos (Figura 4.1), concordando com os resultados de Becerra-Castro et al. (2011), analisando isolados de leguminosas (*Cytisus striatus*) e discordando dos resultados encontrados por Canuto et al. (2003) e Cavaglieri et al. (2009), avaliando a densidade populacional de bactérias associadas a gramíneas, cana-de-açúcar e milho, respectivamente e Kuklinsky-Sobral et al. (2004), avaliando a comunidade bacteriana associada a soja e Dias et al. (2009) em plantas de

morango, que encontraram diferenças na densidade populacional dos isolados bacterianos nos diferentes nichos analisados e Reis Junior et al. (2004) e Bergamaschi et al. (2007), avaliando diferentes espécies de *Brachiaria* e sorgo forrageiro, respectivamente, que observaram a influência do genótipo da planta na colonização bacteriana. Segundo Loredó-Osti et al. (2004), o número quantitativo de microorganismos associados as raízes varia entre espécies vegetais e mesmo entre genótipos da mesma espécie, fato atribuído a variação de cada planta na quantidade e qualidade dos exsudados radiculares liberados.

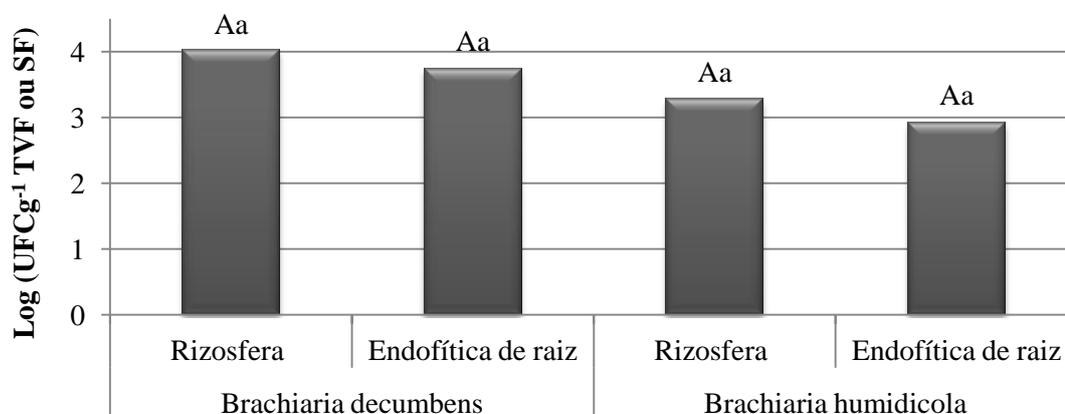


Figura 4.1. Densidade populacional da comunidade bacteriana total, isolada em meio de cultura TSA 10%, de bactérias endofíticas de raiz e da rizosfera de plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*. Letras maiúsculas comparam os nichos por espécie vegetal, letras minúsculas os nichos entre si de ambas as espécies vegetais. Letras iguais não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Apesar de não ter sido observado diferença significativa, os valores das densidades populacionais no nicho rizosfera, em ambas as espécies de plantas analisadas, apresentaram maior valor, fato este esperado como citado por Becerra-Castro et al. (2011). Nas condições utilizadas, foram observados três grupos de bactérias predominantes classificadas de acordo com sua coloração, em brancas, amarelas e rosas, com variação na tonalidade de cor, tamanho, forma, consistência e elevação, havendo predominância de colônias de cor branca e amarela (Figura 4.2). De forma a abranger

todos os grupos de colônias bacterianas, espécies vegetais e nichos foram selecionados 100 isolados bacterianos, que foram utilizados também para os demais testes.



Figura 4.2. Placa de Petri com meio de cultura TSA 10% do isolamento total de bactérias associadas a diferentes espécies de gramíneas do gênero *Brachiaria*.

#### 4.3.2 Identificação de bactérias com características de promoção de crescimento vegetal

As bactérias apresentaram diferentes mecanismos que podem induzir a promoção de crescimento vegetal, entre eles, a FBN, produção de fitohormônios, solubilização de fosfato inorgânico, entre outros (Araújo et al., 2010; Hayat et al., 2010; Taulé et al., 2011). As 100 bactérias isoladas, 42 de *B. humidicola* (25 endofítica de raiz e 17 da rizosfera) e 58 de *B. decumbens* (23 endofítica de raiz e 35 da rizosfera), foram avaliadas quanto a diferentes características de promoção de crescimento e os resultados estão expressos na tabela 4.1.

Tabela 4.1. Fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de AIA com acréscimo de L-triptofano no meio de cultura, dos 100 isolados bacterianos associados as gramíneas *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*. Os valores, em cada coluna, seguidos de mesma letra indicam ausência de significância estatística de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ )

Isolados	Espécie Vegetal	Nicho	FBN	Produção de AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	IS
UAGB 1	BH	ER	+	35,52 e	3,82 a
UAGB 2	BH	ER	+	-	3,27 b
UAGB 3	BH	ER	-	-	-
UAGB 4	BH	ER	-	29,52 e	-
UAGB 5	BH	ER	-	-	-
UAGB 6	BH	ER	-	26,38 e	1,59 b
UAGB 7	BH	ER	-	63,03 d	4,26 a
UAGB 8	BH	ER	-	38,11 e	3,08 b
UAGB 9	BH	ER	+	30,04 e	3,14 b
UAGB 10	BH	RIZ	+	13,48 f	-
UAGB 11	BH	RIZ	-	-	2,80 b
UAGB 12	BH	RIZ	-	-	-
UAGB 13	BH	RIZ	+	16,07 f	-
UAGB 14	BH	RIZ	+	-	-
UAGB 15	BH	RIZ	+	-	-
UAGB 16	BH	RIZ	-	-	-
UAGB 17	BH	RIZ	-	-	-
UAGB 18	BH	RIZ	-	-	2,16 b
UAGB 19	BD	ER	+	-	2,31 b
UAGB 20	BD	ER	-	-	1,40 b
UAGB 21	BD	ER	+	-	2,57 b
UAGB 22	BD	ER	-	64,72 d	5,00 a
UAGB 23	BD	ER	+	-	-
UAGB 24	BD	ER	-	-	-
UAGB 25	BD	ER	+	-	-
UAGB 26	BD	ER	+	-	-
UAGB 27	BD	ER	-	-	-
UAGB 28	BD	RIZ	-	28,19 e	3,14 b
UAGB 29	BD	RIZ	+	-	-
UAGB 30	BD	RIZ	+	-	1,61 b
UAGB 31	BD	RIZ	-	10,29 f	-
UAGB 32	BD	RIZ	-	11,46 f	-
UAGB 33	BD	RIZ	+	-	-
UAGB 34	BD	RIZ	+	27,02 e	1,48 b
UAGB 35	BD	RIZ	+	59,63 d	6,08 a
UAGB 36	BD	RIZ	+	-	-
UAGB 37	BH	ER	-	3,91 f	-
UAGB 38	BH	ER	-	-	-
UAGB 39	BH	RIZ	+	47,38 e	-
UAGB 40	BH	RIZ	-	20,98 e	-
UAGB 41	BH	RIZ	-	3,99 f	-
UAGB 42	BH	RIZ	-	4,59 f	-
UAGB 43	BD	ER	+	34,70 e	-
UAGB 44	BD	ER	+	4,64 f	-
UAGB 45	BD	ER	-	-	-
UAGB 46	BD	RIZ	+	-	-
UAGB 47	BD	RIZ	+	8,05 f	3,18 b
UAGB 48	BD	RIZ	+	78,72 c	2,96 b
UAGB 49	BD	RIZ	+	16,98 f	3,05 b
UAGB 50	BD	RIZ	-	6,84 f	-
UAGB 51	BD	RIZ	+	-	-

(Continuação da Tabela 4.1)

Isolados	Espécie Vegetal	Nicho	FBN	Produção de AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	IS
UAGB 52	BH	ER	-	2,27 f	-
UAGB 53	BH	ER	+	35,52 e	2,69 b
UAGB 54	BH	ER	-	7,74 f	-
UAGB 55	BH	ER	+	20,55 e	3,06 b
UAGB 56	BH	ER	+	7,70 f	2,32 b
UAGB 57	BH	ER	+	3,26 f	3,00 b
UAGB 58	BH	ER	-	4,73 f	-
UAGB 59	BH	RIZ	+	56,78 d	-
UAGB 60	BH	RIZ	+	4,98 f	-
UAGB 61	BH	RIZ	-	81,45 c	-
UAGB 62	BH	RIZ	+	148,34 a	-
UAGB 63	BD	ER	-	9,56 f	2,41 b
UAGB 64	BD	ER	-	8,13 f	4,88 a
UAGB 65	BD	ER	-	97,92 c	-
UAGB 66	BD	ER	+	-	-
UAGB 67	BD	ER	+	4,25 f	-
UAGB 64	BD	ER	-	8,13 f	4,88 a
UAGB 68	BD	ER	+	66,53 d	-
UAGB 69	BD	ER	+	162,10 a	-
UAGB 70	BD	ER	+	3,61 f	-
UAGB 71	BD	RIZ	+	113,67 b	-
UAGB 72	BD	RIZ	+	-	3,92 a
UAGB 73	BD	RIZ	-	-	-
UAGB 74	BD	RIZ	+	37,24 e	-
UAGB 75	BD	RIZ	+	28,36 e	-
UAGB 76	BD	RIZ	-	36,51 e	-
UAGB 77	BD	RIZ	+	21,72 e	1,76 b
UAGB 78	BD	RIZ	+	16,07 f	4,32 a
UAGB 79	BD	RIZ	+	151,06 a	3,68 a
UAGB 80	BD	RIZ	+	5,84 f	2,03 b
UAGB 81	BD	RIZ	+	28,79 e	-
UAGB 82	BD	RIZ	-	31,38 e	-
UAGB 83	BD	RIZ	-	-	-
UAGB 84	BD	ER	+	18,74 f	-
UAGB 85	BH	ER	+	92,06 c	5,06 a
UAGB 86	BD	ER	+	-	-
UAGB 87	BD	RIZ	-	3,04 f	-
UAGB 88	BD	RIZ	-	-	-
UAGB 89	BD	ER	-	4,73 f	-
UAGB 90	BH	ER	-	5,50 f	-
UAGB 91	BH	ER	-	33,67 e	-
UAGB 92	BH	ER	+	47,25 e	4,46 a
UAGB 93	BH	ER	+	56,48 d	4,12 a
UAGB 94	BH	ER	+	62,99 d	4,56 a
UAGB 95	BH	ER	-	-	-
UAGB 96	BD	RIZ	+	43,54 e	-
UAGB 97	BD	RIZ	-	11,93 f	-
UAGB 98	BD	RIZ	+	3,60 f	-
UAGB 99	BD	RIZ	+	5,33 f	-
UAGB 100	BD	RIZ	+	9,86 f	-

IS = Índice de solubilização de fosfato inorgânico

BH = *Brachiaria humidicola* / BD = *Brachiaria decumbens*

RIZ = Rizosfera / ER = Endofítico de raiz

+ = Isolado positivo / - = Isolado negativo

Foi observado que 12,0% dos isolados não expressaram nenhum dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal avaliados, 72,0% foram positivos para um ou dois mecanismos e 16,0% apresentaram-se positivos para as três análises, tendo os nichos e espécies vegetais com percentuais bem próximos, corroborando com Taulé et al. (2011) que afirmaram que bactérias promotoras de crescimento vegetal podem habitar endo e epifiticamente a planta.

Dos 88,0% de isolados bacterianos com um, dois ou três mecanismos de promoção de crescimento vegetal, foi observado que em ambas as espécies vegetais os percentuais de positivos ficaram bem próximos. Quando comparado os nichos, o endofítico de raiz obteve o maior percentual dos seus isolados positivos (91,8%). As bactérias de distintos nichos apresentaram diferentes capacidades de promoção de crescimento vegetal, refletindo nas adaptações e na indicação do seu potencial de impacto sobre o seu ambiente natural (Ferrara et al., 2011), podendo a vir a desempenhar importante papel nos sistemas agrícolas (Piromyot et al., 2011).

#### **4.3.2.1 Bactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio atmosférico**

O teste de FBN identificou que 57,0% dos isolados testados foram positivos. Resultado semelhante foi observado por Brasil et al. (2005), que detectaram a associação de bactérias fixadoras de nitrogênio nas amostras de solo e raiz de gramíneas do gênero *Brachiaria* e, em outras gramíneas forrageiras. Bergamaschi et al. (2007) trabalhando com plantas de sorgo forrageiro e Reinhardt et al. (2008) em *Panicum maximum* também observaram bactérias diazotróficas associadas a esses vegetais.

Dentre as bactérias diazotróficas, os maiores percentuais ficaram com o nicho endofítico de raiz e rizosfera da espécie *B. decumbens*, com 61,5 e 65,5%, respectivamente, porém segundo o teste do  $\chi^2$ , houve influência apenas entre as espécies vegetais. Analisando os nichos por espécie vegetal, observou-se significância apenas na gramínea *B. decumbens*, e o nicho rizosfera quando analisado entre plantas (Figura 4.3).

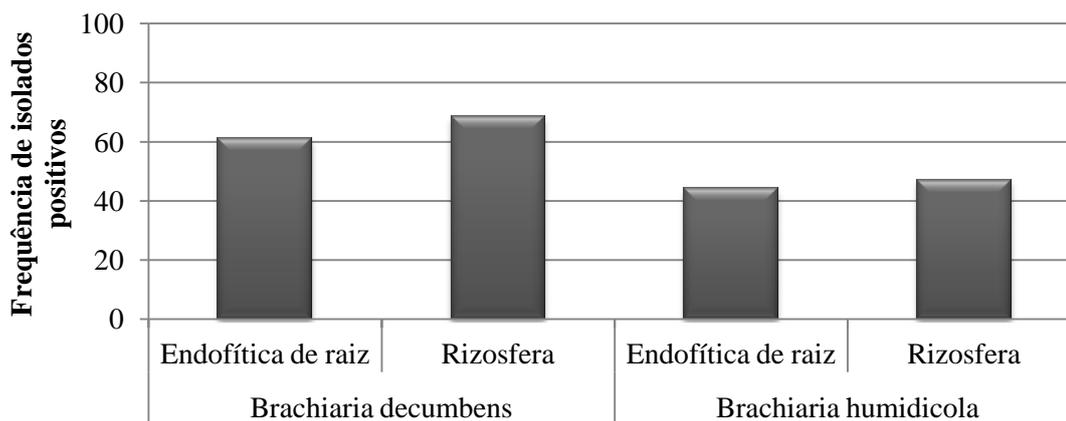


Figura 4.3. Frequência relativa (%) de isolados bacterianos potencialmente fixadores de nitrogênio associados à rizosfera e raiz de plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*.

