

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar inoculada com bactérias
diazotróficas**

Alice de Sousa Cassetari

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração: Solos
e Nutrição de Plantas

**Piracicaba
2015**

Alice de Sousa Cassetari
Engenheira Agrônoma

**Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar inoculada com bactérias
diazotróficas**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:

Prof. Dr. **MARCIO RODRIGUES LAMBAIS**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração: Solos
e Nutrição de Plantas

Piracicaba
2015

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Cassetari, Alice de Sousa

Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas / Alice de Sousa Cassetari. -- versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. -- Piracicaba, 2015. 161 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Filosfera 2. Bactérias fixadoras de nitrogênio 3. Biofertilizante 4. Gramíneas
I. Título

CDD 633.61
C344f

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICO

Ao meu amado e inesquecível irmão Alexandre (in memoriam)

Aos melhores pais Daniel e Marlene, pelo exemplo de vida e perseverança, pelo incentivo, amor e apoio sempre.

Às minhas irmãs Luciana e Sofia pela alegria que trazem para minha vida.

Ao meu namorado Fábio pela paciência e amor em todos os momentos.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Sou eternamente grata a todas as pessoas que estiveram ao meu lado durante os 6 anos e meio que vivi em Piracicaba e a todos os desafios que me foram colocados pois contribuíram muito para minha formação pessoal e profissional.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. *Marcio Rodrigues Lambais*, pela oportunidade, orientação, e confiança ao longo de todo o mestrado e doutorado.

À *Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP)*, ao *Departamento de Ciência do Solo (LSO)* e ao *Programa de Pós-Graduação de Solos e Nutrição de Plantas*, pela oportunidade concedida e por fornecer a estrutura para a realização deste trabalho.

À *CAPES*, pela bolsa concedida nos meses iniciais do curso e ao *CNPq*, pela bolsa concedida até o final do curso.

Aos meus pais e grandes exemplos de vida *Marlene e Daniel*, e as minhas amadas irmãs *Luciana e Sofia* pela educação, confiança, amor e apoio incondicional em todos os momentos.

Um agradecimento especial ao meu grande companheiro, *Fábio Pertille*, pelo carinho e incentivo durante toda a caminhada, mas principalmente pela paciência, apoio e compreensão nos momentos de dificuldade.

Aos Professores Doutores: *Elke J. B. N. Cardoso, Fernando D. Andreote e Paulo Sergio Pavinato*, pela participação no exame de qualificação, momento importante para a minha formação pessoal e profissional.

Ao amigo Dr. *Adriano Reis Lucheta* pela amizade, ensinamentos e orientações durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

A amiga Prof. Dra. *Giselle Gomes Fracetto* pela amizade, conselhos e pelos ensinamentos que auxiliaram nas análises de real time.

Aos funcionários *Denise Mescolotti, Fernando Baldesin e Wladimir Rosignolo* por todo auxílio durante o desenvolvimento do trabalho na casa-de-vegetação e laboratório.

A amiga *Silvia Serra Negra* pela concessão das mudas de cana-de-açúcar para condução dos experimentos.

A amiga colombiana *Silvia Barrera* pela imensa ajuda nas análises cromatográficas e *Stalin Flores* pela ajuda no decorrer dos experimentos.

Aos colegas do laboratório de microbiologia, atuais e que já concluíram seus trabalhos: Adriano, *Silvia, Elisa, Sandra, Giselle Fracetto, Rafael Valadares, Gisele Nunes, Vivian, Eder, Paulinha, Felipe, Daniel Bini, Myllene, Thiago Gumiere, Diogo, Emiliana, Julia Lima, Dorotéia.*

Aos estagiários *Felipe Moraes Ribeiro Bozza, e Paula Pafetti* pelo auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho.

À família que fiz em Piracicaba, *Bruna Oliveira, João, Nara, Ana Cláudia, Fabi, Fabio (gaúcho), Layanne, Jéssica, Adriano Anselmi, Tatiana, Juliana Deganello, Matheus, Elcio, Luciano França, Paulinho, Giselle, Felipe Cury* por estarem ao meu lado nesta importante etapa da minha vida.

A todos que não foram mencionados, mas que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho e para o meu crescimento pessoal e profissional.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1 Hipótese	16
1.2 Objetivos	16
1.3 Revisão bibliográfica	17
1.3.1 Fixação biológica de nitrogênio	17
1.3.2 Micro-organismos diazotróficos.....	20
1.3.3 Contribuição dos micro-organismos para os ecossistemas.....	23
1.3.4 Potencial de uso de diazotróficos na agricultura	26
1.3.5 Inoculantes microbianos para uso agrícola	29
Referências	33
2 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DA MATA ATLÂNTICA.....	45
Resumo.....	45
Abstract	46
2.1 Introdução	47
2.2 Desenvolvimento	49
2.2.1 Material e Métodos.....	49
2.2.1.1 Local de amostragem.....	49
2.2.1.2 Análise química das folhas e liteira de bambu	50
2.2.1.3 Isolamento e purificação das bactérias	51
2.2.1.4 Fixação biológica de nitrogênio “ <i>in vitro</i> ”	52
2.2.1.5 Solubilização de fosfato inorgânico	53
2.2.1.6 Produção de ácido indol-3-acético (AIA)	54
2.2.1.7 Produção de ACC desaminase	54
2.2.1.8 Produção de quitinases	55
2.2.1.9 Produção de sideróforo	55
2.2.1.10 Extração de DNA bacteriano	56
2.2.1.11 Caracterização genotípica dos isolados por BOX-PCR.....	56
2.2.1.12 Amplificação e sequenciamento do gene rRNA 16S dos isolados.....	57

2.2.1.13 Amplificação e sequenciamento dos genes rRNA 16S e <i>nifH</i> de isolados selecionados.....	58
2.2.2 Resultados e discussão	59
2.2.2.1 Caracterização química das folhas de bambu	59
2.2.2.2 Isolamento das bactérias da filosfera e liteira de bambu	62
2.2.2.3 Fixação biológica de nitrogênio “ <i>in vitro</i> ”.....	64
2.2.2.4 Solubilização de fosfato inorgânico.....	66
2.2.2.5 Produção de ácido indol-3-acético (AIA).....	69
2.2.2.6 Produção de ACC desaminases.....	72
2.2.2.7 Produção de quitinases	72
2.2.2.8 Produção de sideróforos.....	74
2.2.2.9 Análise de BOX-PCR.....	76
2.2.2.10 Análise de sequenciamento do gene rRNA 16S dos isolados	79
2.2.2.11 Análise do sequenciamento completo do gene rRNA 16S dos isolados e gene <i>nifH</i>	85
2.3 Conclusões	89
Referências.....	89
3 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BIOFERTILIZANTES COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EPIFÍTICAS	102
Resumo	102
Abstract.....	103
3.1 Introdução.....	104
3.2 Desenvolvimento	105
3.2.1 Material e métodos.....	105
3.2.1.1 EXPERIMENTO 1. Inoculação de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar micropropagada por meio de pulverização foliar	106
3.2.1.1.1 Preparo do inóculo.....	107
3.2.1.1.2 Determinação da atividade da nitrogenase nas folhas inoculadas	108
3.2.1.1.3 Dinâmica da população bacteriana na superfície das folhas de cana-de-açúcar inoculadas.....	110
3.2.1.2 EXPERIMENTO 2. Inoculação de bactérias diazotróficas encapsuladas em micro-esferas de alginato em cana-de-açúcar micropropagada.....	111
3.2.1.2.1 Preparo do inóculo.....	112
3.2.1.2.2 Determinação da atividade da nitrogenase.....	113

3.2.1.2.3 Dinâmica da população bacteriana no solo	114
3.2.2 Resultados e discussão.....	115
3.2.2.1 EXPERIMENTO 1. Inoculação de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar micropropagada por meio de pulverização foliar	115
3.2.2.1.1 Atividade da nitrogenase	123
3.2.2.1.2 Dinâmica da população bacteriana na superfície das folhas de cana-de-açúcar inoculadas	127
3.2.2.2 EXPERIMENTO 2. Inoculação de bactérias diazotróficas encapsuladas em micro-esferas de alginato em cana-de-açúcar micropropagada.....	131
3.2.2.2.1 Determinação da atividade da nitrogenase	138
3.2.2.2.2 Dinâmica da população bacteriana no solo	141
3.3 Conclusões.....	144
Referências	145
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	152
ANEXOS	154

RESUMO

Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas

O processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) é a principal forma de entrada de nitrogênio (N) em ecossistemas naturais e é intermediado por micro-organismos diazotróficos simbióticos ou de vida livre. A produção de biofertilizantes com bactérias diazotróficas é a principal alternativa ao uso de fertilizantes nitrogenados solúveis. Apesar da simbiose *Rhizobium*-leguminosas ser eficiente em promover o crescimento das plantas, a inoculação de bactérias diazotróficas em gramíneas vem apresentando resultados questionáveis, principalmente devido à baixa eficiência e incompatibilidade entre os atuais inoculantes bacterianos e as plantas. Os biofertilizantes para gramíneas utilizam bactérias endofíticas as quais desenvolvem interações pouco conhecidas com as plantas. Uma possibilidade para melhorar a eficiência da FBN em gramíneas é a aplicação de bactérias epifíticas de menor seletividade em relação às bactérias endofíticas. Os objetivos deste trabalho foram isolar novos genótipos de bactérias diazotróficas da filosfera de bambu da Mata Atlântica, verificar seu potencial biotecnológico *in vitro* e avaliar sua eficiência agrônoma como biofertilizante em cana-de-açúcar em casa-de-vegetação. Foram obtidos 120 isolados bacterianos os quais foram caracterizados morfológica e filogeneticamente. Com relação ao potencial biotecnológico, 48 isolados bacterianos apresentaram resposta positiva nos testes *in vitro* de redução de acetileno (ARA) e para produção *in vitro* de ácido indol-3-acético (AIA) na presença de L-triptofano. Desses 48 isolados, 50% apresentaram capacidade de solubilizar fosfato de cálcio, 8% de produzir quitinases, 16% de produzir ACC desaminase e 17% de produzir sideróforos. O sequenciamento do gene rRNA 16S indicou que 75% dos isolados da filosfera de bambu foram similares à classe *Gammaproteobacteria* (*Proteobacteria*), e a família *Enterobacteriaceae*. Dentre eles, 32% dos isolados apresentaram sequências similares a *Klebsiella sp.* e 2% foram similares a *Serratia e Enterobacter*. Das 48 sequências analisadas, 37% delas não foram classificadas quanto ao gênero, podendo então representar novos gêneros ou espécies. Dez isolados contendo o gene *nifH* foram selecionados para experimentos de eficiência agrônoma em casa-de-vegetação usando bactérias inoculadas via pulverização foliar ou encapsuladas em micro-esferas de alginato e associados a diferentes níveis de adubação nitrogenada. A inoculação por meio de pulverização nas folhas de cana-de-açúcar resultou em aumento significativo de massa seca de parte aérea e concentração de N na parte aérea das plantas na sua fase inicial de desenvolvimento. A maior taxa de fixação nas folhas inoculadas foi observada sete dias após a inoculação no tratamento sem adição de N mineral. A inoculação no solo com os mesmos 10 isolados encapsulados em matriz polimérica em conjunto com diferentes níveis de adubação nitrogenada mostrou aumentos significativos de massa seca da parte aérea, raízes e concentração de N na parte aérea da cana-de-açúcar em comparação aos controles, principalmente nas fases tardias do desenvolvimento das plantas. O solo que recebeu as bactérias encapsuladas apresentaram elevadas taxas de FBN, oscilando entre 0 e 4 g de N g⁻¹ h⁻¹, 7 dias após a inoculação. Os resultados sugerem que as bactérias selecionadas possuem alto potencial biotecnológico para promover o crescimento das plantas em momentos diferentes do seu ciclo de desenvolvimento, dependendo do tipo de abordagem para inoculação.

Palavras-chave: Filosfera; Bactérias fixadoras de nitrogênio; Biofertilizante;
Gramíneas

ABSTRACT

Biological nitrogen fixation in sugarcane inoculated with diazotrophic bacteria

The process of biological nitrogen fixation (BNF) is the most important form of nitrogen (N) input in natural ecosystems and is mediated by symbiotic or free-living diazotrophic microorganisms. The production of biofertilizers containing diazotrophic bacteria is the main alternative to the use of soluble nitrogen fertilizers, improving plant growth by nitrogen fixation or other plant growth promoting mechanisms. Despite the efficiency of the symbioses *Rhizobium*-legumes in promoting plant growth, the inoculation of diazotrophic bacteria in grasses, such as sugarcane, has shown variable results, mainly due to the low efficiency and incompatibility between the current bacterial strains used in inoculants and plant genotypes. Most of the biofertilizers for grasses uses endophytic bacteria that develop complex interactions with the host plant, which are not totally understood. A possibility to improve the efficiency of BNF in grasses is the application of epiphytic diazotrophic bacteria that are less selective as compared to endophytes. The aims of this work were to isolate new genotypes of diazotrophic bacteria from the phyllosphere of bamboo from Atlantic Forest, determine their biotechnological potential based on *in vitro* assays, and evaluate their agronomic efficiency as biofertilizer for sugarcane under greenhouse conditions. A total of 120 bacterial isolates were obtained and characterized morphologically and phylogenetically. Regarding the biotechnological potential, 48 isolates showed positive responses under *in vitro* the acetylene reduction assay (ARA) and indole-acetic-acid (IAA) production *in vitro* assay in the presence of L-tryptophan. Among the 48 isolates evaluated, 50% were able to solubilize calcium phosphate, 8% produced chitinases, 16% were able to produce ACC deaminase, and 17% produced siderophores. The sequencing of the rRNA 16S gene revealed that 75% of the isolates were phylogenetically related to the family *Enterobacteriaceae* (*Gammaproteobacteria*). The genus *Klebsiella* accounted for 32% of the isolates, whereas *Serratia* and *Enterobacter* accounted for 2%. Approximately 37% of the isolates were assembled unclassified Bacteria. Ten isolates containing the *nifH* gene were selected for agronomic efficiency test under greenhouse conditions, using bacteria inoculated via foliar spraying, or encapsulation in alginate beads and inoculation in the soil, associated with different doses of nitrogen fertilizer. The inoculation on the sugarcane leaf surfaces resulted in significant increases in root biomass and N concentration in the shoots at the early stage of plant development. The highest N fixation rates in inoculated leaves were observed 7 days after inoculation in the absence of mineral N. The soil inoculation with the same 10 isolates immobilized in polymeric matrix in addition to different rates of nitrogen fertilization showed significant increases in shoot and root biomass and N concentration in the shoots of sugarcane, when compared to the controls, mostly at later stages of plant development. The soil inoculated with encapsulated bacteria showed high rates of BNF even when nitrogen fertilizer was applied, ranging between 0 and 4 g of N g⁻¹ h⁻¹ seven days after the inoculation. The results suggest that the selected bacteria have high biotechnological potential to promote sugarcane growth at different stages of development, depending on the inoculation approach.

Keywords: Phyllosphere; Nitrogen fixing bacteria; Biofertilizer; Grasses

1 INTRODUÇÃO GERAL

Com o crescimento da população mundial, espera-se uma maior demanda por alimentos e bioenergia que deverá ser compensada pelo aumento da produção e produtividade agrícola. Atualmente, o Brasil já ocupa um importante papel mundial na produção e comércio de “commodities agrícolas”, que se expande a cada ano pela adoção de novas tecnologias e aumento no consumo de insumos químicos. Dentre as principais culturas agrícolas brasileiras, a cana-de-açúcar (*Saccharum spp L*) é uma das mais importantes, posicionando o Brasil atualmente como o seu maior produtor mundial. De acordo com o levantamento do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014) a produção estimada para a safra de 2014 é de aproximadamente 737 milhões de toneladas. Segundo o levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB 2014), a área cultivada com cana-de-açúcar, que será colhida e destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2014/15, será de aproximadamente 9.130,1 mil hectares, sendo a produção de açúcar estimada em 39,46 milhões de toneladas, 4,17% maior que a produção da safra anterior, enquanto que a produção de etanol está estimada em 28,37 bilhões de litros. Para que fossem obtidos os níveis de produção atuais, estima-se que no ano de 2013, foram usadas 31 milhões toneladas de fertilizantes, e destes, 21,6 milhões toneladas foram importadas (ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA A DIFUSÃO DE ADUBOS E CORRETIVOS – ANDA, 2014)

Considerando apenas os fertilizantes nitrogenados, a demanda aumentou 25% em relação à safra de 2012. Atualmente, 70% dos fertilizantes nitrogenados são importados de outros países, principalmente da Rússia e China, o que acarreta na oneração da balança comercial e elevação dos custos de produção. Ainda de acordo com a ANDA (2014), a importação de fertilizantes deve aumentar em 15% no ano de 2014.

A aplicação de N em cana-de-açúcar cultivada no Brasil é relativamente baixa quando comparada aos níveis usados em outros países produtores de cana, chegando a representar apenas 1/3 do N aplicado. Apesar disso, ainda existem incertezas na recomendação de adubação nitrogenada devido à falta de métodos para o diagnóstico da disponibilidade de N com base em análises de solo no Brasil (RAIJ et al., 1996), o que pode levar a estimativas errôneas de recomendação de N.

O uso excessivo e indiscriminado de fertilizantes nitrogenados pode trazer inúmeros prejuízos ao meio ambiente, contaminando águas subterrâneas ou mesmo gerando gases de efeito estufa, como o óxido nítrico (N_2O) em condições redutoras.

O nitrogênio é um nutriente absorvido em grandes quantidades pela cana-de-açúcar. A maior parte do N absorvido pela planta é proveniente do solo, devido ao seu ciclo longo e sistema radicular abundante. As doses de fertilizante nitrogenado aplicadas nas áreas de cana-de-açúcar no Brasil são, em média, de 40 kg ha^{-1} de N na cana-planta e 80 kg ha^{-1} de N nas soqueiras (NUNES JUNIOR et al., 2005), porém, estudos apontam um baixo aproveitamento do N aplicado via fertilizante (BALASUBRAMANIAN et al., 2004), chegando ao máximo de 40% de aproveitamento na cana-planta e 70% na soqueira (FRANCO et al., 2011). Dessa maneira, é possível que a cana obtenha grande parte do N necessário para seu desenvolvimento de outras fontes que não sejam os fertilizantes sintéticos.

Uma alternativa sustentável e pouco explorada ao uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos é a utilização de biofertilizantes contendo culturas puras ou misturadas de bactérias diazotróficas. Entretanto, diferentemente da utilização bem sucedida de bactérias do gênero *Rhizobium* no processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) em associação com espécies da família das *Fabaceas*, a inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas ou de vida livre em gramíneas ainda não atingiu o mesmo nível de eficiência no fornecimento de N. Uma das limitações do uso de diazotróficos endofíticos como inoculantes, além da baixa eficiência de algumas bactérias, é a necessidade de uma grande especificidade na interação bactéria/planta, impedindo a ativação de mecanismos de defesa vegetal e permitindo a colonização dos tecidos vegetais internos. Assim sendo, é possível que micro-organismos diazotróficos epifíticos possam apresentar maior vantagem adaptativa devido à menor especificidade em sua relação com a planta, de forma que o processo de FBN seja mais eficiente, principalmente em gramíneas como a cana-de-açúcar, que não apresentam simbiose com as bactérias fixadoras de N como no caso das leguminosas. Além disso, a otimização das formas de aplicação de inoculantes e maximização da sobrevivência dos inóculos ainda são objetos de estudos.

Dessa maneira, a busca por micro-organismos mais eficientes e a possibilidade de prospecção de isolados microbianos levou ao interesse da exploração do isolamento e reinoculação de micro-organismos alvos em ensaios experimentais de

seleção de estirpes (OLIVARES, 2009). Em ecossistemas naturais, como por exemplo, a Mata Atlântica, a exuberância da floresta é mantida principalmente pelo processo de fixação biológica de N realizado pelos micro-organismos diazotróficos de vida livre ou simbióticos, que também são responsáveis por grande parte da ciclagem dos nutrientes no solo. Segundo dados reportados por Gomez (2012), foram observados baixos valores de $\delta^{15}\text{N}$ ($<2,0\%$) em folhas de *Merostachys neesii* da Mata Atlântica, o que sugere o que grande parte do aporte do N nas folhas dessa espécie vegetal é via FBN.

O Brasil é um dos países com a maior diversidade de espécies de plantas e animais do planeta e possui uma das mais importantes florestas tropicais do mundo, sendo natural que essa riqueza seja explorada para a obtenção de bioprodutos e processos microbianos que possam ser usados para aumentar a sustentabilidade dos sistemas agrícolas atuais e garantir o aumento da produção e produtividade no futuro.

Este trabalho teve como objetivo a busca por novas bactérias diazotróficas da filosfera de Bambu (*Merostachys neesii*), para que possam ser usadas como biofertilizante na agricultura brasileira.

1.1 Hipótese

Bactérias diazotróficas isoladas da filosfera de gramíneas em florestas naturais possuem elevado potencial de fixação biológica de nitrogênio e podem interagir com a cana-de-açúcar, promovendo seu crescimento.

1.2 Objetivos

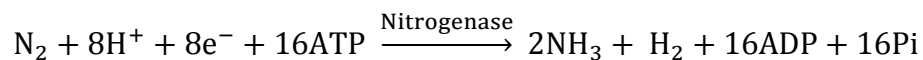
- Isolar, caracterizar e identificar bactérias diazotróficas que colonizam folhas e liteira de bambu (*Merostachys neesii*) com elevado potencial para fixar nitrogênio, por meio de plaqueamento em meios de cultura específicos isento de N;
- Avaliar o potencial das bactérias isoladas na produção de AIA, sideróforos, quitinase, ACC desaminase e solubilização de fosfato, por meio de análises bioquímicas *in vitro*;

- Avaliar a eficiência agronômica de biofertilizantes produzidos com as bactérias diazotróficas epifíticas isoladas e diferentes modos de aplicação, em comparação com fertilizantes nitrogenados solúveis, e avaliar a dinâmica da população bacteriana inoculada ao longo do tempo.

1.3 Revisão Bibliográfica

1.3.1 Fixação Biológica de Nitrogênio

A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é um dos processos naturais mais importantes do planeta, assim como a fotossíntese. A maior parte do nitrogênio fixado no ambiente terrestre é originada da FBN. Esse processo é intermediado por micro-organismos que reduzem o nitrogênio atmosférico (N₂) a amônia (NH₃), por meio do complexo enzimático nitrogenase, segundo a reação:



As bactérias que realizam esse processo são chamadas de diazotróficas, e são as principais fontes naturais de N dos solos agrícolas. Os micro-organismos diazotróficos são capazes de crescer em ambientes isento de nitrogênio combinado (DIXON; KAHN, 2004), utilizando como fonte de nitrogênio a forma gasosa (N₂), a qual é reduzida a amônia e assimilada na forma de aminoácidos pelas plantas.

Algumas bactérias diazotróficas podem formar simbiose com as plantas hospedeiras, resultando na formação de nódulos nas raízes, ou podem sobreviver livremente no solo e colonizar a rizosfera, ou o interior e superfície das plantas (EVANS; BURRIS, 1992). Dentre os micro-organismos diazotróficos, os de vida livre são os mais abundantes e foram os primeiros a serem reconhecidos. No Brasil, trabalhos pioneiros realizados pela Dra. Johanna Döbereiner, resultaram no isolamento das espécies *Beijerinckia fluminensis* e *Beijerinckia indica* da rizosfera de cana-de-açúcar cultivadas em solos tropicais (DÖBEREINER; RUSCHEL, 1958; BURRIS, 1975).

O processo químico de redução do nitrogênio atmosférico requer elevado gasto de energia, além de utilizar altas pressões e temperaturas para o rompimento da ligação tripla covalente entre os dois átomos de N. Industrialmente, a redução do nitrogênio à amônia consome energia derivada de fontes não renováveis, como o

petróleo (SPRENT; SPRENT, 1990), processo este conhecido como Haber-Bosch (MARIN et al., 2010). Nos diazotróficos, a capacidade de fixar nitrogênio, seja em associação ou não com as plantas, está ligada à presença e atividade do complexo enzimático conhecido como nitrogenase, que tem como centro funcional a combinação das proteínas codificadas pelos genes *nifDKH*. O complexo nitrogenase é capaz de promover a mesma reação de rompimento da tripla ligação dos átomos de N à temperatura ambiente e pressão normal, utilizando energia proveniente de processos foto ou quimiossintéticos ou obtida a partir do metabolismo de carboidratos (fermentação ou respiração) na forma de ATP (ZEHR et al., 2003).

A regulação da nitrogenase e sua estrutura são determinadas por um conjunto de genes, chamados de genes *nif* (“*nitrogen fixation*”) identificados primeiramente em *Klebsiella pneumoniae* (STREICHER et al., 1972; DIXON; POSTGATE, 1972; CANNON et al., 1976).

O complexo nitrogenase é composto de duas proteínas: uma Fe-proteína e uma MoFe-proteína. A primeira é codificada pelo gene *nifH*, e a subunidade α e β da MoFe-proteína são codificadas pelos genes *nifDK* (TEIXEIRA, 1997). As Fe-proteínas são dímeros de subunidades idênticas com peso molecular variando entre 57 a 72 kDa, sendo que todas contém um agrupamento 4Fe-4S (responsáveis pelo caráter redutor da Fe-proteína), por dímero. As duas subunidades da Fe-proteína são relacionadas entre si por um eixo de simetria bilateral que atravessa o agrupamento 4Fe-4S. Já a MoFe-proteína é um tetrâmero com peso molecular médio de 220 kDa. Além das proteínas estruturais, o complexo da nitrogenase requer a presença de centros metálicos, os agrupamentos 4Fe-4S, os agrupamentos P e o cofator de Fe e Mo (FeMoCo) que participam da transferência de elétrons e da arquitetura do sítio ativo da MoFe-proteína, respectivamente.

Durante a redução do N_2 , uma terceira molécula transportadora de elétrons é utilizada, a ferridoxina. Ela transfere um elétron para a unidade Fe-proteína da nitrogenase, que será reduzida e doa o elétron recebido para a MoFe-proteína. Após acumular oito elétrons, ela então fará a redução do N atmosférico à amônia. A amônia (NH_3^+) em contato com o substrato aquoso do citoplasma das bactérias é convertida rapidamente a amônio (NH_4^+). O amônio por sua vez inibe a fixação do N, tendo que ser transportado para fora da célula bacteriana. Como o amônio também é prejudicial para as células vegetais, ele é rapidamente assimilado sob a forma de

glutamina, por meio da enzima glutamina sintetase, a qual será utilizada pelas plantas para síntese de aminoácidos (CARDOSO et al., 1992).

A enzima nitrogenase é extremamente versátil, pois, além de reduzir o N_2 a amônia, também é capaz de reduzir outros substratos, como o acetileno (C_2H_2) para etileno (C_2H_4). A atividade de redução do acetileno (ARA) é uma técnica de grande importância nos estudos dos micro-organismos diazotróficos. A técnica utiliza cromatografia gasosa para medir o etileno, por ser bastante sensível, rápida, de baixo custo e de fácil condução. Ela tem sido utilizada em estudos qualitativos para detectar a presença da enzima e, conseqüentemente, identificar micro-organismos diazotróficos no ambiente (DILWORTH, 1966; HARDY et al., 1968; BURRIS, 1972; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Ueda e colaboradores (1995) destacam que o gene *nifH* é um dos genes mais antigos e funcionais existentes na história da evolução genética de micro-organismos diazotróficos. Esse gene evoluiu de forma semelhante ao gene rRNA 16S, podendo ser usado também como marcador molecular (YOUNG, 1992). Analisando a diversidade de bactérias diazotróficas em diferentes localidades do Rio Grande do Sul com base nas sequências do gene *nifH*, Roesh e colaboradores (2007) detectaram grande diversidade de espécies não descritas, além de espécies já conhecidas, como *Bradyrhizobium* e *Sinorhizobium*. Bactérias pertencentes aos gêneros *Enterobacter* e *Serratia* foram isoladas do rizoplane de *Lupinus albus* e caracterizadas também quanto a presença do gene *nifH*, confirmando seu caráter diazotrófico.

Diversos fatores podem regular o potencial de fixação de nitrogênio dos micro-organismos diazotróficos e o mesmo pode ocorrer em três níveis: ao nível de transcrição, pós-tradução e compartimentalização. O mecanismo de regulação ao nível de transcrição é dependente do produto do gene *nifA*. O gene *nifA* codifica para uma proteína capaz de identificar regiões promotoras a 5' de outros genes *nif* permitindo então a ação da RNA polimerase acoplada a um fator sigma alternativo, o qual tem sido encontrado na literatura com diferentes nomenclaturas tal como σ^N , σ^{54} , RpoN ou NtrA (BUCHANAN-WOLLASTON et al., 1981; TAYLOR et al., 1996; TEIXEIRA, 1997b). A regulação da FBN em *Acetobacter diazotrophicus* foi verificada por meio de estudos de inibição da atividade dessa enzima em presença de diversas fontes de nitrogênio (STEPHAN et al., 1991).

Como exemplo da regulação pós-traducional, pode-se citar a sensibilidade da enzima nitrogenase a níveis de oxigênio e amônio. A enzima nitrogenase é altamente sensível a elevados níveis de oxigênio, fazendo com que os micro-organismos criem mecanismos de defesa contra o mesmo. Em leguminosas, por exemplo, além do córtex do nódulo ser uma barreira contra a entrada de oxigênio, as leghemoglobinas atuam sequestrando o oxigênio presente no meio, diminuindo ainda mais suas concentrações (DIXON, 2000). No caso das bactérias diazotróficas de vida livre, a presença de amônia é mais determinante na expressão da nitrogenase do que em bactérias simbióticas (HALBLEIB; LUDDEN, 2000). Dessa forma, a regulação da expressão dos genes *nif* em altas concentrações de oxigênio e amônia (inibitórias da atividade da nitrogenase) é essencial para a eficiência desse processo de fixação de N. Em espécies do gênero *Azospirillum* ou *Azotobacter* a adição de pequenas quantidades de nitrogênio gera uma redução drástica na atividade da nitrogenase, já em outros gêneros o mesmo não foi observado (RUDNICK et al., 1997).

1.3.2 Micro-organismos diazotróficos

O levantamento de bactérias diazotróficas tem mostrado a ocorrência de uma grande diversidade desses micro-organismos associados a diversas espécies vegetais, além do solo e dos sistemas aquáticos.

A FBN dentro dos nódulos de plantas vasculares é realizada por dois grupos de bactérias simbióticas, os rizóbios que pertencem à classe *Alphaproteobacteria* (ordem *Rhizobiales*, gêneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*) (YOUNG, 1996), ou as Franquias que se associam com uma ampla variedade de espécies de oito famílias de plantas (HUSS-DANELL, 1997; VESSEY et al., 2004). Esse grupo de bactérias é provavelmente responsável pela maior parte de fluxo de nitrogênio fixado biologicamente (KAHINDI et al., 1997).

Outro importante grupo de bactérias diazotróficas são as cianobactérias, que são micro-organismos fototróficos aeróbicos encontrados em associação com inúmeras espécies de plantas, fungos e algas (MEEKS; ELHAI, 2002). Já bactérias diazotróficas de vida livre podem colonizar tanto a rizosfera, filosfera ou mesmo o interior das plantas sem a formação de estrutura diferenciada, utilizando o N fixado

para o próprio consumo além de disponibilizar grande parte ao meio ambiente (ELMERICH; NEWTON, 2007; DÖBEREINER, 1992; BALDANI; BALDANI 2005).

Essa grande diversidade de bactérias diazotróficas garante não só a resiliência do processo que realizam em diferentes ecossistemas, como também a ocorrência deste processo nos mais diferentes habitats (MOREIRA, SIQUEIRA, 2006). Dessa forma, espécies diazotróficas já foram isoladas das mais diferentes plantas como gramíneas forrageiras (MAGALHÃES; DÖBEREINER, 1984; DÖBEREINER, 1992; BALDANI et al., 1997; FERNANDES et al., 2001; SALA et al., 2005), batata doce (REIS et al., 2000), palmeiras (PERIN et al., 2006), cana-de-açúcar (REIS et al., 2000), entre outras.

Historicamente, vários diazotróficos de vida livre têm sido amplamente utilizados como organismos modelos para estudos da interação planta-bactéria. *Clostridium pasteurianum*, *Azotobacter vinelandii* e *Azotobacter chroococcum* foram utilizados para o isolamento e caracterização do complexo enzimático nitrogenase (DÖBEREINER et al., 1995). As espécies *Klebsiella pneumoniae*, *A. vinelandii*, *A. chroococcum* e *Anabaena* até hoje são utilizadas como organismos modelo para os estudos de genética e bioquímica da FBN (HASELKORN et al., 1985).

Os primeiros diazotróficos de vida livre identificados, *Beijerinckia fluminensis* e *Beijerinckia indica*, foram isolados da superfície da cana-de-açúcar (DÖBEREINER, RUSCHEL, 1958). Já entre os diazotróficos associativos, destacam-se os *Azospirillum spp.* por sua ampla distribuição geográfica e capacidade de colonizar plantas em diversos habitats (BALDANI et al., 1997). As bactérias diazotróficas de vida livre (*Azotobacter chroococcum*, *Beijerinckia fluminensis*, *Azotobacter paspali*, *Derris spp.*, *Paenibacillus azotofixans*) colonizam todos os tipos de solo, rizosfera, filosfera, ambientes aquáticos e o trato intestinal de animais (KASS et al., 1971; DÖBEREINER; RUSCHEL, 1958; DÖBEREINER et al., 1972; ROSADO et al., 1998).

Um dos habitats de vários grupos de micro-organismos diazotróficos de vida livre que tem despertado interesse para muitas pesquisas é a superfície das plantas, ou filosfera. Alguns trabalhos relatam a existência de bactérias diazotróficas na filosfera, com elevada capacidade de fixar N atmosférico (DÖBEREINER, 1992; BALDANI et al., 1997; SALA et al., 2005; FÜRNKRANZ, et al., 2008). A filosfera mesmo sendo um ambiente extremo e com certa limitação nutricional pode abrigar

uma grande quantidade e diversidade de bactérias (LINDOW; BRANDL, 2003; LAMBAIS et al., 2006).

Os fatores que determinam a diversidade e densidade dos micro-organismos na filosfera, e os processos que os selecionam tem sido estudados nos últimos anos. Ao comparar a comunidade bacteriana de diferentes plantas da Mata Atlântica, por meio de técnicas moleculares, foi constatado que a filosfera de cada uma delas pode abrigar uma comunidade bacteriana única, variando entre 95 e 671 espécies de bactérias por comunidade (LAMBAIS et al., 2006). Levantamento da diversidade de bactérias na filosfera de *Euterpe edulis* e *Guapira opposita* na restinga da Mata Atlântica, por meio do sequenciamento em larga escala do gene rRNA 16S indicou a presença predominante de bactérias dos gêneros *Rhodophila*, *Beijerinckia*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas* e *Methylovirgula*, *Pseudomonas*, *Derxia* e *Burkholderia* (BERDUGO, 2012). Em floresta de Montana da Mata Atlântica uma grande diversidade de potenciais bacterias diazotróficas foi detectada na filosfera de *Merostachys neesii* (bambu) (GOMEZ, 2012), a qual mostrou alta atividade de fixação biológica de N₂. Lambais e colaboradores (2014) recentemente ampliaram ainda mais as estimativas da diversidade da comunidade microbiana associadas a espécies vegetais na Mata Atlântica. Usando a combinação das técnicas de PCR-DGGE e sequenciamento de clones de bibliotecas do gene rRNA 16S e considerando a presença de 20.000 espécies de plantas vasculares na Mata Atlântica (MYERS et al., 2000), os autores estimaram um número de espécies de bactérias associadas à filosfera, cascas e raízes variando entre 72 e 1.400 milhões de espécies microbianas.

Na tentativa de se estimar a diversidade de espécies bacterianas no solo da Mata Atlântica, Bruce e colaboradores (2010) mostraram que este ambiente pode abrigar entre 263 a 446 espécies bacterianas por grama de solo. Além disso, estudos apontam que o tipo de vegetação, composição química e propriedades físicas dos diferentes solos encontrados na Mata Atlântica influenciam na estrutura da comunidade microbiana (SANTOS et al., 2014). Dessa forma, é possível que exista uma grande quantidade de bactérias com potencial biotecnológico nesse ambiente, e muito provavelmente os mesmos estejam envolvidos nos ciclos biogeoquímicos de vários nutrientes, inclusive do N.

Apesar dessa grande diversidade de bactérias na filosfera, observada nos trabalhos citados, a maioria dos estudos caracteriza a comunidade microbiana por

meio de técnicas moleculares independente de cultivo. São escassos os levantamentos realizados sobre as comunidades microbianas diazotróficas na filosfera de espécies da Mata Atlântica caracterizadas por meio de técnicas de isolamento e cultivo em meio de cultura específico. Em um desses trabalhos, Andreote (2013) isolou da filosfera de *Guapira opposita*, *Euterpe edulis* e *M neesii* da Mata Atlântica grande quantidade de cianobactérias a qual foram também caracterizadas com relação à presença do gene *nifH*.

Como visto, são poucos os estudos focados no isolamento de bactérias diazotróficas da filosfera e, além disso, com a finalidade de desenvolver inoculantes com potencial para utilização na agricultura ainda não foram relatados.

1.3.3 Contribuição dos micro-organismos para os ecossistemas

Estima-se que a taxa de FBN por processos naturais nos ecossistemas terrestres seja de 128 Tg N ano⁻¹. Essa atividade é suficiente para suprir 15% das necessidades de nitrogênio de todos os tipos de biomas (GALLOWAY et al., 2004), conferindo uma enorme importância na manutenção da vida na terra. Furnkranz e colaboradores (2008), por meio do sequenciamento dos genes rRNA 16S e *nifH*, encontraram uma grande diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio, principalmente cianobactérias, colonizando a filosfera de plantas superiores em uma floresta tropical na Costa Rica. Neste estudo foi verificada que a contribuição da FBN no aporte de N nesse ecossistema varia em função das condições ambientais e da planta hospedeira avaliada.

A dinâmica do N em solos das florestas difere da dinâmica em solos agrícolas, e conseqüentemente, a contribuição da FBN nesses diferentes ecossistemas também será diferenciada. Florestas tropicais úmidas apresentam elevadas taxas de mineralização de matéria orgânica, devido à alta atividade de micro-organismos, a maioria deles aeróbios (SPACCINI et al., 2002). No entanto, a disponibilidade de N nos solos das florestas é controlada por fatores químicos, físicos e biológicos (CANTARELLA, 2007). Além disso, elevadas taxas de lixiviação de N também podem ser observadas em solos das florestas tropicais (MARTINELLI et al., 1999). Porém, em sistemas naturais em equilíbrio, como no caso das florestas tropicais, as modificações da dinâmica do N não são perceptíveis, devido ao equilíbrio dinâmico entre adições e perdas existentes.

Em florestas tropicais na Costa Rica, Freiberg (1998) observou as taxas de FBN na filosfera variando de 2 a 5 kg N ha⁻¹ ano⁻¹, com papel importante na ciclagem de N. Estudos envolvendo a entrada de N via FBN por micro-organismos de vida livre em florestas tropicais de Porto Rico sugerem que a taxa anual de fixação de N seria em torno de 3 e 12 kg de N ha⁻¹ em floresta em altitude baixa, e entre 1 e 8 kg de N ha⁻¹ em floresta de altitude elevada, indicando um importante papel dos diazotróficos de vida livre no aporte de N nestas florestas (CUSACK et al., 2009).

Em um recente estudo, Sullivan e colaboradores (2014) destacaram a grande dificuldade de se estimar a verdadeira contribuição da FBN em florestas tropicais, mesmo porque os resultados apresentados até então são baseados em dados empíricos. Sendo assim, os autores estimaram que as taxas globais de FBN em florestas são na verdade cinco vezes menores do que as taxas anteriormente publicadas, pois estariam em torno de 1,2 kg N h⁻¹ ano⁻¹ em florestas primárias e entre 6,2 e 14,4 kg N ha⁻¹ano⁻¹ em florestas secundárias. Anteriormente, Reed e colaboradores (2011) tinham estimado as taxas de FBN 10 vezes maiores, chegando a 11,7 kg N ha⁻¹ano⁻¹. Apesar da grande divergência sobre a real taxa de FBN em florestas, em ambos fica claro que os diazotróficos de vida livre apresentaram maiores taxas de FBN do que os simbióticos (SULLIVAN et al., 2014).

Na Mata Atlântica foi observado que seus solos e águas possuem uma quantidade de N extremamente baixa (JOLY; MARTINELLI, 2008). Até então não se tinha informação de como uma floresta tão pobre em N poderia apresentar tamanha exuberância e diversidade biológica. Por meio da técnica de redução de acetileno (ARA) Gomez (2012) observou que parte do nitrogênio da Mata Atlântica era derivada do processo de FBN, tanto no solo próximo as raízes (rizosfera), quanto em cascas, folhas e liteira de *Euterpe edulis* (Palmito juçara) *Guapira opposita* (Louro-branco) e *Merostachys neesii* (Bambu), a qual poderia contribuir com aproximadamente 30 kg N fixado ha⁻¹ ano⁻¹, principalmente nas folhas e liteira de *M. neesii*.

Em solos agrícolas, a contribuição da FBN por diazotróficos de vida livre não é tão significativa quanto a contribuição dos simbiotes. Entretanto, se for considerada a grande extensão de terras recobertas por gramíneas e cereais, esta se torna importante, em termos globais (MOREIRA et al., 2010). Tanto para a cultura da cana-de-açúcar como para milho, trigo, arroz, sorgo e plantas forrageiras, a

contribuição da FBN por micro-organismos de vida livre já foi relatada e as mesmas podem contribuir de forma significativa para o desenvolvimento das plantas.

Algumas bactérias diazotróficas encontradas na filosfera são conhecidas como bactérias promotoras de crescimento vegetal (*PGPB-plant growth promoting bactéria*) (KLOEPPER; SCHROTH; 1992), e podem favorecer o crescimento das plantas por meio de diversos mecanismos de ação além da FBN (MELO, 1995). Um dos mecanismos de ação direta das bactérias promotoras de crescimento de plantas é a capacidade de sintetizar fitohormônios e seus análogos, tais como auxinas, giberelinas e citocininas (MELO, 1998).

Além da produção de fitormônios, os micro-organismos também podem promover o crescimento vegetal através da solubilização de nutrientes pouco disponíveis para as plantas, como o fósforo (P), por exemplo. O P é um dos nutrientes mais limitantes ao crescimento das plantas terrestres, ficando atrás apenas do N. Apesar dos solos possuírem grandes reservas desse elemento, apenas uma pequena quantidade se encontra disponível às plantas. Bactérias solubilizadoras de fosfato facilitam a conversão das formas inorgânicas de P pouco solúveis e do P da matéria orgânica do solo tornando-as disponíveis para absorção radicular, por meio de mecanismos como a secreção de ácidos orgânicos e fosfatases. O uso de micro-organismos solubilizadores de fosfato tem sido sugerido como uma alternativa para substituir ou diminuir o uso de fertilizantes fosfatados solúveis, reduzindo as perdas de P pelo processo de fixação no solo e mantendo de forma mais eficiente, sua disponibilidade para o crescimento de plantas (VESSEY, 2003).

O etileno é uma molécula que regula o crescimento vegetal estando em baixas concentrações, porém sua produção pode ser aumentada em condições de estresse. A enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) encontrada em muitos micro-organismos promotores de crescimento pode promover uma proteção significativa das plantas contra níveis elevados de etileno (GLICK, 2012). Essa enzima pode decompor a molécula de ACC, que é precursora da síntese do etileno, modulando assim os níveis de etileno nas plantas. Pesquisas conduzidas por Shaharoon e colaboradores (2006) sugerem uma correlação positiva entre a produção de ACC pelas bactérias promotoras de crescimento e o alongamento das raízes, indicando a caracterização do ACC como importante mecanismo para seleção de bactérias para produção de biofertilizantes.

Outro mecanismo indireto de promoção do crescimento de plantas, realizados pelos micro-organismos, é a produção de compostos antimicrobianos. A produção de quitinases, considerada uma proteína relacionada à patogênese (PR), por bactérias, é um exemplo deste mecanismo. As quitinases possuem atividade antifúngica, devido fundamentalmente à sua ação sobre as paredes celulares de alguns fungos (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999; STINTZI et al., 1993).

1.3.4 Potencial do uso de diazotróficos na agricultura

Em associação com leguminosas, a FBN sempre despertou grande interesse dos pesquisadores devido a sua grande eficiência e importância para agricultura. Porém, com o passar dos anos, outras relações entre diazotróficos e espécies vegetais foram ganhando destaque no meio científico. Estudos sobre associação de bactérias diazotróficas com gramíneas e cereais se iniciaram na década de 1960. Nestas plantas, não ocorre a formação de nódulos, mas sim a colonização da superfície e/ou interior das raízes e folhas por bactérias do solo que fixam nitrogênio do ar e disponibilizam às plantas. A seleção de bactérias de vida livre ou endofíticas para elaboração de inoculantes ainda não apresentou resultados tão satisfatórios quanto à seleção de micro-organismos que realizam simbiose em leguminosas.

Os estudos sobre quantificação da FBN associada à cana-de-açúcar, milho e outras gramíneas começaram no início dos anos 70, aplicando-se técnicas de redução de acetileno (medida da atividade da enzima nitrogenase) em raízes de cana-de-açúcar (DÖBEREINER et al., 1972), uso de ^{15}N (RUSCHEL et al., 1975), diluição isotópica de ^{15}N (FREITAS et al., 1984; URQUIAGA et al., 1992), balanço de N total (BODDEY; URQUIAGA, 1992) e abundância natural de ^{15}N (YONEYAMA et al., 1997; RESENDE, 2000; BODDEY et al., 2001).

Um dos pioneiros e relevantes trabalhos sobre a contribuição da FBN para gramíneas foi realizado por Urquiaga e colaboradores (1992) em que os autores descobriram por meio de técnicas isotópicas de ^{15}N que algumas variedades de cana-de-açúcar poderiam obter cerca de 60% do N necessário para seu desenvolvimento por meio da associação com bactérias endofíticas.

A FBN em cana-de-açúcar sempre despertou grande interesse entre os pesquisadores, sobretudo depois da descoberta de inúmeras bactérias diazotróficas (*Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *A. halopraeferans*, *A. irakense*, *Herbaspirillum*

seropedicae, *H. rubrosubalbicans* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*) (BODDEY et al., 1995; CAVALCANTE; DÖBEREINER, 1988; DÖBEREINER; PEDROSA, 1987; GILLIS et al., 1989; REINHOLD et al., 1987; OLIVARES et al., 1996) colonizando tanto o interior das plantas quanto a filosfera e rizosfera da cana-de-açúcar.

Utilizando a técnica de diluição isotópica de ^{15}N , Boddey e colaboradores (2001) verificaram que de 25 a 60% do N assimilado pela planta de cana era proveniente da FBN. Por meio da mesma técnica, Polidoro e colaboradores (2002) mostraram uma contribuição da FBN no total de N assimilado pela cana-de-açúcar variando entre zero a 70%.

A inoculação pode ser realizada com uma bactéria ou consórcios bacteriano. Oliveira e colaboradores em 2002 demonstraram a inoculação de consórcios bacterianos, porém, os autores mostraram não haver aumento maior que 30% na concentração de N, sugerindo que novos estudos deveriam ser realizados para que se pudesse melhor explorar o potencial das bactérias diazotróficas para culturas agrícolas (OLIVEIRA et al., 2002). Uma das possíveis causas dessa baixa eficiência foi reportada em estudos utilizando a técnica de hibridização fluorescente *in vitro* (FISH), em que foi observada a ocorrência de grupos específicos de bactérias diazotróficas colonizando a cana-de-açúcar, ocorrendo dessa forma uma competição entre as bactérias nativas e as inoculadas, levando a uma menor eficiência do processo de FBN (OLIVEIRA et al., 2009).

Possivelmente, a principal causa da baixa eficiência da FBN por micro-organismos endofíticos em gramíneas esteja relacionada com a baixa persistência de determinados grupos de micro-organismos no interior da planta. Lambais (2001) relatou que a presença das bactérias diazotróficas endofíticas *Gluconacetobacter diazotrophicus* ou *Herbaspirillum rubrisubalbicans* em cana-de-açúcar induziu a expressão de genes relacionados ao sistema de defesa vegetal. Essa indução pode ser observada por meio da super-expressão de genes que codificam proteínas relacionadas à defesa como quitinases, β -1,3-glucanases, fenilalanina amônia liases (PAL), chalcona sintases, chalcona isomerases, isoflavona redutases, glicoproteínas, peroxidases, catalases, superóxido dismutases, fatores de transcrição similares a WRKY e proteínas envolvidas no controle da morte celular programada.

Mesmo com os inúmeros avanços nos estudos genéticos, pouco ou nenhum sucesso foi obtido na indução de uma interação mais específica entre bactérias

diazotróficas com gramíneas (SAIKIA; JAIN, 2007). Sabe-se que, dependendo da interação planta-micro-organismo, os micro-organismos podem ser reconhecidos como intrusos não-benéficos nos tecidos vegetais (*host non-self recognition*) e serem eliminados pelo sistema de defesa vegetal (KOGEL, 2006). Por outro lado, alguns micro-organismos podem ter outros tipos de interação com as plantas e usarem mecanismos diversos para neutralizar o sistema de defesa vegetal. Desse modo, é possível que micro-organismos diazotróficos epifíticos possam apresentar maior vantagem adaptativa em relação aos endofíticos, e interagir mutualisticamente com a planta, de forma que o processo de FBN seja mais eficiente. Da mesma maneira, alguns micro-organismos epifíticos podem ter maior capacidade de sobrevivência e propagação, em relação aos endofíticos, já que se estabelecem na superfície das plantas e podem não ser reconhecidos de imediato pelo sistema de defesa vegetal (JAMES et al., 2002).

Como visto, os resultados de pesquisas focadas na inoculação de diazotróficos em gramíneas são muito controversos, principalmente com relação às condições de campo. Assim, o aumento da eficiência da FBN em gramíneas é um desafio, e a interação planta-bactéria deve ser mais bem explorada (OLIVEIRA et al., 2003).

As pesquisas envolvendo a inoculação de bactérias diazotróficas de vida livre ou endofíticas não estão direcionadas apenas em cana-de-açúcar, mas também em outras gramíneas importantes para a agricultura e pecuária. Boddey e colaboradores (1993), avaliando a contribuição da FBN para *Paspalum notatum* cv. Batatais (grama-batatais) verificaram que a planta obteve aproximadamente 10% de seu N através da FBN. Em diferentes genótipos de *Pennisetum purpureum*, (capim-elefante) Morais e colaboradores (2011), usando técnicas isotópicas, relataram que 18 a 70% do N acumulado seria derivado da FBN. Em milho, trabalhos também foram desenvolvidos para verificar a existência de bactérias fixadoras de N. Os resultados mostram a existência de uma grande diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas com alto potencial em fixar N₂ e essa comunidade é fortemente influenciada pelas condições edafoclimáticas como temperatura e precipitação (ROESCH et al., 2007).

Em sorgo (*Sorghum bicolor*), a inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Azotobacter chroococcum* aumentaram a produção de grãos em 6,2% em relação a plantas que não receberam a inoculação (TILAK et al., 1981). Por meio da técnica de isótopos marcados com ¹⁵N, Stein e colaboradores (1997) mensuraram que o

acúmulo de N na parte aérea e raiz de sorgo devido a inoculação de *Azoarcus sp.* foi de 10,7% e 2% respectivamente, atribuídos somente a FBN.

A inoculação de *Azospirillum* também foi testada em plantas de trigo, sendo que foi observado um aumento significativo de raízes devido possivelmente a produção de fitormônios, principalmente auxinas, produzidos pelas bactérias. Dessa forma, mesmo não observando um incremento em rendimento de grãos, foi verificado um melhor aproveitamento do fertilizante, principalmente nas fases iniciais da cultura, devido ao maior desenvolvimento radicular (DIDONET et al., 2000).

Está claro que existe uma nítida contribuição da FBN para inúmeras culturas de interesse agrícola. Porém, mesmo com o grande esforço empregado neste tipo de pesquisa, algumas variedades de cana-de-açúcar não respondem de maneira produtiva a inoculação com bactérias diazotróficas e necessitam de doses altas de adubação com fertilizantes nitrogenados solúveis, aumentando assim o custo de produção da cultura. Normalmente, a eficiência dos inoculantes de bactérias diazotróficas endofíticas é dada principalmente pela promoção de crescimento vegetal e produção de fitormônios, do que propriamente pelo fornecimento de N atmosférico. Essa eficiência depende ainda de diversos fatores como genótipo da planta e variação do ambiente (CANUTO et al., 2003) que precisam ser estudados profundamente.

1.3.5 Inoculantes microbianos para uso na agrícola

A biodiversidade brasileira é uma fonte inesgotável de biomoléculas que podem ser utilizadas biotecnologicamente. Segundo o Relatório Nacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica (BRASIL, 1998), o Brasil é o país de maior diversidade biológica do planeta, entre outros 17 países que reúnem 70% das espécies de animais e vegetais até então catalogadas no mundo. Porém, apenas uma pequena parcela das espécies nativas brasileiras foi estudada até o momento.

A exploração dos recursos genéticos, conhecida como bioprospecção, é uma estratégia para a obtenção de produtos que podem ser utilizados na produção de fármacos, cosméticos, alimentos e principalmente na agricultura. Um dos principais exemplos da aplicação dos recursos naturais na agricultura no Brasil foi a produção de inoculante para soja que, segundo a Embrapa, proporciona uma economia de

mais de três bilhões de dólares anuais em fertilizantes nitrogenados (HUNGRIA, 2011).

A exploração da FBN pode ser uma fonte não poluente de aplicação de N, contribuindo para o aumento da produção agrícola e redução do uso de fertilizantes sintéticos. A produção de inoculante no Brasil iniciou-se na década de 1950 (FREIRE et al., 1968), utilizando-se a turfa como veículo para as bactérias, e este ainda é o mais utilizado pela indústria até os dias atuais, apesar de seu custo relativamente alto e oferta limitada. Considerando os benefícios econômicos que as bactérias diazotróficas podem trazer aos sistemas agrícolas, o uso de inoculantes é uma alternativa ao uso de fertilizantes nitrogenados em sistemas de produção sustentável (BUCHER et al., 2008).

Um produto de fácil elaboração, contendo bactérias benéficas que podem ainda reduzir os custos de produção, tem sido proposto há muitos anos, mas ainda não foi obtido (BASHAN, 1998; PANDEY; MAHESHWARI, 2007; DAZA et al., 2000).

O manejo de bactérias diazotróficas simbióticas para leguminosas é um processo bem sucedido e aplicado em todo país. A inoculação da cultura da soja com bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* pode suprir totalmente a necessidade de N para o desenvolvimento da cultura. Já em gramíneas, esse processo não está muito bem esclarecido. A interação dos micro-organismos associativos com as plantas não tem a mesma fisiologia das simbioses entre rizóbios e leguminosas, o que pode acarretar em menor eficiência dos processos que realizam.

Algumas empresas de pesquisa têm conduzido diversos trabalhos com a finalidade de desenvolver inoculantes para gramíneas com capacidade para estimular o aumento de produtividade e/ou de matéria seca e acúmulo de N pela planta. Contudo, a grande dificuldade encontrada neste tipo de pesquisa tem sido a baixa eficiência das bactérias, principalmente endofíticas, no fornecimento de N em condições de campo, possivelmente pelo fato das interações não serem totalmente compatíveis. Além disso, foi demonstrada também a baixa persistência dessas bactérias, as quais contribuem com a FBN apenas nas fases iniciais do desenvolvimento da planta (FRANCO et al., 2011).

Existem alguns produtos no mercado que prometem uma eficiência relativamente alta no fornecimento de N para gramíneas via fixação biológica. O produto com nome comercial de Zea-Nit™, contém uma mistura de *Azospirillum*

brasiliense e *A. lipoferum*. Segundo os fabricantes, com a aplicação desse produto, seria possível reduzir até 40% do nitrogênio necessário para a cultura do milho (OKON et al., 1994). No Brasil foi lançado em 2011 o primeiro inoculante na forma líquida para trigo e milho, contendo a bactéria *Azospirillum*, chamado Azototal, fruto de uma parceria feita pela Embrapa e a empresa Total Biotecnologia. Segundo os pesquisadores, esse inoculante proporciona a redução de até 50% da adubação nitrogenada nas culturas, além de promover o crescimento das plantas e possibilitar um melhor desenvolvimento de raiz. Apesar disso, testes realizados indicam não haver resposta significativa à inoculação (VOGT et al., 2013). Levantamentos realizados nos últimos 20 anos constataram que em 30 a 40% dos casos não ocorreram incrementos de produtividade em função da inoculação com *Azospirillum brasiliense* (OKON; LABANDERA-GONZALES, 1994). No México, um inoculante denominado “Fertilizante para milho”, tem apresentado bons resultados, visto sua grande aplicação principalmente no ano de 1993 (PAREDES-CARDONA et al., 1988; CABALLERO-MELLADO et al., 1992). Na Argentina, um produto denominado Graminante contendo como veículo pó de carbonato de cálcio e carbonato de magnésio e uma mistura de estirpes de *Azospirillum* têm sido usados para a cultura do milho, com aplicação do produto feita a seco. Os fabricantes informam que o produto pode aumentar a produtividade do milho em cerca de 20 % (OKON et al., 1994), porém testes realizados indicam que a estirpe presente no inoculante, além de não especificada pelo fabricante, não são eficientes.

Além do N fixado pelas bactérias diazotróficas, esses micro-organismos também podem trazer outros benefícios para as plantas. De acordo com McInroy e Kloepper (1995), isolados bacterianos provenientes da comunidade endofítica e epifítica, podem ser potenciais agentes de controle biológico e de promoção de crescimento de plantas, além de acelerar a degradação da palhada da cana-de-açúcar. Esses e outros fatores são pontos positivos já citados na seleção de novos micro-organismos para prospecção e elaboração de um novo biofertilizante.

Os diferentes tipos de inoculantes encontrados no mercado visam aprimorar e facilitar a forma de aplicação dos mesmos, melhorando sua qualidade, com redução dos custos de produção e ao mesmo tempo garantindo a sobrevivência e eficiência dos micro-organismos. Dessa maneira, alternativas de veículos para aplicação de inoculantes têm sido buscadas (BEN REBAH et al., 2007; ALBAREDA et al., 2008).

Além da aplicação na forma líquida, várias pesquisas propuseram a imobilização de micro-organismos em matrizes poliméricas como o alginato para a aplicação de inoculantes. Em 1986, Bashan desenvolveu um polímero para encapsulamento de bactérias com liberação lenta das mesmas no solo. As bactérias encapsuladas eram do gênero *Azospirillum brasilense*. A partir dessa pesquisa, novas abordagens e conceitos foram gerados sobre a produção de inoculantes, principalmente com bactérias de vida livre.

Os polímeros de alginato e goma xantana são substâncias biodegradáveis, de baixo custo e promovem a imobilização das células liberando-as após a degradação do material no ambiente e protegendo-as contra estresses ambientais. Esses polímeros podem favorecer a multiplicação e sobrevivência das células, quando aplicados ao solo (DENARDIN; FREIRE, 2000; BASHAN et al., 2002). Pensando nisso, um inoculante composto pela mistura de estirpes de bactérias diazotróficas, carboximetilcelulose e amido foram testados verificando seu efeito sobre a produção de cana-de-açúcar. Os dados indicam que os tratamentos com os inoculantes com a mistura de bactérias diazotróficas e os polímeros promoveram aumento médio da produtividade das variedades RB72454 e RB867515 após 11 meses da inoculação, não diferindo estatisticamente do controle que recebeu adubação com nitrogênio mineral (SILVA et al., 2009), sugerindo ser uma técnica promissora.

Segundo Bashan e colaboradores (2014) os requisitos básicos para utilização de uma matriz polimérica na produção de inoculantes são: (1) o produto deve ser não tóxico e livre de conservantes que podem afetar as bactérias ou a planta inoculada, (2) a degradação do polímero deve ser gradual para a liberação lenta dos micro-organismos no solo, (3) o polímero deve fornecer proteção física para os micro-organismos contra estresses ambientais, (4) o polímero deve reter umidade suficiente para manter as células microbianas viáveis (5) o polímero deve ser de fácil dispersão em água, para permitir que os micro-organismos se movimentem do polímero até a planta.

A tecnologia de imobilização celular possui uma ampla gama de aplicações como na indústria farmacêutica, alimentícia, de cosméticos e na agricultura. Dessa forma, a utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal encapsuladas é uma alternativa viável à inoculação de células livres, que além de possibilitar uma menor competição com outros micro-organismos do solo (BASHAN, 1986; BASHAN

et al., 2002; YOUNG et al., 2006), ainda permite a sobrevivência das bactérias no solo por um período prolongado.

Os benefícios do encapsulamento já foram reportados em trabalhos com bactérias diazotróficas de vida livre (PEDRAZA, 2008), solubilizadores de fosfatos (RODRIGUEZ et al., 2006; ZAIDI et al., 2009), e produtores de hormônios de crescimento vegetal (DOBBELAERE et al., 2001; SPAEPEN et al., 2007). Apesar dos inúmeros benefícios e vantagens da utilização desta tecnologia, o maior fator limitante é a produção em escala industrial, sendo que até o momento não existe no mercado um produto com essas especificações e ainda que supram as necessidades da agricultura brasileira.

Dessa maneira, o mercado de biofertilizantes com bactérias diazotróficas para gramíneas e outras espécies não leguminosas é bastante promissor, mas, ainda carente de desenvolvimento tecnológico, principalmente aplicado a formulação do inoculante e veículo de inoculação.

Referências

ALBAREDA, M.; RODRIGUEZ-NAVARRO, D.N.; CAMACHO, M.; TEMPRANO, F.J. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: solid and liquid formulations. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 2771-2779, 2008.

ANDREOTE, A.P.D. **Filosfera da Mata Atlântica: isolamento e sistemática de cianobactérias, bioprospecção e caracterização da comunidade diazotrófica**. 2013. 153 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS. Disponível em: <<http://www.anda.org.br>>. Acesso em: 07 maio 2014.

BALASUBRAMANIAN, V.; ALVES, B.; AULAKH, M.; BEKUNDA, M.; CAI, Z.; DRINKWATER, L.; MUGENDI, D.; KESSEL, C. van; OENEMA O. Crop, environmental, and management factors affecting nitrogen use efficiency. In: MOSIER, A.R.; SYERS, J.K.; FRENEY, J. (Ed.). **Agriculture and the nitrogen cycle**. Washington: Scientific Committee on Problems of the Environment, 2004. p. 1933.

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**, Seropédica, v. 77, n. 3, p. 549–579, 2005.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 911-922, 1997.

BASHAN, Y. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow-release of bacteria that affect plant growth. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 51, p. 1089-1098, 1986.

_____. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 729-770, 1998.

BASHAN, Y.; HERNANDEZ, J.P.; LEYVA, L.A.; BACILIO, M. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 35, p. 359-368, 2002.

BASHAN, L.E.; ANTOUN, H.; BASHAN, Y. Involvement of indole-3-acetic-acid produced by the growth-promoting bacterium *Azospirillum spp.* in promoting growth of *Chlorella vulgaris*. **Journal of Phycology**, New York, v. 44, p. 938–947, 2008.

BASHAN, Y.; BASHAN, L.E.; PRABHU, S.E.; HERNANDEZ, J.P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant and Soil**, The Hague, v. 378, n. 1/2, p. 1–33, 2014.

BEN REBAH, F.; PRÉVOST, D.; YEZZA, A.; TYAGI, R.D. Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for *rhizobial* inoculant production: a review. **Bioresource Technology**, New York, v. 98, p. 3535-3546, 2007.

BERDUGO, S.B. **Fixação biológica de N₂ e diversidade de bactérias fixadoras de N₂ associadas às espécies *Euterpe edulis* e *Guapira opposita***. 2012. 95 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. Calculations and assumptions involved in the use of the A-value and ¹⁵N isotope dilution techniques for the estimation of the contribution of plant-associated biological N₂ fixation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 145, p. 151-155, 1992.

BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, The Hague, v. 252, p. 139-149, 2003.

BODDEY, R.M.; POLIDORO, J.C.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. Use of the ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to grasses and cereals. **Australian Journal of Plant Physiology**, Sidney, v. 28, p. 1-7, 2001.

BODDEY, R.M.; RESENDE, C.P.; SCHUNKE, R.M.; ALVES, B.J.R.; CADISH, G.; PEREIRA, J.M. Sustentabilidade de pastagens consorciadas e de gramíneas em monocultura: O papel chave das transformações de nitrogênio. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 30., 1993, Rio de Janeiro. **Palestras...** Rio de Janeiro: SBZ, 1993. p. 141-173.

- BODDEY, R.M.; OLIVEIRA, O.C. de; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; OLIVARES, F. L. de; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: contributions and prospecta for improvement, **Plant and Soil**, The Hague, v. 174, p. 195-209, 1995.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. **Primeiro Relatório Nacional para a Convenção sobre a Diversidade Biológica no Brasil**. Brasília, 1998.
- BRUCE, T.; MARTINEZ, I.B.; MAIA NETO, O.; VICENTE, A.C.P.; KRUGER, R.H.; THOMPSON, F.L. Bacterial community diversity in the brazilian atlantic forest soils. **Microbial Ecology**, New York, v. 60, p. 840-849, 2010.
- BUCHANAN-WOLLASTON, V.; CANNON, M.C.; BEYNON, J.; CANNON, F.C. Role of the nifA gene product in the regulation of nif expression in *klebsiella pneumoniae*. **Nature**, London, v. 294, p. 776-778, 1981.
- BUCHER, C.A.; REIS, V.M. **Biofertilizante contendo bactérias diazotróficas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 17 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 247).
- BURRIS, R. H. Nitrogen fixation assay - methods and techniques. **Methods in Enzymology**, New York, v.24B, p.415-431, 1972.
- BURRIS R.H. The acetylene reduction technique. In: Nitrogen fixation by free-living microorganisms. D.P.Stewart ed. International Biological Programme. v.6, p. 249-258. Cambridge Univ. Press., New York, 1975.
- CABALLERO-MELLADO, J.; CARCANO-MONTIEL, M.; MASCARUA-ESPARZA, M. A. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, p. 243-253, 1992.
- CANNON, F.C.; DIXON, R.A.; POSTGATE, J.R. Derivation and properties of F-prime factors carrying nitrogen fixation genes from *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 93, p. 111-125, 1976.
- CANUTO, E.L.; SALLES, J.F.; OLIVEIRA, A.L.M.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Resposta de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar a inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. **Agronomia**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 2, p. 67-72, 2003.
- CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V. V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. **Fertilidade do solo**. Viçosa: SBCS, 2007. p. 375-470.
- CAVALCANTE, V.A.; DOBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, The Hague v. 108, p. 23-31, 1988.
- CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em:
<<http://www.conab.gov.br/conabweb>. Acesso em: 03 jul. 2014.

CUSACK, D.F.; SILVER, W.; MCDOWELL, W.H. Biological nitrogen fixation in two tropical forests: ecosystemlevel patterns and effects of nitrogen fertilization. **Ecosystems**, New York, v. 12, p. 1299–1315, 2009.

DAZA, A.; SANTAMARIA C.; RODRIGUEZ-NAVARRO, D.N.; CAMACHO, M.; ORIVE, R.; TEMPRANO, F. Perlite as carrier for bacterial inoculants. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 32, p. 657-572, 2000.

DENARDIN, N.D.; FREIRE, J.R.J. Assessment of polymers for the formulation of legume inoculants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 16, p. 215-217, 2000.

DIDONET, A.D.; LIMA, O.S.; CANDATEN, A.A.; RODRIGUES, O. Realocação de nitrogênio e de biomassa para os grãos em trigo submetido a inoculação de *Azospirillum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 401–411, 2000.

DILWORTH, M.J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianunz*. **Biochimica Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 127, p. 285-294, 1966.

DIXON, R.A.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, p. 621-631, 2004.

DIXON, R.A.; POSTGATE, J.R. Genetic transfer of nitrogen fixation from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli*. **Nature**, London, v. 237, p. 102-103, 1972.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHES, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, P. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, Sidney, v. 28, p. 871–879, 2001.

DÖBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 13, p. 1-13, 1992.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. **Nitrogen-fixing bacteria in non-leguminous crop plants**. Madison: Science Tech, 1987. 155 p. (Brock/Springer Contemporary Bioscience Series).

DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A.P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**, Lisboa, v. 1, p. 261-272, 1958.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Itaguaí: EMBRAPA, CNPAB, 1995. 60 p.

DÖBEREINER, J.; DAY, J.M.; DART, P.J. Nitrogenase activity in the rhizosphere of sugar cane and some other tropical grasses. **Plant and Soil**, The Hague, v. 37, p. 191-196, 1972.

ELMERICH, C.; NEWTON, W.E. **Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations**. The Netherlands, 321, p. 1-16, 2007

EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J (Ed.). **Biological nitrogen fixation**, New York: Chapman and Hall, p. 1-42. 1992.

FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.M.; RODRIGUES, L.S. Bactérias diazotróficas associadas a coqueiros na região de baixada litorânea em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, p. 1509-1517, 2001.

FRANCO, H.C.J.; OTTO, R.; FARONI, C.E.; VITTI, A.C.; OLIVEIRA, E.C.A.; TRIVELIN, P.C.O. Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under Brazilian field conditions. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 121, p. 29-41, 2011.

FREIBERG, E. Microclimatic parameters influencing nitrogen fixation in the phyllosphere in a Costa Rican premontane rain forest. **Oecologia**, Berlin, v. 117, p. 9-18, 1998.

FREIRE, J.R.J. Trabalhos em rizobiologia no Rio Grande do Sul. In: REUNIÃO LATINO AMERICANA. INOCULANTES LEGUMINOSA, 4., 1968, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre, 1968. p. 19-24.