Diferentemente dos resultados observados no presente trabalho, Canuto et al. (2003), Rodrigues et al. (2006) e Garrido et al. (2010), também avaliando bactérias diazotróficas em associação com gramíneas forrageiras, observaram maior percentual de isolados positivos no nicho endofítico de raiz. Em relação às espécies vegetais, Canuto et al. (2003) observaram que a espécie vegetal influencia na FBN, fato observado também neste trabalho.

Além da diminuição da atividade, o declínio da comunidade bacteriana vem sendo evidenciado com a elevação da salinidade do solo (Sardinha et al., 2003; Medeiros et al., 2007; Egamberdieva & Kucharova, 2009). Porém, existem bactérias que toleram concentrações de sal, denominadas de halotolerantes, desenvolvendo-se em meios contendo de 2,0% a 5,0%, ou até maiores concentrações de NaCl, e outras que requerem, para sua sobrevivência, um mínimo de 9,0%, podendo tolerar até 23,0% de sais no meio, sendo designadas de halófitas (Oetterer, 2009; Afrasayab et al., 2010).

Quando analisados os 36 isolados bacterianos (UAGB 1 a UAGB 36) foi observado que 50,0% são potencialmente fixadoras de nitrogênio, crescendo em meio livre de fonte nitrogenada (Tabela 4.2) e que quando incorporado 0,1% de NaCl no meio, os 18 isolados diazotróficos continuaram a fixar nitrogênio, suportando o sal e

apresentando crescimento característico. Contudo, nas concentrações de 2,5 e 5,0% de sal, os percentuais de isolados diazotróficos capazes de fixar nitrogênio na presença do NaCl apresentaram decréscimo, de 83,3 e 55,5%, respectivamente. Assim como nas plantas, o excesso de sais solúveis nas bactérias diazotróficas provoca efeitos tóxicos, intervindo no processo de FBN (Tripathi et al., 2002; Nóbrega et al., 2004).

Tabela 4.2. Seleção de bactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio em meio semi-sólido NFb sob diferentes concentrações de NaCl (0,1; 2,5; 5,0 e 10,0%)

Isolados	Espécie Vegetal	Nicho	Concentrações de NaCl			
			0,10%	2,50%	5,00%	10,00%
UAGB 1	<i>B. humidicola</i>	ER	+	+	+	-
UAGB 2	<i>B. humidicola</i>	ER	+	+	+	-
UAGB 9	<i>B. humidicola</i>	ER	+	+	+	-
UAGB 10	<i>B. humidicola</i>	RIZ	+	+	+	-
UAGB 13	<i>B. humidicola</i>	RIZ	+	+	+	+
UAGB 14	<i>B. humidicola</i>	RIZ	+	+	-	-
UAGB 15	<i>B. humidicola</i>	RIZ	+	+	-	+
UAGB 19	<i>B. decumbens</i>	ER	+	+	-	-
UAGB 21	<i>B. decumbens</i>	ER	+	+	+	-
UAGB 23	<i>B. decumbens</i>	ER	+	-	-	-
UAGB 25	<i>B. decumbens</i>	ER	+	+	-	-
UAGB 26	<i>B. decumbens</i>	ER	+	-	+	+
UAGB 29	<i>B. decumbens</i>	RIZ	+	-	-	-
UAGB 30	<i>B. decumbens</i>	RIZ	+	+	+	-
UAGB 33	<i>B. decumbens</i>	RIZ	+	+	-	-
UAGB 34	<i>B. decumbens</i>	RIZ	+	+	+	+
UAGB 35	<i>B. decumbens</i>	RIZ	+	+	-	-
UAGB 36	<i>B. decumbens</i>	RIZ	+	+	+	+

RIZ = Rizosfera / ER = Endofítico de raiz  
 + = Isolado positivo / - = Isolado negativo

Na concentração de 10,0% de NaCl foi constatada uma acentuada queda no percentual de isolados capazes de fixar, com apenas 27,8% (5 isolados), ficando evidente que o aumento na concentração de sal interfere no desenvolvimento bacteriano e no seu potencial biotecnológico, concordando com trabalhos de Santos et al. (2012) e Pereira et al. (2012), ambos avaliando bactérias isoladas em cana-de-açúcar.

As bactérias provenientes da rizosfera apresentaram capacidade de FBN em concentrações mais elevadas de sal, fator este que pode ser explicado segundo Santos et al. (2012), que afirmou que o estresse salino encontrado nos solos da região de coleta e

a maior adaptação destes isolados às mudanças ocorridas no meio contribui para sua tolerância, diferindo dos isolados endofíticos que estão em ambientes mais estáveis (no interior dos tecido da planta) (Tripathi et al., 2002).

#### 4.3.2.2 Avaliação de bactérias produtoras de ácido indol acético (AIA)

Quanto à produção de AIA, via dependente de L-triptofano, 66,0% dos isolados avaliados foram positivos, valor inferior ao encontrado por Calvo et al. (2010), analisando *Bacillus* em rizosfera de batata e dos isolados do Capítulo I, em meio seletivo para bactérias diazotróficas, evidenciando que isolados de meio seletivo, provavelmente, apresentam mais de uma característica fenotípica.

Os dados foram submetidos ao teste de Scott-Knott, levando-se em consideração os isolados e suas respectivas produções. O teste agrupou as produções em seis grupos distintos (Tabela 4.1), o grupo “f” contendo 46,7% dos isolados avaliados, com intervalo de produção de 2,27 a 18,79  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , seguido do grupo “e”, com 31,3% dos isolados produzindo entre 20,55 a 47,38  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os demais grupos obtiveram 22,0% dos isolados com produção entre 56,48 e 162,10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , com o isolado UAGB 69, com valor bem superior ao encontrado por Cárdenas et al. (2010) que obteve produção máxima de AIA pelos isolados bacterianos de gramínea *Brachiaria* de 45,18  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; e Ferrara et al. (2011) com 17,73  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em isolados bacterianos de cana-de-açúcar.

Comparando os nichos e as espécies vegetais, o teste do  $\chi^2$  revelou influência entre espécies e nichos avaliados, discordando de Ferreira et al. (2011), analisando isolados de cana-de-açúcar. Destacou-se a planta hospedeira *B. humidicola* e o nicho endofítico de raiz, concordando com Bhattacharjee et al. (2008) e Dias et al. (2009), que afirmaram que as bactérias endofíticas por estarem em um ambiente mais favorável que as bactérias de rizosfera apresentam maiores produções de AIA. Comparando os nichos dentro e entre as espécies vegetais, houve significância nas duas espécies de *Brachiaria*

e nichos (Figura 4.4), concordando com Merzaeva & Shirokikh, (2010) em que os micro-organismos sintetizadores de AIA variaram de acordo com os tecidos vegetais.

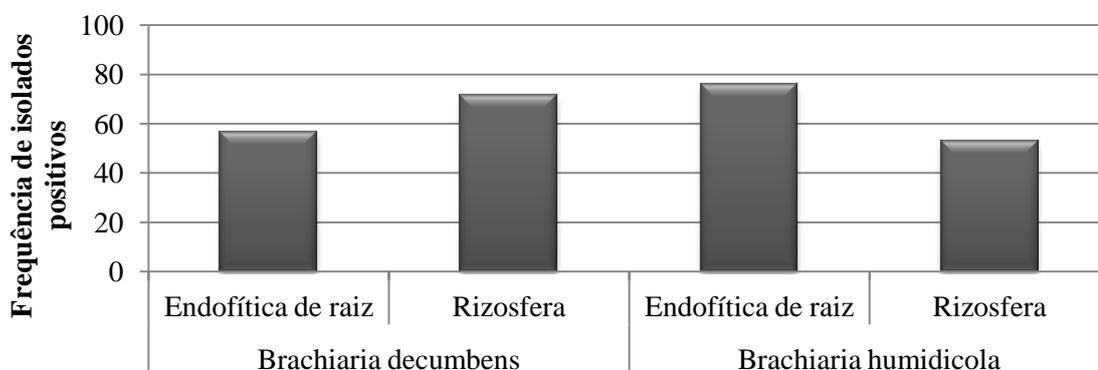


Figura 4.4. Frequência relativa (%) de isolados bacterianos associados a rizosfera e raiz de plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* em relação a capacidade de produção de ácido indol acético (AIA) com a presença do aminoácido precursor L-triptofano *in vitro*.

Com relação aos 36 isolados avaliados quanto a produção de AIA via dependente e independente de triptofano, (UAGB 1 a UAGB 36), 38,9% são capazes de produzir AIA em meio com o acréscimo do aminoácido L-triptofano, com variação de produção entre 8,3 a 60,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As bactérias que foram capazes de produzir AIA via independente de triptofano também foram capazes de produzir AIA via dependente do aminoácido, representando 85,7%, com produções entre 1,9 a 16,7  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , tendo como os maiores produtores os isolados UAGB 8 e UAGB 35 (Figura 4.5).

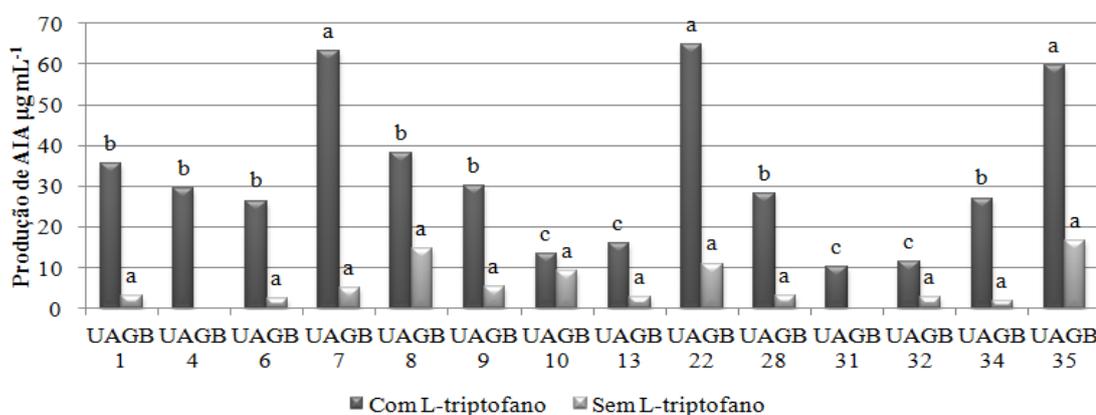


Figura 4.5. Produção de ácido indol acético ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), em meio com e sem o suplemento do aminoácido L-triptofano, por bactérias associadas à

*Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*. Médias seguidas por letras com números iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Ficou evidenciado que os isolados bacterianos associados às raízes de *B. decumbens* e *B. humidicola* apresentaram mais de uma rota bioquímica para síntese de AIA, como encontrado por Pedrinho et al. (2010) analisando isolados de milho e Malhotra & Srivastava (2009) em estudo com bactérias *Azospirillum brasilense*. Porém, os valores de produção são inferiores aos da via dependente do aminoácido L-triptofano, que ficaram nos grupos “b” e “a” segundo o teste de Scott-Knott, e os isolados sem a presença do aminoácido ficando no grupo “c”, concordando com Merzaeva & Shirokikh (2010), que afirmaram que o L-triptofano influencia na produção de AIA.

#### **4.3.2.3 Avaliação de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico**

O teste utilizado para a observação da solubilização de fosfato inorgânico pelas bactérias permitiu a visualização do halo de solubilização em 34,0% das bactérias isoladas, valor bem superior ao encontrado por Beneduzi et al. (2008) em plantas de trigo e inferior ao depurado por Pedrinho et al. (2010) e Calvo et al. (2010), analisando plantas de milho e batata, respectivamente. A análise estatística do teste de Scott-Knott agrupou os isolados em dois grupos (Tabela 4.1), onde o grupo “b” variou com índice de solubilização (IS) de 1,40 a 3,27, com 64,7% dos isolados e o grupo “a” com 35,3% dos isolados, com IS variando de 3,60 a 6,08. Valores superiores aos encontrados por Taulé et al. (2011), avaliando isolados de cana-de-açúcar.

Classificando-se o índice de solubilização IS segundo a recomendação de Berraquero et al. (1976), Hara & Oliveira, (2004) e Chagas Junior, (2007) em baixo (IS < 2,0), médio (IS de 2,0 a 4,0) e alto (IS > 4,0), 58,8% dos isolados apresentaram IS mediano, concordando com Lira-Cadete et al. (2012), analisando isolados de cana-de-açúcar. O elevado potencial de solubilização por bactérias associadas às gramíneas do

gênero *Brachiaria* foi evidenciado em que 85,3% dos isolados apresentaram IS de médio a alto, com destaque para o isolado UAGB 35, com IS = 6,08.

O teste do  $\chi^2$  detectou influência das espécies vegetais e o nicho de origem dos isolados bacterianos na solubilização de fosfato, destacando-se a espécie vegetal *B. humidicola* e o nicho endofítico de raiz, que apresentaram, 40,5 e 41,6% respectivamente, dos seus isolados positivos, os mesmos também se sobressaíram quando analisado os nichos dentro e entre espécies vegetais (Figura 4.6). Também no nicho endofítico de raiz foi encontrado maior número de isolados com IS superior a 4,00, resultado diferente do observado por Santos et al. (2012), em que os isolados com maiores valores de IS foram encontrados na rizosfera, em estudos com cana-de-açúcar.

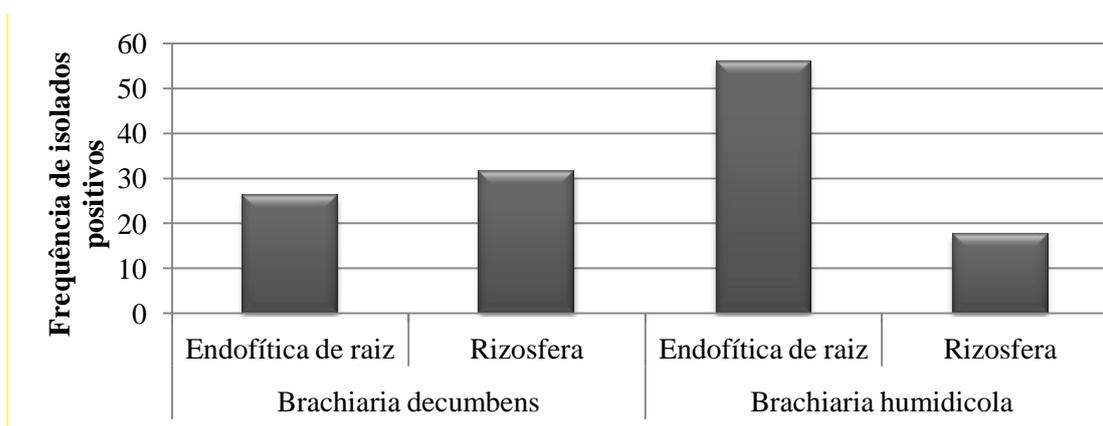


Figura 4.6. Frequência relativa (%) de isolados bacterianos associados a rizosfera e raiz de plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* em relação a capacidade de solubilização de fosfato inorgânico *in vitro*.