FREITAS, J.R.; VICTORIA, R.L.; RUSCHEL, A.P.; VOSE, P.B. Estimation of N₂-fixation by sugar cane, *Saccharum sp.* and soybean, *Glycine max*, grown in soil with ¹⁵N labelled organic matter. **Plant and Soil**, The Hague, v. 82, p. 257-261, 1984.

FURNKRANZ, M.; WANEK, W.; RICHTER, A.; ABELL, G.; RASCHE, F.; SESSITSCH, A. Nitrogen fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica. **The ISME Journal**, New York, v. 2, p. 561-570, 2008.

GALLOWAY, J.N.; DENTENER, F.J.; CAPONE, D.G.; BOYER, E.W.; HOWARTH, R.W.; SEITZINGER, S.P.; ASNER, G.P.; CLEVELAND, C.C.; GREEN, P.A.; HOLLAND, E.A.; KARL, D.M.; MICHAELS, A.F.; PORTER, J.H.; TOWNSEND, A.R.; VOROSMARTY, C.J. Nitrogen cycles: past, present, and future. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 70, p. 153–226, 2004.

GILLIS, M.; KERTERS, B.; HOSTE, D.J.; KROPPESTEDT, R.M.; STEPHAN, M. P.; TEIXEIRA, K.R. dos S.; DÖBEREINER, J.; De LEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov. nitrogen fixing acetic acid bacterium associated with sugar cane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v. 39, p. 361-364, 1989.

GLICK, B.R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 251, n. 1, p. 1–7, 2005.

_____. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, Cairo, v. 2012, p. 1-15, 2012.

GÓMEZ, S.P.M. **Diversidade de bactérias diazotróficas e fixação biológica de nitrogênio na Mata Atlântica**. 2012. 127 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

HARDY, R.W.F.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E.K.; BURNS, R.C. The acetylene/ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 43, p. 1185-207, 1968.

HALBLEIB, C.M.; LUDDEN, P.W. Regulation of biological nitrogen fixation. **Journal of Nutrition**, Pennsylvania, v. 130, p. 1081-1084, 2000.

HASELKORN, R.; GOLDEN, J.W.; LAMMERS, P.J.; MULLIGAN, M.E. Organization of the genes for nitrogen fixation in the cyanobacterium *Anabaena*. In: EVANS, H.J.; BOTTOMLEY, P.J.; NEWTON, W.E. **Nitrogen fixation research progress**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985. p. 485-490.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36p. – (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 1516-781X; n.325).

HUSS-DANELL, K. Actinorhizal symbioses and their N₂ fixation. **New Phytology**, Oxford, v. 136, p. 375-405, 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola, Sistema IBGE e recuperação automática – SIDRA**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 04 jun. 2014.

JAMES, E.K.; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N.; BARRAQUIO, W.L.; REDDY, P.M.; LANNETTA, P.P.M.; OLIVARES, F.L.; LADHA, L.K. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 15, p. 894-906, 2002.

JOLY, C.A.; MARTINELLI, L.A. A floresta inesperada. **Pesquisa FAPESP**, São Paulo, v. 154, p. 86-87, 2008.

KAHINDI, J.H.P.; WOOMER, P.; GEORGE, T.; de SOUZA MOREIRA, F.M.; KARANJA, N.K.; GILLER, K.E. Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen-fixing bacteria. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 6, p. 55-76, 1997.

KASS, D.L.; DROSDOFF, M.; ALEXANDER, M. Nitrogen fixation by *Azotobacter paspali* in association with *Bahiagrass Paspalum notatum*. **Soil Science Society of America Proceedings**, Madison, v. 35, p. 286-289, 1971.

KLOEPPER, J.W. SCHROTH. Proposed elimination of the term Endorhizosphere. **Phytopathology**, Lancaster, v. 82, p. 726-727, 1992.

KOGEL, K.; FRANKEN, P.; HUCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite - What decides? **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.9, p.358-363, 2006.

LAMBAIS, M.R. In silico differential display of defense-related expressed sequence tags from sugarcane tissues infected with diazotrophic endophytes. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.24, p. 103-111, 2001.

LAMBAIS, M.R.; CROWLEY, D.E.; CURY, D.E.; BULL, R.C.; RODRIGUES, R.R. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic forest. **Science**, Washington, p. 312-1917, 2006.

LAMBAIS, M.R.; LUCHETA, A.R.; CROWLEY, D.E. Bacterial Community Assemblages Associated with the Phyllosphere, Dermosphere, and Rhizosphere of Tree Species of the Atlantic Forest are Host Taxon Dependent. **Microbial Ecology**, New York, v. 3 , p. 567-574, 2014.

LINDOW, S.E.; BRANDL, M.T. MINIREVIEW, Microbiology of the Phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 4, p. 1875–1883, 2003.

MAGALHÃES, F.M.M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.15, p. 246-252, 1984.

MARIN, V.A.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.R. dos S. BALDANI, J.I. Fixação Biológica de Nitrogênio: Bactérias Fixadoras de Nitrogênio de Importância para a Agricultura Tropical, 2010. Disponível em <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/598661>. Acesso em: 9 jun. 2014.

MARTINELLI, L.A.; PICCOLO, M.C.; TOWNSEND, A.R.; VITOUSEK, P.M.; CUEVAS, E.; MCDOWELL, W.; ROBERTSON, G.P.; SANTOS, O.C.; TRESEDER, K. Nitrogen stable isotopic composition of leaves and soil: Tropical versus temperate forests. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 46, n. 1, p. 45-65, 1999.

MCINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, p. 41, 895–901, 1995.

MEEKS, J.C.; ELHAI, J. Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. **Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR**, Washington, v. 66, p. 94–121, 2002.

MELO, I.S.; VALARINI, P.J. Potencial de Rizobactérias no controle de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Em pepino (*Cucumis sativum* L.). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 52, p. 326-330, 1995.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPMA, p.205-227, 1998.

MORAIS, R. F.; QUESADA, D. M.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Contribution of biological nitrogen fixation to Elephant grass (*Pennisetum purpureum Schum.*). **Plant and soil**, Dordrecht, v.356, pp 23-34 2011.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2 ed. Lavras: UFLA, 2006. 729p.

MOREIRA, F.M.S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R.S.A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas : diversidade , ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, Teresina, v. 1, p.74-99, 2010.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v.403, p. 853-858,2000.

NUNES JR., D.; PINTO, R.S.A.; TRENTO, F.E.; ELIAS, A.I. **Indicadores agrícolas do setor canavieiro, safra 2003/2004**. Ribeirão Preto: Idea, 2005. 111p.

OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotroph *Herbaspirillum spp.* In: roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.21, p.197-200,1996.

OLIVARES, F.L. Biologia do Solo- história, tendências e perspectivas. **Boletim informativo Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas,v. 34, n. 1,, p. 33-34, 2009.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and soil**, The Hague, n. 1992, p. 205–215, 2002.

OLIVEIRA, A.L.M.; CANUTO, E.L.; REIS, V.M.; BALDANI, J.L. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.34, p.59-61, 2003

OLIVEIRA, A.L.M.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 45, p.106-113, 2009.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 26, p. 1591-1601, 1994.

PANDEY, P.; MAHESHWARI, D.K. Bioformulation of *Burkholderia* sp. MSSP with a multispecies consortium for growth promotion of *Cajanus cajan*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.53, p.213-222, 2007.

- PAREDES-CARDONA, E.; CARCANO-MONTIEL, M.; MASCARUA-ESPARZA, M.; CABALLERO-MELLADO, J. Respuesta del maíz a la inoculación con *Azospirillum brasilense*. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, México, v. 30, p. 351-355, 1988.
- PEDRAZA, R.O. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. **International journal of food microbiology**, Amsterdam, v.125, n.1, p. 25-35, jun. 2008.
- PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; CASTRO-GONZÁLEZ, R.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; CABELLOS-AVELAR, T.; GUEDES, H.V.; REIS, V.M.; CABALLERO-MELLADO J. Diazotrophic Burkholderia species associated with field-grown maize and sugarcane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.72, p. 3103–3110, 2006.
- POLIDORO, J.C. **O molibdênio na nutrição nitrogenada e na contribuição da fixação biológica do nitrogênio associada à cultura da cana-de-açúcar**. 2002. 185p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ,2002.
- RAIJ, B.V.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A; FURLANI, A.M.C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2.ed. Campinas: IAC, 1996. 285p. (IAC. Boletim Técnico, 100)
- REED, S.C.; CLEVELAND. C.C.; TOWNSEND, A.R. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, v.42, p.489–512, 2011.
- REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v.19, p.227-247, 2000.
- REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; De LEY, J. *Azospirillum halopraeferans* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L) Kunth.). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v. 37, p. 43-51, 1987.
- RESENDE, A.S. **A fixação biológica de nitrogênio (FBN) como suporte da produtividade e fertilidade nitrogenada dos solos na cultura de cana-de-açúcar: Uso de adubos verdes**. 2000. 145p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de concentração em Ciência do Solo) - Universidade federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2000.
- ROESCH, L.F.W.; PASSAGLIA, L.M.P.; BENTO, F.M.; TRIPLETT, E.W.; CAMARGO, F.A.O. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.31, p.1367-1380, 2007.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R.; GONZALEZ, T.; BASHAN, Y. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth promoting bacteria. **Plant and Soil**, The Hague, v. 287, p.15–21, 2006.

ROSADO, A.S. de AZEVEDO, F. S.; da CRUZ, D. W.; VAN, ELSAS J. D.; SELDIN, L. Phenotypic and genetic diversity of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from the rhizoplane or rhizosphere soil of different grasses. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.84, p.216–226, 1998.

RUSCHEL, A.P.; HENIS, Y.; SALATI, E. Nitrogen ^{15}N traing of N-fixation with soil-grown sugar cane seedlings. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 7, p. 181-182, 1975.

RUDNICK, P.; MELETZUS, D.; GREEN, A.; HE, L.; KENNEDY, C. Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 831-841, 1997.

SAIKIA, P.; JAIN, V. Biological nitrogen fixation with non-legumes: an achievable target or a dogma? **Current Science**, Bangalore, v. 92, n. 3, p.317-322, 2007.

SALA, V.M.R.; FREITAS, S.S.; DONZELI, P.; FREITAS J.G.; GALLO, P.B.; SILVEIRA, A.P.D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 29, p.345-352,2005.

SANTOS, E.C.; ARMAS, E.D.; CROWLEY, D.; LAMBAIS, M.R. Artificial neural network modeling of microbial community structures on the Atlantic Forest of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.69, p.101-109, 2014.

SHAHAROONA, B.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 42, p. 155-159, 2006.

SILVA, M.F.; OLIVEIRA, P.J.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G.; REIS, V.M. Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.11, p.1437-1443, 2009.

SPACCINI, R.; PICCOLO, A.; MBAGWU, J.S.C.; ZENA T.A.; IGWE, C.A. Influence of the addition of organic residues on carbohydrate content and structural stability of some highland soils in Ethiopia. **Soil Use Manage**, Stirling, v. 18, p. 404-411, 2002.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v.31, p.425–448, 2007.

SPRENT, J. I.; SPRENT, P. Nitrogen fixing organisms. London: Chapman and Hall, 2 ed., 1990, 256p.

STEIN, T.; HAYEN-SCHNEG, N.; FENDRIK, I. Contribution of BNF by *Azoarcus* sp. BH72 in *Sorghum vulgare*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, n.5/6, p.969-971, 1997.

STEPHAN, M.P.; OLIVEIRA, M.; TEIXEIRA, K.R.S.; MARTINEZ, D.G.; DÖBEREINER, J. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 77, p. 67–72, 1991.

STINTZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, Paris, v. 75, p. 687-706, 1993.

STREICHER, S.L.; GURNEY, E.G.; VALENTINE, R.C. The nitrogen fixation genes. **Nature**, London, v. 239, p. 495-499, 1972.

SULLIVAN, B.W.; SMITH, W.K.; TOWNSEND, A.R.; NASTO, M.K.; REED, S.C.; CHAZDON, R.L.; CLEVELAND, C.C. Spatially robust estimates of biological nitrogen (N) fixation imply substantial human alteration of the tropical N cycle. **Proceeding of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v.111, p. 8101–8110, 2014.

TAYLOR, M.; BUTLER, R.; CHAMBERS, S.; CASIMIRO, M.; BADII, F.; MERRICK, M. The RpoN-box motif of the RNA polymerase sigma factor σ_N plays a role in promoter recognition. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.22, p.1045-1054, 1996.

TEIXEIRA, K.R. **Bases moleculares e genética da fixação de nitrogênio**. Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1997. 26p. (EMBRAPA. CNPAB. Documentos, 32).

_____. ***Acetobacter diazotrophicus*, endófito diazotrófico associado à cana-de-açúcar: presença de plasmídeos e sequenciamento do gene nifA, responsável pela regulação da fixação biológica de nitrogênio**. 1997. 168p. Tese (Doutorado na área de Biologia Celular e Molecular) FIOCRUZ – Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Rio de Janeiro, 1997.

TILAK, K.V.B.R.; SINGH, C.S.; ROY, N.K.; SUBA RAO, N.S. *Azospirillum brasiliense* and *Azotobacter chroococcum* inoculum: effect on yield of maize (*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum bicolor*). **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.14, n.4, p.417-418, 1981.

UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUCHI, T. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of nifH gene sequences. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 3, p. 1414-1417, 1995.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.; BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.56, p. 105-114, 1992.

VAN LOON, L.C., VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and molecular plant pathology**, London, v.55, p. 85-97. 1999.

VESSEY, J.K. Plant growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, The Hague, v.255, p. 571–586, 2003.

VESSEY, J.K.; PAWLOWSKI, K.; BERGMAN, B. Root-based N₂-fixing symbioses: legumes, actinorhizal plants, Parasponia and cycads. **Plant and Soil**, The Hague v.266, p. 205–230, 2004.

YONEYAMA, T.; MURAOKA, T.; KIM, T.H.; DACANAY, E.V.; NAKANISHI, Y. The natural ¹⁵N abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the hilippines and Miyako (Japan). **Plant and Soil**, The Hague, v. 189, p. 239-244, 1997.

YOUNG, J.P.W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G., BURRIS, R., AND EVANS, H. (Ed.). **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman & Hall, 1992. p. 43–86.

_____. Phylogeny and taxonomy of rhizobia. **Plant and Soil**. The Hague, v.186, p.45-52, 1996.

YOUNG, C.C.; REKHA, P.; LAI, W.A.; ARUN, A.B. Encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate beads enriched with humic acid. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.95, p.76–83, 2006.

ZAIDI, A.; KHAN, M.S.; AHMAD, M.; OVES, M. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. **Acta microbiologica immunologica Hungarica**, Budapest, v.56, p.263–284, 2009.

ZEHR, J.P.; JENKINS, B.D.; SHORT, S.M.; STEWARD, G.F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.5, p.539-554, 2003.

2 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DA MATA ATLÂNTICA

Resumo

A Mata Atlântica é uma das mais importantes florestas tropicais do mundo e um “hotspot” de biodiversidade. As comunidades microbianas presentes neste bioma desempenham papéis essenciais nos ciclos biogeoquímicos, principalmente do nitrogênio (N). O processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) é a principal forma de entrada de N nos ecossistemas e é intermediada por vários micro-organismos diazotróficos. Estudos recentes sugerem que na filosfera de algumas espécies de plantas da Mata Atlântica existe uma grande diversidade de bactérias com elevado potencial em fixar N atmosférico. Com a finalidade de avaliar o potencial biotecnológico desses micro-organismos, 120 genótipos bacterianos da superfície de folhas e liteira de *Merostachys neesii* (bambu), coletados no Parque Estadual da Serra do Mar, foram isolados em cultura pura. Desses isolados, 48 foram caracterizados como fixadores de N pelo teste de redução de acetileno (ARA), fixando entre 5 e 30 nmol C₂H₄ h⁻¹mg⁻¹ de proteína em meio de cultura livre de N, com produção de AIA na presença de L-triptofano. Dentre esses 48 isolados, 50% apresentaram capacidade de solubilizar fosfato de cálcio, 8% de produzir quitinases, 17% de produzir sideróforos e 16% de produzir ACC desaminase *in vitro*. A análise genotípica por BOX-PCR, baseada na análise discriminante dos perfis de bandas nos géis e NMDS, mostrou que os isolados se agrupam em três grandes grupos, porém, apresentaram baixa tendência de se agruparem com base no ambiente de origem. Todos os 48 isolados foram caracterizados filogeneticamente com base na sequência parcial do gene rRNA 16S. Cerca de 75% dos isolados da filosfera de bambu são pertencentes à classe *Gammaproteobacteria* (*Proteobacteria*), e foram representados em sua maioria pela família *Enterobacteriaceae*. Já *Klebsiella sp.*, e os gêneros *Serratia* e *Enterobacter* apresentaram uma similaridade de 32 e 2% dos isolados adquiridos, respectivamente. Aproximadamente 37% das sequências não foram identificados ao nível de gênero, podendo então representar novos gêneros ou espécies. Os dez isolados mais promissores, com base nos testes bioquímicos tiveram os genes rRNA 16S completamente sequenciados, confirmando assim sua afiliação à família *Enterobacteriaceae*. O sequenciamento do gene *nifH* confirmou o caráter diazotrófico dos mesmos. Os resultados observados sugerem que a filosfera de bambu possui uma comunidade bacteriana diazotrófica complexa e com elevado potencial biotecnológico. Sugere-se que as populações bacterianas detectadas na filosfera de bambu podem apresentar uma variada capacidade de fixação de N atmosférico, produção de AIA, solubilização de fosfato de cálcio e produção de sideróforos e quitinases *in vitro*, podendo futuramente ser utilizada como biofertilizante na agricultura.

Palavras-chave: Filosfera; Bactérias promotoras de crescimento de plantas; Fixação biológica de nitrogênio, rRNA 16S, *nifH*

Abstract

The Atlantic Forest is one of the most important tropical forests in the world and a "hotspot" of biodiversity. The microbial communities in this biome play essential roles in the biogeochemical cycles, mainly of the nitrogen (N). The process of biological nitrogen fixation (BNF) is the main N input in several ecosystems, and is mediated by several diazotrophic microorganisms. Recent studies suggest a great diversity of bacteria with a high potential for nitrogen fixation in the phyllosphere of several plant species of the Atlantic Forest. In order to evaluate the biotechnological potential of these microorganisms, 120 bacterial genotypes were isolated in pure cultures from the leaf surfaces and litter of *Merostachys neesii* (bamboo), sampled at the Serra do Mar State Park. From that, 48 isolates were characterized as N fixers by the acetylene reduction assay (ARA), fixing from 5 to 30 nmol C₂H₄ h⁻¹ mg⁻¹ protein in nitrogen-free medium, and produced indole-acetic-acid (IAA) in the presence of L-tryptophan. Among these 48 isolates, 50% were able to solubilize inorganic phosphate, 8% were able to produce chitinases, 17% were able to produce siderophores and 16% produced ACC desaminase. Genotypic analysis, using BOX-PCR, showed that the isolates clustered into three major groups. However, there was a low tendency of clustering according to the microenvironment from which they were isolated, based on discriminant and NMDS analyses. All isolates were phylogenetically characterized based on their partial rRNA 16S gene sequences. The sequencing of the rRNA 16S gene revealed that 75% of the isolates were phylogenetically related to the family *Enterobacteriaceae* (*Gammaproteobacteria*). The genus *Klebsiella* accounted for 32% of the isolates, whereas *Serratia* and *Enterobacter* accounted for 2% whereas 37% were assembled unclassified Bacteria. The ten most promising isolates, based on the biochemical tests, had their rRNA 16S gene fully sequenced, confirming their affiliation to *Enterobacteriaceae*. The sequencing of the *nifH* gene confirmed the diazotrophic attribute of these isolates. The results obtained suggest that the phyllosphere of bamboo has a complex community of diazotrophic bacteria with high biotechnological potential. Bacterial populations in the phyllosphere of bamboo also have variable capabilities to fix atmospheric N, produce IAA, solubilize calcium phosphate, and to produce siderophores and chitinases in vitro, and may potentially be used as biofertilizer in agriculture.

Keywords: Phyllosphere; Plant growth promoting bacteria; Biological nitrogen fixation; rRNA 16S, *nifH*

2.1 Introdução

A Mata Atlântica é considerada um “*hotspot*” de biodiversidade mundial, porém, pouco se sabe sobre as comunidades microbianas que habitam os solos ou que estão associadas às plantas e animais deste ambiente, uma vez que poucos estudos foram realizados e a maioria deles se concentra na avaliação de grupos específicos de fungos e bactérias.

Um dos primeiros trabalhos comparando as comunidades bacterianas de diferentes plantas da Mata Atlântica considerando família, gênero e espécie, por meio das técnicas de PCR, DGGE de amplicons do gene rRNA 16S e sequenciamento, constatou que a filosfera de cada uma delas pode abrigar uma comunidade bacteriana única, variando entre 95 e 671 espécies de bactérias (LAMBALIS et al., 2006). Recentemente, Lambais e colaboradores (2014) ampliaram ainda mais as estimativas de diversidade da comunidade microbiana associadas a espécies vegetais na Mata Atlântica. Por meio da combinação das técnicas de PCR-DGGE e sequenciamento de clones de bibliotecas do gene rRNA 16S. Considerando que a Mata Atlântica possui aproximadamente 20.000 espécies de plantas vasculares (MYERS et al., 2000), os autores estimaram a possibilidade de haver cerca de 72 a 1.400 milhões de espécies bacterianas associadas à filosfera, casca e raiz de diferentes espécies arbóreas que abrigam nesse ambiente.

Considerando a diversidade microbiana dos solos da Mata Atlântica, estudos vem comprovando que estes podem abrigar entre 263 a 466 espécies bacterianas (BRUCE et al., 2010). Além disso, pesquisas apontam que o tipo de vegetação, composição química e propriedades físicas dos diferentes solos encontrados na Mata Atlântica influenciam na estrutura da comunidade microbiana (SANTOS et al., 2014). Portanto, acredita-se que exista um grande número de bactérias com elevado potencial biotecnológico nesse ambiente, e muito provavelmente os mesmos estejam envolvidos nos ciclos biogeoquímicos de vários nutrientes, inclusive do N.

Considerando os diversos grupos de micro-organismos presentes na filosfera, as bactérias são numericamente mais abundantes (ANDREWS; HARRIS, 2000; LINDOW; BRANDL, 2003) e podem exercer influência tanto negativa quanto positiva sobre a planta hospedeira. São diversos os processos realizados pela comunidade microbiana que vivem tanto no solo quanto associados às plantas ou mesmo na filosfera, podendo desempenhar papéis essenciais para a sustentabilidade do

ecossistema. Um dos principais processos realizados pelos micro-organismos na natureza é a FBN, que é a principal forma de entrada de N nos ecossistemas naturais ou agrícolas (MARIN et al., 1999) e está diretamente relacionado com a manutenção da vida na Terra. Alguns trabalhos relatam a existência de bactérias diazotróficas com elevada capacidade de fixar N atmosférico na filosfera de diversas plantas, como por exemplo nas gramíneas (DÖBEREINER, 1992; BALDANI et al., 1997; SALA et al., 2005).

Em um estudo envolvendo a entrada de N via FBN por micro-organismos de vida livre em florestas tropicais de Porto Rico, Cusack e colaboradores (2009) estimaram utilizando técnicas de redução de acetileno que a taxa anual de fixação de N seria em torno de 3 e 12 kg de N ha⁻¹ em floresta em altitude baixa, e entre 1 e 8 kg de N ha⁻¹ em floresta de altitude elevada, indicando um importante papel dos diazotróficos no aporte de N nestas florestas.

As taxas de FBN dependem tanto da abundância e diversidade de bactérias diazotróficas como da sua distribuição espacial (REED et al., 2010). Neste sentido, trabalhos conduzidos pelo Programa Biota Fapesp, realizados no Parque Estadual da Serra do Mar (SP), mostraram que na superfície das folhas e liteira de Bambu (*Merostachys neesii*) existem uma elevada diversidade de espécies de bactérias diazotróficas as quais podem fixar aproximadamente 30 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N. Estudos realizados a partir do pirosequenciamento do gene rRNA 16S de amostras de folhas, casca e solo, foram obtidas 423.210 sequências que se agruparam em 35.216 unidades taxonômicas operacionais (UTOs), distribuídas em 32 filos, dentre os quais o mais abundante foi o filo *Proteobacteria* (36,6%). Dos possíveis diazotróficos observados, o filo *Proteobacteria* foi dominante nos três compartimentos avaliados, com predomínio da classe *Alphaproteobacteria*, principalmente nas folhas de *M. neesii*, a qual variou em função da época de amostragem e da taxa de FBN (GOMEZ, 2012).

A fim de investigar a comunidade de cianobactérias presente na filosfera de diferentes espécies da Mata Atlântica, Andreote (2013) identificou cianobactérias dos gêneros *Nostoc*, *Desmonostoc*, *Leptolyngbya*, *Oculatella*, *Brasilonema*, *Pleurocapsa* *Chroococcidiopsis*, também colonizando a filosfera de *M. neesii*, além de *Euterpe edulis*, *Guapira opposita* e *Garcinia gardneriana*. Destas, algumas foram caracterizadas como diazotróficas através dos métodos de amplificação, sequenciamento e filogenia do gene *nifH*.

Dessa forma, os trabalhos que abordam como tema a diversidade de micro-organismos na Mata Atlântica sugerem que a comunidade bacteriana é altamente diversificada neste bioma, e esta pode contribuir com grande parte do aporte de N para as plantas por meio da fixação biológica. Sabendo-se do grande potencial que as bactérias diazotróficas da Mata Atlântica possuem em fixar N₂ e a necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias que visem o manejo sustentável do processo de produção agrícola, a identificação e a caracterização bioquímica das bactérias diazotróficas presentes na superfície das folhas de bambu pode ser essencial para o desenvolvimento de novos biofertilizantes. Portanto, o objetivo deste trabalho foi isolar, caracterizar e identificar bactérias diazotróficas de filosfera de folhas e liteiras de bambu da Mata Atlântica, por meio de técnicas dependentes e independentes de cultivo e avaliar *in vitro* seu potencial para a fixar N₂, produzir AIA, sideróforos, quitinase e ACC desaminase.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e Métodos

2.2.1.1 Local de amostragem

Bactérias capazes de crescer em meio de cultura isento de N foram isoladas a partir de amostras de folha e liteira de bambu (*Merostachys neesii*) coletadas no Parque Estadual da Serra do Mar. A região é recoberta predominantemente por Floresta Ombrófila Densa Montana (VELOSO et al., 1991) à uma altitude de aproximadamente 1.010 e 1.044 metros e está localizada no Núcleo Santa Virgínia (Figura 2.1) no município de São Luís do Paraitinga, à 23°17' a 23°24'S e 45°03' à 45°11'W. O clima regional é tropical temperado (SETZER, 1966), com uma precipitação média anual superior à 2000 mm (PADGURSCHI et al., 2011; MARTINS, 2010). A área foi previamente selecionada com base no projeto de pesquisa Biota - Gradiente funcional (FAPESP 03/12595-7). O projeto abrange três diferentes fitofisionomias, onde estão instaladas 12 parcelas permanentes de 1 ha cada, quatro por altitude, e todas subdivididas em 100 sub-parcelas de 10 x 10 m.

A amostragem foi realizada em outubro de 2011 na parcela N do parque Estadual da Serra do Mar. Amostras de folhas foram coletadas com auxílio de uma

tesoura de poda alta, e a liteira coletada logo abaixo da touceira de *M. neesii*. Foram coletadas uma amostra de folha e uma de liteira de bambu dentro de cada sub-parcela totalizando 200 amostras. As amostras coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis e mantidas em caixas térmicas com gelo até serem processadas no Laboratório de Microbiologia Molecular da ESALQ-USP.

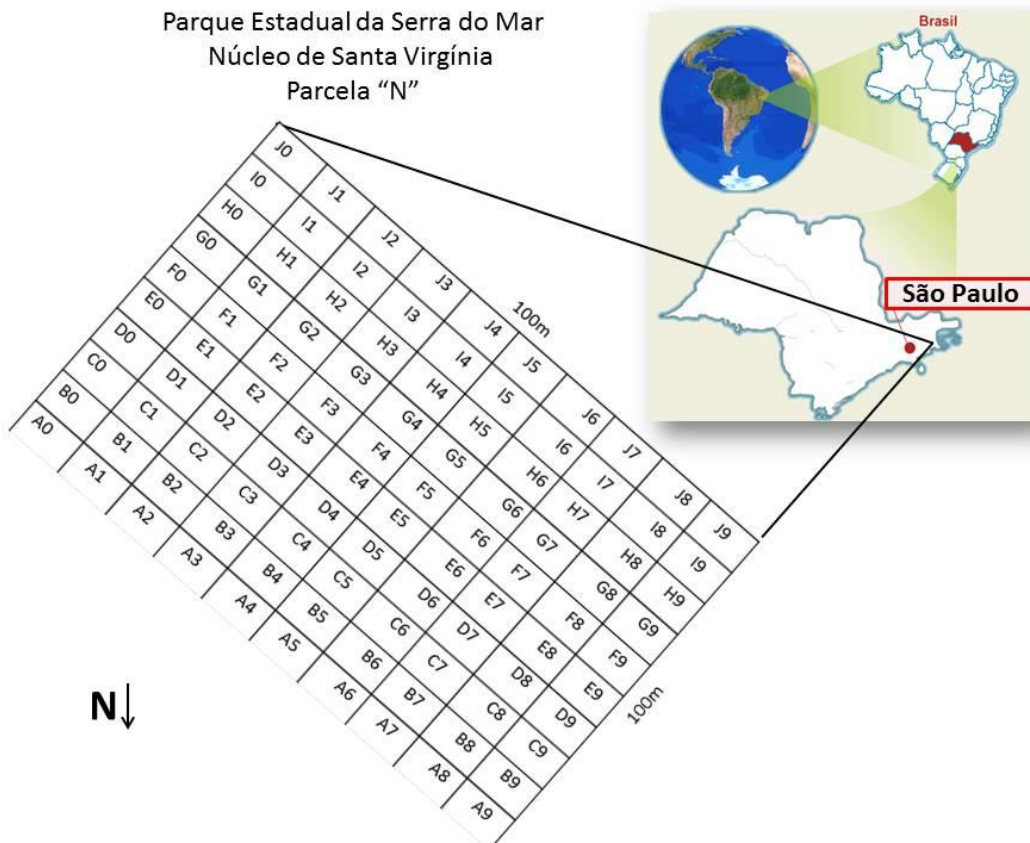


Figura 2.1 – Mapa do Brasil destacando o Estado de São Paulo com a localização do núcleo de Santa Virgínia e a parcela N amostrada no Parque Estadual da Serra do Mar

2.2.1.2 Análise química das folhas e liteira de bambu

Amostras de folha e liteira de bambu coletados da Mata Atlântica (Figura 2.2) foram analisadas com relação a composição química no laboratório de análise de tecido vegetal do Departamento de Ciência do Solo (ESALQ/USP). As amostras foram secas e moídas, e a extração dos nutrientes foi realizada por digestão ácida a quente. Foram determinadas as concentrações foliares dos macronutrientes N, P, K, S, Ca e Mg em g kg^{-1} e micronutrientes em mg kg^{-1} , segundo Sarruge e Haag (1974).



Figura 2.2 - Liteira e folhas de bambu amostradas da Mata Atlântica. **A.** Touceira de bambu e liteira. **B.** Detalhe das folhas de bambu coletadas. **C.** Amostras de folhas de bambu coletadas

2.2.1.3 Isolamento e purificação das bactérias

Aproximadamente 10 gramas de folhas e liteira de bambu coletadas de cada subparcela no Parque Estadual da Serra do Mar foram acondicionadas em béqueres autoclavados (500 mL) contendo 100 mL de tampão PBS (68 g.L⁻¹ de KH₂PO₄; 85 g.L⁻¹ de K₂HPO₄; pH 7,0) e mantidos sob agitação (100 rpm) à 28° C por 1 hora. Da suspensão resultante, foram realizadas diluições seriadas, adicionando-se 0,1mL das diluições 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ em frascos contendo 5mL de meio semissólido para bactérias diazotróficas de vida livre, descrito por Döbereiner e colaboradores (1995) sem a adição de N (ANEXO A). Os meios de cultura inoculados foram mantidos em câmara de crescimento à 28° C e observou-se o crescimento bacteriano por meio da formação de película característica durante o período de incubação de 7 dias. O isolamento das colônias típicas de fixadores de N₂ foi realizado por meio de repicagens sucessivas, alternando o crescimento no mesmo meio de origem sólido.

Posteriormente, os isolados foram cultivados em meio de cultura líquido por dois dias, homogeneizados e estocados em glicerol 20% à - 80° C.

2.2.1.4 Fixação biológica de nitrogênio “*in vitro*”

A capacidade do complexo nitrogenase em reduzir nitrogênio, pode ser medida indiretamente pela atividade de redução do acetileno (ARA) um inibidor competitivo da enzima nitrogenase redutase (SCHINNER et al., 1995). A técnica de redução de acetileno foi descrita por Hardy e colaboradores (1968) e o ARA pode ser expresso em termos de afinidade específica com base no teor de proteína total celular acumulada no meio de cultura.

Os isolados foram cultivados em meio Dyg's (ANEXO B, RODRIGUES NETO et al., 1986) por 24 horas sob agitação de 200 rpm à 30° C, com três repetições por isolado. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com solução salina para remover o N do meio. Após a lavagem, foi realizada a leitura da densidade óptica das culturas em espectrofotômetro ajustado com o comprimento de onda de 600 nm (DO 0,6). Este procedimento foi realizado para todos os testes que foram realizados posteriormente.

Foram inoculados 20 µL da suspensão em frascos contendo 5 mL de JNFb semissólido (ANEXO C, DÖBEREINER et al. 1995) sem biotina e sem azul de bromotimol. Os frascos foram incubados por 48 horas à 30° C. Após a formação da película na superfície do meio de cultura e aumento da opacidade do meio, os frascos foram vedados e foi injetado 1 mL de acetileno resultando em uma atmosfera de incubação de 20%. Os frascos foram incubados à 30° C por uma hora e em seguida, um volume de 1mL da atmosfera dos frascos foi retirado e injetado em cromatógrafo a gás Thermo Scientific, equipado com um detector de ionização por chama (250° C) e uma coluna N Poropak (120° C; Supelco, Bellefonte, Pensilvânia, E.U.A.). Controles negativos foram utilizados a partir da injeção no cromatógrafo de amostras gasosas não incubados com acetileno. A concentração de proteína total acumulada das culturas foi determinada após sonicação do meio de cultura com a bactéria por 1 minuto à 22,5 kHz em um disruptor de células ultra-sônico (MISONIX INC., Atlantic Beach, NY, USA), seguido de resfriamento em gelo. O procedimento

foi repetido três vezes. A concentração de proteína foi determinada por fluorimetria, utilizando-se um fluorímetro *Qubit™* (LIFE TECHNOLOGIES, Carlsbad, USA).

As taxas de redução de acetileno foram calculadas em nanomoles de acetileno reduzido por miligrama de proteína, por hora de incubação, representada pela seguinte equação:

$$\text{nmol etileno. } h^{-1} = \frac{(S - C) \cdot V \cdot P}{V_2 \cdot R \cdot T \cdot t}$$

Onde:

S= quantidade de etileno obtido na amostra após incubação com acetileno (ppm);

C= quantidade de etileno em frascos sem incubação com acetileno;

V= volume “headspace” nos frascos de incubação;

P= pressão de ar sob condições padrão (101300 Pa);

V₂= volume de gás injetado na amostra;

R= constante de gás (8.314 J. mol⁻¹. K⁻¹);

T= temperatura de incubação (°C);

t= tempo de incubação.

Todos os valores foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas utilizando-se o teste Tukey (p<0,05), por meio do programa SISVAR versão 5.1.

2.2.1.5 Solubilização de fosfato inorgânico

Os isolados bacterianos que apresentaram resposta positiva no teste de ARA foram avaliados quanto a capacidade de solubilização do P inorgânico na forma de fosfato de cálcio (P-Ca) segundo metodologia descrita por Hara; Oliveira, (2004). Ao meio de cultura (glicose, 10 g.L⁻¹; extrato de levedura, 2 g.L⁻¹; agar, 18 g.L⁻¹ e o pH foi ajustado para 7.2), esterilizado em autoclave, ainda fundente, foi adicionado assepticamente 50 mL de solução esterilizada de K₂HPO₄ (10%) e 100 mL de solução esterilizada de CaCl₂ (10%). A reação entre as soluções produziu um precipitado de CaHPO₄. O meio obtido foi distribuído em placas de Petri. Os isolados foram repicados para o meio de cultura contendo CaHPO₄ com o auxílio de uma alça de platina. Foram estabelecidas quatro colônias por placa e uma placa por isolado. As placas foram incubadas à 28° C durante 15 dias. A capacidade de solubilização de P pelos isolados foi verificada no terceiro e décimo quinto dias após a inoculação.

O diâmetro (\emptyset) dos halos de solubilização, visualizado como uma área translúcida ao redor da colônia, e o diâmetro das próprias colônias foram medidos utilizando-se um paquímetro digital. Os índices de solubilização (IS) de cada isolado foram determinados através da fórmula: $IS = \emptyset \text{ Halo (mm)} / \emptyset \text{ Colônia (mm)}$. Todos os valores foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas utilizando-se o teste Tukey ($p < 0,05$), por meio do programa SISVAR versão 5.1. Com base nos valores calculados do IS, os isolados foram classificados como baixa ($IS < 2$), média ($2 \leq IS < 4$) ou alta ($IS \geq 4$) capacidade de solubilização de P inorgânico (HARA; OLIVEIRA, 2004).

2.2.1.6 Produção de ácido indol-3-acético (AIA)

A metodologia utilizada para determinação da produção de ácido indol-3-acético (AIA) foi descrita por Ahmad e colaboradores (2008). O método para detecção de AIA produzido por bactérias baseia-se na alteração de coloração das amostras devido à oxidação dos compostos indólicos, variando de amarelo (não oxidado) a vermelho (oxidado). Somente os isolados bacterianos que apresentaram resposta positiva no teste de ARA foram cultivados em meio Dyg's e meio Dyg's suplementado com L-triptofano (1 g.L^{-1}). Os isolados foram incubados por 48 horas à 28°C , sob agitação (120 rpm), 1,5 mL da cultura dos isolados foram centrifugados à 4000 g e 4°C , durante 10 minutos. A 1 mL do sobrenadante misturou-se 1 mL do reagente Salkowski (FeCl_3 $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, 1 mL; HClO_4 35%, 49 mL) (SERGEEVA, LIAIMER, BERGMAN, 2002) e incubou-se por 30 minutos no escuro. A concentração de AIA foi determinada no espectrofotômetro à 540 nm, com base em uma curva padrão de AIA ($1-100 \text{ mg.mL}^{-1}$). O ensaio foi realizado em triplicata. Todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas utilizando-se o teste Scott-knott ($p < 0,05$), por meio do programa SISVAR versão 5.1.

2.2.1.7 Produção de ACC desaminase

A atividade da enzima ACC desaminase foi determinada também somente para os isolados bacterianos que apresentaram resposta positiva no teste de ARA. O teste foi realizado medindo a capacidade dos isolados em crescerem em meio de cultura contendo o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) como única fonte

de nitrogênio. Para tanto, utilizou-se o procedimento descrito por Penrose e Glick (2003) e Souza e colaboradores (2012). Após os isolados serem cultivados em meio de cultura Dyg's líquido, foram centrifugados e lavados em solução salina 0,85% três vezes. 20 µL de cada amostra foi transferido para placas contendo meio de cultura mineral M9 com e sem a adição de 3 mM ACC como única fonte de nitrogênio (ANEXO D). Os isolados foram incubados à 28° C por 10 dias e aqueles que apresentaram crescimento mais acentuado no meio M9 + ACC em comparação com o meio livre de ACC foram considerados como produtores de ACC desaminase.

2.2.1.8 Produção de quitinases

Para avaliar a capacidade dos isolados produzirem quitinases foi utilizado o método qualitativo descrito por Hsu; Lockwood (1975), utilizando quitina como única fonte de carbono. Os isolados bacterianos que apresentaram resposta positiva no teste de ARA foram repicados para o meio de cultura específico (ANEXO E) com o auxílio de uma alça de platina. Foram estabelecidas quatro colônias por placa e uma placa por isolado. As placas foram incubadas à 28° C por 15 dias. A produção de quitinase foi avaliada 16 dias após a incubação. A produção de quitinase foi determinada pela formação de um halo claro ao redor das colônias.

2.2.1.9 Produção de sideróforo

A produção de sideróforos foi avaliada para os 48 isolados bacterianos que apresentaram resposta positiva no teste de ARA. Foi utilizada a metodologia descrita por Alexander; Zuberer (1991). Os isolados foram inoculados em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura Dyg's líquido e mantidos durante 7 dias à 28° C, sob agitação constante. Após esse período, adicionou-se 1 mL das culturas em microtubos de 1,5 mL de capacidade. Os microtubos foram então centrifugados durante 5 minutos à 4000 g. Adicionou-se 100 µL do sobrenadante de cada cultura a poços de microplaca, além de mais 100 µL do reagente cromo azurol S (CAS). Após 30 minutos, as placas foram avaliadas. A coloração alaranjada ou amarelada das amostras indica a produção de sideróforos pelos isolados. O meio de cultura Dyg's, sem inóculo, foi utilizado como controle negativo.

2.2.1.10 Extração de DNA bacteriano

Os 48 isolados foram cultivados no meio de cultura descrito no item 2.2.1.3 líquido isento de N. Foi realizada uma curva de crescimento dos isolados em meio de cultura e a leitura da densidade óptica das culturas foi determinada em espectrofotômetro ajustado com o comprimento de onda de 600 nm. Posteriormente, o DNA dos isolados foi extraído utilizando-se o *kit Genomic DNA Isolation* (Norgen Biotek, Ontario, Canadá) de acordo com as recomendações do fabricante. A integridade do DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X (Tris, Ácido acético, EDTA), depois de corado com *Sybr Green* (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos). As imagens do gel foram obtidas através de um densitômetro *Storm[™]* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e foram analisadas com o programa *Image Quant TL* (GE Healthcare Uppsala, Suécia). A concentração do DNA foi determinada por fluorescência utilizando-se um fluorímetro *Qubit[™]* (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos) e kit *Quant-iT[™] dsDNA BR* (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos).

2.2.1.11 Caracterização genotípica dos isolados por BOX-PCR

A caracterização genotípica dos isolados foi feita inicialmente por BOX-PCR, utilizando-se o oligonucleotídeo iniciador BOX A1R (5' TCAGGCAAGGCGACGCTGACG 3'), descrito por Versalovic e colaboradores (1994) em solução tampão Gitscher 5X contendo 83 mM de acetato de amônio, 335 mM de Tris-HCl, 33,5 mM de MgCl₂, 33,5 μM de EDTA, 150 mM de β-mercaptoetanol. A reação de amplificação foi feita em um volume final de 25μL contendo: 1μL de DNA molde, 10pmol de oligonucleotídeo iniciador (BOX A1R), 2,5mM de dNTP, 10mg/mL de BSA, 5μL de tampão 5X, 2,5U de DNA polimerase *taq* (Fermentas) e 2,5 μL de DMSO. Após desnaturação à 95° C por 5 minutos, a amplificação do DNA foi feita em 30 ciclos de desnaturação à 90° C por 30 segundos, pareamento à 52° C por 1 minuto e extensão à 65° C por 5 minutos e uma extensão final a 65° C por 16 minutos. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel TAE-agarose 1,5% e analisados como descrito no item anterior. Os padrões de bandas baseados na mobilidade dos fragmentos de DNA no gel foram convertidos em uma matriz binária (presença e ausência) a partir do programa "*Diversity Database*"

(BioRad, Hercules, CA, USA) e utilizados na análise de agrupamento hierárquico feito pelo programa *Systat* 11.0. Os parâmetros adotados para esta análise baseou-se no método de concordância simples (“*simple matching*”), com algoritmo de *Ward* e distância euclidiana como unidade de medida. Análise multivariada de escala multidimensional (NMDS), realizada pelo programa *Primer 5* (PRIMER-E Ltd, UK), foi feita a fim de avaliar o agrupamento dos isolados em função dos diferentes locais de onde foram obtidos (folha e liteira).

2.2.1.12 Amplificação e sequenciamento do gene rRNA 16S dos isolados

A reação de PCR para amplificação do fragmento do gene rRNA 16S foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos universais BAC 8F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e BAC 1541R (5'AAGGAGGTGATCCAGC CGCA 3'), com 25 µL de solução contendo: 2,5 µL de 10x taq (750mM Tris-HCl pH 8,8, 200mM ((NH₄)₂SO₄ e 0,1% de Tween 20), 0,75 µL de 25mM MgCl₂, 2,5 µL de 2 mM dNTP (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos), 0,3 µL de 5 U/µL taq DNA polimerase recombinante (Fermentas Life Sciences, Burlington, Canada) e 1 µL de cada iniciador (10pmoles/µL) e 100ng de DNA genômico, sendo o restante completado com água deionizada esterilizada. As condições de amplificação foram: 3 min à 94° C; 30 ciclos de 45 seg à 94° C, 30 seg à 56° C e 2 min à 72° C, e extensão final por 7 min à 72° C. Os *amplicons* resultantes foram analisados como descrito anteriormente.

O sequenciamento foi realizado utilizando-se um sequenciador automático capilar Modelo *ABI PRISM 3700* (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos) pelo método Sanger. A reação de sequenciamento foi composta por 200ng de DNA purificado, 2 µL de tampão de sequenciamento (200 mM Tris-HCl, pH 9; 5mM MgCl₂), 1 µL de *DYEnamicTM ET Terminator* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Foi utilizado os iniciadores PRBA 63F (5' CAGGCCTAACACATGCAAGTC 3') (MARCHESI et al., 1998) e UM 518R (5' ATTACCGCGGCTGCTGG 3') (ØVREÅS et al., 1997) em reações independentes. As reações foram realizadas em microplacas de 96 cavidades. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial à 95° C por 1 seg, seguido por 25 ciclos à 95° C por 20 seg, 55° C por 15 seg e 60° C por 1 min, sendo a reação incubada à 4° C após o término.

Para precipitação do DNA amplificado, foram adicionados 2µL de solução mix (3 M acetato de sódio pH 9 + 0,5 M EDTA pH 8) e 60µL de etanol absoluto 100%, agitando-se. As placas foram centrifugadas à 4° C, durante 45 min e 1700 g. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 150µL de etanol absoluto 70% e uma nova centrifugação foi realizada por 5 min. O etanol foi descartado e a placa incubada em temperatura ambiente, no escuro, por 2 horas para total evaporação do álcool. As placas foram enviadas para o laboratório de biotecnologia do Centro APTA-Citros Sylvio Moreira, em Cordeirópolis, SP.

As sequências foram processadas pelo programa *PHRED* (EWING; GREEN, 1998) para remoção de bases com baixa qualidade (parâmetro de qualidade >20, menos de um erro em 100 nucleotídeos). As sequências válidas foram comparadas com o banco de dados do programa *Classifier*, disponibilizado pelo RDP *Ribosomal Data Project* – <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) (WANG et al., 2007), e possíveis classificações em diferentes níveis taxonômicos foram definidas com base na distância evolutiva entre as sequências.

2.2.1.13 Amplificação e sequenciamento dos genes rRNA 16S e *nifH* de isolados selecionados

Com base nas análises realizadas anteriormente, foram selecionados dez isolados para teste de inoculação em plantas para avaliar a capacidade de promoção de crescimento vegetal e o potencial de fixação biológica de N. Para tanto, foi realizado o sequenciamento completo do gene rRNA 16S para confirmação da identificação dos dez isolados e, além disto, também foi realizada a amplificação e sequenciamento do gene *nifH*.

A reação de PCR foi realizada como descrito no item 2.2.1.12. O sequenciamento completo do gene rRNA 16S foi realizado utilizando-se 200 ng dos *amplicons* purificados e 10 pmol dos iniciadores BAC8F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'), 341F (5' CCTACGGGAGGCAGCAG 3'), 704F (5' GTAGSGGTGAAATSCGTAGA 3'), 1114R (5' GGGTTGCGCTCGTTGC 3') e BAC1541R (5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3').

Para confirmação da presença do gene *nifH* (± 300 pb) no genoma dos isolados, foi utilizada a metodologia descrita por Ueda e colaboradores (1995). Os iniciadores utilizados foram 19F (5' GCIWTYTAYGGIAARGGIGG 3') e 407R (5'

AAICCRCCRCIAIACIACTRC 3') (onde I= inosina, R=A ou G, W=A ou T, Y=C ou T). A reação continha uma mistura de 10% do volume final da reação de tampão de PCR 10X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 2,0 μM de cada iniciador, 2 unidades de Taq DNA polimerase e 50ng de DNA. As condições de reação foram 94° C por 4 min; 35 ciclos de 94° C por 1 min, 50° C por 45 seg e 72° C por 2 min e uma etapa final de extensão de 72° C por 4 min.

As sequências foram processadas pelo programa *PHRED* (EWING; GREEN, 1998) para remoção de bases com baixa qualidade (parâmetro de qualidade >20, menos de um erro em 100 nucleotídeos). As sequências válidas processadas foram comparadas com o banco de dados de nucleotídeos (NT/NR) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (ALTSCHUL et al., 1990). Foram definidas possíveis classificações em diferentes níveis taxonômicos.

2.2.2 Resultados e discussão

2.2.2.1 Caracterização química das folhas de bambu

Levantamento realizado anteriormente na mesma parcela onde as folhas e liteira de bambu foram coletadas revelou a presença de duas espécies de bambu: *Chusquea kunth* (Poaceae) e *Merostachys spreng* (Poaceae) (PADGURSCHI, 2010), sendo que plantas do gênero *Merostachys* tem presença maciça de apenas uma espécie: *Merostachys neesii* Ruprecht, e é endêmica da Mata Atlântica (JUDZIEWICZ et al., 1999; FILGUEIRAS et al., 2009). Conhecendo a morfologia e ocorrência das espécies, foram coletadas amostras de folhas e liteira de bambu do gênero *M. neesii*. Os resultados de análise de macro e micronutrientes das folhas e liteira de bambu encontram-se na Tabela 2.1.

Os valores de concentração de N nas folhas e liteira de bambu estão entre 20 e 21 g kg⁻¹ aproximadamente. Alguns estudos apontam que a concentração de N em folhas de bambu pode variar de acordo com a espécie avaliada. Na espécie de bambu *Pleioblastus amarusa*, a concentração de N foi de 6,21 g.kg⁻¹, concentração muito maior do que os já observados em outras espécies de bambu, que variam de 0,65 a 3,56 g kg⁻¹ (TU et al., 2013), porém muito menores comparado aos observados na espécie *M. neesii* encontrada na Mata Atlântica. Apesar desses resultados, a concentração de N e K nas folhas de bambu são normalmente maiores

em relação aos demais nutrientes em razão do maior requerimento nas folhas (MENDES et al., 2010).

Tabela 2.1 - Caracterização química das folhas e liteira de bambu da Mata Atlântica. Os valores representam médias (n=4) \pm desvio padrão

Nutrientes	Folha	Liteira
N (g kg ⁻¹)	20,9 \pm 0,8	19,7 \pm 2,34
P (g kg ⁻¹)	0,9 \pm 0,15	0,6 \pm 0,06
K (g kg ⁻¹)	11,5 \pm 4,3	1,6 \pm 0,21
Ca (g kg ⁻¹)	1,4 \pm 0,2	2,59 \pm 0,59
Mg (g kg ⁻¹)	0,98 \pm 0,13	0,7 \pm 0,07
S (g kg ⁻¹)	2,11 \pm 2,36	1,6 \pm 0,32
B (mg kg ⁻¹)	3,79 \pm 0,41	8,22 \pm 2,40
Cu (mg kg ⁻¹)	8,32 \pm 1,28	7,9 \pm 1,14
Fe (mg kg ⁻¹)	98,3 \pm 21,9	360,6 \pm 84,9
Mn (mg kg ⁻¹)	126,6 \pm 113,1	404,8 \pm 87,1
Zn (mg kg ⁻¹)	19,8 \pm 5,8	23,7 \pm 3,5

Segundo Embaye e colaboradores (2005), em floresta de bambu na Etiópia, as concentrações de nutrientes na folhas da espécie *Yushania alpina* variaram bastante com a idade e com as diferentes partes das plantas analisadas. Os autores encontraram uma variação do N entre 16,4 a 17,8 g kg⁻¹, o fósforo variou de 1,4 a 1,9 g kg⁻¹, as concentrações de potássio variaram entre 8,7 a 17,6 g kg⁻¹ e o cálcio variou entre 1,6 a 3,6 g kg⁻¹. Na espécie *Bambusa bambos*, Shanmughavel e Francis (1996) verificaram variações na concentração dos nutrientes nas diferentes partes das plantas também ao longo do tempo. As concentrações nas folhas foram de 19,0 g kg⁻¹ de N; 3,30 g kg⁻¹ de P; 16,0 g kg⁻¹ de K; 5,10 g kg⁻¹ de Ca e 5,40 g kg⁻¹ de Mg. Dessa forma, nota-se que a espécie de bambu *M. nessii* encontrada na Mata Atlântica não difere muito na concentração dos nutrientes das demais espécies de bambu cultivadas em outros países. Embora a concentração de nutrientes varie com o genótipo, idade, ambiente e com a parte da planta, usando como referência a concentração em folhas, que é normalmente alta no bambu, em diferentes espécies, idades e locais, há uma tendência para a sequência K > N > Ca > Mg > P (KLEINHENZ e MIDMORE, 2001; SHANMUGHAVEL e FRANCIS, 2002; EMBAYE et al., 2005). Como pode ser observado nas amostras da Mata Atlântica, são observadas maiores concentrações de N do que de K, e isso pode estar relacionado a elevada atividade da nitrogenase relatada por Gomez (2012) que também verificou baixos valores de $\delta^{15}\text{N}$, sugerindo assim grande aporte de N via FBN.

Em liteira, a concentração de N ($19,7 \text{ g kg}^{-1}$) foi maior que as observadas em liteira das espécies de bambu *S. kurilensis* ($10,06 \text{ g kg}^{-1}$) e *B. ermanii* ($14,5 \text{ g kg}^{-1}$) (TRIPATHI et al., 2006). Segundo os mesmos autores, a concentração de N menor na liteira em comparação com as folhas verdes sugere uma translocação de parte do N para a planta antes da queda das folhas. Essa translocação e/ou diferença não foi visualizada nas amostras avaliadas neste trabalho, já que não houve uma diferença significativa nas concentrações de N apresentados pela liteira e folhas amostradas na floresta Atlântica. Talvez isso não tenha ocorrido em função da época do ano amostrada, ou seja, não era a época de reposição das folhas.

Os solos da Mata Atlântica são caracterizados como muito ácidos, com elevado teor de Al^{3+} e baixa fertilidade, além de uma reserva nutricional restrita na camada superficial (JOLY et al., 2008). Além disso, apresentam potencial relativamente alto de lixiviação de alguns nutrientes como NO^{-3} e K^{+} e elevada capacidade de fixação de P. A acidez do solo pode interferir na absorção de inúmeros nutrientes como o caso de cátions básicos como K, Ca e Mg.

Martins (2010) observou elevados teores de matéria orgânica na parcela estudada, relacionado com temperaturas amenas em altas altitudes, o que leva a uma decomposição mais lenta da matéria orgânica, refletindo em elevados teores de MO e de relação C:N. Em liteira são reportados maiores taxas de FBN por bactérias de vida livre em plantas com maior relação C:N (HEDIN, et al., 2009). Em condições de laboratório, a atividade da enzima nitrogenase é inversamente proporcional a quantidade de N no meio, e diretamente relacionada com a relação C:N do meio de cultura (REED et al., 2011).

É provável que o fornecimento de nutrientes ao solo venha em maior parte da vegetação via liteira do que pelo material de origem (HERRERA, 1985), e possivelmente as folhas de bambu, que são abundantes naquela região, contribuam para o aporte de nutrientes do solo. No entanto, como a concentração de nutrientes minerais nas folhas e liteira afetam a estrutura da comunidade microbiana não é sabido.

Por meio da análise de atividade de redução de acetileno e $\delta^{15}\text{N}$ nas folhas de *M. neesii*, verificou-se elevadas taxas de ARA e baixos valores de $\delta^{15}\text{N}$, indicando que a FBN é elevada (GOMEZ, 2012), sugerindo que parte do N nas folhas é proveniente da FBN. Espécies capazes de realizar FBN apresentam valores de $\delta^{15}\text{N}$ menores do que aquelas não fixadoras (RESENDE, 2000). Apesar da concentração

de N ser relativamente altas nas folhas de bambu, Lindow e Brandl (2003) destacam que nutrientes como N ou Fe não são tão importantes para determinação da comunidade microbiana presente na superfície das folhas quanto à fonte de carbono.

Condições nutricionais e disponibilidade de água são normalmente os principais fatores que influenciam a distribuição da comunidade microbiana na filosfera (LINDOW; BRANDL, 2003). Segundo Reed e colaboradores (2008), concentrações de P e relação C:N nas folhas são importantes e influenciam nas taxas de fixação de bactérias diazotróficas de vida livre. A alta demanda de P é explicada pela alta demanda de energia (ATP) necessária pelas bactérias diazotróficas para a realização da FBN (VITOUSEK et al. 2002), já que o processo demanda grande gasto de energia (REED et al. 2011). Além disso, a concentração de N nas folhas é um dos fatores que mais influencia na capacidade fotossintética da planta, na fixação de C e crescimento da planta (RICO et al., 2014).

Além das características químicas das folhas, inúmeros fatores podem influenciar na comunidade microbiana presente na filosfera de bambu. Características relacionadas com a morfologia da folha (MECHABER et al, 1996), fontes de C e substâncias liberadas do interior para a superfície das folhas também podem interferir na colonização das bactérias. A idade da folha também é um fator importante para a sobrevivência dos epifíticos. Folhas novas apresentam sua cutícula preservada, qual atua como uma barreira contra perda de água, variações de temperatura e proteção contra patógenos (BEATTIE, 2002).

Em geral, as diversas espécies florestais encontradas na Mata Atlântica possuem capacidade variada de concentração dos nutrientes. Os valores dos nutrientes analisados nas folhas e liteira de bambu assemelham-se aos já observados em outras espécies de bambu de florestas tropicais. Cunha e colaboradores (2009) trabalhando em fragmentos da Mata Atlântica no Rio de Janeiro observaram também valores relativamente maiores de nutrientes nas folhas comparados aos observados nas folhas de *M. neesii* da Mata Atlântica, mas ainda assim, limitantes ao desenvolvimento das plantas.

2.2.2.2 Isolamento das bactérias da filosfera e liteira de bambu

Por meio do isolamento de bactérias da superfície das folhas e liteiras de Bambu da Mata Atlântica, foi obtido um total de 120 isolados, sendo 50 isolados originados das folhas e 70 da liteira de bambu. A caracterização morfológica e identificação dos isolados estão apresentadas no Anexo F. O meio de cultura utilizado era totalmente isento de N, o que indica o crescimento de bactérias que utilizam N_2 atmosférico (DOBEREINER, 1995). Todos os isolados apresentaram características semelhantes tais como crescimento lento (no mínimo 5 dias), coloração amarelada ou esbranquiçada, colônias gomosas e de caráter acidificante em meio de cultura livre de N (Figura 2.3).

Os isolados também foram caracterizados quanto ao crescimento em outros meios de cultura como JNFb e Dyg's tanto em placa contendo meio de cultura sólido, quanto na forma líquida ou semissólido. Em todos os casos, os isolados cresceram e acidificaram o meio de cultura. Mesmo que o meio Dyg's não seja apropriado para isolamento de ampla população de diazotróficos, devido à sua composição, o objetivo principal da utilização deste meio foi selecionar bactérias pertencentes a diversos gêneros, e também por ser um meio rico que possibilita o crescimento rápido das bactérias.

O método para isolamento de bactérias diazotróficas utilizado permitiu a obtenção de um número considerável de morfotipos bacterianos, todos caracterizados como gram-negativos. Porém, a identificação baseada apenas em características morfológicas pode não ser confiável. Mirza e colaboradores (2012) testaram o isolamento de bactérias diazotróficas de vida livre de solos da Amazônia por três métodos distintos, e obtiveram um total de 794 colônias puras e isoladas, sendo a maioria deles obtidos pelo mesmo método utilizado no presente trabalho, confirmando a eficiência da técnica utilizada para obtenção de isolados de bactérias diazotróficas de vida livre.

A partir do isolamento e purificação dos isolados, todos foram caracterizados com relação ao seu potencial em fixar N_2 "in vitro" e apenas os que apresentaram resposta positiva foram caracterizados bioquimicamente. Posteriormente, todos foram identificados por meio de técnicas moleculares.

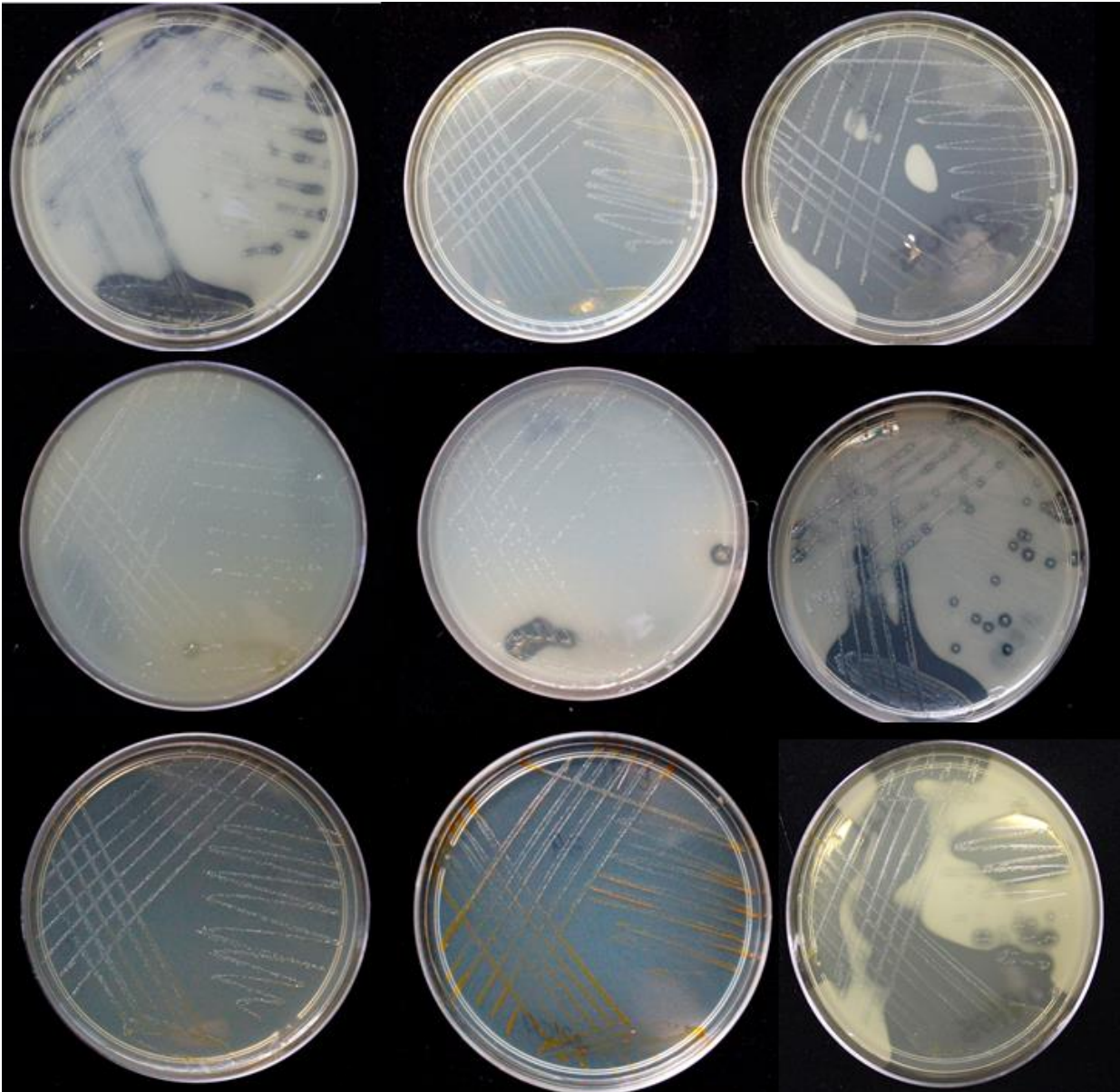


Figura 2.3 – Imagem dos isolados bacterianos diazotróficos epifíticos cultivados em meio de cultura isento de N aos 10 dias de incubação a 28° C

2.2.2.3 Fixação biológica de nitrogênio “*in vitro*”

O caráter diazotrófico dos isolados foi determinado com base na capacidade do complexo nitrogenase em reduzir acetileno como substrato alternativo. Todos os isolados bacterianos foram submetidos ao teste de redução de acetileno, em triplicata. Quando os isolados foram cultivados em meio JNFb, todos apresentaram o desenvolvimento de uma película característica no frasco com o meio de cultura. De

todos os isolados testados, 48 foram capazes de reduzir o acetileno a etileno, podendo ser considerados diazotróficos.

Nas condições do presente trabalho, em termos quantitativos, a atividade da nitrogenase variou entre 5 e 30 nmol de $C_2H_4 h^{-1} mg^{-1}$ proteína (Figura 2.4). Comparando-se as bactérias com relação ao substrato de onde foram isoladas, as bactérias isoladas de liteira apresentaram maiores taxas de ARA do que os isolados das folhas de bambu. Dentre eles, 60% dos isolados não fixaram nitrogênio (0 nmol de $C_2H_4.h^{-1}.mg^{-1}$ proteína), 15% apresentaram baixa fixação (0,1-11 nmol de $C_2H_4.h^{-1}.mg^{-1}$ proteína), 20% apresentaram fixação intermediária (11-20 nmol de $C_2H_4.h^{-1}.mg^{-1}$ proteína) e 5% apresentaram alta fixação (>20 nmol de $C_2H_4 h^{-1}.mg^{-1}$ proteína). A análise estatística do resultado da atividade da nitrogenase indicou não haver diferença significativa entre os isolados.

A capacidade de fixação biológica de bactérias em reduzir acetileno em meio de cultura é variada, como observado em bactérias isoladas de arroz (ARAUJO, 2008) e de raízes de milho (PEDRINHO, 2009). Acredita-se que a baixa atividade da nitrogenase a quantidade e qualidade da fonte de C utilizado no meio de cultura, que pode interferir na atividade enzimática (PEDRINHO, 2009). A atividade da nitrogenase em plântulas de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas foram dependentes da adição de C no meio de enraizamento (GYANESHWAR et al 2001). Algumas bactérias necessitam de meios de cultura apropriados para expressar a atividade da nitrogenase e por esse motivo possivelmente algumas bactérias não apresentaram atividade da nitrogenase, mesmo crescendo em meio de cultura sem N (BALOTA et al., 1999).

Segundo Shahi e colaboradores (2011), foram observadas variações significativas com relação a atividade da nitrogenase de bactérias diazotróficas isoladas da rizosfera de arroz, e mesmo assim, as mesmas apresentaram grande potencial para o desenvolvimento de biofertilizantes em ensaios de campo, devido à capacidade de promoção de crescimento de plantas que apresentaram. A atividade da nitrogenase neste trabalho variou entre 0,23 e 1,72 μmol de $C_2H_4 mg^{-1}$ proteína h^{-1} .

É importante ressaltar que a técnica de redução de acetileno foi utilizada como uma avaliação qualitativa, já que diversas condições como tempo de incubação do gás e quantidade de inóculo, por exemplo, podem interferir na avaliação da atividade da nitrogenase (LIFSHITZ et al., 1986; GILLER, 1987; VESSEY, 1994). Esta técnica

é um método indireto para avaliar a FBN e alguns isolados que apresentam alto potencial de FBN *in vitro* podem não apresentar uma associação eficiente com as plantas (HAN e NEW, 1998).

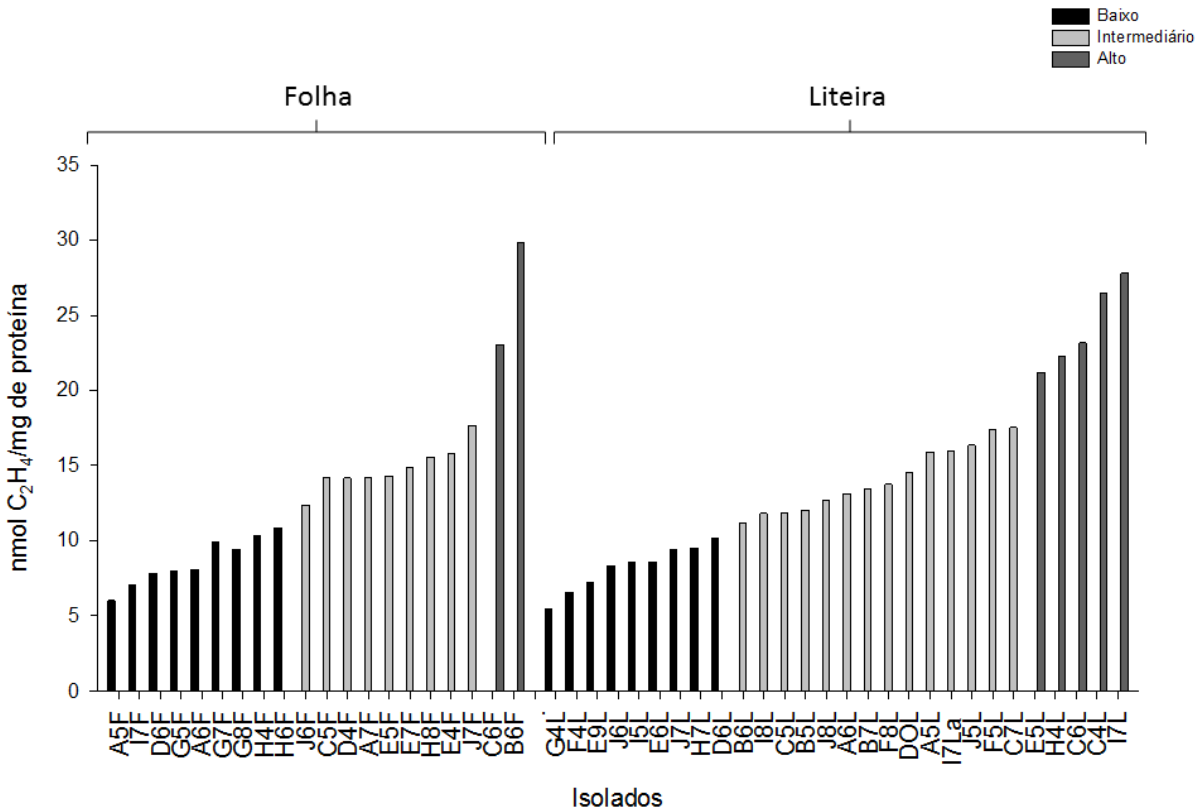


Figura 2.4 – Atividade de redução de acetileno em culturas puras de bactérias diazotróficas epifíticas isoladas da Mata Atlântica, após 1h de incubação a 28°C.