Como observado por Kuklinsky-Sobral et al. (2004) e no Capítulo I, deste trabalho os isolados endofíticos foram os que apresentaram os maiores percentuais de positivos para solubilização de fosfato inorgânico. Porém, neste nicho tal característica não é expressa, devido aos isolados estarem no interior do vegetal, não havendo contato com o solo. Entretanto os endofíticos podem ser, facultativos ou não, estando em parte ou em todo o seu ciclo dentro da planta (Hadoim et al., 2008; Esposito-Polesi, 2011;

Qin et al., 2011), desta forma tal característica é expressa ao colonizarem a rizosfera ou o solo.

Quanto a solubilização de fosfato inorgânico em diferentes fontes de carbono no meio de cultura, dos 36 isolados testados (UAGB 1 a UAGB 36), para o meio contendo glicose como fonte de carbono, 44,4% dos isolados foram positivos (Tabela 4.3), destes 87,5% foram positivos no meio de cultura contendo sacarose e 81,2% em meio contendo manitol.

Tabela 4.3. Índice de solubilização (IS) de fosfato inorgânico em diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose e manitol) por bactérias endofíticas de raiz e da rizosfera de plantas de *Brachiaria humidicola* e *Brachiaria decumbens*. Letras maiúsculas comparam a solubilização dos isolados por fonte de carbono, letras minúsculas comparam a solubilização do isolado nas diferentes fontes de carbono. Colunas seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott

Isolados	Espécie Vegetal	Nicho	Índice de Solubilização (IS)		
			Glicose	Sacarose	Manitol
UAGB 1	<i>B. humidicola</i>	ER	3,82Ba	1,66Db	1,36Bb
UAGB 2	<i>B. humidicola</i>	ER	3,27Ca	1,59Db	2,11Bb
UAGB 6	<i>B. humidicola</i>	ER	1,59Db	1,67Da	2,74Bb
UAGB 7	<i>B. humidicola</i>	ER	4,26Bb	6,54Aa	3,64Ab
UAGB 8	<i>B. humidicola</i>	ER	3,08Ca	3,28Ca	3,64Aa
UAGB 9	<i>B. humidicola</i>	ER	3,14Ca	4,31Ba	4,65Aa
UAGB 11	<i>B. humidicola</i>	RIZ	2,80Ca	-	-
UAGB 18	<i>B. humidicola</i>	RIZ	2,16Ca	2,12Da	2,1Aba
UAGB 19	<i>B. decumbens</i>	ER	2,31Ca	3,46Ca	3,30Aa
UAGB 20	<i>B. decumbens</i>	ER	1,40Db	4,50Ba	4,00Aa
UAGB 21	<i>B. decumbens</i>	ER	2,57Cc	5,37Aa	4,00Aa
UAGB 22	<i>B. decumbens</i>	ER	5,00Aa	-	-
UAGB 28	<i>B. decumbens</i>	RIZ	3,14Cb	6,35Aa	3,26Ab
UAGB 30	<i>B. decumbens</i>	RIZ	1,61Dc	5,55Aa	4,25Ab
UAGB 34	<i>B. decumbens</i>	RIZ	1,48Da	2,44Da	-
UAGB 35	<i>B. decumbens</i>	RIZ	6,08Aa	4,50Bb	3,78Ab

RIZ = Rizosfera / ER = Endofítico de raiz

- = Isolado negativo

As bactérias associadas a gramíneas do gênero *Brachiaria* utilizam diversos açúcares como fonte de carbono na produção de substâncias solubilizadoras, como também demonstrado por autores como Silva Filho & Vidor (2000) e Barroso & Nahas (2008). É possível observar que dependendo da fonte de carbono utilizada pelo isolado,

este aumenta ou diminui sua capacidade e solubilização, concordando com Silva Filho & Vidor (2001) e Barroso et al. (2006), onde foi observado que o potencial de solubilização dos micro-organismos variaram com os fatores nutricionais do meio. O presente trabalho observou a sacarose como fonte de maiores IS.

#### 4.3.2.4 Avaliação da produção de enzimas extracelulares

No teste para avaliar a produção de amilase, pectinases em pH 5,0 e 8,0 (poligalacturonase e pectato liase, respectivamente) e celulase, após a coloração da placa, foi possível a visualização de um halo claro ao redor da colônia bacteriana, indicando a capacidade da linhagem em produzir tais enzimas *in vitro*. Os resultados do índice enzimático (IE), que expressa a relação do diâmetro médio do halo de produção enzimática e o diâmetro médio da colônia dos isolados bacterianos testados, oriundos das diferentes espécies vegetais e nichos, estão expressos na tabela 4.4.

Tabela 4.4. Produção de enzimas extracelulares (pectinase pH 5,0, pectinase pH 8,0, amilase e celulase) e produção de molécula *quorum sensing* por 100 isolados bacterianos associados aos nichos rizosfera e endofítico de raiz das gramíneas *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*. Os valores, em cada coluna, seguidos de mesma letra indicam ausência de significância estatística de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ )

Isolados	Espécie Vegetal	Nicho	QS	Índice Enzimático			
				Celulase	Pect. pH 5,0	Pect. pH 8,0	Amilase
UAGB 1	BH	ER	+	-	-	4,25 b	1,80 d
UAGB 4	BH	ER	-	1,19 a	-	-	-
UAGB 5	BH	ER	+	-	-	-	-
UAGB 6	BH	ER	+	1,19 a	1,54 c	2,19 d	1,20 d
UAGB 7	BH	ER	-	1,08 a	-	-	-
UAGB 9	BH	ER	+	-	-	-	-
UAGB 10	BH	RIZ	+	1,20 a	-	4,86 b	1,09 d
UAGB 11	BH	RIZ	+	-	1,04 c	3,36 c	1,49 d
UAGB 12	BH	RIZ	-	1,29 a	-	3,43 c	1,47 d
UAGB 13	BH	RIZ	-	-	1,06 c	-	-
UAGB 14	BH	RIZ	+	-	-	-	1,48 d
UAGB 15	BH	RIZ	+	1,05 a	-	-	-
UAGB 16	BH	RIZ	-	1,10 a	-	-	2,61 c
UAGB 17	BH	RIZ	-	1,12 a	-	-	1,92 c
UAGB 18	BH	RIZ	+	1,06 a	-	2,54 c	1,20 d
UAGB 19	BD	ER	-	1,17 a	-	-	-
UAGB 20	BD	ER	+	-	-	-	-
UAGB 21	BD	ER	+	1,24 a	1,58 c	-	-
UAGB 22	BD	ER	+	-	-	-	-
UAGB 23	BD	ER	+	1,15 a	-	-	-

(Continuação da Tabela 4.4)

Isolados	Espécie Vegetal	Nicho	QS	Índice Enzimático			
				Celulase	Pect.pH 5,0	Pect. pH 8,0	Amilase
UAGB 24	BD	ER	+	-	-	-	-
UAGB 25	BD	ER	+	-	-	8,26 a	-
UAGB 26	BD	ER	-	-	1,72 c	2,44 c	-
UAGB 27	BD	ER	+	1,08 a	-	-	-
UAGB 28	BD	RIZ	+	-	-	-	-
UAGB 29	BD	RIZ	+	-	-	-	-
UAGB 30	BD	RIZ	+	1,08 a	-	-	-
UAGB 31	BD	RIZ	+	-	-	-	-
UAGB 33	BD	RIZ	+	-	-	-	-
UAGB 34	BD	RIZ	-	1,05 a	-	-	-
UAGB 35	BD	RIZ	+	1,07 a	-	-	-
UAGB 37	BH	ER	-	*	-	2,49 c	-
UAGB 38	BH	ER	+	*	-	2,97 c	-
UAGB 39	BH	RIZ	+	*	-	4,06 b	1,30 d
UAGB 40	BH	RIZ	-	*	-	2,17 d	-
UAGB 41	BH	RIZ	-	*	-	4,08 b	-
UAGB 42	BH	RIZ	+	*	-	-	-
UAGB 43	BD	ER	+	*	-	-	-
UAGB 45	BD	ER	-	*	-	3,78 b	-
UAGB 46	BD	RIZ	-	*	-	1,94 d	-
UAGB 47	BD	RIZ	+	*	-	-	-
UAGB 49	BD	RIZ	+	*	-	2,92 c	-
UAGB 50	BD	RIZ	+	*	-	2,75 c	-
UAGB 51	BD	RIZ	+	*	-	2,68 c	-
UAGB 52	BH	ER	+	*	-	2,43 c	2,42 c
UAGB 53	BH	ER	+	*	-	-	-
UAGB 54	BH	ER	-	*	-	4,51 b	1,78 d
UAGB 55	BH	ER	+	*	-	-	-
UAGB 56	BH	ER	+	*	-	-	-
UAGB 57	BH	ER	+	*	-	-	-
UAGB 58	BH	ER	+	*	-	3,92 b	2,11 c
UAGB 59	BH	RIZ	-	*	-	2,98 c	-
UAGB 60	BH	RIZ	+	*	-	2,29 d	2,20 c
UAGB 61	BH	RIZ	+	*	-	3,91 b	-
UAGB 62	BH	RIZ	+	*	-	-	-
UAGB 63	BD	ER	+	*	-	-	-
UAGB 64	BD	ER	+	*	-	-	-
UAGB 65	BD	ER	+	*	2,48 b	4,55 b	-
UAGB 66	BD	ER	-	*	-	4,59 b	3,81 a
UAGB 67	BD	ER	-	*	-	3,72 b	4,10 a
UAGB 68	BD	ER	+	*	-	4,25 b	3,63 a
UAGB 69	BD	ER	-	*	-	4,73 b	-
UAGB 70	BD	ER	-	*	-	7,33 a	4,57 a
UAGB 71	BD	RIZ	-	*	4,00 a	3,76 b	2,76 b
UAGB 72	BD	RIZ	+	*	-	-	-
UAGB 73	BD	RIZ	-	*	-	3,95 b	3,12 b
UAGB 74	BD	RIZ	+	*	-	-	-
UAGB 75	BD	RIZ	+	*	-	4,37 b	1,46 d
UAGB 77	BD	RIZ	+	*	-	-	-
UAGB 79	BD	RIZ	+	*	-	1,33 d	-
UAGB 80	BD	RIZ	-	*	-	1,86 d	1,62 d
UAGB 82	BD	RIZ	-	*	2,91 b	1,94 d	1,17 d
UAGB 83	BD	RIZ	-	*	-	2,16 d	2,33 c
UAGB 84	BD	ER	+	*	-	2,64 c	-
UAGB 85	BH	ER	+	*	-	-	-
UAGB 86	BD	ER	+	*	-	-	-
UAGB 88	BD	RIZ	+	*	-	-	-
UAGB 89	BD	ER	-	*	-	3,18 c	-

(Continuação da Tabela 4.4)

Isolados	Espécie Vegetal	Nicho	QS	Índice Enzimático			
				Celulase	Pect.pH 5,0	Pect. pH 8,0	Amilase
UAGB 92	BH	ER	+	*	-	-	-
UAGB 93	BH	ER	+	*	-	-	-
UAGB 94	BH	ER	+	*	-	-	-
UAGB 95	BH	ER	-	*	3,02 b	1,49 d	-
UAGB 96	BD	RIZ	+	*	3,04 b	1,63 d	-
UAGB 97	BD	RIZ	+	*	3,72 a	1,34 d	-
UAGB 98	BD	RIZ	+	*	-	-	-
UAGB 99	BD	RIZ	+	*	-	-	-
UAGB 100	BD	RIZ	+	*	-	1,25 d	-

QS = quorum sensing

BH = *Brachiaria humidicola* / BD = *Brachiaria decumbens*

RIZ = Rizosfera / ER = Endofítico de raiz

+ = Isolado positivo / - = Isolado negativo / \* = Isolados não testados

O teste de produção enzimática demonstrou que do total de isolados testados para as enzimas amilase, poligalacturonase (pectinase pH 5,0) e pectato liase (pectinase pH 8,0), 22,0% foram capazes de produzir um tipo de enzima, 21,0% foram capazes de produzir dois tipos de enzimas, e 4,0% os três tipos de enzimas, sendo os isolados UAGB 6, UAGB 11, UAGB 71 e UAGB 82, oriundos da rizosfera. Dos isolados positivos, 87,5% apresentaram valores de IE superior a 2,0. O IE é uma ferramenta que seleciona e melhor permite comparar as diferentes produções (Carrim et al., 2006; Oliveira et al., 2007) e quando é igual ou maior que 2,0, caracteriza uma bactéria como boa produtora de enzimas extracelulares em meio sólido (Alves et al., 2002).

O teste de produção de pectinases demonstrou que para os 100 isolados, 11,0% foram capazes de produzir em pH 5,0, que caracteriza a enzima poligalacturonase; e 43,0% em pH 8,0, que caracteriza a pectato liase, valores inferiores aos encontrados por Prakamhang et al. (2009), analisando isolados de arroz. O teste de Scott-Knott para a pectinase pH 5,0 identificou três grupos, o grupo “c” com 45,5% dos isolados positivos com variação de 1,04 a 1,72 e os demais grupos com 54,5% dos isolados, variando de 2,48 a 4,00 (Tabela 4.4).

Quando analisando a espécie vegetal e nichos de colonização, o teste do  $\chi^2$  revelou que esses fatores influenciaram a produção de enzimas, destacando-se a *B.*

*humidicola* e o nicho rizosfera, porém foi na espécie *B. decumbens* em que os maiores valores de IE foram observados, com os isolados UAGB 97 e UAGB 71. Analisando os nichos dentre e entre as espécies vegetais (Figura 4.7), o teste de  $\chi^2$  não detectou influência significativa destes fatores.