2.2.2.4 Solubilização de fosfato inorgânico

Quanto à capacidade de solubilização de fosfato inorgânico na forma de CaHPO₄ em meio de cultura, 50% dos 48 isolados testados apresentaram a formação de halo, indicando resposta positiva neste ensaio (Figura 2.5). Apenas o isolado D6L apresentou índice de solubilização médio (IS=3,79), sendo significativamente superior ($p < 0,05$) aos demais isolados, ao 15º dia de avaliação. Dos isolados que apresentaram resposta positiva, 48% apresentaram índice de solubilização baixo, variando de 1,15 a 1,86 (Tabela 2.2). Dos 6 isolados que apresentaram alta fixação no teste de ARA, apenas o isolado I7L foi capaz de solubilizar fosfato, os demais não apresentaram halo de solubilização.

Os resultados corroboram aos apresentados por Marra e colaboradores (2012) em que a maior parte das bactérias diazotróficas testadas também apresentaram

índice de solubilização baixo ($IS < 2,0$) quando avaliado para CaHPO_4 . Apesar disso, o maior índice de solubilização ($IS = 3,79$) obtido para o isolado D6L foi maior do que aqueles apresentados por Marra e colaboradores (2012) ($IS = 3,55$) e Ogut e colaboradores (2010) ($IS = 2,0$).

A capacidade de solubilizar fosfatos *in vitro* de algumas bactérias diazotróficas nem sempre ocorre de forma semelhante. Muitas vezes esse processo depende da presença de diferentes fontes de C ou mesmo de diferentes fontes de P no meio de cultura (FILHO; VIDOR, 2000).

Hara; Oliveira (2004) observaram que dentre as 30 bactérias isoladas de solos com alta acidez e elevadas concentrações de Al da região Amazônica, 57% foram capazes de solubilizar fosfato, entretanto apresentaram baixo índice de solubilização. No presente trabalho, observa-se que a proporção entre bactérias solubilizadoras e não solubilizadoras foi semelhante aos resultados obtidos por Hara; Oliveira (2004), indicando comportamento semelhante entre muitas das bactérias isoladas de biomas e condições distintas.

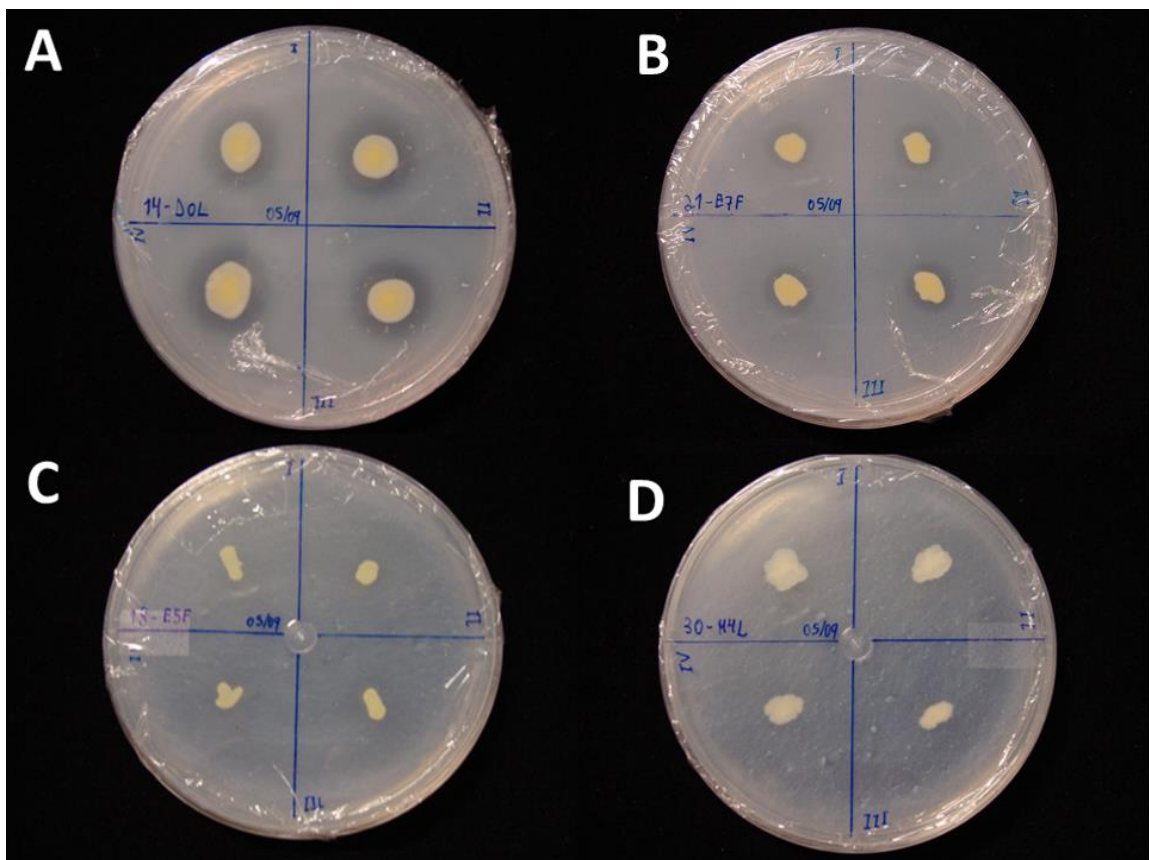


Figura 2.5 - Halo indicando solubilização de fosfato inorgânico em meio de cultura. **A** e **B**. Isolados que solubilizaram fosfato de cálcio em meio de cultura. **C** e **D**. Isolados que apresentaram crescimento, mas não solubilizaram fosfato em meio de cultura

Tabela 2.2 – Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio de bactérias diazotróficas epifíticas isoladas da Mata Atlântica

Isolados	Ø colônia (cm)	Ø halo (cm)	I.S. ⁽¹⁾	Classe de solubilização
A5F	6,6	12,3	1,86 b	Baixa
A6F	7,42	CNS ⁽²⁾	-	-
A7F	5,42	CNS	-	-
B6F	8,76	CNS	-	-
C5F	10,02	12,28	1,22 b	Baixa
C6F	13,7	CNS	-	-
D4F	6,86	12,13	1,76 b	Baixa
D6F	6,31	CNS	-	-
E4F	5,69	CNS	-	-
E5F	6,33	CNS	-	-
E7F	6,9	10,16	1,47 b	Baixa
G5F	7,71	8,92	1,15 b	Baixa
G7F	10,03	CNS	-	-
G8F	10,59	12,7	1,19 b	Baixa
H4F	10,53	CNS	-	-
H6F	13,94	CNS	-	-
H8F	9,97	12,48	1,25 b	Baixa
I7F	6,32	8,23	1,30 b	Baixa
J6F	7,89	CNS	-	-
J7F	7,26	8,79	1,21 b	Baixa
A5L	9,51	CNS	-	-
A6L	10,57	15,14	1,4 3 b	Baixa
B5L	8,83	CNS	-	-
B6L	9,7	14,15	1,45 b	Baixa
B7L	11,66	14,89	1,27 b	Baixa
C4L	8,23	CNS	-	-
C5L	7,01	CNS	-	-
C6L	2,74	CNS	-	-
C7L	14,85	CNS	-	-
D0L	9,83	15,92	1,61 b	Baixa
D6L	5,96	22,47	3,79 a	Média
E5L	6,37	CNS	-	-
E6L	6,13	CNS	-	-
E9L	13,24	19,72	1,48 b	Baixa
F4L	9,93	14,82	1,49 b	Baixa
F5L	14,4	17,37	1,20 b	Baixa
F8L	15,41	CNS	-	-
G4L	2,15	CNS	-	-
H4L	8,23	CNS	-	-
H7L	13,05	CNS	-	-
I5L	6,11	CNS	-	-
I7L	14,27	16,74	1,17 b	Baixa
I7La	12,61	17,58	1,39 b	Baixa
I8L	16,33	19,08	1,16 b	Baixa
J5L	13,62	16,84	1,23 b	Baixa
J6L	14,29	17,68	1,24 b	Baixa
J7L	8,39	10,83	1,29 b	Baixa
J8L	12,39	16,4	1,32 b	Baixa

⁽¹⁾ Índice de Solubilização após 15 dias.

Os dados são médias de 4 repetições. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de scott knot ($p < 0.05$).

⁽²⁾ CNS = cresceu e não solubilizou.

Algumas bactérias capazes de solubilizar fosfatos inorgânicos normalmente apresentam outros mecanismos promotores de crescimento das plantas e as mesmas são comumente conhecidas como bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR) (VESSEY, 2003). A obtenção de isolados com capacidade de solubilizar fosfatos no solo é uma etapa muito importante na seleção de bactérias para a produção de inoculantes com potencial para serem utilizadas na agricultura (SOUCHIE et al., 2005). Foram descritas como sendo eficientes em solubilizar fosfatos, bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium* (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999) e muitas delas utilizadas em inoculantes aplicados na agricultura com sucesso. Até o presente, apenas trabalhos realizados por Mwajita e colaboradores (2013) descrevem bactérias diazotróficas isoladas da rizosfera e filosfera de arroz cultivados no Quênia com capacidade de solubilização de P inorgânico.

2.2.2.5 Produção de ácido indol-3-acético (AIA)

Nas condições testadas, todos os isolados apresentaram habilidade de produzir AIA em meio de cultura contendo L-triptofano, variando entre 1,71 e 51,77 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Já na ausência desse precursor, 56% dos isolados apresentaram a produção de AIA, variando de 1,28 a 22,42 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 2.3). Os isolados J7L e H8F apresentaram os maiores níveis de produção de AIA tanto no meio de cultura contendo L-triptofano, bem como na ausência do aminoácido. De maneira geral, na presença do L-triptofano, 69% dos isolados produziram AIA em concentração alta, variando entre 11-50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 30% produziram AIA entre 1-10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e 2% produziram elevada concentração de AIA ($> 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Figura 2.6A). Na ausência do precursor, 39% não produziram AIA, 55% produziram intermediária concentração de AIA (1-10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), e 7% apresentaram alta concentração de AIA (11-50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Figura 2.6B).

O predomínio de isolados bacterianos que produzem AIA na presença do precursor também foi observado por Gravel e colaboradores (2007) os quais analisaram o potencial da bactéria do gênero *Pseudomonas putida* na promoção de crescimento de tomate. Apesar disso, outras vias independentes de L-triptofano já foram descritas (SPAEPEN et al., 2007), o que explica a síntese de AIA na ausência do mesmo.

Yasmin e colaboradores (2007) avaliaram a capacidade de 15 isolados bacterianos quanto à produção de AIA e todos se mostraram capazes de produzir o fitormônio sendo que, em meio suplementado com L-triptofano o isolado UPMSP9 apresentou a maior concentração de AIA ($46,66 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Os autores também verificaram que a presença do aminoácido aumentou a produção de AIA de diversos isolados, mostrando que a produção está ligada a rotas metabólicas dependentes do L-triptofano. Os resultados obtidos no presente trabalho condizem com os obtidos pelos autores citados, evidenciando que os isolados avaliados provavelmente também utilizam a via do L-triptofano na produção de AIA.

Tabela 2.3 – Produção de AIA de bactérias diazotróficas epifíticas isoladas da Mata Atlântica, na presença e ausência de L-triptofano

Isolados	(Produção de AIA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$))				
	Com L-triptofano	Sem L-triptofano	Isolados	Com L-triptofano	Sem L-triptofano
A5F	10,97 C	-	B7L	44,45 A	-
A6F	12,95 C	1,96 c	C4L	12,42 C	-
A7F	5,76 D	-	C5L	4,22 D	-
B6F	30,23 A	4,38 c	C6L	27,48 B	-
C5F	16,99 C	2,00 c	C7L	4,39 D	-
C6F	26,24 B	-	D0L	12,83 C	-
D4F	26,25 B	1,28 c	D6L	42,83 A	3,06 c
D6F	12,88 C	-	E5L	6,32 D	-
E4F	12,95 C	-	E6L	10,02 C	-
E5F	18,30 C	-	E9L	1,71 D	-
E7F	10,29 C	-	F4L	45,18 A	2,78 c
G5F	4,13 D	1,94 c	F5L	11,94 C	3,50 c
G7F	5,48 D	2,28 c	F8L	4,89 D	2,67 c
G8F	40,40 A	6,14 c	G4L	29,14 B	9,42 b
H4F	34,94 B	3,39 c	H4L	7,42 D	8,02 b
H6F	6,77 D	1,77 c	H7L	39,99 A	4,23 c
H8F	51,77 A	13,72 a	I5L	16,71 C	4,77 c
I7F	38,52 A	4,48 c	I7L	39,75 A	5,86 c
J6F	16,82 C	-	I7La	33,70 B	2,84 c
J7F	8,27 D	4,68 c	I8L	48,69 A	4,74 c
A5L	8,29 D	-	J5L	34,35 B	4,40 c
A6L	16,25 C	-	J6L	47,38 A	6,30 c
B5L	15,87 C	-	J7L	45,96 A	22,42 a
B6L	5,54 D	-	J8L	36,96 B	10,59 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, pelo teste de Scott-Knott, ($p < 0.05$). Letras maiúsculas comparam meios suplementados com L-triptofano e minúsculas comparam meio sem L-triptofano; dados originais transformados em raiz quadrada de (x).

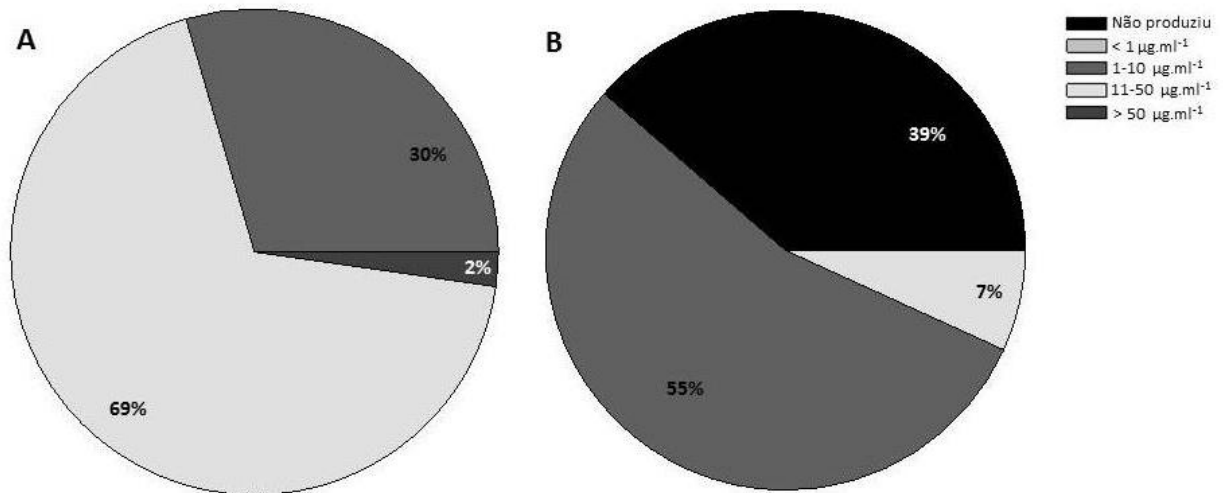


Figura 2.6 – Frequência dos isolados que apresentaram capacidade de produção de AIA **(A)** na presença do precursor L-triptofano e **(B)** na ausência do precursor L-triptofano. De acordo com a concentração de AIA detectada, temos: <1 µg.mL⁻¹ (baixa produção); 1-10 µg.mL⁻¹ (média produção); 11-50 µg.mL⁻¹ (alta produção); >50 µg.mL⁻¹ (elevada produção de AIA)

Os isolados da filosfera de bambu da Mata Atlântica apresentaram alta capacidade em produzir AIA, o que contradiz relatos na literatura que demonstram que as bactérias da filosfera são ineficientes para produzir AIA (LINDOW; BRANDL, 2003; MWAJITA et al., 2013). É importante ressaltar que mesmo com elevada produção de AIA, a função dos fitormônios produzidos pelas comunidades epifíticas não está muito bem esclarecida. A produção de AIA por bactérias epifíticas pode estar relacionada a uma maior competitividade durante a colonização da planta hospedeira (BRANDL; LINDOW, 1998). Na rizosfera, a produção de AIA pode aumentar o volume de raízes adventícias, o que favorece a absorção de água e nutrientes e este, por sua vez, libera exsudatos para as bactérias no solo. Já na superfície foliar, o fitormônio pode promover o afrouxamento da parede celular, podendo ainda estimular a liberação de açúcares (FRY, 1989; GOLDBERG, 1980). Além disso, o hormônio secretado pelas bactérias pode promover o crescimento das plantas de forma indireta, influenciando na atividade da enzima ACC desaminase (1-aminociclopropano-1-carboxilato), que é um precursor do etileno (PATTEN, GLICK, 2002). Segundo Li e colaboradores (2000) e Glick (2001), bactérias mutantes promotoras de crescimento vegetal, que não produzem ACC desaminase, também perderam a habilidade de estimular o alongamento das raízes. O AIA produzido pelas bactérias pode aumentar a transcrição e atividade da ACC sintase, que

catalisa a produção de ACC nas plantas (JACOBSON et al., 1994; PECK , KENDE;1995, LI, GLICK, 2001).

2.2.2.6 Produção de ACC desaminases

Com relação a produção de ACC desaminase, sete (16%) dos 48 isolados apresentaram crescimento acentuado no meio M9+ACC podendo então ser considerados possíveis metabolizadores da enzima ACC desaminase (Tabela 2.4). Glick (2005) demonstrou que tanto as bactérias do solo produtoras de ACC desaminase, quanto seu transgene em plantas são capazes de atuar na proteção às plantas quanto a estresses bióticos e abióticos. Tal característica elucida um possível uso dessa enzima nas práticas agrícolas. Além disso, a atividade da enzima ACC desaminase não afeta a estrutura das raízes, sugerindo que a enzima pode estimular o crescimento de fungos micorrízicos arbusculares (GAMALERO et al., 2008). Também foram obtidos resultados que demonstram uma relação sinérgica positiva entre isolados bacterianos produtores de ACC desaminase e fungos micorrízicos que culminam em um maior crescimento da planta e da atividade fotossintética.

2.2.2.7 Produção de quitinases

Dos 48 isolados analisados, apenas 8% formaram halos ao final de 16 dias em meio de cultura contendo quitina como única fonte de C (Figura 2.7), (Tabela 2.4). Importante ressaltar que 4 dos isolados que produziram quitinases (H4F, H8F, I7F e J7L) também apresentaram resposta positiva tanto nos testes de redução de acetileno, solubilização de fosfato e produção de AIA.

A baixa frequência de bactérias diazotróficas capazes de produzir quitinases no presente trabalho também foi observada em trabalhos semelhantes. Ribeiro (2012), ao testar a capacidade de 97 isolados de rizobactérias quanto à síntese de quitinases não obteve resultados positivos, apesar de apresentarem outros mecanismos de promoção de crescimento vegetal como FBN e produção de AIA e sideróforos.

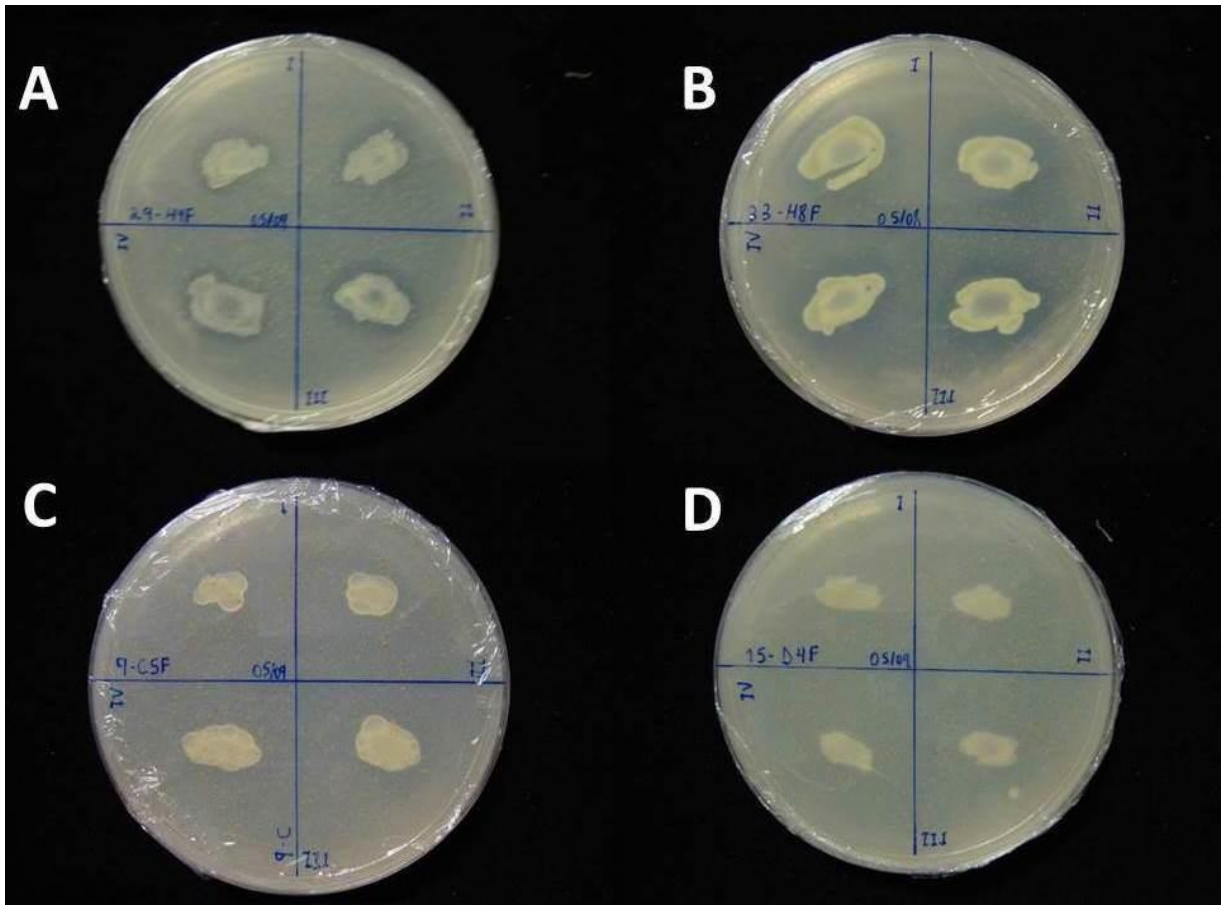


Figura 2.7 – Halo indicando produção de quitinases em meio de cultura. **A** e **B**. Isolados que produziram halo de solubilização em meio de cultura. **C** e **D**. Isolados que apresentaram crescimento, mas não produziram halo em meio de cultura após 16 dias.

Alguns micro-organismos que não possuem quitina em sua parede celular podem produzir quitinase com objetivo de degradar quitina de outros organismos e obter nutrientes, na ausência de outras fontes de carbono, como no caso de bactérias do solo. Em associação com as plantas, a produção de quitinases está relacionada com a defesa contra fungos fitopatogênicos (SHAIKH; DESHPANDE, 1993), característica interessante em possíveis bactérias selecionadas para a produção de inoculante.

A produção de quitinases já foi reportada em 3 linhagens de *Pseudomonas fluorescens* (epifítica) em que foi confirmada a atividade antagonista ao fungo *Colletotrichum falcatum* relacionada à produção de quitinases (VISWANATHAN; SAMIYAPPAN, 2004). Da mesma forma Velusamy e Kim (2011), mostraram que bactérias dos gêneros *Erwinia* e *Enterobacter* isoladas da superfície de folhas de algodão com sintomas de antracnose apresentaram ação antagônica a *Rhizoctonia solani*, através da produção de quitinases. *Burkholderia* com capacidade de produzir

quitinases e quitosanases, que são enzimas importantes no controle biológico de fitopatógenos, também foram observadas em ensaios *in vitro* (SHIMOSAKA et al., 2000). A importância do controle biológico de fungos patogênicos por meio da produção de quitinases também foi relatada por Barra e colaboradores (2008). Dos 43 isolados de rizosfera e filosfera de plantas cultivadas de importância econômica, 22 foram capazes de produzir quitinases. Da mesma maneira, Shaharoon e colaboradores (2006) detectaram algumas linhagens de *Pseudomonas* com elevada habilidade de promover o crescimento vegetal, e atribui a esse potencial à produção de quitinases e ACC-desaminases.

2.2.2.8 Produção de sideróforos

Dentre todos os 48 isolados testados, 17% foram capazes de produzir sideróforos (Tabela 2.4). Os sideróforos produzidos pelas bactérias retiram o ferro presente na solução de CAS, alterando a coloração do meio de cultura (Figura 2.8) (ALEXANDER; ZUBERER, 1991). Sideróforos são moléculas de peso molecular baixo que tem a função de sequestrar o Fe do ambiente e o tornar disponível para as células. O Fe desempenha um papel essencial no metabolismo dos micro-organismos. Em condições aeróbicas, é responsável pela redução de oxigênio na síntese de ATP (NEILANDS, 1995).

Dos 8 isolados que apresentaram resposta positiva no teste de produção de sideróforos, todos também apresentaram resposta positiva a pelo menos dois outros testes realizados anteriormente, indicando elevado potencial para produção de biofertilizantes.

A capacidade em produzir sideróforos foi obtida em 85% dos isolados bacterianos obtidos da rizosfera de tabaco (TIAN et al, 2009). Segundo os autores, bactérias do gênero *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pantoea*, *Erwinia* e *Stenotrophomonas* estão entre as capazes de produzir sideróforos em condições de baixa concentração de ferro no meio de cultura. Cianobactérias isoladas da superfície de folhas de *Merostachys neesii*, *Euterpe edulis*, *Garcinia gardneriana* e *Guapira opposita* da Mata Atlântica, apresentaram alguns mecanismos de crescimento vegetal *in vitro*, porém não foi observada produção de sideróforos *in vitro*, sugerindo que as cianobactérias isoladas da Mata Atlântica podem auxiliar no

crescimento das plantas por outros mecanismos de crescimento, mas não pela produção de sideróforos (ANDREOTE, 2013).

Tabela 2.4- Produção de quitinase, atividade de ACC desaminase e produção de sideróforo das bactérias diazotróficas epifíticas isoladas da Mata Atlântica

Isolados	Produção de quitinase	Atividade de ACC desaminase	Produção de sideróforo	Isolados	Produção de quitinase	Atividade de ACC desaminase	Produção de sideróforo
A5F	-	-	-	B7L	-	+	-
A6F	-	-	+	C4L	-	-	-
A7F	-	-	-	C5L	-	-	-
B6F	-	-	+	C6L	-	-	-
C5F	-	-	+	C7L	-	-	-
C6F	-	-	-	D0L	-	-	-
D4F	-	-	+	D6L	-	-	-
D6F	-	-	-	E5L	-	-	-
E4F	-	-	-	E6L	-	-	-
E5F	-	-	-	E9L	-	-	-
E7F	-	-	-	F4L	-	-	-
G5F	-	-	-	F5L	-	-	-
G7F	-	-	-	F8L	-	-	-
G8F	-	-	-	G4L	-	-	+
H4F	+	-	-	H4L	-	-	-
H6F	-	-	+	H7L	-	-	+
H8F	+	+	-	I5L	-	-	+
I7F	+	+	+	I7L	-	+	-
J6F	-	-	-	I7la	-	-	-
J7F	-	-	-	I8L	-	-	-
A5L	-	-	-	J5L	-	-	-
A6L	-	+	-	J6L	-	-	-
B5L	-	-	-	J7L	+	+	-
B6L	-	+	-	J8L	-	-	-

+, com produção; -, sem produção

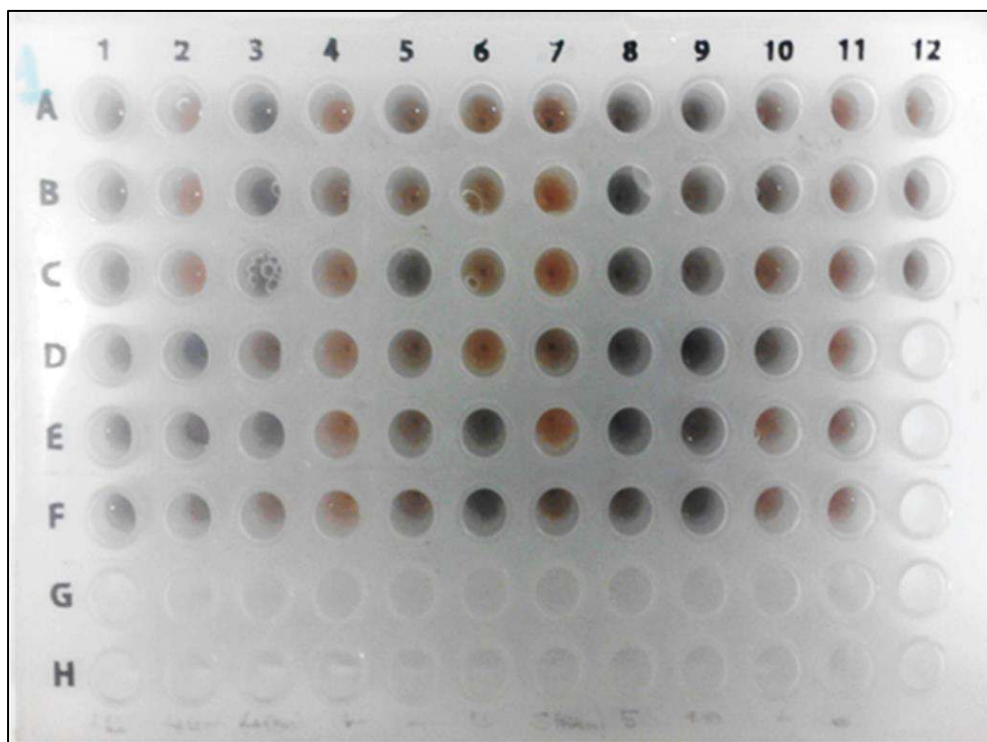


Figura 2.8- Coloração laranja indica produção de sideróforo

2.2.2.9 Análise de BOX-PCR

Para Isolados bacterianos filogeneticamente muito próximos (BRUIJN et al., 1996) BOX-PCR é uma técnica que pode ser utilizada para distingui-los (MENNA et al., 2009) e pode ser aplicada para análise genotípica de populações de bactérias diazotróficas de maneira eficiente (LAGUERRE et al., 1997; KASCHUK et al., 2006).

Todos os 48 isolados selecionados foram analisados por BOX-PCR, a qual baseia-se na utilização de um único oligonucleotídeo como iniciador para amplificar regiões repetitivas dispersas no genoma, gerando um “fingerprint” ou impressão digital de cada isolado bacteriano (VERSALOVIC et al., 1994). Dentre os isolados analisados, 7 não apresentaram produto de amplificação.

Considerando-se que cada padrão de bandas representa uma população distinta, a análise por BOX-PCR mostrou alta dissimilaridade entre o padrão de banda dos isolados, indicando alta diversidade genética. A análise dos padrões de banda resultou na formação de 30 padrões de bandas distintos, sugerindo a existência de 30 diferentes populações bacterianas diazotróficas na filosfera de bambu.

Através de análise de agrupamento hierárquico, foi possível agrupar os isolados em três grandes grupos, considerando a distância euclidiana mínima de 1,6. Os grupos I e III são formados por isolados tanto da liteira quanto das folhas de bambu. Já o grupo II é formado quase que exclusivamente por isolados da liteira, sugerindo uma correlação com o microambiente de onde os isolados foram obtidos (Figura 2.9). Porém, resultados de análise discriminante dos padrões de bandas dos géis do BOX-PCR sugerem que não existe diferença entre os isolados de folha e liteira (Wilks' lambda= 0,5549, $p > 0,05$), apresentando baixa probabilidade dos isolados se agruparem em função do microambiente de origem ($F = 1,7277$, prob = 0,1098). Da mesma forma, a análise multivariada de escala multidimensional (NMDS) mostrou que existe uma baixa tendência dos isolados se agruparem em função do local de origem (stress=0.13, Figura 2.10), sugerindo que genótipos similares de bactérias diazotróficas ocorrem tanto nas folhas quanto na liteira de Bambu.

Os dados obtidos por meio da técnica molecular BOX-PCR sugerem que existe uma grande diversidade de bactérias epifíticas na superfície das folhas e liteira de Bambu, e com isso, todos os isolados foram sequenciados para identificação e análise mais detalhada.