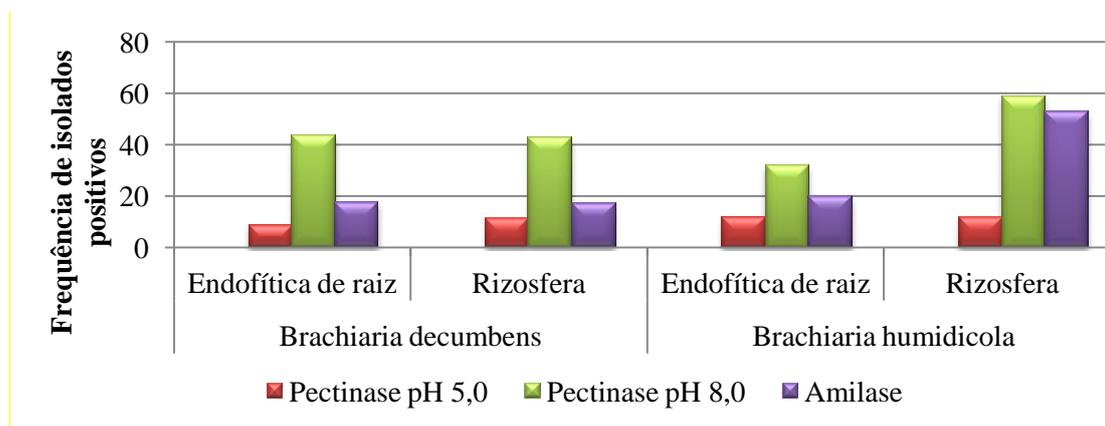


Figura 4.7. Frequência relativa (%) dos isolados bacterianos positivos associados à rizosfera e raiz de plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* em relação à produção de pectinase e amilase *in vitro*.

O teste de produção de pectinase a pH 8,0 (enzima pectato liase), segundo o teste de Scott-Knott, diferenciou quatro grupos (Tabela 4.4), o grupo “d” com 27,9% de isolados positivos, com variação do IE de 1,25 a 2,29, o grupo “c” com 30,2% dos isolados, e IE de 2,43 a 3,98, os demais grupos com 41,8% dos isolados positivos, com valores de IE de 3,72 a 8,26, destacando-se o isolado UAGB 25. Dos isolados positivos, 88,4% apresentaram IE igual ou superior a 2,0. Em ambos os capítulos deste trabalho é observado que os valores percentuais de isolados positivos para a enzima pectato liase (pectinase pH 8,0) são mais elevados que a poligalacturonase (pectinase pH 5,0). Analisando a espécie vegetal e nichos de colonização, o teste do  $\chi^2$  não observou influência destes fatores, fato não observado quando analisado os nichos por espécie vegetal, tendo a rizosfera da *B. humidicola* se destacado, como ilustrado na figura 4.7.

O teste de produção de celulase para os 36 isolados avaliados (UAGB 1 a UAGB 36) identificou 52,8% de bactérias positivas, valor superior ao de Oliveira et al.

(2007), com 9,0% em isolados de nódulos de feijão caupi e soja sendo positivos, porém, semelhantemente a este trabalho, não foi observado valores de IE superior a 2,0. O teste de Scott-Knott não apresentou diferença significativa entre os IE das bactérias produtoras de celulase (Tabela 4.4). Dentre as positivas 57,9% foram isoladas de *B. humidicola* revelando que esta gramínea pode apresentar maior associação com bactérias secretoras de celulase, e segundo Torres et al. (2008), as espécies vegetais influenciam a produção de celulase bacteriana.

Sabe-se da estreita relação do nicho habitado pelo micro-organismo e as características de suas enzimas extracelulares (Gomes et al., 2007; Beneduzi et al., 2008). As enzimas degradadoras têm sido produzidas durante a infecção e colonização bacteriana ao vegetal (Torres et al., 2008; Jha et al., 2011), como forma de facilitar a quebra da barreira física da parede celular (Rosenblueth & Martinez-Romero, 2006; Bhattacharjee et al., 2008), entre estas enzimas há a produção de pectinase e celulase (Romão et al., 2011). A descoberta e manipulação de micro-organismos produtores de enzimas extracelulares, além de auxiliar o entendimento da forma de penetração no vegetal destes isolados, pode favorecer campos da zootecnia, como por exemplo, a utilização destas enzimas para elevar a digestão de forragem por parte dos ruminantes (Compestrini et al., 2005), reduzir a viscosidade da ração, aumentando a absorção e liberação de nutrientes (Venoje & Pastore, 2007).

O teste de produção de amilase demonstrou que dos 100 isolados testados, 24,0% são positivos, menor valor que o encontrado por Carrim et al., (2006) de 60,0% das linhagens positivas de *Jacaranda decurrens*. De acordo com a análise estatística, os isolados foram subdivididos em quatro grupos, onde o grupo “d” apresentou variação de IE entre 1,09 a 1,80, com 50,0% dos isolados positivos, o segundo grupo “c”, com 25,0% dos isolados e variação IE de 1,92 a 2,61; os demais grupos tiveram variação de IE entre 2,76 a 4,57, com 25,0% dos isolados positivos (Tabela 4.4). Do total de

isolados com capacidade de produzir amilase *in vitro*, 45,8% apresentaram IE superior a 2,0.

Comparando as espécies vegetais e nichos de forma geral e dentro e entre as espécies vegetais, pode-se observar a prevalência da *B. humidicola* e o nicho rizosfera (Figura 4.7). Porém os isolados com maiores valores de IE (UAGB 68, UAGB 66, UAGB 67 e UAGB 70) são provenientes da *B. decumbens* e nicho endofítico de raiz. As amilases produzidas por micro-organismos são uma das principais enzimas utilizadas nos processos industriais, sendo produzida por grande número de bactérias, tendo vantagens econômicas, de manipulação e obtenção (Souza & Magalhães, 2010), além de elevada qualidade (Lima et al., 2001).

#### 4.3.2.5 Bactérias produtoras de moléculas *quorum sensing*

A produção de ALH, molécula *quorum sensing*, foi constatada em 60,0% dos isolados (Tabela 4.4), valor superior ao encontrado por Yoshida et al. (2006) com 33,0% dos isolados de trigo sendo positivos para produção da molécula de *quorum sensing*. As espécies vegetais e nichos analisados obtiveram elevada porcentagem de isolados produtores de molécula *quorum sensing*, porém não houve influência entre os nichos e espécies vegetais, segundo o teste do  $\chi^2$ , que identificou significância apenas no nicho endofítico de raiz quando avaliado entre plantas, na espécie *B. humidicola* (Figura 4.8).

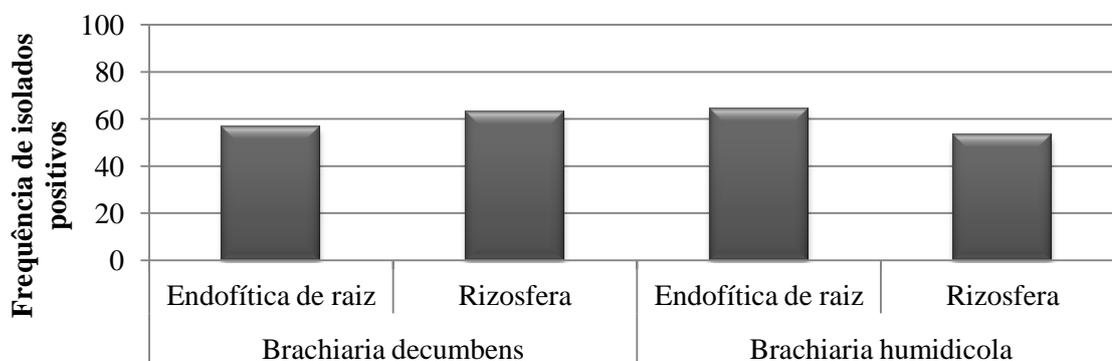


Figura 4.8. Frequência relativa (%) dos isolados bacterianos positivos associados à rizosfera e raiz de plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* em relação à produção da molécula *quorum sensing*

O estudo de moléculas *quorum sensing* por micro-organismos promotores de crescimento vegetal é de fundamental importância (Poonguzhali et al., 2007), pois estas moléculas regulam a expressão de diferentes processos biológicos, entre estes a formação de biofilme, que tem função de resposta aos diversos estímulos ambientais (Romero et al., 2009), favorecendo a manutenção da densidade populacional, facilitando as interações benéficas ou deletérias entre plantas e bactérias (Pinton et al., 2010).

### **4.3.3 Caracterização da diversidade genômica**

#### **4.3.3.1 Diversidade genética da comunidade bacteriana cultivável associada a gramíneas do gênero *Brachiaria***

A análise da diversidade genética por meio do BOX-PCR permitiu observar o perfil das bandas geradas, estas sendo avaliadas por meio do dendrograma construído com base na matriz de similaridade de Jaccard, que identificou nove grupos (*clusters*) com elevada variabilidade entre os isolados dos diferentes nichos e espécies vegetais (Figura 4.9). Entretanto, há isolados com 100% de similaridade associadas a ambos os nichos e espécies vegetais, diferentemente do Capítulo I, foi observado que os isolados UAGB 84 e UAGB 85, oriundos de plantas e nichos diferentes, apresentaram 100% de similaridade, evidenciando que os mesmos genótipos bacterianos podem habitar diferentes gramíneas do gênero *Brachiaria*, estes transitando entre os distintos nichos de colonização, evidenciando a especificidade entre plantas e micro-organismos, como mencionado por Berg (2009).

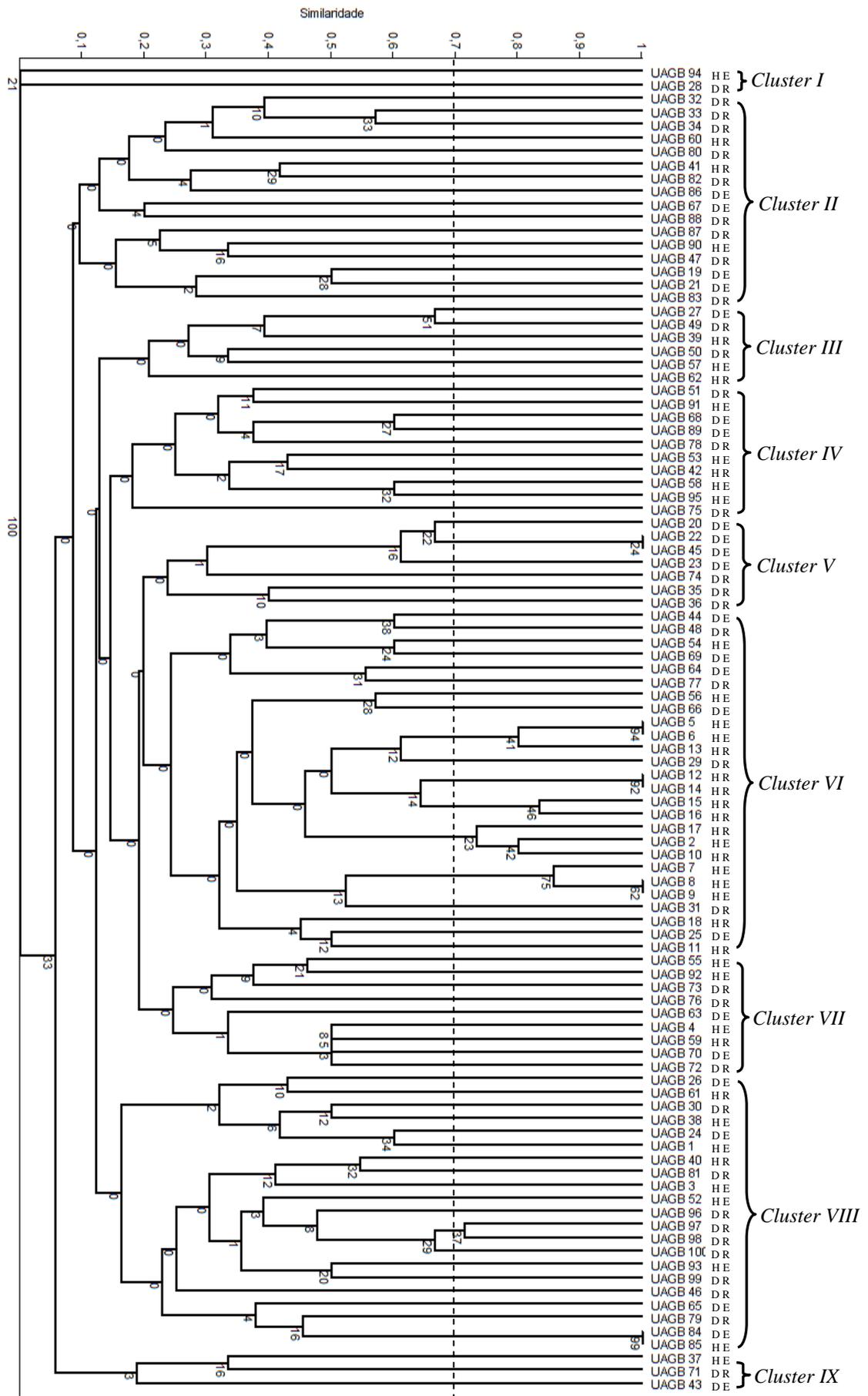


Figura 4.9. Dendrograma obtido pelo agrupamento realizado pelo algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) a partir da

matriz de similaridade genética de 100 isolados bacterianos, da rizosfera e endofíticos de raiz, de plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*. D/E = *B. decumbens*/endofítico de raiz; D/R = *B. decumbens*/rizosfera; H/E = *B. humidicola*/endofítico de raiz; H/R = *B. humidicola*/rizosfera. O coeficiente de Jaccard foi utilizado para a construção da matriz de similaridade. Os números nos nós do dendrograma indicam o valor da porcentagem de vezes que o grupo ocorreu no mesmo nó durante o *Bootstrap* de 1000 repetições.

O percentual de isolados igual ou acima de 70,0% de similaridade foi de 19,0%, valor inferior ao encontrado no Capítulo I com o meio semi-seletivo para bactérias diazotróficas, podendo-se afirmar que o meio não seletivo proporciona o isolamento de isolados com maior diversidade, corroborando com Magnani et al. (2010), que relatou que o crescimento em meio rico proporciona maior diversidade de bactérias.

Ao analisar os *clusters* foi constatada a formação de agrupamento de isolados por espécie vegetal, *cluster V* com a espécie vegetal *B. decumbens*, corroborando com Haichar et al. (2008), que observou influência das plantas na comunidade bacteriana. Nos demais *clusters*, os isolados foram agrupados independente da espécie vegetal e nicho, concordando com Magnani et al., (2010), que constataram que as populações de micro-organismos podem variar de acordo com o órgão da planta avaliado, não sendo encontrado dominância de isolados, evidenciando a elevada diversidade da comunidade bacteriana cultivável total associada às gramíneas *B. decumbens* e *B. humidicola*. A diversidade de micro-organismos associadas às plantas apresenta-se como alternativa para melhorar as características econômicas do vegetal e a sustentabilidade da cultura (Luvizotto et al., 2010; Pereira et al., 2012).

#### **4.3.4 Caracterização dos isolados quanto ao seu genótipo e potencial biotecnológico**

A partir das bandas geradas pelo BOX-PCR e as características fenotípicas de cada isolado foi construído um dendrograma com base na matriz de similaridade de Jaccard (Figura 4.10).

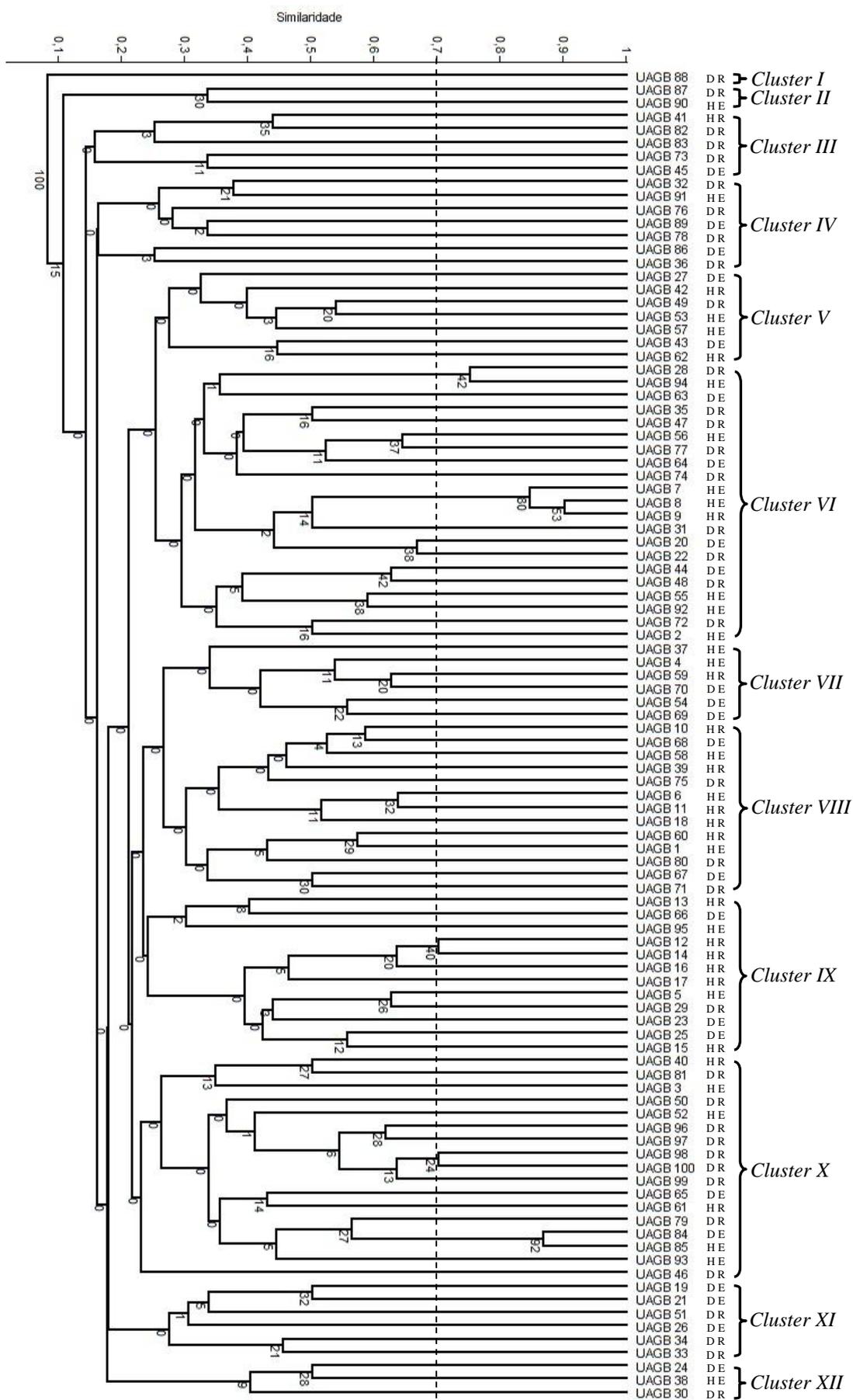


Figura 4.10. Dendrograma obtido pelo agrupamento realizado pelo algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) a partir da

matriz de similaridade genética e características fenotípicas dos 100 isolados bacterianos, da rizosfera e endofíticos de raiz, de plantas de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*. D/E = *B. decumbens*/endofítico de raiz; D/R = *B. decumbens*/rizosfera; H/E = *B. humidicola*/endofítico de raiz; H/R = *B. humidicola*/rizosfera. O coeficiente de Jaccard foi utilizado para a construção da matriz de similaridade. Os números nos nós do dendrograma indicam o valor da porcentagem de vezes que o grupo ocorreu no mesmo nó durante o *Bootstrap* de 1000 repetições.

Analisando a caracterização genotípica e fenotípica dos 100 isolados bacterianos, em relação às diferentes espécies vegetais e nichos de isolamento, observou-se que, semelhante ao Capítulo I, onde a diversidade genética foi alterada quando incluídas as características biotecnológicas, ocorrendo um aumento da dissimilaridade e o número de *clusters*, reagrupando-se em 12, parte destes (maior que do dendrograma genético) agrupando os isolados por espécies vegetais e nicho, como no caso dos *clusters III, IV, VII e XI*.

Os micro-organismos cultiváveis presente na comunidade total associada às gramíneas *B. decumbens* e *B. humidicola* nos nichos rizosfera e endofítico de raiz apresentaram elevada diversidade fisiológica e genética, não sendo observado isolados com 100% de similaridade de acordo com matriz de Jaccard.

#### **4.4 Conclusões**

As gramíneas *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* cultivadas em Pernambuco apresentaram elevada densidade da comunidade bacteriana cultivável total associada à região da raiz, apresentando elevado potencial de crescimento vegetal; fixando biologicamente o nitrogênio atmosférico, com e sem a presença de sal no meio de cultura, sendo as bactérias de rizosfera mais resistentes à salinidade; sintetizando ácido indol acético por diferentes rotas bioquímicas, com e sem a presença do aminoácido precursor L-triptofano, tendo a produção destaca na presença do aminoácido; solubilizando fosfato inorgânico em diferentes fontes de carbono no meio,

com a fonte sacarose e o nicho endofítico de raiz destacando-se; produzindo enzimas extracelulares (pectinase, amilase e celulase) com elevados índices enzimáticos, com valor maior que 2,0 com exceção da celulose, além de elevado percentual de isolados produzirem a molécula *quorum sensing*.

A elevada dissimilaridade genética entre os isolados bacterianos foi evidenciada pelo BOX-PCR, porém com isolados apresentando 100% de similaridade e a formação de grupos ou *clusters*, entre as espécies vegetais e nichos de colonização. Isolados com 100% de similaridade não apresentam as mesmas características fenotípicas que seus pares.

#### BIBLIOGRAFIA CITADA

- AFRASAYAB, S.; FAISAL, M.; HASNAIN, S. Comparative study of wild and transformed salt tolerant bacterial strains on *Triticum aestivum* growth under salt stress. **Brazilian Journal de Microbiology**, v.41, p.946-955, 2010.
- ALVES, M.H; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; PORTO, A.L.F. et al. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase e protease. **Brazilian Journal de Microbiology**, v.33, p.225-230, 2002.
- ARAÚJO, A.E.S.; ROSSETTO, C.A.V.; BALDANI, V.L.D. et al. Germinação e vigor de sementes de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas. **Ciência Agrotecnologica**, v.34, p.932-939, 2010.
- BARROSO, C.B.; NAHAS, E. Solubilização de fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.529-535, 2008.
- BARROSO, C.B.; PEREIRA, G.T.; NAHAS, E. Solubilization of CaHPO<sub>4</sub> and AlPO<sub>4</sub> by *Aspergillus Níger* in culture media with different carbon and nitrogen sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.434-438, 2006.
- BECERRA-CASTRO, C.; KIDD, P.S.; PRIETO-FERNÁNDEZ, Á. et al. Endophytic and rhizoplane bacteria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: isolation and characterisation. **Plant Soil**, v.340, p.413-433, 2011.
- BENEDUZI, A.; PERES, D.; COSTA, P.B. et al. Genetic and phenotypic diversity of plant-growth-promoting bacilli isolated from wheat fields in southern Brazil. **Research in Microbiology**, v.159, p.244-250, 2008.
- BERGAMASCHI, C.; ROESCH, L.F.W.; QUADROS, P.D. et al. Ocorrência de bacterias diazotróficas associadas a cultivares de sorgo forrageiro. **Ciência Rural**, v.37, p.727-733, 2007.
- BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspective for controlled use of microorganisms in agriculture. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.84, p.11-18, 2009.

- BERRAQUERO, F.R.; BAYA, A.M.; CORMENZANA, A.R. Establecimiento de índices para el estdo de La subilización de fosfatos por bacterias Del suelo. **Ars Pharmaceutica**, v.17, p.399-406, 1976.
- BHATTACHARJEE, R.B.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S.N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertilisers for non-legumes: prospects and challenges. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.80, p.199-209, 2008.
- BRASIL, M.S.; BALDANI, J.; BALDANI, V.L.D. Ocorrência e diversidade de bacterias diazotróficas asociadas a gramíneas forrageiras do pantanal sul matogrossense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.179-190, 2005.
- CALVO, P.; PRMENO-ORRILLO, E.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. et al. Chatacterization of *Baccillus* isolates of potato rhizosphere from Andean soils of Peru and their potencial PGPR chacteristics. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.899-906, 2010.
- CAMPESTRINI, E.; SILVA, V.T.M.; APPELT, M.D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.2, p.259-272, 2005.
- CANUTO, E.L.; OLIVEIRA, A.L.M.; REIS, V.M. et al. Evaluation of the biological nitrogen fixation contribution in sugarcane plants originated from seeds inoculated with nitrogen-fixing endophytes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.62-64, 2003.
- CÁRDENAS, D.M.; GARRIDO, M.F.; BONILLA, R.R. et al. Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. Pasto guinea (*Panicum maximum* Jacd.) del Valle del Cesar. **Pastos y Forrajes**, v.33, p.1-17, 2010.
- CARRIM, A.J.J.; BARBOSA, E.C.; VIEIRA, J.D.G. Endophytic nitrogen fixation in bacterial isolate of Jacaranda decurrens Cham. (carobinha-de-campo). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, p.359-359, 2006.
- CASTRO, C.B.; KIDD, P.S. FERNANDES, A.P. et al. Endophytic and rhizoplane bacteria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: isolation and characterisation. **Plant Soil**, v.340, p.413-433, 2011.
- CAVAGLIERI, L.; ORLAND, J.; ETCHEVERRY, M. Rhizosphere microbial community structure at different maize plant growth stages and root locations. **Microbiological Research**, v.164, p.391-399, 2009.
- CHAGAS JUNIOR, A.F. **Características agronômicas e ecológicas de rizóbios isolados de solo ácido e de baixa**. 2007. 172f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Amazonas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia, Manaus.
- DIAS, A.C.F.; COSTA, F.E.C.; ANDREOTE, F.D. et al. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v.25, p.189-195, 2009.
- EGAMBERDIEVA, D.; KACHAROVA, Z. Selection for root colonizing bacteria stimulating wheat growth in saline soils. **Biol Fertil Soils**, v.45, p.563-571, 2009.
- ESPINOZA, S.; OVALLE, C.; POZO, A. et al. Biological fixation of N<sub>2</sub> in mono and polyspeccific legume pasture in the humid mediterranean zone of Chile. **Chilen Journal of Agricultural Research**, v.71, p.132-139, 2011.
- ESPOSITO-POLESI, N.P. Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Biociências**, v.9, p.533-541, 2011.
- FERRARA, F.I.S.; OLIVEIRA, Z.M.; GONZALES, H.H.S. et al. Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. **Plant Soil**, v.353, p.409-417, 2011.
- GARRIDO, M.F.; CARDENAS, D.M.; BONILLA, R.R. et al. Effect of the edaphoclimatic factors and pasture species on the diversity of diazotrophic bacteria. **Pastos y Forrajes**, v.33, p.1-11, 2010.

- GOMES, E.; GUES, M.A.; MARTIN, N. et al. Enzimas termoestáveis: fonte, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v.30, p.136-145, 2007.
- HAICHAR, F.Z.; MOROL, C.; BERGE, O. et al. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. **International Society for Microbial Ecology Journal**, v.2, p.1221-1230, 2008.
- HARA, F.A.S.; OLIVEIRA, L.A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e alcalinos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazonica**, v.34, p.343-357, 2004.
- HARDOIM, P.R.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends Microbiol**, v.16, p.463-471, 2008.
- HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Ann Microbiol**, v.60, p.579-598, 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**, v.61, p.2799-2811, 2011.
- KUKLINSKY-SOBRA, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R. et al. Isolation and characterization of soybean associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v.6, p.1244-1251, 2004.
- KUSS, A.V.; KUSS, V.V.; LOVATO, T. et al. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indol acético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1459-1465, 2007.
- LIMA, A.S.T.; BARRETO, M.C.S.; ARAÚJO, J.M. et al. Simergismo *Bacillus*, *Brevibacillus* e , ou *Paenibacillus* na simbiose *Bradyrhizobium-caupi*. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.35, p.713-721, 2011.
- LINDSTROM, K.; MURWIRA, M. WLLWMS, A. et al. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. **Research in Microbiology**, v.161, p.453-463, 2010.
- LIRA-CADETE, L.; FARIAS, A.R.B. RAMOS, A.P.S. et al. 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.
- LOREDO-OSTI, C.; LÓPEZ-REYES, L.; ESPINOSA-VICTORIA, D. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas. **Terra Latino American**, v.22, p.225-239, 2004.
- LUVIZOTTO, D.M.; MARCON, J.; ANDREOTE, F.D. et al. Genetic diversity and plant-growth related features of *Burkholderia* spp. from sugarcane roots. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.26, p.1829-1836, 2010.
- MAGNANI, G.S.; DIDONET, C.M.; CRUZ, L.M. et al. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, v.9, p.250-258, 2010.
- MALHOTRA, M.; SRIVASTAVA, S. Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. **European Journal of Soil Biology**, v.45, p.73-80, 2009.
- MEDEIROS E.V.; SILVA, K.J.P.; MARTINS, C.M. et al. Tolerância de bactérias fixadoras de nitrogênio provenientes de municípios do Rio Grande do Norte à temperatura e salinidade. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, v.7, 2007.
- MERZAEVA, O.V.; SHIROKIKH, I.G. The production of auxins by the endophytic bacteria of winter rye. **Appl Biochem Microbiol**, v.46, p.44-50, 2010.
- MOREIRA, F.M.S.; LANGE, A.; KLAUBERG-FILHO, O. et al. Associative diazotrophic bacteria in grass roots and soils from heavy metal contaminated sites. **Brazilian Academy of Sciences**, v.80, p.749-761, 2008.