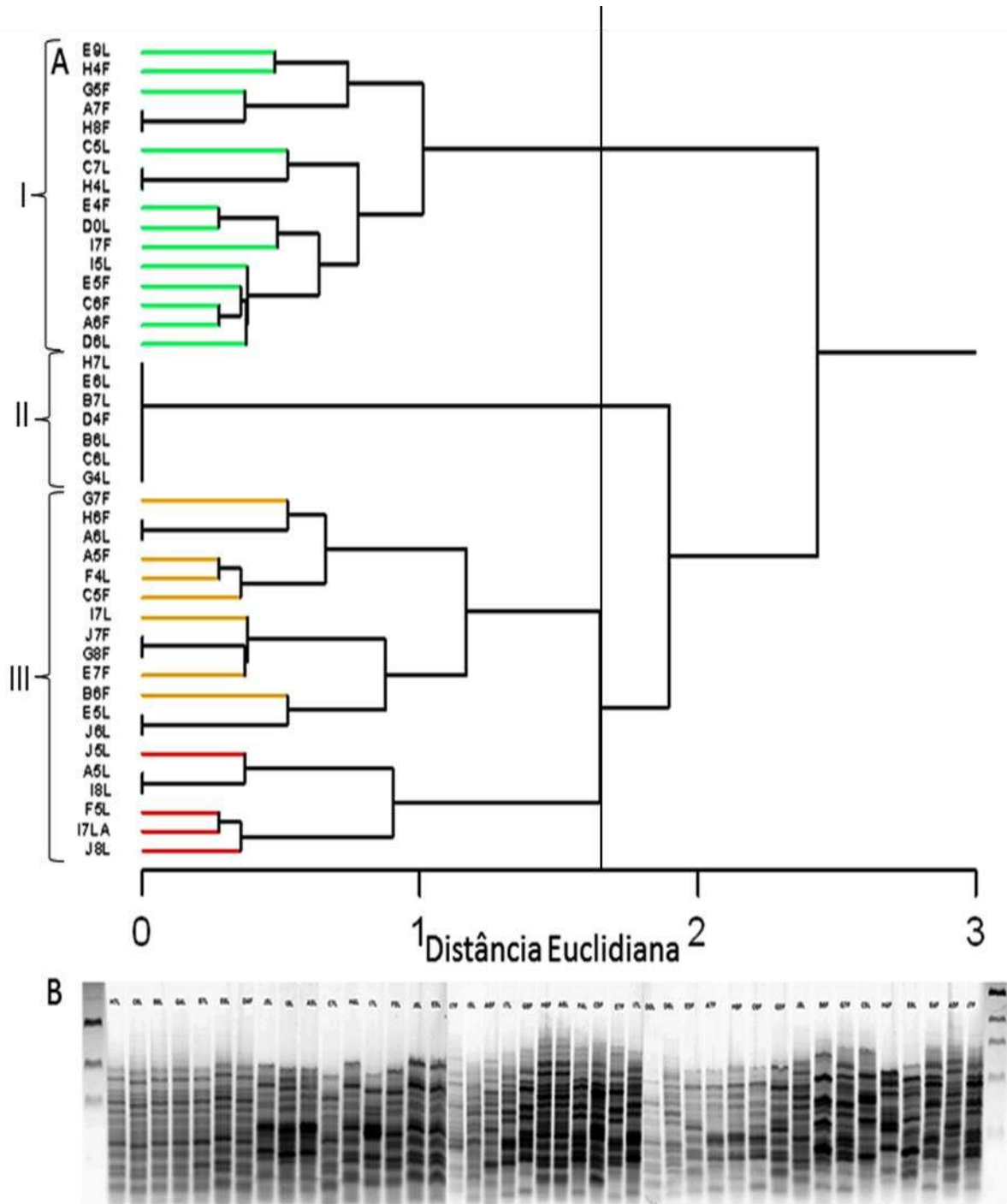


Figura 2.9 – BOX-PCR dos isolados bacterianos de filosfera e liteira de Bambu da Mata Atlântica. **A.** Agrupamento hierárquico com base no perfil de bandamento dos géis **B.** Produtos de amplificação dos isolados bacterianos por BOX-PCR

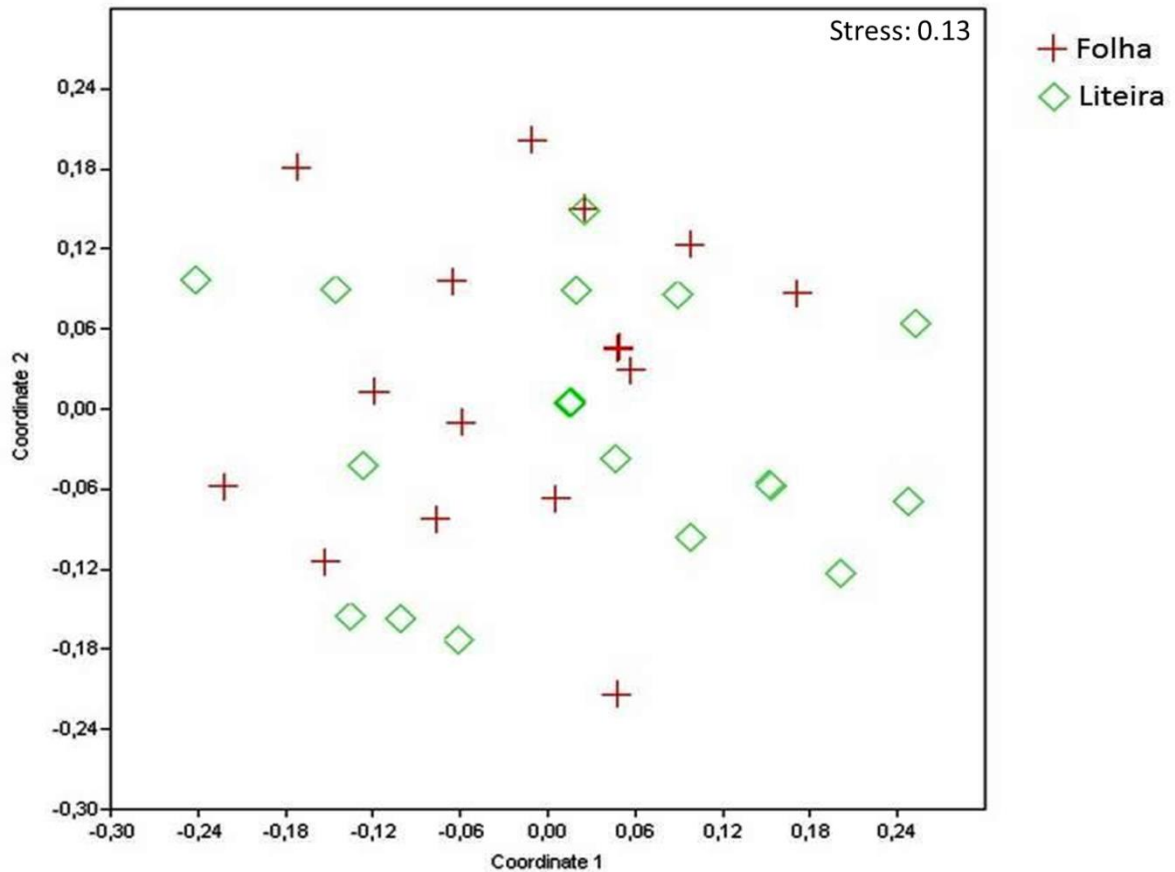


Figura 2.10 – Análise multivariada de escalonamento multidimensional não-métrica (NMDS) com base no perfil de bandas após BOX-PCR de bactérias diazotróficas, considerando-se os dois locais de origem das mesmas, sendo + (bactérias isoladas das folhas de Bambu); \diamond (bactérias isoladas das liteiras de Bambu). NMDS gerado com base em matriz de similaridade de Bray-Curtis

2.2.2.10 Análise de sequenciamento do gene rRNA 16S dos isolados

Sequências de 11 isolados analisados apresentaram baixa similaridade com sequências depositadas no RDP que podem representar novas espécies ainda não descritas. Novas análises de sequenciamento serão necessárias para melhor definir a afiliação taxonômica desses organismos. Dentre as sequências analisadas, 33 apresentam alta similaridade com sequências de bactérias diazotróficas da família *Enterobacteriaceae* (*Proteobacteria*), (Tabela 2.5). Levando-se em consideração 95% de similaridade entre as sequências para definição de afiliação, 75% dos isolados estudados são pertencentes à classe *Gammaproteobacteria*, e família *Enterobacteriaceae*. 32% dos isolados apresentaram sequências similares a *Klebsiella sp.* e 2% dos isolados foram similares a *Serratia* e *Enterobacter*. 37% das sequências não foram identificadas quanto ao gênero devido à baixa similaridade

com os micro-organismos citados em banco de dados, podendo então representar novos gêneros ou espécies. 25% das sequências apresentaram baixa identidade com outras sequências já depositadas no banco de dados.

Proteobacteria é um dos filos mais estudados e apresenta também o maior número de representantes de bactérias capazes de fixar nitrogênio atmosférico (ZEHR, 2003; RAYMOND et al., 2004). O filo *Proteobacteria* é morfológica e metabolicamente diversificado, além de ser o mais abundante em diversos ambientes (MARGULIS; SCHWARTZ, 1998), e subdivide-se em 5 classes: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* e *Epsilonproteobacteria*. Além disso, é o mais abundante entre os micro-organismos encontrados na filosfera, sendo que os gêneros *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Clavibacter*, *Leifsonia*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas* são encontrados mais frequentemente em diversas plantas (VORHOLT, 2012).

Lindow e Brandl (2003) mostraram que na filosfera ocorre um predomínio de poucos gêneros de bactérias, como *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Erwinia* e *Methylobacterium spp* que foram detectados por métodos dependentes de cultivo, porém Lambais e colaboradores (2006) observaram uma grande diversidade de bactérias na filosfera de várias espécies florestais por métodos independentes de cultivo, indicando uma complexidade na estrutura da comunidade microbiana na filosfera muito maior do que se imaginava.

O conhecimento da comunidade microbiana que coloniza espécies de bambu se restringe a poucos trabalhos. Na Mata Atlântica, observou-se grande diversidade de espécies na filosfera de bambu da espécie *M. neesii*, comparando com a diversidade de bactérias no solo sob a copa das árvores e cascas. Utilizando-se a técnica de pirosequenciamento, verificou-se a presença de bactérias dos filos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, e *Cyanobacteria* (GOMEZ, 2012). Já por meio de técnica de cultivo, Andreote (2013) obteve isolados de cianobactérias também da filosfera de *M. neesii* da Mata Atlântica, as quais foram identificadas por sequenciamento do gene rRNA 16S e afiliadas aos gêneros *Nostoc*, *Desmonostoc*, *Leptolyngbya*, *Oculatella*, *Brasilonema*, *Pleurocapsa* e *Chroococcidiopsis*. Recentemente foram isoladas bactérias da filosfera de bambu da espécie *Bambusa bambos* originadas da Índia, e foram identificadas como sendo da espécie *Methylobacterium* (MADHAIYAN et al., 2014), espécie bacteriana comumente encontrada na filosfera de várias plantas (CORPE, RHEEM, 1989), com capacidade de promover o crescimento das

plantas pela produção de AIA, sideróforos e ACC desaminase (TROTSENKO et al. 2001; HOLLAND, POLACCO 1992; IDRIS et al. 2004).

Na família *Enterobacteriaceae* são encontrados inúmeras bactérias potencialmente patogênicas, tais como *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Erwinia* e *Brenneria* (BRENNER; FARMER, 2005). Porém, já foi demonstrado que alguns representantes desses grupos apresentam capacidade de promover o crescimento das plantas por meio da produção de fitormônios, solubilização de fosfatos e fixação biológica de N (BEHAR; YUVAL; JURKEVITCH, 2005; KÄMPFER; RUPPEL; REMUS, 2005; LIN et al., 2012; PENG et al., 2009; TAULÉ et al., 2011; YOUNG et al., 2006). Bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, epifíticas e endofíticas, foram isoladas de uma ampla variedade de culturas (ASIS & ADACHI, 2003). Kämpfer e colaboradores (2005) propuseram uma nova espécie do gênero *Enterobacter*, *E. radicincitans*, capaz de produzir fitormônios e fixar nitrogênio atmosférico. *Enterobacter oryzae* é uma espécie diazotrófica isolada da rizosfera de arroz selvagem *Oryza latifolia* (PENG et al., 2009).

Bactérias do gênero *Enterobacter* também são descritas como sendo capazes de solubilizar fosfatos, produzir AIA, sugerindo que representantes deste gênero são importantes bactérias promotoras de crescimento de plantas (SHOEBITZ et al., 2009; ALMETHYEB et al., 2013). Foram descritas bactérias do gênero *Enterobacter spp.* produzindo até 258,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AIA (MONTAÑEZ et al., 2012) e colonizando a filosfera de espécies cultivadas (YANG et al., 2001). Bactérias isoladas da filosfera de trigo caracterizadas como fixadoras de N e com capacidade de produzir citocininas também foram caracterizadas taxonomicamente, e foram descritas como similares a família *Enterobacteriaceae* (KAMPFER et al., 2005). A produção de AIA por membros da família *Enterobacteriaceae* também foi reportada tanto por Souchie e colaboradores (2007) quanto por Kavamura e colaboradores (2013), sugerindo assim que esse grupo de bactérias pode contribuir de maneira efetiva para o crescimento e desenvolvimento das plantas por meio da produção de fitormônios em diferentes ecossistemas.

Klebsiella é também um importante gênero de bactérias diazotróficas. Este gênero é considerado um organismo modelo na genética da fixação biológica de N, e possibilitou o estudo da regulação da expressão da nitrogenase, e revela que muitos dos genes envolvidos na FBN são comuns a quase todos os diazotróficos (HOWARD; REES, 1996). Alguns autores relatam o isolamento de bactérias do

gênero *Klebsiella* da filosfera de algumas espécies vegetais cultivadas e ainda com potencial de fixação de N por meio de inoculação (SENGUPTA, SEN, 1981; SAMANTA, SEN, 1986; HASHIDOKO et al., 2002).

No gênero *Serratia sp.*, já foram descritas várias bactérias de vida livre capazes de produzir sideróforos (TIAN et al., 2009), solubilizar fosfatos (ASERSE et al., 2013) além de possuírem ação antagonista a fungos patogênicos (DE VLEESCHAUWER, HÖFTE 2007), sugerindo que são também bactérias com potencial para promover o crescimento vegetal. Bruce e colaboradores (2010) isolaram um grande número de bactérias de amostras de solo da Mata Atlântica e alguns isolados foram caracterizados como *Serratia*, indicando a ocorrência desse gênero não somente na superfície das folhas, mas também no solo desse bioma.

Através de técnicas moleculares como PCR-DGGE e sequenciamento do gene rRNA 16S, o gênero *Yersinia* também já havia sido descrito na filosfera de espécies arbóreas da Mata Atlântica, assim como *Enterobacter* e *Klebsiella* (LAMBAIS et al., 2006).

Tabela 2.5 – Afiliação taxonômica dos isolados bacterianos de folha e liteira de bambu da Mata Atlântica, a partir do sequenciamento parcial do gene rRNA 16S (Continua)

Isolado	Origem	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
B6F	Folha	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Enterobacter (97%)
H4F	Folha	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Serratia (98%)
G5F	Folha	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Klebsiella (97%)
D4F	Folha	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Klebsiella (97%)
C6F	Folha	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Klebsiella (100%)
H8F	Folha	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	ND
I7F	Folha	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	ND
G7F	Folha	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	ND
G8F	Folha	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	ND
E4F	Folha	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	ND
E7F	Folha	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	ND
J6F	Folha	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	ND
J7F	Folha	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	ND
E5F	Folha	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	ND
A7F	Folha	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	ND
H6F	Folha	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	ND
A6F	Folha	ND				
D6F	Folha	ND				
C5F	Folha	ND				
C5L	Liteira	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Klebsiella (97%)
J8L	Liteira	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Klebsiella (100%)
F5L	Liteira	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Klebsiella (97%)
A6L	Liteira	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Klebsiella (100%)
E6L	Liteira	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Klebsiella (100%)
G4L	Liteira	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Klebsiella (97%)
E5L	Liteira	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Klebsiella (97%)

Tabela 2.5 – Afiliação taxonômica dos isolados bacterianos de folha e liteira de bambu da Mata Atlântica, a partir do sequenciamento parcial do gene rRNA 16S (Conclusão)

Isolado	Origem	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
D0L	Liteira	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Klebsiella (97%)
C6L	Liteira	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Klebsiella (97%)
H7L	Liteira	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Klebsiella (99%)
B6L	Liteira	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Klebsiella (97%)
I7L	Liteira	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	ND
C7L	Liteira	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	ND
E9L	Liteira	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	ND
F4L	Liteira	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	ND
J5L	Liteira	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	ND
D6L	Liteira	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	ND
A5L	Liteira	ND				
B5L	Liteira	ND				
B7L	Liteira	ND				
C4L	Liteira	ND				
J7L	Liteira	ND				
J6L	Liteira	ND				
F8L	Liteira	ND				
H4L	Liteira	ND				

ND=Não determinado

Como o presente trabalho tem por objetivo elaborar um biofertilizante que seja eficiente em promover o crescimento da cana-de-açúcar usando bactérias diazotróficas e com outros mecanismos de promoção de crescimento, 10 isolados bacterianos foram selecionados com base nos testes citados anteriormente para inoculação via pulverização foliar e para encapsulamento e aplicação no solo e determinação de sua eficiência em promover o crescimento de cana-de-açúcar.

2.2.2.11 Sequenciamento completo do gene rRNA 16S e gene *nifH* dos isolados

Antes da realização dos ensaios em casa-de-vegetação, os 10 isolados mais promissores em testes laboratoriais foram caracterizados quanto a sequência completa do gene rRNA 16S para confirmação da afiliação filogenética e parcial do gene *nifH*, responsável pelo caráter diazotrófico das bactérias. Para o gene rRNA 16S, o comprimento das sequências analisadas variou de 1.300 a 1.471 pb, representando quase todo o gene. Quanto ao gene *nifH*, o comprimento das sequências variou entre 350 e 380 pb, representando parcialmente o gene.

Resultados de sequenciamento completo do gene rRNA 16S confirmam que os isolados são similares da família *Enterobacteriaceae*, porém a caracterização a nível de espécie não foi observada. Yang e colaboradores (2001) encontraram maior complexidade que se esperava em comunidades de bactérias associadas à filosfera por meio de análises baseadas no gene 16S rRNA, onde as sequências obtidas coincidiam apenas 90% com as depositadas nos bancos de dados, da mesma forma que observado para os isolados do presente estudo. Foi confirmada a presença do gene *nifH* em todos os isolados selecionados (Figura 2.11) confirmando assim o caráter diazotrófico dos mesmos. Para ambos os genes, as 10 bactérias mostraram alta similaridade com a família *Enterobacteriaceae*, porém com divergências com relação ao gênero caracterizado (Tabela 2.6). Árvores filogenéticas do sequenciamento dos genes rRNA 16S e *nifH* dos isolados estão apresentados nas Figuras 2.12 e 2.13, com base na similaridade entre as sequências obtidas e organismos de referência.

Existem algumas limitações com relação ao uso do gene *nifH* para análise filogenética, dependendo do grupo de micro-organismos que se quer acessar (GABY; BUCKLEY, 2012). Os mesmos autores citados testaram a afinidade dos iniciadores utilizados no presente experimento (19F, UEDA et al., 1995) e indicou

uma baixa especificidade para amplificação do gene *nifH* sob as condições testadas, sendo que o mesmo ocorre para inúmeros iniciadores citados na literatura para sequenciamento do gene *nifH*.

O gene *nifH* é um gene altamente conservado em diazotróficos (ZEHR, CAPONE, 1996) e estão localizados em vários operons, porém em *Klebsiella pneumoniae*, vinte genes *nif* estão organizados seqüencialmente, formando 8 operons: *nifJ*, *nifHDKT*, *nifENX*, *nifUSVWZ*, *nifM*, *nifF*, *nifLA* e *nifBQ* (ARNOLD et al., 1988). Já em *Enterobacter*, e em outros diazotróficos de vida livre e associativos, foi observada a presença de genes *nif* na porção extracromossomal do genoma, indicando que esta característica não é única dos diazotrófos simbióticos (SINGH et al., 1983; SINGH, KLINGMULLER, 1986; KREUTZER et al., 1991). Nos micro-organismos de vida livre, os genes *nif* ocupam uma região de aproximadamente 23 Kb do plasmídeo pEA3 de 113 Kb. Mas de maneira geral, os genes *nif*, codificam a formação da proteína FeMo, componente da enzima nitrogenase, responsável pelo processo de fixação de nitrogênio (ROSADO et al, 1999).

Diferentemente do observado no presente estudo, Videira e colaboradores (2012) verificaram a presença do gene *nifH* em isolados com habilidade de promoção de crescimento vegetal obtidos da rizosfera de gramíneas, caracterizados como *Burkholderia*, *Klebsiella* e *Enterobacter*. Liu e colaboradores (2011) também detectaram o gene *nifH* em bactérias do gênero *Klebsiella* isoladas da rizosfera de arroz, e ainda apresentaram diversos mecanismos para promoção de crescimento vegetal, como FBN e formação de biofilme. Dessa forma, pode-se sugerir que esse gênero de bactérias diazotróficas constitui um grupo importante de bactérias capaz de promover o crescimento de plantas tanto na filofera quanto na rizosfera de plantas cultivadas ou em ambientes naturais, como na filofera de espécies de bambu em florestas tropicais.

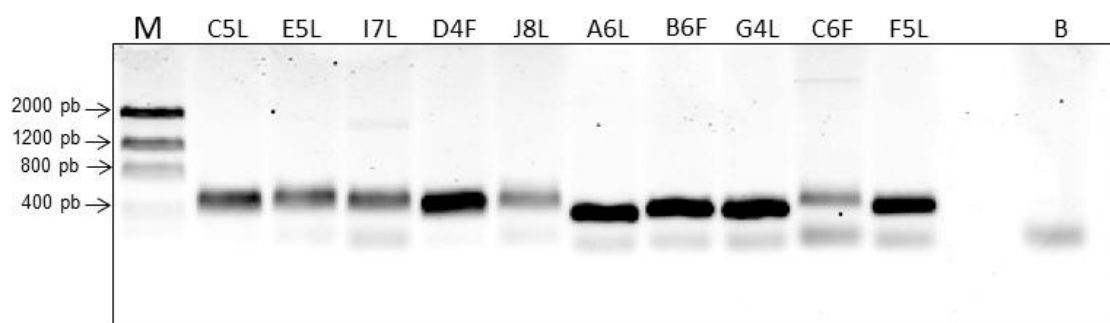


Figura 2.11 - Eletroforese em gel de agarose dos amplicons do gene *nifH* dos isolados de bactérias diazotróficas da Mata Atlântica

Tabela 2.6 – Identidade e cobertura das sequências de rRNA 16S e nifH comparadas com outras sequências depositadas no GenBank (NCBI).

Isolados	Origem	Descrição	Sequências mais similares no banco de dados	Cobertura		E-valeu	Score
				(%)	(%)		
rRNA 16S							
A6L	Liteira	NR_074913.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> MGH 78578 strain ATCC 700721	100	99	0.0	2673
B6F	Folha	NR_037085.1	<i>Raoultella terrigena</i> strain 84	100	99	0.0	2531
C5L	Liteira	NR_037085.1	<i>Raoultella terrigena</i> strain 84	100	99	0.0	2512
C6F	Folha	NR_024996.1	<i>Raoultella planticola</i> strain ATCC 33531	99	99	0.0	963
D4F	Folha	NR_074913.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> MGH 78578 strain ATCC 700721	100	99	0.0	2680
E5L	Liteira	NR_074913.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> MGH 78578 strain ATCC 700721	100	99	0.0	2684
F5L	Liteira	NR_074913.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> MGH 78578 strain ATCC 700721	100	99	0.0	2571
G4L	Liteira	NR_074913.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> MGH 78578 strain ATCC 700721	100	99	0.0	2700
I7L	Liteira	NR_074913.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> MGH 78578 strain ATCC 700721	100	98	0.0	701
J8L	Liteira	NR_037084.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i> strain R-70	100	99	0.0	2357
nifH							
A6L	Liteira	FJ593769.1	<i>Klebsiella</i> sp. P0646 dinitrogenase reductase (<i>nifH</i>) gene	84	99	1,00E-160	575
B6F	Folha	V00631.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> genes <i>nifH</i> and <i>nifD</i> (fragment)	98	92	1,00E-145	525
C5L	Liteira	AY242355.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 342 dinitrogenase reductase	94	95	1,00E-165	592
C6F	Folha	AY846276.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> RP10R3	95	97	1,00E-179	638
D4F	Folha	AY846276.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> RP10R3	97	96	0.0	643
E5L	Liteira	AY846276.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> RP10R3	98	96	1,00E-175	625
F5L	Liteira	AY242355.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 342 dinitrogenase reductase	98	95	1,00E-165	592
G4L	Liteira	AY846276.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> RP10R3	98	97	0.0	652
I7L	Liteira	AY242355.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 342 dinitrogenase reductase	93	97	1,00E-175	625
J8L	Liteira	AY846276.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> RP10R3	98	98	0.0	647

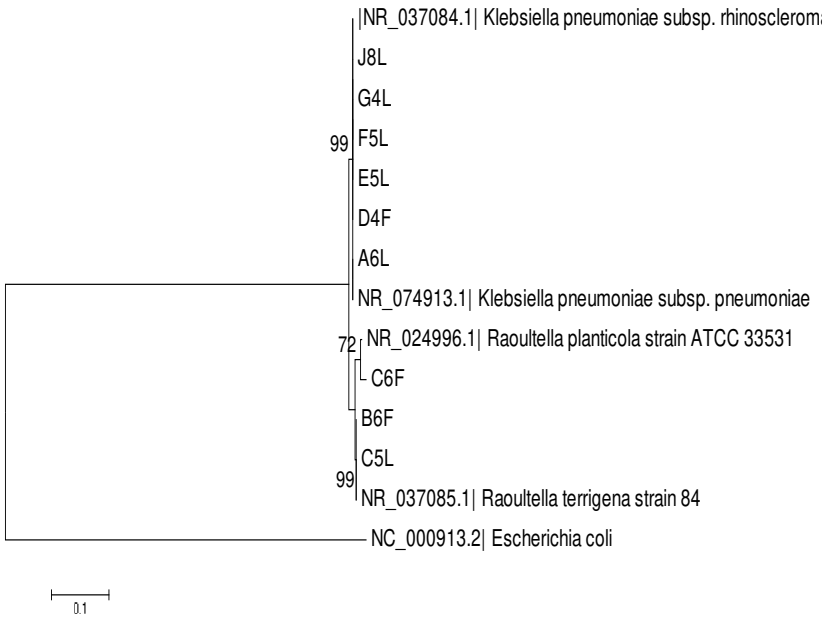


Figura 2.12 - Árvore filogenética determinada pelo método neighbour-joining gerada a partir do parâmetro Kimura 2 e teste de bootstrap com 1000 repetições. Sequências do gene rRNA 16S dos isolados bacterianos diazotróficos de filosfera de bambu da Mata Atlântica.

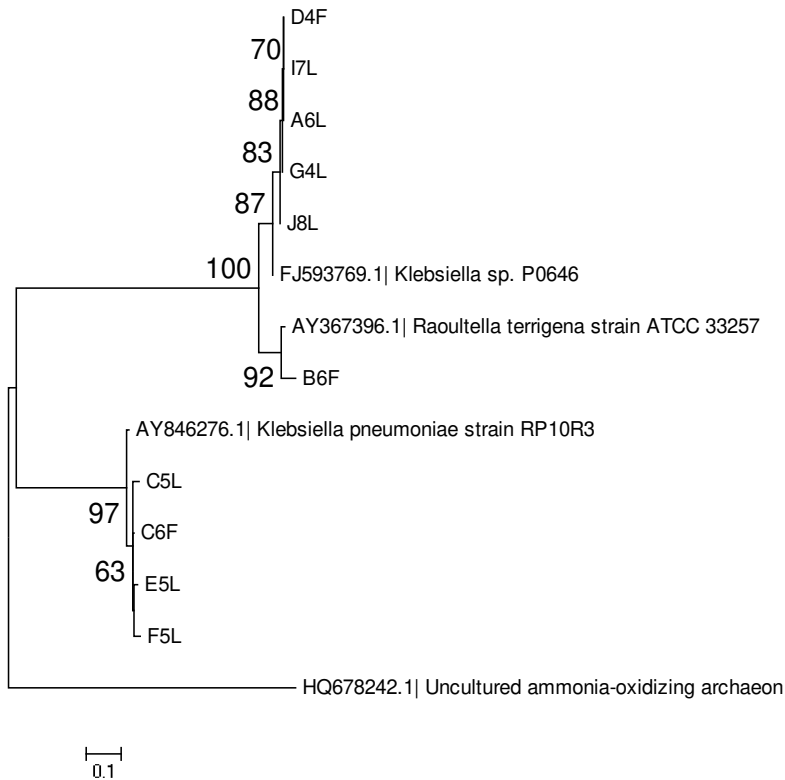


Figura 2.13 – Árvore filogenética determinada pelo método neighbour-joining gerada a partir do parâmetro Kimura 2 e teste de bootstrap com 1000 repetições. Sequências do gene nifH dos isolados bacterianos diazotróficos de filosfera de bambu da Mata Atlântica

Este é o primeiro estudo que identifica bactérias cultiváveis na filosfera de bambu da espécie *M. neesii* similares a família *Enterobacteriaceae*, e o segundo trabalho que identifica bactérias da filosfera de bambu por meio do sequenciamento do gene *nifH*. O primeiro estudo foi realizado por Andreote (2013) com o sequenciamento massivo do gene *nifH* do DNA total da filosfera de *M. neesii*. Neste trabalho foram obtidos 22 UTOs que se afiliaram ao filo *Proteobacteria*, principalmente com espécies que colonizam a filosfera como os gêneros *Nostoc sp* e *Desmonostoc sp* de cianobactérias. De forma similar, Gomez (2012) verificou a ocorrência de grupos de diazotróficos afiliados à esse filo em *M. neesii*, porém por meio de análises de sequências do gene rRNA 16S, o que sugere que a comunidade diazotrófica na filosfera de bambu da Mata Atlântica é dominada por bactéria do filo *Proteobacteria*, e a família *Enterobacteriaceae*.

2.3 Conclusões

No presente trabalho foram identificadas bactérias diazotróficas que colonizam a filosfera de bambu da Mata Atlântica, obtidas por meio de técnicas de isolamento em meio de cultura isento de N. Esses isolados apresentam pelo menos dois mecanismos de promoção de crescimento vegetal direto ou indireto, respostas positivas quanto à capacidade de fixar nitrogênio atmosférico *in vitro*, produzir AIA, quitinases, sideróforos e ACC desaminase, além de solubilizar fosfato de cálcio nas condições testadas.

Os isolados foram classificados taxonomicamente ao filo *Proteobacteria*, e aos gêneros *Enterobacter*, *Klebsiella sp.* e *Serratia*. Os isolados mais promissores foram caracterizados quanto a presença do gene *nifH* e sequenciamento completo do gene rRNA 16S, confirmando assim seu caráter diazotrófico e sua afiliação à família *Enterobacteriaceae*.

Referências

ALEXANDER, D.B.; ZUBERER, D.A. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. **Biology and Fertility of Soils**, Belin, v. 12, n. 1, p. 39-45, 1991.

ALMETHYEB, M., RUPPEL, S., PAULSEN, H.M., VASSILEV, N., EICHLER-LÖBERMANN, B. Single and combined applications of arbuscular mycorrhizal fungi and *Enterobacter radicincitans* affect nutrient uptake of faba bean and soil biological

characteristics. **Applied Agriculture and Forestry Research**, London, 3, p. 229–234. 2013

ASERSE, A.A.; RÄSÄNEN, L.A.; ASEFFA, F.; HAILEMARIAM, A.; LINDSTRÖM, K. Diversity of sporadic symbionts and nonsymbiotic endophytic bacteria isolated from nodules of woody, shrub, and food legumes in Ethiopia. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 97, n. 23, p. 10117–10134, 2013.

ASIS, C.A.; ADACHI, K. Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweet potato stem in Japan. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 38, p.19–23, 2003.

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, Jena, v. 163, n. 2, p. 173-181, 2008.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. “Basic local alignment search tool.” **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v.215, p. 403-410, 1990.

ANDREOTE, A.P.D. **Filosfera da Mata Atlântica: isolamento e sistemática de cianobactérias, bioprospecção e caracterização da comunidade diazotrófica.** 2013. 153p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

ANDREWS, J.H.; HARRIS, R.F. The ecology and biogeography of microorganisms of plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.38, p.145-180, 2000.

ARNOLD, W.; RUMP, A.; KLIPP, W.; PRIEFER, U.B.; PÜHLER, A. Nucleotide sequence of a 24,206 base pair fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Molecular Biology**, England, v.203, p.715-738, 1988.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p. 911-922, 1997.

BALOTA, R.L.; LOPES, E.S.; HUNGRIA, M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, p.1265-1276, 1999.

BARRA, V.R.; ROMEIRO, R.S.; FERRAZ, H.G.M.; MACAGNAN, D.; SILVA, H.S.A.; MOURA, A.B.; HALFELD-VIEIRA, B. A; MENDONÇA, H.L.; VIEIRA JÚNIOR, J.R. Potencialidade antagonística em alguns procariotas agentes de biocontrole de enfermidades de plantas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.34, n.2, p.121-126, 2008.

BEATTIE, G.A. Leaf surface waxes and the process of leaf colonization by microorganisms. In: LINDOW, S.E.; HECHT-POINAR, E.I.; ELLIOTT, V.J. (Ed.). **Phyllosphere Microbiology**, St. Paul, 2002. p. 3–26.

BEHAR, A.; YUVAL, B.; JURKEVITCH, E. Enterobacteria-mediated nitrogen fixation in natural populations of the fruit fly *Ceratitis capitata*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n. 9, p. 2637–2643, 2005.

BODDEY, R.M.; BODDEY, L.H.; URQUIAGA, S. **A técnica de redução de acetileno na medição da fixação biológica de nitrogênio**. Itaguaí: Editora Universidade Rural, 1990. 37p. (EMBRAPA-CNPBS. Documentos, 6).

BRANDL, M.T.; LINDOW, S.E. Contribution of indole-3-acetic acid production to the epiphytic fitness of *Erwinia herbicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.3256-3263, 1998.

BRENNER, D.J.; FARMER, J.J. Family I. *Enterobacteriaceae*. In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2nd ed. The *Proteobacteria* pt B: The *Gammaproteobacteria*. USA: Springer, 2005. p.587-607.

BRUCE, T.I.B.; MARTINEZ, O.; MAIA NETO, A.C.; VICENTE, R.H.; KRUGER F.L. Bacterial community diversity in the Brazilian Atlantic forest soils. **Microbial Ecology**, New York, v.60, p. 840–849, 2010.

BRUIJN, F.I.; RADEMAKER, J.; SCHNEIDER, M.; ROSSBACH, U.; LOUWS, F.I. Rep-PCR genomic fingerprinting of plant-associated bacteria and computer-assisted phylogenetic analyses. In: STACEY, G.; MULLIN, B.; GRESSHOFF, P., (Ed.). *Biology of Plant-Microbe Interaction*. INTERNATIONAL CONGRESS OF MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS, 8., 1996. Knoxville. **Proceedings...** Knoxville:APS Press, 1996. p. 497-502.

CORPE, W.A.; RHEEM, S. Ecology of the methylotrophic bacteria on living leaf surfaces. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.62, p.243–249, 1989.

CUNHA, G.M.; GAMA-RODRIGUES, A.; GAMA-RODRIGUES, E.F.; VELLOSO, A.C.X. Biomassa e estoque de carbono e nutrientes em florestas montanas da mata atlântica na região norte do estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.33, p. 1175-1185, 2009.

CUSACK, D.F.; SILVER, W.; McDOWELL, H. Biological nitrogen fixation in two tropical forest: Ecosystem-level patterns and effects of nitrogen fertilization. **Ecosystem**, New York, v, 12, p. 1299-1315, 2009.

DE VLEESCHAUWER, D.; HÖFTE, M. Using *Serratia plymuthica* to control fungal pathogens of plant. **CAB Reviews**, Wallingford, v.2, p.46, 2007.

DÖBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, p. 1-13, 1992.

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

EMBAYE, K.; WEIH, M.; LEDIN, S.; CHRISTERSSON, L. Biomass and nutrient distribution in a highland bamboo forest in southwest Ethiopia: implications for management. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v.204, n.2/3, p.159-169, 2005.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred.II error probabilities, **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v.8, p.186-194, 1998.

FILGUEIRAS, T.S.; SHIRASUNA, R.T. Redescoberta de espécies presumivelmente extintas de Poaceae da Flora de São Paulo, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v.36, p.507-509, 2009.

FILHO, G.N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, n. 1, p. 311–319, 2000.

FRY, S.C. Cellulases, hemicelluloses and auxin-stimulated growth: a possible relationship. **Physiologia Plantarum**, Kopenhagem, v. 75, p. 532–536, 1989.

GABY, J.C.; BUCKLEY, D.H. A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the *nifH* gene of nitrogenase. **PLoS one**, San Francisco, v. 7, n. 7, p. e42149, 2012.

GAMALERO, E.; BERTA, N.; MASSA, N.; GLICK, B.R.; LINGUA, G. Synergistic interactions between the ACC deaminase-producing bacterium *Pseudomonas putida* UW4 and the AM fungus *Gigaspora rosea* positively affect cucumber plant growth. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam v. 64, p. 459-467, 2008.

GILLER, K.E. Use and abuse of acetylene reduction assay for measurement of “associative nitrogen fixation”. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 783-784, 1987.

GLICK, B.R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 251, p. 1–7, 2005.

GOLDBERG, R. Cell wall polysaccharidase activities and growth processes: a possible relationship. **Physiologia Plantarum**, Kopenhagem, v. 50, p. 261–264, 1980.

GOMEZ, S.P.M. **Diversidade de bactérias diazotróficas e fixação biológica do nitrogênio na Mata Atlântica**. 2012, 107p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R.J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida*

or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, n. 8, p. 1968-1977, 2007.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; MATHAN, N.; REDDY, P.M.; REINHOLD-HUREK, B.; LADHA, J. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.183, n. 8, p. 2634 – 2645, 2001.

HAN, S.O.; NEW, P.B. Variation in nitrogen fixing ability among natural isolates of *Azospirillum*. **Microbial Ecology**, New York, v.36, p.193-201, 1998.

HARA, F.A.S.; OLIVEIRA, L.A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álcalis de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 34, n. 3, p. 343-357, 2004.

HASHIDOKO, Y.; TADA, M.; TAHARA, S. Soft gel médium solidified with gellan gum for preliminary screening for root-associated, free-living nitrogen-fixing bacteria inhabiting the rhizosphere of plants. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v.66, p.2259-2263, 2002.

HEDIN, L.O.; BROOKSHIRE, E.N.J.; MENGE, D.N.L.; BARRON A.R. The nitrogen paradox in tropical forest ecosystems. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v.40, p.613–635, 2009.

HERRERA, R. Nutrient cycling in Amazonian Forest. In: PRANCE, G.T.; LOVEJOY, T.E. (Ed.). **Amazonia: key environments**. Oxford: Pergamon Press, 1985. p. 95-105.

HSU, S.C.; LOCKWOOD, J.L. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v.29, n.3, p.422-426, 1975.

HOLLAND, M.A.; POLACCO, J.C. Urease-null and hydrogenase-null phenotypes of a phylloplane bacterium reveal altered nickel metabolism in two soybean mutants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 98, p.942–948. 1992.

HOWARD, J.B.; REES, D.C. Structural basis of biological nitrogen fixation. **Chemical Review**, Easton, v.96, p. 2965–2982, 1996.

IDRIS, R.; TRIFONOVA, R.; PUSCHENREITER, M.; WENZEL, W.W.; SESSITSCH, A. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, p.2667–2677, 2004.

JACOBSON, C.B.; PASTERNAK, J.J.; GLICK, B.R. Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 40, p.1019-1025, 1994.

JOLY, C.A.; MARTINELLI, L.A. A floresta inesperada. **Pesquisa FAPESP**, São Paulo, v. 154, p. 86-87, 2008.

- JUDZIEWICZ, E.J.; CLARK, L.G.; LONDONO, X.; STERN, M.J. **American Bamboos**. Washington and London: Smithsonian Institution Press, 1999. 392p.
- KAMPFER, P.; RUPEL, S.; REMUS, R. *Enterobacter radicincitans* sp. nov., a plant growth promoting species of the family *Enterobacteriaceae*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart v.28, p. 213–221, 2005.
- KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; AND CAMPO, R.J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.32, p. 210-220, 2006.
- KAVAMURA, V. N. SANTOSA, S.N., SILVA, J.L.; PARMA, M.M.; ÁVILA, L.A.; VISCONTI, A; ZUCCHI, T.D.; TAKETANIA, R.G.; ANDREOTE, F.D.; MELO, I.S. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological research**, Jena, v. 168, n. 4, p. 183–91, 6 2013.
- KLEINHENZ, V.; MIDMORE, D. J. Aspects of bamboo agronomy. **Advances in Agronomy**, New York, v.74, p.99-149, 2001.
- KREUTZER, R.; STEIBL, H.-D.; DAYANANDA, S.; DIPPE, R.; HALDA, L.; BUCK, M.; KLINGMÜLLER, W. Genetic characterization of nitrogen fixation in *Enterobacter* strains from the rhizosphere of cereals. In: POLSINELLI, M.; MATERASSI, R.; VINCENZINI, M., ed. **Nitrogen Fixation**. Dordrecht; Kluwer Academic, 1991. p.25-36.
- LAGUERRE. G.; BERKUM. P.; AMARGER.N.; PRÉVOST. D. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v. 63, p. 4748-4758 1997.
- LAMBAIS, M.R.; CROWLEY, D.E.; CURY, J.C.; BULL, R.C.; RODRIGUES, R.R. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic Forest. **Science**, Washington, v.312, p.1917-1917, 2006.
- LAMBAIS, M.R.; LUCHETA, A.R.; CROWLEY, D.E. Bacterial Community Assemblages Associated with the Phyllosphere, Dermosphere, and Rhizosphere of Tree Species of the Atlantic Forest are Host Taxon Dependent. **Microbial Ecology**, New York, v.3,p. 567-574, 2014.
- LI, J.; GLICK, B.R. Transcriptional regulation of the *Enterobacter cloacae* UW4 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene (*acdS*). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 259-267, 2001.
- LIN, L.; LI, Z.; HU, C.; ZHANG, X.; CHANG, S.; YANG, L.; LI, Y. AN, Q. Plant Growth-Promoting Nitrogen-Fixing *Enterobacteria* Are in Association with Sugarcane Plants Growing in Guangxi, China. **Microbes and Environments**, Tagajo, v. 27, n. 4, p. 391–398, 2012.

LINDOW S.E.; BRANDL, M.T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 1875-1883, 2003.

LIFSHITZ, R.; KLOPPER, J.W.; SCHER, F.M.; TIPPING, E.M.; LALIBERTÉ, M. Nitrogen-fixing pseudomonas isolated from roots of plants grown in the Canadian High Artic. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 51, n. 2, p. 251-255, 1986.

LIU, Y.; WANG, H.; SUN, X.; YANG, H.; WANG, Y.; SONG, W. Study on Mechanisms of Colonization of Nitrogen-Fixing PGPB, *Klebsiella pneumoniae* NG14 on the root surface of rice and the formation of biofilm. **Current Microbiology**, New York, v.62, p.1113-1122. 2011.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S. *Methylobacterium pseudosasa* sp. nov., a pink-pigmented, facultatively methylotrophic bacterium isolated from the bamboo phyllosphere. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 105, n. 2, p. 367–376, Feb. 2014.

MARCHESI, J.R. ;TAKUICHI, S.; WEIGHTMAN, A.J.; MARTIN,T.A.; FRY, J.C.; HIOM. S.J.; WADE.W.G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.795-799, 1998.

MARIN, V.A.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.R.S. ; BALDANI, J.I. **Fixação biológica de Nitrogênio**: Bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical. Seropédica, 1999. 34p., (Série Documentos. Embrapa Agrobiologia).

MARTINS, S.C. **Caracterização dos solos e serrapilheira ao longo do gradiente altitudinal da Mata Atlântica, Estado de São Paulo**. 2010. 155p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K.V. **Five kingdoms**: an illustrated guide to the phyla of life on earth. 3rd . ed. New York: WH Freeman, 1998. 520p.

MARRA, L.M.; SOARES, C.R.F.S.; OLIVEIRA, S.M. de; FERREIRA, P.A.A.; SOARES, B.L.; CARVALHO, R. de F.; LIMA, J.M. de; MOREIRA, F.M. de S. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, The Hague, v.357, p.289-307, 2012.

MECHABER, W.L.; MARSHALL, D.B.; MECHABER, R.A.; JOBE, R.T. ;CHEW, F.S. Mapping leaf surface landscapes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.93, p. 4600–4603, 1996.

MENDES, S.C.; MOLICA, S.G.; FERREIRA, R.L.C.; CÉSPEDES, G.H.G. Absorção e distribuição de nutrientes em plantios comerciais de bambu (*bambusa vulgaris*) no nordeste do Brasil. **Revista Árvore**, Viçosa, v.34, n.6, p.991-999, 2010.

MENNA, P.; PEREIRA, A.A.; BANGEL, E.V.; HUNGRIA, M. rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. **Symbiosis**, Netherlands, v. 48, p. 1-3, 2009.

MIRZA, B.S.; RODRIGUES, J.L.M. Development of a Direct Isolation Procedure for Free-Living Diazotrophs under Controlled Hypoxic Conditions **Applied and Environmental Microbiology**, Washington. v. 78(16):5542, 2012.

MONTAÑEZ, A.; BLANCO, A.R.; BARLOCCO, C.; BERACOCHEA, M.; SICARDI, M. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 58, p. 21-28, 2012.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v.403, p. 853-858, 2000.

MWAJITA, M.R. MURAGE, H.; TANI, A.; KAHANGI, E.M. Evaluation of rhizosphere, rhizoplane and phyllosphere bacteria and fungi isolated from rice in Kenya for plant growth promoters. **SpringerPlus**, Switzerland, v. 2, p. 606, 2013.

NEILANDS, J.B. Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 270, n. 45, p. 26723–26726, 1995.

OGUT M, ER F, KANDEMIR N . Phosphate solubilization potentials of soil Acinetobacter strains. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.46, p.707–715, 2010.

ØVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F.L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR- amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3367-3373, 1997.

PADGURSCHI, M.C.G. **Composição e Estrutura arbórea de um Trecho de Floresta Ombrófila Densa Montana com Taquaras na Mata Atlântica**. 2010. 133p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, p.3795–3801, 2002.

PECK, S.C.; KENDE, H. Sequential induction of the ethylene biosynthetic enzymes by indole-3-acetic acid in etiolated peas. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v.28, p. 293-301, 1995.

PEDRINHO, E.A.N. **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays* L.)** 2007. 87p. Tese (Doutorado na área de Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, SP.

PENG, G.; ZHANG, W.; LUO, H.; XIE, H.; LAI, W.; TAN, Z. *Enterobacter oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the wild rice species *Oryza latifolia*, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 59, p.1650–1655, 2009.

PENROSE, D.M.; GLICK, B.R. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. **Physiologia Plantarum**, Lund, v.118, p.10–15, 2003.

RAYMOND, J.; SIEFERT, J.L.; STAPLES, C.R.; BLANKENSHIP, R.E. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 21, n. 3, p. 541-554, 2004.

REED, S.C.; CLEVELAND, C.C.; TOWNSEND, A.R. Tree species control rates of free-living nitrogen fixation in a tropical rain forest. **Ecology**, Davis, v.89, n.10, p.2924–2934, 2008.

REED S.C.; TOWNSEND A.R.; CLEVELAND C.C.; NEMERGUT D.R. Microbial community shifts influence patterns in tropical forest nitrogen fixation. **Oecologia**, Berlin, v.164, p.521–531, 2010.

REED, S.C.; CLEVELAND, C.C.; TOWNSEND, A.R. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: A contemporary perspective. **The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto v. 42, p.489–512, 2011.

RESENDE, A.S. **A fixação biológica de nitrogênio (FBN) como suporte da produtividade e fertilidade nitrogenada dos solos na cultura de cana-de-a c car: uso de adubos verdes**. 2000. 123p. Disserta o (Mestrado na area de Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2000.

RIBEIRO, C. M.; CARDOSO, E. J. B. N. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). **Microbiological research**, Jena, v. 167, n. 2, p. 69–78, 2012.

RICO, L. OGAYA, R.; TERRADAS, J.; PENUELAS, J. Community structures of N₂ - fixing bacteria associated with the phyllosphere of a Holm oak forest and their response to drought. **Plant Biology**, Stuttgart, Germany, v. 16, n. 3, p. 586–593, 2014.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA, J.R.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Suma Phytopathologica**, Botucatu, v.12, p.16, 1986.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology advances**, Oxford ; New York, v. 17, n. 4/5, p. 319–39, Oct. 1999.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; MENDONÇA-HAGLER, L.C. A moderna microbiologia do solo: Aplica o de técnicas de biologia molecular. In: SIQUEIRA, J.

O.; MOREIRA, F.M.S; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FRUTINI-NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/ DCS, 1999. p. 429-448.

SALA, V.M.R.; FREITAS, S.S.; DONZELI, P.; FREITAS J.G.; GALLO, P.B.; SILVEIRA, A.P.D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 29, p.345-352, 2005.

SAMANTA, R.;SEM, S.P. Further observations on the utility of N₂-fixing microorganisms in the phyllosphere of cereals. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 107, 1986, pp 673-680.

SANTOS, E.C.; ARMAS, E.D.; CROWLEY, D.LAMBAIS, M.R. Artificial neural network modeling of microbial community structures in the Atlantic Forest of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 69, p. 101–109, 2014.

SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: USP/ESALQ, 1974. 56p.

SCHINNER, F.; ÖHLINGER, R.; KANDELER E.; R. MARGESIN. 1995. **Methods in soil biology**. Springer: Berlin, p 425.

SENGUPTA, B.; NAUDI, A.S.; SAMANTA, R.K.; PAL, D.; SENGUPTA, D.N.; SEN. S.P. Nitrogen fixation in the phyllosphere of tropical plants: occurrence of phyllosphere nitro- gen-fixing microorganisms in eastern India and their utility for the growth and nutrition of host plants. **Annals of Botany**, London, v.48, p. 705–716. 1981.

SERGEEVA, E.; LIAIMER, A.; BERGMAN, B. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. **Planta**, Berlin, v. 215, p. 229–238, 2002.

SETZER, J. **Atlas climatológico do estado de São Paulo**. Comissão interestadual da bacia do Paraná-Paraguai. São Paulo:Cesp, 1966

SHAHAROONA, B.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). **Letter of Applied Microbiology**, Oxford, v.42 p.155–159, 2006.

SHAHI, S.K.; RAI, A.K.; TYAGI, M.B.; SINHA, R.P.; KUMAR, A. Rhizosphere of rice plants harbor bacteria with multiple plant growth promoting features. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, p. 8296-8305, 2011.

SHAIKH, S.A.; DESHPANDE, M.V. Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.9, p. 468-475,1993.

SHANMUGHAVEL, P.; FRANCIS, K. Biomass and nutrient cycling in bamboo (*Bambusa bambos*) plantations of tropical areas. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.23, n.4, p.431-434, 1996.

_____. The dynamics of biomass and nutrients in bamboo (*Bambusa vulgaris*) plantations. **Journal of Bamboo and Rattan**, v.1, n.2. p.157-170, 2002.

SHIMOSAKA, M.; FUKUMORI, Y.; ZHANG, X.Y.; HE, N.J.; KODAIRA, R.; OKAZAKI M. Molecular cloning and characterization of a chitosanase from the chitosanolytic bacterium *Burkholderia gladioli* strain CHB101. **Applied Microbiology Biotechnology**, Washington, v.54, p. 354-360, 2000.

SHOEBITZ, M.; RIBAUDO, C.M.; PARDO, M.A.; CANTORE, M.L.; CIAMPI, L.; CURÁ, J.A. Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford v.41, p.1768–1774, 2009.

SINGH, M.; KLEEBERGER, A.; KLINGMULLER, W. Location of nitrogen fixation (*nif*) genes on indigenous plasmids of *Enterobacter agglomerans*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v.190, p.373-378, 1983.

SINGH, M.; KLINGMÜLLER, W. Cloning of pEA3, a large plasmid of *Enterobacter agglomerans* containing nitrogenase structural genes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.90, p.235- 242, 1986.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism–plant signaling. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 31, p. 425–448, 2007.

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN-JÚNIOR, O.J.; SILVA, E. M. R. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 11, p. 1149-1152, Nov. 2005.

SOUZA, R.; BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; COSTA, P.B.; MEYER, L.; VARGAS, L.K.; SCHOENFELD, R.; PASSAGLIA, L.M.P. The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. **Plant and Soil**, The Hague, v. 366, n. 1/2, p. 585–603, 2012.

TAULÉ, C.; MAREQUE, C.; BARLOCCO, C.; HACKEMBRUCH, F.; REIS, V.M.; SICARDI, M.; BATTISTONI, F. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community, **Plant and Soil**, The Hague, v.356, p.35-49, 2011.

TIAN, F.; DING, Y.; ZHU, H.; YAO, L.; DU, B. Genetic diversity of siderophore-producing bacteria of tobacco rhizosphere. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.40, p.276–284, 2009.

TRIPATHI, S. K.; SUMIDA, A.; SHIBATA, H.; ONO, K.; UEMURA, S.; KODAMA, Y.; HARA, T. Leaf litterfall and decomposition of different above- and belowground parts of birch (*Betula ermanii*) trees and dwarf bamboo (*Sasa kurilensis*) shrubs in a young secondary forest in Northern Japan. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin v. 43, n. 2, p. 237-246, 2006.

TROTSSENKO, Y.A.; IVANOVA, E.G.; DORONINA, N.V. Aerobic methylotrophic bacteria as phytosymbionts. **Microbiology**, Moskva, v.70, n.6, p.623-632, 2001.

TU, L.; HU, T.; ZHANG, J.; HUANG, L.; XIAO, Y.; CHEN, G.; HU, H.; LIU, L.; ZHENG, J.; XU, Z.; CHEN, L. Nitrogen distribution and cycling through water flows in a subtropical bamboo forest under high level of atmospheric deposition. **PloS one**, San Francisco, v. 8, n. 10, p. e75862, 2013.

UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; SUGUCHI, T. Genetic diversity of N₂ fixing bacteria associated with rice roots by molecular evolutionary analysis of a *NifD* library. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.41, p.235–240, 1995.

VELOSO, H.P.; RANGEL FILHO, A.L.R.; LIMA, J.C.A. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: IBGE, 1991. 112p. (Projeto RADAMBRASIL)

VELUSAMY, P.; KIM, K.Y. Chitinolytic activity of *Enterobacter sp.* KB3 antagonistic to *Rhizoctonia solani* and its role in the degradation of living fungal hyphae. **Full Length Research Paper**, Sapele, v. 2, p. 206-214, 2011.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v.5, p.25-40, 1994.

VESSEY, J.K. Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: In defense of the acetylene reduction assay. **Plant and Soil**, The Hague, v.158, n. 2, p.151-162, 1994.

VESSEY, J.K. Plant growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, The Hague, v.255, p.571-586, 2003.

VIDEIRA, S.S.; OLIVEIRA, D.M.; MORAIS, R.F.; BORGES, W.L.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. **Plant and Soil**, The Hague v.356, p.51-66.2012

VITOUSEK, P.M.; CASSMAN, K.; CLEVELAND, C.; CREWS, T.; FIELD, C.B.; GRIMM, N.B.; HOWARTH, R.W.; MARINO, R.; MARTINELLI, L.; RASTETTER, R.B.; SPRENT, J.I. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v.57, p. 1–45, 2002.

VISWANATHAN, R.; SAMIYAPPAN, R. Antifungal activity of chitinases produced by some fluorescent *Pseudomonas* against *Colletotrichum falcatum* Went causing red rot disease in sugarcane. **Microbiological Research**, Jena, v. 155, p.309-314, 2004.

VORHOLT, J.A. Microbial life in the Phyllosphere, **Nature Reviews Microbiology**, London, v.10, p. 828–840, 2012.

YANG, C.H.; CROWLEY, D.E.; BORNEMAN, J.; KEEN, N.T. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, p. 3889–3894, 2001

YASMIN, F.; OTHMAN, R.; SAAD, M.S.; SIJAM, K. Screening for beneficial properties of rhizobacteria isolated from sweetpotato rhizosphere. **Biotechnology**, v.6, p.49–52, 2007.

YOUNG, C. REKHA,P.D.; LAI, W.; ARUN, A.B. Encapsulation of Plant Growth-Promoting Bacteria in Alginate Beads Enriched With Humic Acid. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v 95, n. 1, p.76-83, 2006.

WANG, Q.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M.; COLE, J.R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.73, p. 5261–5267, 2007.

ZEHR J.P., CAPONE D.G. Problems and promises of assaying the genetic potential for nitrogen fixation in the marine environment. **Microbial Ecology**, New York, v.32, p.263–281, 1996.

ZEHR, J.P., JENKINS, B.D., SHORT, S.M. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 539–554, 2003.

3 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BIOFERTILIZANTES COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EPIFÍTICAS

Resumo

Com objetivo de desenvolver novas tecnologias para a produção de biofertilizantes e reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados na agricultura, dois ensaios foram conduzidos em casa-de-vegetação durante 60 dias, avaliando a inoculação de bactérias diazotróficas isoladas da filosfera de bambu da Mata Atlântica em cana-de-açúcar micropropagada. As taxas de FBN foram estimadas em folhas e solo inoculados com as bactérias diazotróficas, através da técnica de redução do acetileno (ARA). O monitoramento das bactérias inoculadas foi feito por meio de PCR quantitativo do gene rRNA 16S durante os 60 dias. O primeiro experimento foi realizado com a inoculação de 10 isolados de bactérias diazotróficas, inoculados individualmente por pulverização foliar em mudas de cana-de-açúcar micropropagadas, com aplicação de N na forma de uréia em doses equivalentes a 0, 30 e 60 kg N ha⁻¹. A inoculação via pulverização foliar mostrou um efeito positivo no desenvolvimento precoce das plantas, promovendo aumento significativo de massa seca de raízes e concentração de N nos tecidos foliares, principalmente 7 dias após a inoculação. Os testes de comparação de médias indicaram que a aplicação de 50% da dose de N recomendada para a cultura (60 kg de N ha⁻¹) reduziu a taxa de FBN na parte aérea das plantas em alguns casos, porém ainda assim os parâmetros agronômicos avaliados foram superiores aos das plantas não-inoculadas. A presença dos isolados inoculados na superfície das folhas foi detectada até o final do experimento. No segundo ensaio, foi realizada a imobilização das células bacterianas por encapsulamento em micro-esferas de alginato. As micro-esferas foram inoculadas no solo no momento do transplante das mudas micropropagadas, juntamente com N na forma de uréia em doses equivalentes a 0, 30 e 60 kg N ha⁻¹. Os isolados encapsulados apresentaram elevado potencial em promover o crescimento das plantas e fixar N atmosférico. Dentre os tratamentos inoculados, 60% apresentaram médias de massa seca da parte aérea estatisticamente superiores aos controles não-inoculados. Da mesma forma, 40% dos tratamentos apresentaram médias de massa seca de raízes e concentração de N na parte aérea superiores aos controles não-inoculados, principalmente 60 dias após a inoculação. Menores taxas de FBN no solo inoculado foram observadas na presença de N-uréia. A presença dos isolados no solo após 60 dias de inoculação foi confirmada por PCR quantitativo do gene rRNA 16S. Em geral, foi possível observar um melhor desenvolvimento das plantas de cana-de-açúcar em tratamentos inoculados com as bactérias diazotróficas, mais precocemente quando aplicadas sobre as folhas e mais tardiamente quando o inoculante foi aplicado no solo com metade da dose de N recomendada para a cultura. Novos testes devem ser realizados em condições de campo para confirmar a eficiência agronômica dos isolados. Porém, os resultados em casa-de-vegetação indicam que a inoculação de bactérias diazotróficas epifíticas em cana-de-açúcar micropropagada é uma tecnologia promissora para uso na agricultura.

Palavras-chave: Filosfera; Nitrogênio; Cana-de-açúcar; Encapsulamento; Fixação biológica de N

Abstract

Aiming to develop new technologies for the production of biofertilizers, and reduction in the use of nitrogen fertilizers in agriculture, two experiments were carried out under greenhouse conditions for 60 days, evaluating the inoculation of diazotrophic bacteria isolated from the phyllosphere of bamboo from the Atlantic Forest in micropropagated sugarcane plantlets. The rates of BNF were estimated in leaves and soil inoculated with the diazotrophic bacteria, using the acetylene reduction assay (ARA). The monitoring of inoculated bacteria was performed by quantitative PCR of the rRNA 16S gene during the 60 days of incubation. The first experiment was performed by inoculating individually 10 diazotrophic bacterial isolates, using foliar spray, on plantlets of micropropagated sugarcane, with the application of N as urea at the equivalent to 0, 30 and 60 kg N ha⁻¹. The inoculation through foliar spray showed a positive effect on plant growth at early stages of development, promoting a significant increase in dry root biomass and N concentration in shoots, mostly at 7 days after inoculation. The application of the equivalent to 50% of the recommended nitrogen dose (60 kg N ha⁻¹) resulted in reduced BNF rates in the shoots of plants of some treatments. However, the agronomic parameters evaluated were better than in not-inoculated plants. The inoculated bacteria were detected on the leaves until the end of the experiment. In the second experiment, the immobilization of the bacterial cells was performed by encapsulation in alginate beads. The bacteria were inoculated in the soil at the transplantation of the plantlets, along with the addition of N-urea at the equivalent to 0, 30 and 60 kg N ha⁻¹. The encapsulated isolates showed high potential for promoting plant growth and fixing atmospheric N. 60% of the inoculated treatments showed means of shoot dry mass statistically higher than the not-inoculated controls. In addition, 40% of inoculated treatments showed root dry mass and N concentration in the shoots higher than the not-inoculated controls, mostly 60 days after inoculation. The lowest BNF rates were observed in the presence of N-urea. The presence of the inoculated bacteria in the soil 60 days after inoculation was confirmed by qPCR of the rRNA 16S gene. In general, in these experiments, plants inoculated with diazotrophic bacteria showed enhanced growth at early stages when inoculation was on the leaves as free cells, and at late stages when inoculation was in the soil as immobilized cells with half the N dose recommended for the crop. New experiments should be performed under field conditions to confirm the agronomic efficiency of the isolates. However, the results under greenhouse conditions indicate that the inoculation of epiphytic diazotrophic bacteria in micropropagated sugarcane is a promising technology for the agriculture.

Keywords: Phyllosphere; Nitrogen; Sugarcane, Encapsulation, Biological Nitrogen fixation

3.1 Introdução

De acordo com dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), em 2050 existirá no mundo 9 bilhões de pessoas. Para suprir a demanda por alimento e biocombustível, os países deverão investir aproximadamente US\$ 44 bilhões por ano na produção agrícola, cinco vezes mais do que os US\$ 7,9 bilhões que são investidos atualmente. Com esse investimento, a produção de alimentos deverá crescer 60%, valor apontado como necessário para que se atenda essa demanda.

Atualmente o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e também o primeiro na produção de açúcar e etanol. De acordo com levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2014), a área cultivada com cana-de-açúcar que será colhida e destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2014/15 será de aproximadamente 9.130,1 mil hectares, sendo a produção de açúcar estimada em 39,46 milhões de toneladas, 4,17% maior que a produção da safra anterior, e a produção de etanol estimada em 28,37 bilhões de litros.

Para alcançar tamanha produção, são necessárias quantidades cada vez maiores de fertilizantes, principalmente fertilizantes nitrogenados. O N é um dos nutrientes com menor índice de aproveitamento pela cana-de-açúcar, sendo que cerca de 50% de todo o fertilizante aplicado é perdido por lixiviação na forma de nitrato (NO_3^-), contaminando o lençol freático, ou por desnitrificação na forma de óxido nítrico (N_2O), contribuindo para o agravamento do aquecimento global (BRONSON et al., 1997). Algumas alternativas têm sido buscadas para a redução do impacto ambiental que o fertilizante nitrogenado tem causado, e uma delas é a utilização de biofertilizantes contendo bactérias diazotróficas.

Segundo a lei nº6894 de 16 de novembro de 1980, inoculante ou biofertilizante é o produto que contém micro-organismos com ação favorável ao crescimento das plantas (BUCHER; REIS, 2008). Os benefícios que os biofertilizantes com bactérias diazotróficas trazem são por meio da fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfatos, produção de hormônios de crescimento vegetal e proteção contra patógenos (KLOEPPER, 1989; BAREA, 1997). No Brasil, o uso de bactérias diazotróficas para o cultivo de leguminosas, é um processo muito bem sucedido. A inoculação da cultura da soja com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* pode suprir

totalmente o N necessário ao desenvolvimento da cultura . Já em gramíneas, esse processo ainda não está bem estabelecido.

A grande maioria dos inoculantes existentes no mercado para gramíneas, como por exemplo, Azototal, Zea-Nit™, “Fertilizante para milho”, Graminante que já foram mencionados neste trabalho, são compostos por bactérias diazotróficas endofíticas. Os micro-organismos quando se encontram no interior da planta, como no caso das bactérias endofíticas, podem ser reconhecidos como intrusos não benéficos nos tecidos vegetais (*host non-self recognition*) e serem eliminados pelo sistema de defesa vegetal (KOGEL et al., 2006). Desse modo, uma alternativa que tem sido pouco explorada é a utilização de bactérias diazotróficas de vida livre na produção de inoculantes. É possível que os micro-organismos diazotróficos que vivem na superfície das folhas (filosfera) ou na rizosfera apresentem maior vantagem adaptativa em relação aos endofíticos, e possam contribuir de forma mais eficientemente para o suprimento de N para as plantas.

Novos veículos de aplicação de inoculantes têm sido buscados. Desde a década de 70, Bessems e colaboradores (1973) já vinham mostrando que a pulverização em folhas de milho com bactérias diazotróficas podia trazer ganhos significativos para a cultura. Por meio de encapsulamento de bactérias em esferas de alginato, Bashan (1986) verificou um aumento da vida útil das bactérias utilizadas como inoculantes. Sabendo disso e conhecendo o potencial diazotrófico de algumas bactérias diazotróficas de vida livre que foram isoladas da filosfera de *Merostachys neesii* (Bambu) da Mata Atlântica, a utilização das mesmas para elaboração de um novo biofertilizante que promova o crescimento da cana-de-açúcar despertou o interesse para o presente trabalho.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de um biofertilizante produzido para cana-de-açúcar contendo bactérias diazotróficas epifíticas isoladas da Mata Atlântica, aplicadas de duas maneiras, via pulverização foliar ou encapsuladas em esferas de alginato de K e inoculada no solo.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e métodos

3.2.1.1 EXPERIMENTO 1. Inoculação de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar micropropagada por meio de pulverização foliar

Este ensaio teve a finalidade de avaliar a eficiência de aplicação de biofertilizante contendo bactérias diazotróficas de vida livre na superfície das folhas de cana-de-açúcar por meio de pulverização foliar na promoção do crescimento das plantas e avaliar o potencial de fixação biológica de N atmosférico.

O experimento foi realizado em casa-de-vegetação com o plantio de mudas de cana-de-açúcar micropropagadas, variedade RB 855156, em vasos contendo 3 kg solo do horizonte A, predominantemente argiloso, coletado na camada de 0-20 cm em um local próximo à estrada do Paredão Vermelho (22°41'1.45"S; 47°52'1.34"O), no município de Piracicaba, SP. O local escolhido para coleta do solo foi uma área coberta com braquiária cujo manejo foi apenas a roçagem, sem aplicação de fertilizantes. Os atributos do solo utilizado no experimento podem ser vistos na tabela 3.1. O solo recebeu calagem com calcário dolomítico reativo (PRNT 88%) de acordo com a recomendação da cultura e com base da análise química do mesmo. Adubação foi feita com o equivalente a 160 kg de P_2O_5 ha^{-1} e 200 kg de K_2O ha^{-1} na forma de adubo formulado NPK (0-4-28) e superfosfato simples, além de 1 mL de solução de Fe-EDTA e 1mL de solução de micronutrientes da solução nutritiva de Hoagland por vaso (SARRUGE, 1975).

Tabela 3.1 - Análise química do solo utilizado nos experimentos

	pH (CaCl ₂)	M.O g.dm ⁻³	P (resin) mg.dm ⁻³	K	Ca	Mg	H+Al	Al	Base Sum	CEC	Sat. Base V%	Sat. Al m%	S - SO ₄ mg.dm ⁻³
0-20 cm	5	18	9	1,8	7	5	20	0	14	34	41	0	8

Foram selecionados 10 isolados bacterianos com base nos resultados dos testes descritos no capítulo anterior. O experimento foi conduzido em esquema fatorial (10 x 3), constituído de 10 isolados e três doses de adubação nitrogenada, equivalente a 0, 30 e 60 kg de N ha^{-1} na forma de ureia, com três repetições por tratamento. Como controle, foram utilizados tratamentos que não receberam adubação nitrogenada e nem inoculação com as bactérias diazotróficas e tratamentos que receberam o equivalente a 30 e 60 kg de N ha^{-1} sem inoculação com bactérias diazotróficas.

Após uma semana do transplântio das mudas de cana-de-açúcar micropropagadas, cada tratamento recebeu cerca de 40 mL do seu respectivo inóculo foliar com auxílio de um pulverizador de pressão prévia de 1,25L (Figura 3.1). A eficiência do biofertilizante foi avaliada pela determinação do acúmulo de massa seca da parte aérea e raízes e concentração de N na parte aérea das plantas pelo método de digestão por balão Kjeldahl aos 7, 30 e 60 dias após a inoculação (DAI). Para determinação da atividade da nitrogenase nas folhas inoculadas, também foi realizado o teste de redução de acetileno em amostras de folhas de todos os tratamentos.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento e três repetições em cada tempo de coleta, totalizando 297 unidades experimentais.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida de uma classificação de médias em cada período de incubação pelo teste aglomerativo de Scott Knott ($p < 0,05$), de modo a comparar as médias de todos os tratamentos dentro de cada dose com seu respectivo controle (0, 30 ou 60 kg N ha⁻¹). Além disso, também foi determinada a dinâmica da população bacteriana nas folhas de cana-de-açúcar por meio de testes de PCR em tempo real. Para normalização dos dados, as médias de atividade da nitrogenase foram transformadas $(x+1)^{0,5}$. As médias de atividade da nitrogenase e a dinâmica da população bacteriana inoculada foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) pelo programa SISVAR versão 5.1.

3.2.1.1.1 Preparo do inóculo

Os isolados foram cultivados em 50 mL meio de cultura Dyg's (ANEXO B, RODRIGUES NETO et al., 1986) líquido por 24 horas sob agitação constante a 28° C. Após este período, a suspensão bacteriana foi transferida para tubos cônicos e centrifugadas a 4000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 10 mL de solução salina (NaCl 0,85%) para lavagem das células e remoção do nitrogênio do meio. O processo de centrifugação e lavagem foi repetido novamente e o novo pélete foi ressuspendido em 40 mL de solução salina. A absorbância de todas as amostras foi medida a 600 nm e a densidade bacteriana ajustada para 0,6 O.D.mL⁻¹.