- MOREIRA, F.M.S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R.S.A. et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicação. **Comunicata Scientiae**, v.2, p.74-99, 2010.
- NÓBREGA, R.S.A.; MOTTA, J.S.; LACERDA, A.M. et al. Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade *in vitro*. **Ciência Agrotecnica**, v.28, p.899-905, 2004.
- OETTERER, M. [2009]. **O processo de fermentação do pescado (Anchovamento)**. Available at: <<http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/Fermentação%20%20pescado.pdf>>. Accessed on: Maio 12, 2011.
- OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S. et al. Produção e amylase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.61-66, 2007.
- PEDRINHO, E.A.N.; GALDIANO JUNIOR, R.F.; CAMPANHARO, J.C. et al. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, v.69, p.905-911, 2010.
- PEREIRA, A.P.A.; SILVA, M.C.B.; OLIVEIRA, J.R.S. et al. 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.
- PINTON, R.; DIAS, A.; XAVIER, T.F. et al. Caracterização morfofocultural, biossíntese de autoindutor e formação de biofilme por rizobactérias de 88 hortaliças. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p.284-293, 2010.
- PIROMYOR, P.; BURANABANYAT, B.; TANTASAWAT, P. et al. Effect of growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. **European Journal of Soil Biology**, v.47, p.44-54, 2011.
- POONGUZHALI, S.; MADHAIYAN, M.; SA, T. Quorum-sensing signals produced by plant-growth promoting *Burkholderia* strains under *in vitro* and *in planta* conditions. **Research in Microbiology**, v.158, p.287-294, 2007.
- PRAKAMHANG, J.; MINAMISAWA, K.; TEAMTAISON, K. et al. The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L). **Applied Soil Ecology**, v.42, p.141-149, 2009.
- QIN, S.; XING, K.; JIANG, J.H. et al. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.89, p.457-473, 2011.
- REINHARDT, É.; RAMOS, P.L.; MAUFIO, G.P. et al. Molecular characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from Brazilian agricultural plants at São Paulo State. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.414-422, 2008.
- REIS JUNIOR, F.B.; SILVA, M.F.; TEIXEIRA, K.R.S. et al. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.28, p.103-113, 2004.
- RODRIGUES, L.S.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M. et al. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inoculado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.275-284, 2006.
- ROMÃO, A.S.; SPÓSITO, M.B.; ANDREOTE, F.D. et al. Enzymatic differences between the endophyte *Guignardia maniferae* (Botryosphaeriaceae) and the citrus pathogen *G. citricarpa*. **Genetics and Molecular Research**, v.10, p.243-252, 2011.
- ROMERO, D.; AGUILAR, C.; LOSICK, R. et al. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. **Whitehead Institute for Biomedical Research**, v.107, p.2230-2234, 2009.

- ROESCH, L.F.W.; PASSAGLI, L.M.P.; BENTO, F.M. et al. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.31, p.1367-1380, 2007.
- ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **The American Phytopathological Society**, v.19, p.827-837, 2006.
- SANTOS, I.B.; LIMA, D.R.M.; BARBOSA, J.G. et al. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de-açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância a salinidade. **Bioscience Journal**, v.28, p.142-149, 2012.
- SARDINHA, M.; MULLER, T.; SCHMEISKY, H. et al. Microbial performance in soils along a salinity gradient under acidic conditions. **Applied Soil Ecology**, v.23, p.237-244, 2003.
- SCHLOTTER, M.; LEBUHN, M.; HEULIN, T.; HARTMANN, A. Ecology and evolution of bacterial microdiversity. **FEMS Microbiological Review**, v.24, p.647-660, 2001.
- SILVA FILHO, G.N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfato por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.24, p.311-319, 2000.
- SOUZA, P.M.; MAGALHÃES, P.O. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry – a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.850-861, 2010.
- TAULÉ, C.; MAREQUE, C.; BARLOCCO, C. et al. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant Soil**, v.10, p.1007-1023, 2011.
- TORRES, A.R.; ARAÚJO, W.L.; CURSINO, L. et al. Diversity of endophytic enterobacteria associated with different host plants. **The Journal of Microbiology**, v.46, p.373-379, 2008.
- TRIPATHI, A.K.; VERMA, S.C.; RON, E. Molecular characterization of a salt-tolerant bacterial community in the rice rhizosphere. **Research in Microbiology**, v.153, p.579-584, 2002.
- UENOJO, M.; PASTORE, G.M. Pectinase: aplicação industrial e perspectivas. **Química Nova**, v.30, p.388-394, 2007.
- YOSHIDA, S.; KINKEL, L.L.; SHINOHARA, H. et al. Production of *quorum-sensing*-related signal molecules by epiphytic inhabiting wheat heads. **Canada Journal Microbiology**, v.52, p.411-418, 2006.

5      **CAPÍTULO 03****Comunidade bacteriana diazotrófica associada a *Brachiaria decumbens* sob diferentes tempos de adubação**

**Resumo:** As atividades agropecuárias intensas vêm provocando distúrbios nos ecossistemas, alterando tanto seu funcionamento quanto as comunidades vivas presentes. Assim, a densidade e diversidade de populações bacterianas associadas a essas atividades poderão indicar se certas práticas agrícolas podem causar impacto no meio ambiente. Tendo em vista que grande parte das áreas de pastagem cultivadas, ou não, encontram-se em diferentes estágios de degradação, apresentando diminuição da fertilidade química e biológica do solo, este trabalho teve como objetivos: avaliar a densidade populacional e isolar bactérias potencialmente diazotróficas associadas aos nichos rizosfera e endofítico de raiz da gramínea *Brachiaria decumbens*, cultivada em pastagens sob diferentes tempos de cultivo e adubação, na região Agreste do estado de Pernambuco; e analisar a variabilidade genética da comunidade bacteriana total, por método independente de cultivo. As plantas de *B. decumbens* foram coletadas de três diferentes pastagens estabelecidas: uma com 30 anos de cultivo sem adubação; outra em que sua formação e último ano de adubação ocorreu em 2005; e uma terceira em que sua formação e último ano de adubação ocorreu em 2008. Amostras de raízes e da rizosfera foram utilizadas para o isolamento em meio semi-sólido NFb. A densidade populacional foi estimada por meio do número mais provável, posteriormente sendo realizada a purificação e estocagem das bactérias. A diversidade da comunidade bacteriana diazotrófica independente de cultivo foi avaliada pela técnica de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) do gene *nifH*. A densidade populacional de bactérias potencialmente diazotróficas foi elevada nos habitat rizosfera e endofítico de raiz, destacando-se o nicho rizosfera de pastagens sem adubação e com última adubação em 2008. Foram isoladas 90 bactérias em meio NFb e após purificação e novo teste de fixação biológica de nitrogênio, 100% dos isolados apresentaram-se positivos. A técnica de PCR-DGGE do gene *nifH* demonstrou elevada diversidade genética na comunidade bacteriana diazotrófica, ou seja, alta variabilidade do gene *nifH*, codificante da enzima nitrogenase, nas bactérias associadas a gramínea *Brachiaria decumbens*, sob diferentes manejos de adubação e degradação. As populações bacterianas agruparam-se formando *clusters*, entre os nichos ou tempos de cultivo sem adubação. Portanto, gramíneas *Brachiaria decumbens*, cultivadas na região Agreste do estado de Pernambuco, sob manejo sem adubação, apresentaram associação com bactérias potencialmente diazotróficas, com elevada densidade populacional, e alta variabilidade genética da comunidade bacteriana fixadora de nitrogênio nos nichos rizosfera e endofítico de raiz.

**Palavras chaves:** DGGE, fixação biológica de nitrogênio, gramíneas forrageiras, variabilidade genética, promoção de crescimento vegetal

## **Diazotrophic bacterial community associated with *Brachiaria decumbens* under different fertilization times**

**Abstract:** The intense agricultural activities have caused disturbances in ecosystems, altering both its operation and the communities living there. Thus, the density and diversity of bacterial populations associated with these activities may indicate that certain agricultural practices can impact the environment. Given that much of the pasture areas cultivated, or not, are at different stages of degradation, with decreased fertility and soil biological chemistry, this study aimed to assess the population density and isolate diazotrophic bacteria potentially associated the rhizosphere and endophytic niches root of *Brachiaria decumbens*, grown under different periods of cultivation and fertilization in the Agreste region of Pernambuco State, and to analyze the genetic variability of the total bacterial community by cultivation-independent method. Plants *B. decumbens* were collected from three different pastures established: one with 30 years of cultivation without fertilization; other in their final year of training and fertilization was in 2005, and a third in his final year of training and fertilization was 2008. Samples of the roots and rhizosphere used for insulation in a semi-solid NFB. The population density was estimated by most probable number, later being made purification and storage of bacteria. The diversity of diazotrophic bacterial community independent of cultivation was analyzed by DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) of *nifH*. The population density of potentially diazotrophic bacteria was high in the rhizosphere and endophytic habitat root, especially the niche rhizosphere pasture without fertilization and with fertilization last in 2008. 90 bacteria were isolated in the midst NFB and after purification and testing of new biological nitrogen fixation, 100% of the isolates were positive. The PCR-DGGE of *nifH* showed high genetic diversity in diazotrophic bacterial community, ie, high variability of *nifH*, encoding nitrogenase enzyme in bacteria associated with *Brachiaria decumbens* under different fertilizer managements and degradation. Bacterial populations were grouped to form clusters, or niches between the times of cultivation without fertilization. Therefore, *Brachiaria decumbens*, grown in the Agreste region of Pernambuco State, under management without fertilizer, were associated with potentially diazotrophic bacteria with high population density, and high genetic variability of nitrogen-fixing bacterial community in rhizosphere and endophytic niches root.

**Keywords:** biological nitrogen fixation, DGGE, forage grasses, genetic variability, plant growth promotion

## 5.1 Introdução

A busca por sistemas de produção agropecuária mais sustentáveis, cujo manejo cause menor degradação e impacto ao solo, minimizando os danos na densidade de micro-organismos funcionais (Ramos et al., 2012), tem estimulado pesquisas que visam descrever a associação de bactérias diazotróficas e/ou com potencial de crescimento vegetal associadas às gramíneas forrageiras (Loredo-Osti et al., 2004), tendo as bactérias um importante papel nos sistemas agrícolas, especialmente como biofertilizantes (Chubatsu et al., 2011; Piromyot et al., 2011).

As atividades humanas, com a incorporação de nitrogênio no meio, através da adubação nitrogenada, estão causando grande aumento na ciclagem do nitrogênio. Além do desequilíbrio deste excesso, a inclusão de altos níveis de nitrogênio provoca a poluição dos ecossistemas e alteram tanto seu funcionamento ecológico, quanto as comunidades vivas presentes. Desta forma, o tamanho de uma determinada população bacteriana pode indicar se práticas humanas causam impacto ao meio ambiente, com consequências positivas ou negativas (Paria-Llanos et al., 2010).

Os micro-organismos diazotróficos possuem o complexo enzimático da nitrogenase, apresentando elevada diversidade e diferindo quanto à morfologia, fisiologia, genética e filogenética, garantido sua ocorrência nos mais diversos ecossistemas (Franche et al., 2009).

A técnica do PCR-DGGE (*Polimerase Chain Reaction – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) possibilita o acesso à diversidade genética das populações bacterianas oriundas diretamente do meio ambiente, não sendo necessário o cultivo bacteriano em laboratório (Lacava et al., 2006), além de possibilitar a avaliação da diversidade genética e funcional dos micro-organismos presentes na interação solo-planta e sua flutuação no ambiente em relação aos fatores bióticos e abióticos (Saito et al., 2007).

Dos 200 milhões de hectares de pastagens, cultivadas e não cultivadas, no território brasileiro, aproximadamente a metade encontra-se em diferentes estágios de degradação (Dias Filho, 2007; Jank et al., 2011), apresentando diminuição da fertilidade química e biológica do solo (Ferreira et al., 2010; Tavares Filho et al., 2011). Neste contexto, objetivou-se com o presente trabalho, avaliar a densidade populacional e isolar bactérias potencialmente diazotróficas associadas aos nichos rizosfera e endofítico de raiz da gramínea *Brachiaria decumbens* sob diferentes manejos de tempos de adubação, além de analisar a variabilidade genética da comunidade bacteriana total de fixadoras de nitrogênio atmosférico associadas às gramíneas *Brachiaria decumbens*, por método independente de cultivo.

## **5.2 Material e métodos**

### **5.2.1 Áreas de estudo e material vegetal**

As coletas foram realizadas em pastagens de *Brachiaria decumbens* cultivadas na Fazenda Riacho do Papagaio, no município de São João, no Agreste Meridional do Estado de Pernambuco, sob diferentes manejos e tempos de cultivo. As três áreas de cultivo foram escolhidas levando-se em consideração o tempo de aplicação do fertilizante nitrogenado e o estágio de degradação das pastagens. Os locais foram georreferenciados com o auxílio de um GPS:

- Pastagem com 30 anos de cultivo sem adubação e em estágio de degradação avançado. Coordenadas S 08°49'11" e W 036°23'38";
- Pastagem formada e com o último ano de adubação em 2005, em estágio de degradação intermediário. Coordenadas S 08°48'35" e W 036°24'27";
- Pastagem formada e com o último ano de adubação em 2008, não degradada. Coordenadas S 08°49'00" e W 036°23'38".

De cada área da pastagem, aleatoriamente, foram coletadas três amostras vegetais e de solo, a uma profundidade de 0-0,2 m. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e, em seguida, levadas ao Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana, da Unidade Acadêmica de Garanhuns/Universidade Federal Rural de Pernambuco, para processamento e análises. As amostras de solo foram encaminhadas para análise das características químicas e físicas no Laboratório de Química do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Características químicas e físicas dos solos coletados nas áreas de pastagens de *Brachiaria decumbens* cultivadas na fazenda Riacho do Papagaio do município de São João-PE

Análises Químicas									
Área	pH	P	K	Ca	Mg	Na	Al <sup>3+</sup>	H+Al	C total
		mg dm <sup>-3</sup>	-----cmol <sub>c</sub> dm <sup>3</sup> -----						
T1	6,02	15,44	0,12	0,15	0,45	0,02	0,10	0,40	0,12
T2	5,05	52,63	0,18	0,10	0,40	0,02	0,15	0,25	0,07
T3	6,01	31,79	0,12	0,20	0,50	0,03	0,10	0,35	0,06

Análises Físicas							
Área	Areias (%)			Silte	Argila	Argila dispersa em água	Textura
	Grossa	Fina	Total	-----%-----		----g g <sup>-1</sup> ----	
T1	76,45	15,68	92,13	4,41	3,45	0,0044	Arenosa
T2	75,86	15,96	91,82	5,40	2,77	0,0019	Arenosa
T3	74,92	17,02	91,94	3,24	4,83	0,0030	Arenosa

T1 = Pastagem com 30 anos de formação e sem adubação

T2 = Pastagem com última adubação ocorrida no ano de 2005

T3 = Pastagem com última adubação ocorrida no ano de 2008

## 5.2.2 Isolamento e estocagem bacteriana

O isolamento, a avaliação de densidade e posterior estocagem de bactérias da rizosfera e endofítica de raiz foram realizados como descrito no subitem 3.2.2 (Capítulo I). Com 90 isolados bacterianos selecionados, estes de diferentes pastagens e nichos para os posteriores testes.

## 5.2.3 Caracterização fenotípica

### 5.2.3.1 Identificação de bactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio atmosférico

Como descrito no subitem 3.2.3.1 (Capítulo I).

## 5.2.4 Caracterização genética

### 5.2.4.1 Análise da comunidade bacteriana diazotrófica total por DGGE

A técnica de DGGE do gene *nifH* foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Solo, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo.

A extração do DNA total das amostras de solo rizosférico e das raízes, desinfetadas superficialmente, foi realizada utilizando-se o Power Soil DNA kit (MoBio; EUA). Após a extração, a integridade e a qualidade dos DNAs foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1% (w/v) em tampão TAE 1x.

#### 5.2.4.1.1 PCR (*Polimerase Chain Reaction*) do gene *nifH*

Para a amplificação do gene *nifH* foram utilizados os *primers* FGPH19 (5'-TACGGCAARGGTGGNATH-3') e PolR (5'-ATSGCCATCATYTTCRCCG-3'). A amplificação ocorreu em 25  $\mu\text{L}$  de volume final, contendo 2  $\mu\text{L}$  de dNTP 2,5 mM; 2,5  $\mu\text{L}$  de Taq Buffer 10X (Fermentas); 2,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM; 0,05  $\mu\text{L}$  de BSA (bovine serum albumin), 5  $\mu\text{L}$  de de 5U  $\mu\text{L}^{-1}$  de Taq DNA Polimerase (Fermentas); 0,125  $\mu\text{L}$  de cada *primer* (10 pmoles  $\mu\text{L}^{-1}$ ) e 2  $\mu\text{L}$  de DNA total do solo ou da raiz (10 ng), sendo o restante do volume completado com água ultra pura autoclavada. As condições da amplificação foram: 5 min a 94 °C; 30 ciclos de 1 min a 94 °C; 1 min a 56 °C; 2 min a 72 °C e 30 min a 72 °C.

O produto da amplificação, os amplicons, foram utilizados numa segunda reação de PCR para o gene *nifH*, utilizando os *primers* PolF-GC (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCCGCGCCCCCGCCCCCTGCGAYCCSAA RGCBGACTC-3') e AQER (5'-ACGATGTAGATYTCCTG-3'). A amplificação ocorreu em 50  $\mu\text{L}$  de volume final, contendo: 4  $\mu\text{L}$  de dNTP 2,5 mM; 5  $\mu\text{L}$  de Taq Buffer (Fermentas); 2,0 de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2  $\mu\text{L}$  de Taq DNA Polimerase (Fermentas); 0,250  $\mu\text{L}$  de cada *primer* (10 pmoles  $\mu\text{L}^{-1}$ ) e 2  $\mu\text{L}$  do PCR da 1ª reação (10 ng de DNA),

sendo o restante do volume completado com água ultra pura autoclavada. Os ciclos de amplificação foram 5 min a 94 °C; 30 ciclos de 1 min a 94 °C; 1 min a 48 °C; 2 min a 72 °C e 30 min a 72 °C.

Todos os produtos de PCR, cerca de 10 µL da reação, foram verificados em gel de agarose 1% em TAE 1x, para confirmação da amplificação do produto desejado.

#### **5.2.4.1.2 Análise por DGGE**

As análises por DGGE foram realizadas no equipamento Ingeny PhorU System (Ingeny, Goes, The Netherlands). Para a análise, foi preparado um gel de poliacrilamida 6% (w/v), com gradiente desnaturante de 40 a 65% para o produto do PCR do gene *nifH*. O gel foi submetido à eletroforese por 16 h a 75 Volts, à temperatura de 60 °C. Após a corrida da eletroforese, os géis foram corados com SYBR-gold (Invitrogen, Breda, The Netherlands) e TAE 1x na proporção de 1:10.000 por 30 min e fotodocumentados.

#### **5.2.5 Análise estatística**

As análises quantitativas de densidade populacional foram submetidas à análise de variância (ANOVA), através do programa estatístico SISVAR 5.3<sup>®</sup> e a comparação entre as médias foram realizadas pelo Teste de Scott-Knott, ( $p < 0,05$ ). Por meio da análise do gel de poliacrilamida, as bandas observadas pela amplificação foram transformadas em dados binários e, a partir destes dados, foi construída uma planilha, analisada pelo software Past 1.90, empregando-se o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) e aplicado o Coeficiente de Jaccard para análise da matriz de similaridade entre as bactérias analisadas.

### 5.3 Resultados e discussão

#### 5.3.1 Densidade populacional de bactérias potencialmente diazotróficas associadas a plantas de *Brachiaria decumbens*

Nas pastagens de *B. decumbens* com diferentes períodos de adubação nitrogenada e na testemunha não adubada foi observada elevada densidade populacional de bactérias potencialmente diazotróficas associadas aos nichos, rizosfera e endofítico de raiz, com variação de número mais provável (NMP) de  $4,00 \times 10^3$  a  $1,60 \times 10^6$  células  $g^{-1}$  de solo ou tecido vegetal fresco. Segundo o teste de Scott-Knott, o nicho rizosfera da pastagem sem adubação e da pastagem com última adubação no ano de 2008, obtiveram destaque com as maiores densidades populacionais de bactérias diazotróficas, tanto entre os diferentes tempos de adubação, quanto entre os nichos por período de adubação (Figura 5.1), concordando com Rosenblueth & Martínez-Romero, (2006) e Pariona-Llanos et al. (2010), que encontraram que a população endofítica é inferior a da rizosfera.

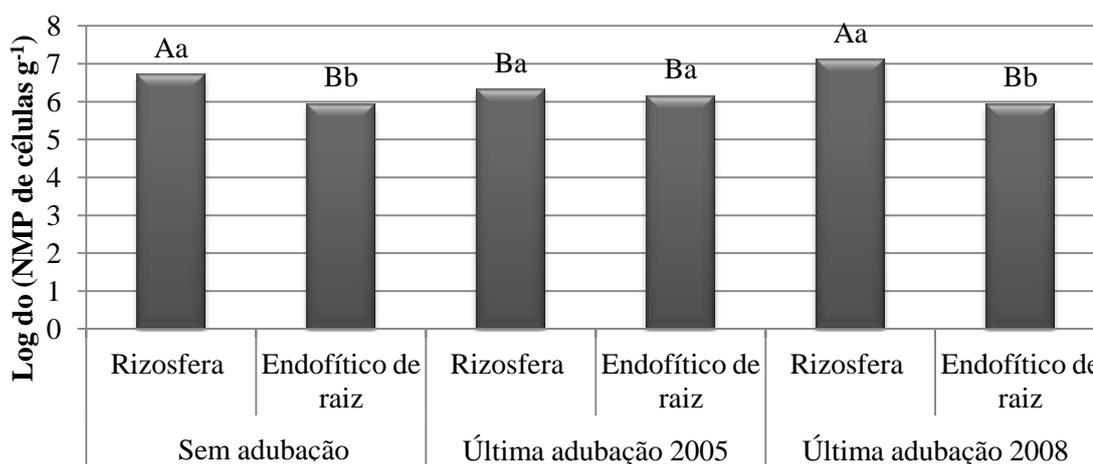


Figura 5.1. Densidade populacional da comunidade bacteriana diazotrófica, endofítica de raiz e rizosfera, de plantas de *Brachiaria decumbens* em diferentes tempos sem adubação. Letras maiúsculas comparam os nichos entre si e os períodos de adubação, letras minúsculas os nichos por período de adubação. Letras iguais não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott

O nicho rizosfera apresenta predominância em número de isolados em comparação aos demais, devido à liberação dos exsudados radiculares e a matéria orgânica do solo, favorecendo o crescimento microbiano (Haichar et al., 2008; Castro et al., 2011).

Diferentemente do esperado, a pastagem com última adubação em 2008 teve densidade semelhante à sem adubação, fato explicado que independente do manejo de adubação nitrogenada empregada a pastagem apresenta-se colonizada com bactérias potencialmente diazotrófica, que possivelmente imprimem a característica de fixação biológica de nitrogênio na ausência de nitrogênio em forma de adubação, esta característica podendo não se expressar na presença do fertilizante. Já que o uso destes tem provocado impactos sobre a comunidade de micro-organismos presente no solo, (Yuan et al. 2010).

### **5.3.2 Características de promoção de crescimento vegetal**

#### **5.3.2.1 Bactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio atmosférico**

Os 90 isolados bacterianos potencialmente diazotróficos selecionados, sendo 30 de cada pastagem, destes 15 de cada nicho, foram reinoculadas em meio NFb semi-sólido e 100% apresentaram halo de crescimento no interior do meio de cultura.

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) deve ser explorada não apenas como alternativa econômica de fornecimento de nitrogênio para agricultura (Sala et al., 2005), mais como de primordial função na preservação ecológica (Bhattacharjee et al., 2008; Conceição et al., 2009), podendo promover o aumento da produção de biomassa (Roesch et al., 2007; Piromyot et al., 2011) e a restauração de áreas degradadas, como as de pastagem, que hoje ocupam grande parte das áreas destinadas ao cultivos de gramíneas forrageiras.

### 5.3.3 Caracterização da diversidade genômica

#### 5.3.3.1 Diversidade da comunidade bacteriana diazotrófica total associada a plantas de *Brachiaria decumbens* sob diferentes tempos de adubação

A análise da comunidade bacteriana independente de cultivo, por DGGE do gene *nifH*, permitiu o acesso da diversidade bacteriana total diazotrófica endofítica de raiz e da rizosfera de plantas *Brachiaria decumbens* sob diferentes tempo de adubação. A figura 5.2 ilustra o gel de poliacrilamida com perfis de bandas (*amplicons*) dos genes *nifH*, obtidos através do uso da técnica DGGE. Esta técnica é mais apurada, pois diferentemente dos géis de agarose convencionais, que a análise ocorre em relação às diferenças de tamanho entre as bandas, o DGGE diferencia a composição das bases nitrogenadas dos *amplicons* (Andreote et al., 2009), sendo observado diferentes padrões de bandas.

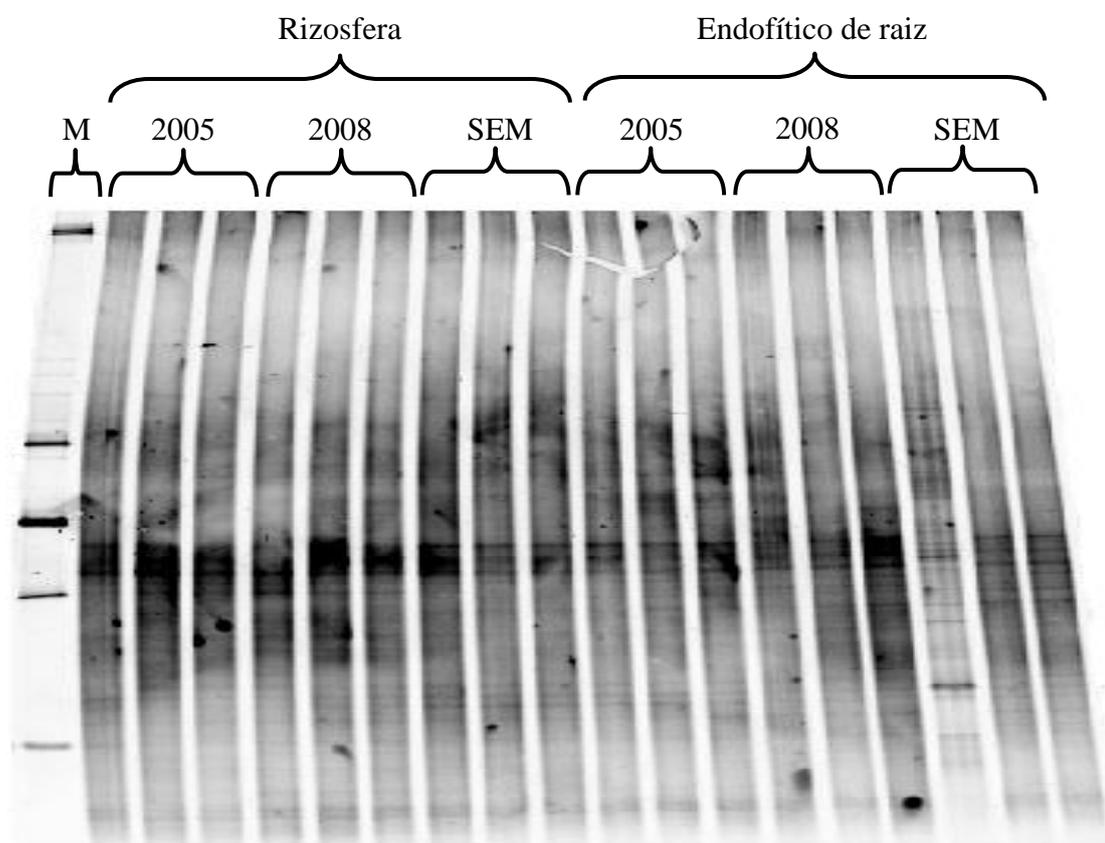


Figura 5.2. Gel de poliacrilamida com perfis obtidos no DGGE do *nifH* das comunidades bacterianas diazotróficas endofíticas de raiz e rizosfera de plantas de *Brachiaria decumbens*, sob diferentes tempos de adubação. M =

marcador; 2005 = pastagem com última adubação no ano de 2005; 2008 = pastagem com última adubação no ano de 2008; SEM = pastagem cultivada há 30 anos e nunca adubada

A análise da comunidade bacteriana por uso da técnica DGGE, semelhantemente aos resultados obtidos pela técnica de BOX-PCR, evidenciou elevada diversidade genética da comunidade bacteriana existente na rizosfera e nas raízes da gramínea *Brachiaria decumbens* (Figura 5.3). A elevada variabilidade do gene *nifH* também foi observada por Giuntini et al. (2006) analisando a comunidade bacteriana em solos tratados com casca de oliveira.

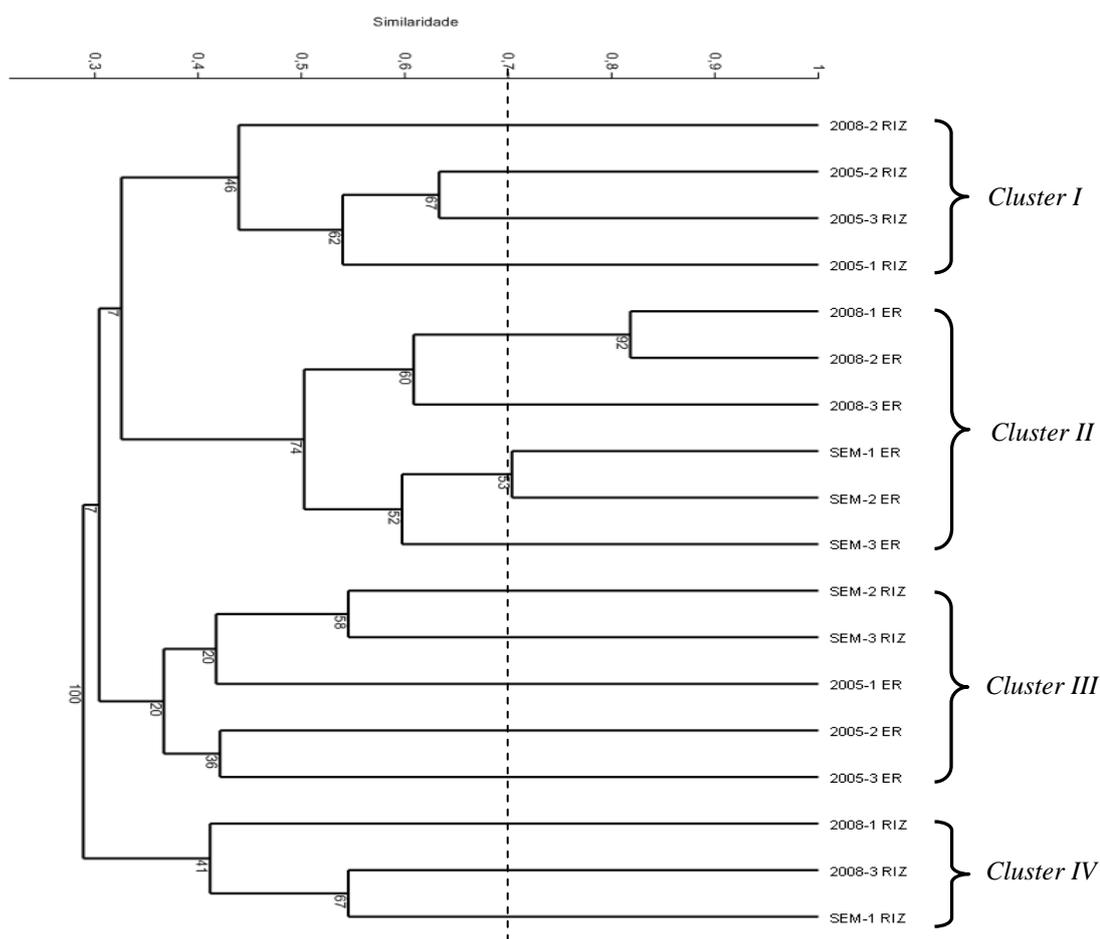


Figura 5.3 Dendrograma de similaridade das comunidades bacterianas diazotróficas associadas às plantas de *Brachiaria decumbens* sob diferentes tempos de adubação. 2005 = plantas com última adubação no ano de 2005; 2008 = plantas com última adubação no ano de 2008; SEM = plantas que nunca foram adubadas em 30 anos de cultivo; 1, 2 ou 3 = repetição por cada amostra; ER = endofítico de raiz; RIZ = rizosfera. Baseadas nos perfis obtidos através da técnica de DGGE do gene *nifH* e analisados através do

coeficiente de Jaccard foi utilizado para a construção da matriz de similaridade. Os números nos nós do dendrograma indicam o valor da porcentagem de vezes que o grupo ocorreu no mesmo nó durante o *Bootstrap* de 1000 repetições

É possível observar o agrupamento existente nos *clusters* entre os tempos sem adubação e os nichos avaliados, bem como, a baixa similaridade da maioria dos *clusters*. Houve a formação de apenas dois grupos dominantes com similaridade genética igual ou acima de 70%, sendo ambos do nicho endofítico de raiz (nos tratamento sem adubação e com última adubação no ano de 2008).

Os diferentes tempos de adubação impostos às pastagens influenciaram as comunidades de bactérias diazotróficas, tanto da rizosfera quanto endofíticas de raiz, sendo observado maior diversidade na comunidade bacteriana que compõem a rizosfera em ambas as pastagens, semelhante aos encontrados por Coelho et al. (2009) em estudos com DGGE do gene *nifH* na comunidade bacteriana associada ao sorgo (*Sorghum bicolor*) submetido a diferentes quantidades de adubação nitrogenada.

Diferente deste trabalho, com gramínea *Brachiaria decumbens*, e do trabalho realizado por Coelho et al. (2009), Prakamhang et al. (2009), analisando plantas de arroz (*Oryza sativa* L.), não observaram a expressão do gene *nifH* pela técnica de DGGE em raízes e solo adubados em diferentes estágio de crescimento vegetal, sendo observado apenas nas folhas, em todo o crescimento da planta.

#### **5.4 Conclusões**

A densidade populacional de bactérias potencialmente diazotróficas é elevada nos nichos rizosfera e endofítica de raiz nas gramíneas do gênero *Brachiaria decumbens*, independente do tempo sem adubação (pastagem formada há 30 anos sem adubação, pastagem com última adubação no ano de 2005 e pastagem com última

adubação no ano de 2008). O nicho rizosfera se destacou com a maior associação de bactérias diazotróficas em todas as pastagens, com e sem adubação.

Foi observada alta (100%) frequência de isolados bacterianos diazotróficos em associação com gramíneas do tipo *Brachiaria decumbens*, sob diferentes tempos de adubação.

A técnica de PCR-DGGE do gene *nifH* das amostras de solo e raiz das plantas *Brachiaria decumbens* apresentaram elevada diversidade genética, porém foi observado o agrupamento entre os nichos e tempos de adubação.

### BIBLIOGRAFIA CITADA

- ANDREOTE, F.D.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.417-432, 2009.
- BHATTACHARJEE, R.B.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S.N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertilisers for non-legumes: prospects and challenges. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.80, p.199-209, 2008.
- CASTRO, C.B.; KIDD, P.S. FERNANDES, A.P. et al. Endophytic and rhizoplane bacteria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: isolation and characterisation. **Plant Soil**, v.340, p.413-433, 2011.
- COELHO, M.R.; MARRIEL, I.E.; JENKINS, S.N. et al. Molecular detection and quantification of *nifH* gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer. **Applied Soil Ecology**, v.42, p.48-53, 2009.
- CONCEIÇÃO, P.M.; VIEIRA, H.D.; CANELLAS, L.P. et al. Efeitos dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho. **Ciência Rural**, v.39, p.1880-1883, 2009.
- CHUBATSU, L.S.; MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M. et al. Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant Soil**, v.356, p.197-207, 2011.
- DIAS-FILHO, M. B. **Degradação de pastagens: processos, causas e estratégias de recuperação**. 3.ed. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2007. 190 p
- FERREIRA, R.F.; CARDOSO, I.C.M.; SILVA, C.F. et al. Rice response to inoculation with P-solubilizing microorganisms from Brazilian cerrado. **Bioscience Journal**, v.25, p.1-7, 2009.
- FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant Soil**, v.321, p.35-59, 2009.
- GUIUNTINI, E.; BAZZICALUPO, M.; CASTALDINI, M. et al. Diversidade genética de dinitrogênio-fixação de comunidades bacterianas em solo com casca de azeitona. **Annals of Microbiology**, v.56, p.83-88, 2006.

- HAICHAR, F.Z.; MOROL, C.; BERGE, O. et al. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. **International Society for Microbial Ecology Journal**, v.2, p.1221-1230, 2008.
- JANK, L.; VALLE, C.B.; RESENDE, R.M.S. Breeding tropical forages. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.1, p.27-34, 2011.
- LACAVA, P.T.; ANDREOTE, F.D.; ARAÚJO, W.L. et al. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR específico e DGGE. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.637-642, 2006.
- LOREDO-OSTI, C.; LÓPEZ-REYES, L.; ESPINOSA-VICTORIA, D. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas. **Terra Latino American**, v.22, p.225-239, 2004.
- PARIONA-LLANOS, R.; FERRARA, F.I.S.; GONZALES, H.H.S. et al. Influence of organic fertilization on the number of culturable diazotrophic endophytic bacteria isolated from sugarcane. **European Journal of Soil Biology**, v.46, p.387-393, 2010.
- PIROMYOR, P.; BURANABANYAT, B.; TANTASAWAT, P. et al. Effect of growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. **European Journal of Soil Biology**, v.47, p.44-54, 2011.
- PRAKAMHANG, J.; MINAMISAWA, K.; TEAMTAISONG, K. et al. The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L). **Applied Soil Ecology**, v.42, p.141-149, 2009.
- RAMOS, M.L.G.; MENEGHIN, M.F.S.; PEDROSA, C. et al. Efeito dos sistemas de manejo e plantio sobre a densidade de grupos funcionais de microrganismos, em solos de cerrado. **Bioscience journal**, v.28, p.58-68, 2012.
- ROESCH, L.F.W.; PASSAGLI, L.M.P.; BENTO, F.M. et al. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.31, p.1367-1380, 2007.
- ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **The American Phytopathological Society**, v.19, p.827-837, 2006.
- SAITO, A.; IKEDA, S.; EZURA, H. et al. Microbial community analysis of the phytosphere using culture-independent methodologies. **Microbes and Environments**, v.22, p.93-105, 2007.
- SALA, V.M.R.; FREITAS, S.S.; DANZELI, V.P. et al. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.29, p.345-352, 2005.
- TAVARES FILHO, J.; FERREIRA, R.R.M.; FERREIRA, V.M. Fertilidade química do solo sob pastagens formadas com diferentes espécies nativas e com *Brachiaria decumbens* manejadas com queimadas anuais. **Ciências Agrárias**, v.32, p.1771-1782, 2011.
- YUAN, S.Y.; HUANG, I.C.; CHANG, B.V. Biodegradation of dibutyl phthalate and di-(2-ethylhexyl) phthalate and microbial community changes in mangrove sediment. **Journal of Hazardous Materials**, v.184, p.826-831, 2010.

## 6 CONCLUSÃO GERAL

As diferentes espécies vegetais de gramíneas forrageiras *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola* e os diferentes nichos de colonização, rizosfera e endofítico de raiz, apresentam associação com alta diversidade bacteriana, tanto para o meio específico para crescimento de bactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio quanto em meio não seletivo.

Os isolados bacterianos analisados, quanto as suas características fisiológicas, apresentaram mecanismos de promoção de crescimento vegetal em ambas as espécies vegetais e nichos avaliados, fixando biologicamente o nitrogênio atmosférico (com e sem a presença de sal no meio de cultura), produzindo enzimas extracelulares (celulase, amilase e pectinase), solubilizando de fosfato inorgânico (com a utilização de varias fontes de carbono), produzindo ácido indol acético por diferentes rotas bioquímicas e produzindo a molécula *quorum sensing*. Porém é observado que isolados provenientes do isolamento em meio NFb (meio seletivo para bactérias potencialmente diazotróficas) apresentaram maior potencial de promoção de crescimento (ocorrendo maior frequência de positivos para as análise e os isolados apresentando mais de uma característica biotecnológica), desta forma sugerindo que o meio de isolamento influencia na seleção de bactérias com elevado potencial de crescimento vegetal.

A elevada diversidade genética foi observada tanto pela técnica que utiliza o cultivo bactéria (BOX-PCR) quanto a que não utiliza o cultivo e especifica para avaliar as bactérias fixadoras biológicas de nitrogênio (DGGE do gene *nifH*), porém é observado entre os isolados pela técnica do BOX-PCR elevada similaridade esta acima de 70,00% em ambos os meios de isolamento NFb e TSA 10%. Em ambas as técnicas de avaliação da diversidade genética (com e sem o cultivo bacteriano) foi observado o

agrupamento dos isolados (no BOX-PCR) e na comunidade (no DGGE), estes formando *clusters* no dendrograma em relação à espécie vegetal ou nicho associado.

Tal associação bactéria planta-solo pode proporcionar vários benefícios à planta, não apenas a fixação biológica do nitrogênio, porém investimentos em pesquisas utilizando gramíneas forrageiras são de fundamental importância pelo elevado valor que esta representa na alimentação animal e elevada área de ocupação no território nacional, juntamente com a interação de estudos multidisciplinares e integrados, em áreas como microbiologia, ciência do solo, melhoramento de plantas, manejo de culturas, entre outras, podem trazer um grande benefício para o produtor, aumentando a disponibilidade de alimentos para o seu rebanho.