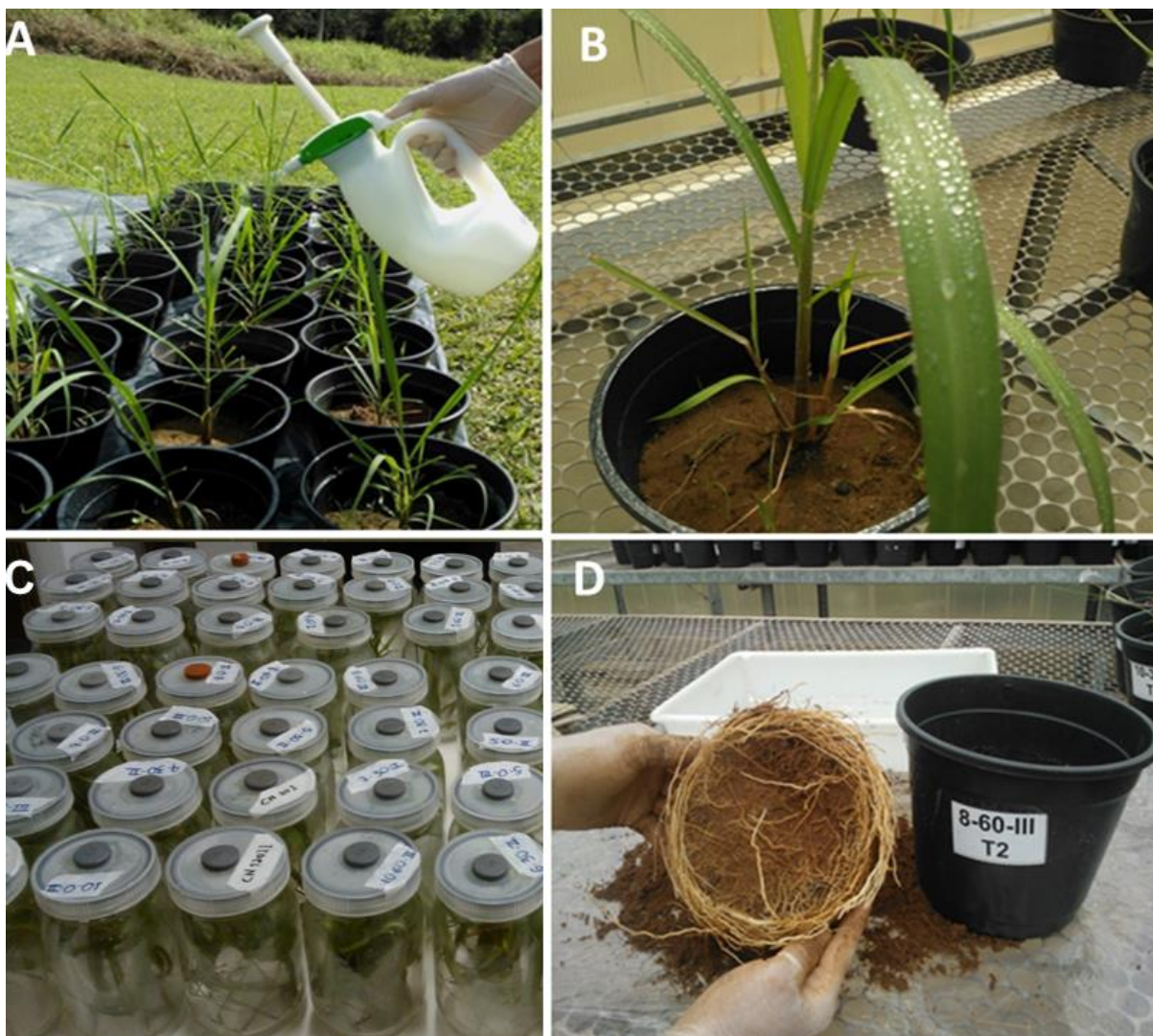


Figura 3.1 - Aplicação do biofertilizante por meio de pulverização foliar. A e B– mudas de cana-de-açúcar recebendo aplicação de biofertilizante foliar, C- teste de redução de acetileno nas folhas de cana-de-açúcar e D- visualização dos resultados obtidos

3.2.1.1.2 Determinação da atividade da nitrogenase nas folhas inoculadas

Todas as plantas inoculadas foram submetidas à análise da atividade da nitrogenase. A parte aérea de cada planta dos tratamentos de 7 e 30 DAI foram inseridas em frascos de vidro de 25 mL, logo após o corte, e as plantas dos tratamentos de 60 DAI foram inseridas em frascos de 1000 mL, os quais em seguida foram vedados. Retirou-se um volume de 10% de ar de cada frasco, e injetou-se o mesmo volume de acetileno. Todas as amostras foram incubadas por 12 horas com temperatura controlada de 20°C no escuro. A concentração de etileno foi determinada por cromatografia gasosa, injetando-se 1 mL de amostra em

cromatógrafo Thermo Scientific, equipado com um detector de ionização por chama (250° C) e uma coluna N Poropak (120° C; Supelco, Bellefonte, Pensilvânia, E.U.A.). Controles negativos foram utilizados a partir da injeção de amostras não incubadas com acetileno.

As taxas de redução de acetileno foram calculadas em nanomoles de acetileno reduzido por grama de massa seca, por hora de incubação, segundo a equação (1):

$$\text{nmol etileno. g}^{-1} \cdot \text{ms. h}^{-1} = \frac{(A-C) \cdot V \cdot P \cdot 100}{MA \cdot ml \cdot R \cdot T \cdot t \cdot \%ms} \quad (1)$$

Onde:

A= quantidade de etileno obtido na amostra após incubação (nl);

C = quantidade de etileno em frascos não incubados;

V = volume “headspace” nos frascos de incubação;

P = pressão de ar sob condições padrão (101300 Pa);

MA = massa da amostra (g)

ml= quantidade de amostra injetada no cromatógrafo (1ml)

R = gás constante (8.314 J. mol⁻¹. K⁻¹);

T = temperatura de incubação (°C);

t = tempo de incubação (h);

% ms = porcentagem de matéria seca da parte aérea

A transformação para quantidade de N fixado foi feita por meio da relação teórica (HARDY et al., 1968), de 1 mol de NH₃, por 3 mols de C₂H₄ formados, segundo a equação (2):

$$\text{N}_2 \text{ fixado em } \mu\text{g de N g}^{-1} \text{ h}^{-1} = \frac{\text{nmol etileno. g}^{-1} \text{ ms h}^{-1}}{3} \times 28 \quad (2)$$

Onde: 28 é a massa molecular do N₂ e 3 o fator de conversão. ms é a massa de matéria seca. As taxas de N fixado nas folhas foram expressas em μg de N g⁻¹ h⁻¹ para definição de N total na parte aérea.

3.2.1.1.3 Dinâmica da população bacteriana na superfície das folhas de cana-de-açúcar inoculadas

Durante o ensaio descrito anteriormente, as folhas das plantas inoculadas também foram submetidas a testes de monitoramento para verificar a sobrevivência das bactérias inoculadas nas folhas da cana-de-açúcar por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Logo após o teste de redução de acetileno descrito no item anterior, a parte aérea das plantas de cana-de-açúcar foi colocada em frascos contendo 500 mL de solução tampão fosfato 0,1M, e sonicadas por 5 minutos a 22,5 kHz em um homogeneizador de células ultrassônico (Misonix Microson XL2000, Cole-Parmer Instrument Company, Illinois, USA). A suspensão bacteriana foi filtrada a vácuo utilizando-se uma membrana Millipore com porosidade de 0,22 µm. Posteriormente as membranas foram armazenadas a -20°C até o processo de extração de DNA.

O DNA da comunidade microbiana foi extraído a partir das membranas filtrantes, utilizando-se o kit “*Fast DNA spin filter*” (MP Biomedicals, Solon, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de DNA foi determinada por fluorescência utilizando-se um fluorímetro *Qubit™* (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos) e kit *Quant-iT™ dsDNA BR* (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos).

Análises de qPCR foram realizadas para quantificação do número de cópias do gene rRNA 16S dos isolados inoculados nas folhas de cana-de-açúcar, utilizando-se os iniciadores descritos por Boye e Hansen (2003) (342-357-f) 5'-GCCAGCAGCCGCGGTAAC-3'; (574-555-r) 5'-TCTACGCATTTACyGCTAC-3', onde k=G,T; y=C,T (203 pb) específicos para o gênero *Klebsiella*. Primeiramente, diluições de um DNA amplificado com os iniciadores específicos de um isolado foram utilizados para a realização da curva padrão. Este serviu como ponto inicial para os cálculos de quantificação do gene rRNA 16S nas amostras e os valores de *C_t*s obtidos para cada amostra em cada tempo foram utilizados para determinar o número de cópias do gene rRNA 16S.

As reações de PCR foram realizadas em solução contendo 1 µL de DNA a uma concentração de 1 ng, 2 µM de cada iniciador a uma concentração de 10 µM, 5 µL do kit *Platinum® quantitative PCR Super Mix-UDG* (Invitrogen, São Paulo, Brasil), e o volume final ajustado para 10 µL. As amplificações foram realizadas em

termociclador *Rotor Gene 6000* (Corbett Life Science, Austrália), em triplicata, nas seguintes condições: 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 10 minutos, 60 °C por 15 minutos e 72 °C por 20 segundos, com a detecção da fluorescência no final da extensão de cada ciclo.

A aquisição dos dados foi feita por meio do *software Rotor Gene Real Time Analysis 1.7.65* (Corbett), que calcula valores de cycle threshold (*Ct*), correlação logarítmica (R^2) entre o número de ciclos e a quantidade de DNA nas amostras além da eficiência da reação (*F*). Controles sem inoculação também foram avaliadas para verificar possível contaminação do experimento.

3.2.1.2 EXPERIMENTO 2. Inoculação de bactérias diazotróficas encapsuladas em micro-esferas de alginato em cana-de-açúcar micropropagada

Este ensaio teve a finalidade de avaliar a metodologia de aplicação do biofertilizante contendo as mesmas bactérias diazotróficas testadas anteriormente, porém imobilizadas em esferas de alginato.

Neste experimento foram avaliados a promoção de crescimento das plantas e o potencial de fixação biológica de nitrogênio atmosférico das bactérias aplicadas no solo. Adicionalmente foi realizado o monitoramento das bactérias ao longo do período do experimento.

O experimento foi realizado em casa-de-vegetação com o transplântio de mudas de cana-de-açúcar micropropagadas, variedade RB 83-5054, em vasos contendo 3 kg solo, como descrito no experimento anterior. A inoculação foi realizada com os mesmos 10 isolados bacterianos. Foram usadas três doses de nitrogênio na forma de ureia equivalente a 0, 30 e 60 kg de N ha⁻¹, e adicionados 3 gramas do inóculo fresco no solo de cada vaso e em seguida as mudas foram transplantadas. Foram feitas coletas em três diferentes tempos: 7, 30 e 60 DAI.

O efeito da inoculação foi avaliado por meio da determinação do acúmulo de massa seca da parte aérea e raízes e acúmulo de N na parte aérea das plantas. Além disso, também foi estimada a taxa de FBN e as populações bacterianas em todos os tratamentos.

Foi utilizado o mesmo esquema fatorial do experimento anterior, além de controles sem adubação nitrogenada com a inoculação de esferas sem bactérias e controle com a adubação crescente de N com a inoculação de esferas sem

bactérias. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e em cada período de incubação e de acordo com as doses de N aplicadas. Para o teste de atividade da nitrogenase e para a dinâmica da população bacteriana inoculada, as médias foram comparadas pelo teste aglomerativo de Scott-Knott ($p < 0,05$) pelo programa SISVAR versão 5.1.

3.2.1.2.1 Preparo do inóculo

Para imobilização das bactérias diazotróficas, neste ensaio foram utilizadas esferas produzidas de alginato. As culturas puras dos mesmos 10 isolados utilizados no experimento anterior foram cultivadas em 100 ml de meio de cultura Dyg's (RODRIGUES NETO et al., 1986) por 24 horas a 30°C sob agitação de 200 rpm com três repetições por isolado. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes em solução salina (0,85%) para concentração das células e remoção do nitrogênio do meio de cultura. O processo de centrifugação e lavagem foi repetido novamente e o novo pélete ressuspendido em 40 mL de solução salina. A absorbância de todas as amostras foi medida a 600 nm e a densidade bacteriana ajustada para 0,6 O.D.mL⁻¹.

As esferas foram produzidas a partir da diluição de alginato de potássio (2%) no meio de cultura líquido contendo as bactérias, e a partir disto, foi realizado um gotejamento em 300 ml de solução de CaCl₂ (4%) onde foram incubados por 3 horas. Logo após o preparo das esferas, uma parcela das mesmas foi separada para análise da viabilidade das bactérias após o encapsulamento, e o restante foi levado para casa-de-vegetação para inoculação no momento do transplante das mudas de cana-de-açúcar (Figura 3.2). Esferas somente com meio de cultura, sem bactérias, foram utilizadas nos tratamentos controle.

Para avaliação da viabilidade das bactérias após o encapsulamento, foi utilizada a metodologia descrita por Ivanova e colaboradores (2005). 10 esferas foram separadas de cada tratamento e dissolvidas em 10 ml de solução de tricitrato de sódio (10% v/v), sob agitação constante por 30 minutos. Após este período, foi realizada uma diluição seriada em solução salina (0,85% NaCl), e posteriormente o plaqueamento no meio de cultura de origem. As placas foram incubadas a 28° C por 7 dias e o total de UFC/ml foi contado.

3.2.1.2.2 Determinação da atividade da nitrogenase

Amostras de solo foram coletadas de todos os vasos aos 7, 30 e 60 DAI com auxílio de anéis de PVC de 3,5 cm de diâmetro, a uma profundidade de 10 cm. Os anéis foram inseridos em frascos de vidro de 25 ml e vedados. Retirou-se um volume de 10% de ar de cada frasco, e injetou-se o mesmo volume de acetileno correspondente. Todas as amostras foram incubadas por 12 horas. A concentração de etileno foi determinada por cromatografia gasosa, injetando-se 1 mL de amostra da atmosfera dos frascos em cromatógrafo Thermo Scientific, equipado com um detector de ionização por chama (250° C) e uma coluna N Poropak (120° C; Supelco, Bellefonte, Pensilvânia, E.U.A.). Controles negativos constituído de ar atmosférico foram incubados sem acetileno.

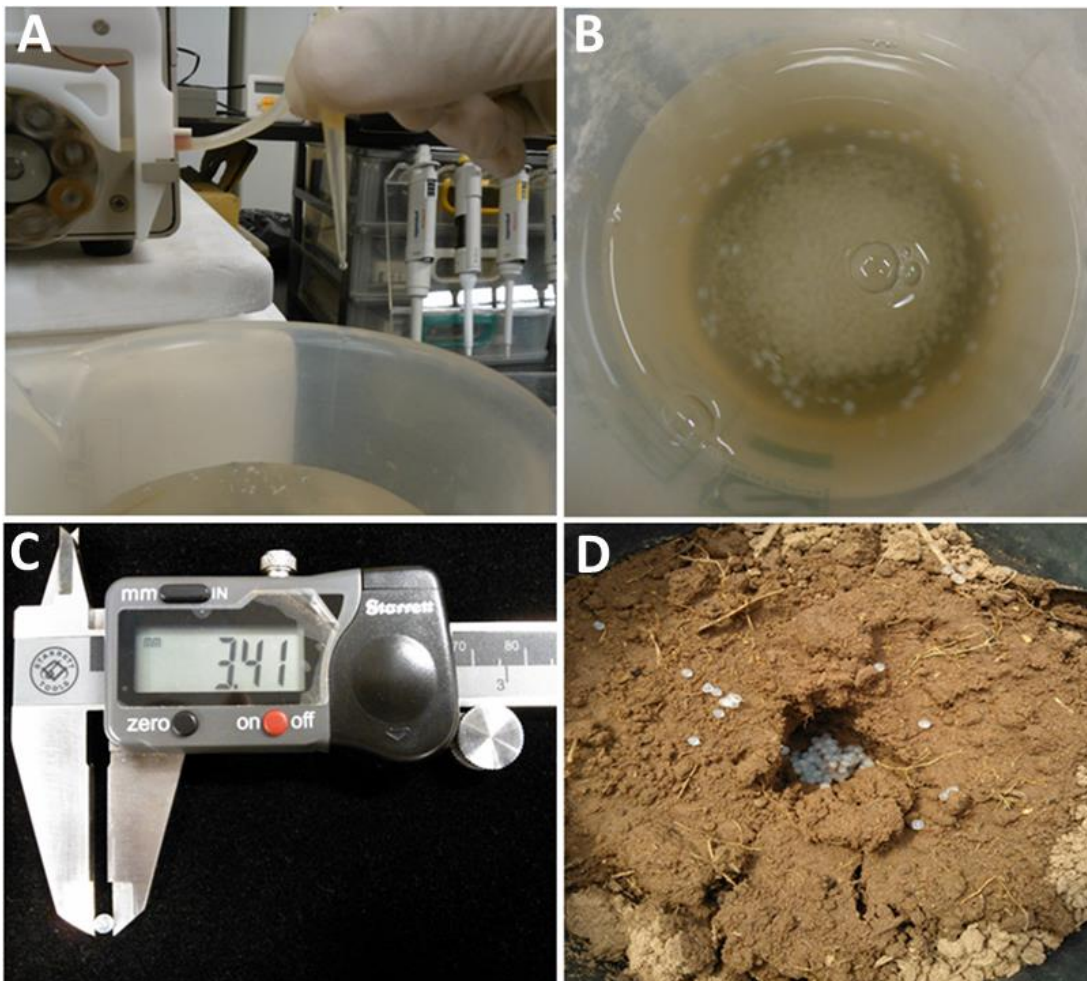


Figura 3.2 – Preparo das micro-esferas de alginato de contendo bactérias diazotróficas epifíticas isoladas da Mata Atlântica e inoculação no solo. **A e B**- procedimento para produção das esferas de alginato. **C**- diâmetro das esferas produzidas, **D**- inoculação nos vasos antes do plantio.

3.2.1.2.3 Dinâmica da população bacteriana no solo

Após o teste de redução de acetileno descrito no item anterior, as amostras de solo foram submetidas a extração de DNA para monitoramento das bactérias inoculadas por meio de análise de PCR quantitativo (qPCR), seguindo o mesmo procedimento do experimento anterior. O DNA total do solo foi extraído de 0,5 g de cada amostra, utilizando-se o *Fast DNA Kit* (Qbiogene, Irvie, CA, USA), de acordo com instruções do fabricante. A concentração do DNA foi determinada por fluotimetria utilizando-se um fluorímetro *Qubit™* (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos) e o kit *Quant-iT™* dsDNA BR (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos).

Os mesmos iniciadores e a mesma curva padrão utilizadas no experimento anterior foram utilizados nesta avaliação. As amplificações de PCR foram realizadas em solução contendo 1 µL de DNA a uma concentração de 1ng, 2 µM de cada iniciador, 5 µL de Platinum SYBR-Green qPCR Super Mix-UDG 2X (Invitrogen, São Paulo, Brasil), para um volume final de 10 µL, em termociclador *Rotor Gene 6000* (Corbett Life Science, Austrália), em triplicata. A ciclagem usada foi: 95° C por 10 minutos, 40 ciclos de 95° C por 10 minutos, 60° C por 15 minutos e 72° C por 20 segundos, com a detecção da fluorescência no final da extensão de cada ciclo.

A aquisição dos dados foi feita por meio do software *Rotor Gene Real Time Analysis 1.7.65* (Corbett), o qual calcula valores de *cycle threshold* (Ct), correlação logarítmica (R^2) entre o número de ciclos e a quantidade de DNA nas amostras além da eficiência da reação (F). Para normalização dos dados, as médias de atividade da nitrogenase foram transformadas $(x+1)^{0,5}$. As medias de atividade da nitrogenase e dinâmica da população bacteriana inoculada foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) pelo programa SISVAR versão 5.1.

3.2.2 Resultados e discussão

3.2.2.1 EXPERIMENTO 1. Inoculação de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar micropropagada por meio de pulverização foliar

Diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as plantas inoculadas e controles não-inoculados foram observados principalmente 7 DAI para massa seca de parte aérea (Tabela 3.2). A maioria dos tratamentos com inoculação de bactérias diazotróficas não apresentou aumento de massa seca de parte aérea significativamente diferente do respectivo controle não-inoculado que recebeu a mesma adubação nitrogenada ($p < 0,05$).

Com relação ao acúmulo de massa seca de parte aérea da cana-de-açúcar, 7 DAI, 3 dos 10 tratamentos (J8L, G4L e F5L) sem adubação nitrogenada com inoculação de bactérias diazotróficas nas folhas apresentaram médias estatisticamente ($p < 0,05$) superiores ao controle. Com adição de N equivalente a 30 e 60 kg de N ha⁻¹, no mesmo período, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Nas coletas realizadas aos 30 e 60 DAI, também não foram observadas diferenças entre as médias dos tratamentos inoculados independente das doses de N aplicada e seus respectivos controles (Tabela 3.2).

A massa seca de raízes nos diferentes tratamentos inoculados não apresentou diferença significativa aos 7 e 30 DAI com relação aos controles não-inoculados independente da dose de N aplicada. Somente 60 DAI, 7 dos 30 tratamentos (23%) apresentaram médias significativamente superiores aos tratamentos controles ($p < 0,05$, Tabela 3.3). Dessa maneira, na ausência de adubação nitrogenada e com a inoculação dos isolados B6F e E5L e com o equivalente a 60 kg de N ha⁻¹ e inoculação com os isolados J8L, E5L, B6F, A6L e I7L, as médias de massa seca de raízes foram estatisticamente superiores aos respectivos controles, sugerindo que esses isolados possuem habilidade em promover o crescimento de raízes possivelmente pela produção de auxinas ou alterações do metabolismo hormonal das plantas.

As plantas inoculadas com bactérias diazotróficas com o equivalente a 30 kg de N ha⁻¹ não apresentaram diferenças estatísticas de massa seca e raízes com relação ao controle não-inoculado. Diferentemente dos resultados observados para

crescimento de parte aérea em que foram encontrados aumentos significativos no início do experimento, a promoção de crescimento de raízes foi significativa apenas nos períodos mais tardios do desenvolvimento da cultura.

A concentração de N na parte aérea da cana-de-açúcar foi analisada também 7, 30 e 60 DAI (Tabela 3.4). Aos 7 DAI sem adição de adubação nitrogenada não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos inoculados em relação ao controle não-inoculado. Com a aplicação do equivalente a 30 kg de N ha⁻¹, foi observado que 40% dos tratamentos apresentaram médias significativamente menores do que os controles não-inoculados e os demais tratamentos apresentaram concentração de N na parte aérea estatisticamente igual ao controle. Com adição do equivalente a 60 kg de N ha⁻¹, 60% dos tratamentos inoculados apresentaram médias de concentração de N na parte aérea estatisticamente superiores ao controle não- inoculado.

Aos 30 DAI, 50% dos tratamentos inoculados que não receberam adubação nitrogenada 50% que receberam o equivalente a 30 kg de N ha⁻¹ apresentaram concentração de N na parte aérea significativamente superiores aos controles não-inoculação ($p < 0,05$). Com o equivalente a 60 kg de N ha⁻¹ não foi verificado aumento significativo com relação ao controle não inoculado.

Aos 60 DAI sem adubação nitrogenada, 30% dos tratamentos inoculados apresentaram concentração de N na parte aérea significativamente superiores ao controle não-inoculado ($p < 0,05$). Com o equivalente a 30 kg de N ha⁻¹ 40% dos tratamentos inoculados apresentaram medias estatisticamente superiores aos controles não inoculados. Com a adição do equivalente a 60 kg de N ha⁻¹, apenas as plantas inoculadas com o isolado F5L apresentaram médias de concentração de N na parte aérea superiores aos controles não inoculados. Os demais tratamentos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle não-inoculado. Esses resultados sugerem que em algumas interações cana-de-açúcar-bactéria, ocorre assimilação do N fixado mais tardiamente, e os incrementos precoces de massa seca de parte aérea podem não estar relacionados com a FBN mas sim com algum outro mecanismo de promoção de crescimento vegetal.

Tabela 3.2 – Médias de massa seca de parte aérea (MSPA) (g) em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas via pulverização foliar e com diferentes doses de N aos 7, 30 e 60 DAI

ISOLADOS	Doses de N	Dias após a inoculação		
		7	30	60
A6L	0	0,62 c	6,15 a	11,50 a
	30	0,76 a	8,12 a	9,01 a
	60	0,76 b	9,37 a	16,51 a
B6F	0	0,85 c	5,79 a	11,67 a
	30	0,86 a	7,87 a	18,47 a
	60	0,51 b	4,84 a	16,99 a
C5L	0	0,81 c	10,47 a	15,14 a
	30	0,84 a	7,82 a	18,31 a
	60	0,65 b	10,27 a	15,94 a
C6F	0	0,88 c	6,99 a	11,36 a
	30	1,02 a	7,57 a	16,91 a
	60	1,34 a	7,60 a	13,60 a
D4F	0	0,87 c	4,81 a	8,33 a
	30	0,87 a	7,20 a	13,48 a
	60	0,59 b	11,32 a	16,81 a
E5L	0	0,98 c	8,18 a	9,77 a
	30	0,91 a	6,81 a	17,87 a
	60	0,74 b	7,67 a	20,21 a
F5L	0	1,08 b	7,13 a	9,34 a
	30	0,67 a	6,95 a	13,47 a
	60	0,67 b	9,42 a	16,01 a
G4L	0	1,45 a	7,58 a	11,41 a
	30	0,83 a	6,17 a	12,88 a
	60	0,76 b	10,27 a	19,54 a
I7L	0	0,70 c	4,41 a	9,79 a
	30	0,75 a	6,04 a	11,53 a
	60	0,84 b	11,47 a	14,09 a
J8L	0	1,09 b	6,10 a	11,48 a
	30	0,76 a	6,48 a	13,91 a
	60	1,08 a	8,63 a	18,11 a
Não-inoculado	0	0,69 c	5,66 a	10,55 a
	30	0,75 a	9,05 a	15,30 a
	60	1,13 a	11,26 a	15,59 a
CV (%)		23,02	21,08	33,70

Valores correspondem às médias de 3 repetições

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$), na mesma coluna e na mesma dose de N

Tabela 3.3 – Médias de massa seca de raízes (MSR) (g) em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas via pulverização foliar e com diferentes doses de N aos 7, 30 e 60 DAI

ISOLADOS	Doses de N	Dias após a inoculação		
		7	30	60
A6L	0	5,21 a	8,55 a	12,57 b
	30	4,92 a	6,55 a	13,55 a
	60	5,02 a	8,08 a	16,18 a
B6F	0	6,08 a	7,12 a	17,57 a
	30	5,93 a	8,70 a	13,96 a
	60	3,95 a	8,04 a	18,39 a
C5L	0	7,10 a	14,28 a	8,39 b
	30	6,28 a	9,51 a	13,90 a
	60	3,99 a	11,14 a	10,07 b
C6F	0	5,70 a	10,05 a	10,58 b
	30	6,58 a	10,02 a	14,84 a
	60	6,81 a	9,60 a	9,82 b
D4F	0	6,09 a	5,94 a	12,74 b
	30	6,77 a	6,90 a	13,25 a
	60	3,88 a	9,63 a	10,55 b
E5L	0	6,77 a	10,52 a	16,71 a
	30	5,88 a	6,40 a	12,44 a
	60	5,70 a	9,32 a	18,67 a
F5L	0	6,58 a	9,88 a	11,95 b
	30	4,73 a	9,11 a	12,44 a
	60	6,47 a	13,96 a	11,00 b
G4L	0	6,91 a	10,02 a	12,29 b
	30	6,77 a	9,05 a	9,30 a
	60	5,88 a	13,88 a	11,44 b
I7L	0	5,35 a	6,32 a	11,36 b
	30	5,52 a	6,89 a	12,72 a
	60	5,66 a	9,61 a	15,71 a
J8L	0	6,13 a	6,92 a	11,19 b
	30	6,92 a	9,15 a	8,53 a
	60	5,52 a	10,59 a	19,41 a
Não-inoculado	0	5,31 a	6,78 a	10,22 b
	30	5,46 a	8,90 a	12,29 a
	60	6,21 a	12,64 a	11,94 b
CV (%)		22,98	17,15	25,56

Valores correspondem às médias de 3 repetições

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$), na mesma coluna e na mesma dose de N

Tabela 3.4 – Médias de concentração de N (g kg^{-1}) na parte aérea de cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas via pulverização foliar e com diferentes doses de N aos 7, 30 e 60 DAI

ISOLADOS	Doses de N	Dias após a inoculação		
		7	30	60
A6L	0	25,87 a	6,72 b	4,13 c
	30	21,59 b	7,71 b	3,88 c
	60	26,03 a	11,22 a	4,49 c
B6F	0	21,75 a	9,19 a	4,22 c
	30	22,28 a	10,57 a	3,79 c
	60	21,83 b	10,05 a	4,48 c
C5L	0	22,48 a	9,73 a	4,03 c
	30	23,52 a	9,74 a	3,99 c
	60	24,06 a	10,78 a	4,91 c
C6F	0	19,43 a	9,84 a	6,06 a
	30	23,74 a	8,86 a	5,52 a
	60	25,42 a	9,13 b	5,89 b
D4F	0	21,50 a	7,65 b	4,06 c
	30	19,03 b	8,11 b	3,88 c
	60	22,16 b	9,43 a	4,81 c
E5L	0	21,92 a	9,02 a	4,95 b
	30	24,85 a	8,12 b	4,11 c
	60	25,17 a	9,98 a	5,33 b
F5L	0	24,64 a	9,12 a	4,54 c
	30	22,82 a	9,48 a	4,76 b
	60	22,45 b	8,21 b	6,71 a
G4L	0	22,80 a	7,90 b	4,61 c
	30	20,48 b	7,86 b	5,02 b
	60	20,21 b	8,35 b	4,53 c
I7L	0	22,97 a	8,39 b	4,59 c
	30	20,93 b	9,71 a	4,03 c
	60	25,59 a	8,34 b	4,27 c
J8L	0	20,59 a	8,32 b	5,52 a
	30	23,18 a	7,11 b	5,95 a
	60	26,53 a	7,37 b	5,62 b
Não-inoculado	0	20,89 a	8,44 b	3,65 c
	30	23,63 a	7,19 b	4,18 c
	60	23,57 b	9,51 a	5,01 b
CV (%)		6,76	10,32	9,79

Valores correspondem às médias de 3 repetições

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$), na mesma coluna e na mesma dose de N

Mesmo não sendo uma prática comum na agricultura, desde trabalhos publicados por Pati e colaboradores (1981) são reportados resultados promissores com a aplicação de bactérias diazotróficas via pulverização foliar em gramíneas. Segundo Sudhakar e colaboradores (2000), a inoculação foliar de bactérias diazotróficas pode apresentar várias vantagens como: (I) o nitrogênio fixado está próximo ao seu local de assimilação, (II) as bactérias na filosfera podem ter ação antagonistas a fungos e outras bactérias patogênicas, (III) na filosfera existe nutrientes suficientes para o crescimento e desenvolvimento das bactérias (IV) a competição com outros micro-organismos é menor do que na rizosfera. Os resultados desse trabalho indicam que houve uma resposta positiva da cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas via pulverização foliar na fase inicial do desenvolvimento da cultura para a variedade de cana-de-açúcar testada.

A interação de plantas com micro-organismos benéficos no início do desenvolvimento das plantas é de grande importância e reportado por vários autores (OLIVEIRA et al, 2009; BISWAS et al., 2000; AZIZ et al, 2012; VARGAS et al., 2012; CANELLAS et al., 2013). Para plantas que passam por fase de viveiro, por exemplo, a associação com bactérias promotoras de crescimento é de grande importância, pois antecipa o tempo de transplante para o campo, estimulando o crescimento precoce da muda e, conseqüentemente, reduzindo o seu tempo de aclimação, o que aumenta a produtividade, a rotatividade na ocupação da infraestrutura e a eficiência de utilização da mão-de-obra especializada (SILVEIRA et al., 2003).

O efeito benéfico da inoculação de bactérias diazotróficas nas plantas em estágios precoces já foi observado em tomate e pimenta vermelha inoculadas com bactérias dos gêneros *Pseudomonas sp.* e *Serratia sp.*, as quais promoveram principalmente aumento do vigor das plantas (ISLAM et al., 2012). Em milho inoculado com bactérias diazotróficas, independente da dose de N aplicada, foi verificado um aumento significativo de raízes logo após a inoculação com bactéria endofítica, o que permitiu um melhor estabelecimento das plantas e maior resistência a estresses ambientais (KNOTH et al., 2013). A combinação de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas em um biofertilizante, promoveu em milho um aumento significativo de raízes laterais na fase inicial do

desenvolvimento da cultura, resultando em maior eficiência fotossintética em condições de baixa disponibilidade de nitrogênio (CANELLAS et al., 2013).

Dessa forma os resultados sugerem que a inoculação foliar com bactérias diazotróficas isoladas da filosfera de bambu podem trazer benefícios para o crescimento da variedade de cana-de-açúcar estudada, principalmente nas fases iniciais do seu desenvolvimento, com base nos dados de massa seca de parte aérea na concentração de N na parte aérea, e também mais tardiamente também visto pelo incremento da concentração de N na parte aérea e raízes da cana-de-açúcar inoculada.

É importante ressaltar que a adição de N não resultou em efeito supressor sobre os isolados bacterianos. Da mesma forma, Govindarajan e colaboradores (2007), verificaram que a inoculação de bactérias diazotróficas e aplicação de N promoveram aumentos significativos de biomassa de cana-de-açúcar, e o N aplicado via fertilizante não afetou significativamente a interação planta-bactéria. Nesse estudo, os isolados *Klebsiella sp. GR9*, *Gluconacetobacter diazotrophicus ATCC49037*, *Herbaspirillum seropedicae ATCC35892*, *Burkholderia vietnamiensis LMG10929T* e *Azospirillum lipoferum LMG4348*, foram inoculados em cana-de-açúcar adubada com o equivalente a 140 kg N ha⁻¹ foi observado que a inoculação associada à adubação resultou em massa seca de parte aérea superior ao controle fertilizado com o equivalente a 280 kg N ha⁻¹, até seis meses após o plantio. Esses dados sugerem que o N aplicado via fertilizante pode não ter efeito negativo sobre os isolados bacterianos inoculados.

A utilização da técnica de inoculação de bactérias diazotróficas nas folhas também foi testada em amoreira com adição de diferentes doses de adubo nitrogenado no solo. Os resultados mostraram que a comunidade diazotrófica na filosfera não foi afetada pela aplicação do fertilizante (SUDHAKAR et al., 2000).

A ausência de resposta positiva na produção de massa seca de parte aérea devido à inoculação de bactérias diazotróficas nas fases mais tardias do desenvolvimento da planta, como observado neste estudo, também já foi observado em ensaios com trigo inoculado com *Azospirillum spp.* (RODRIGUES et al., 2000), no qual não foi verificado efeito significativo da inoculação sobre a produção de grãos. No entanto, o teor de nitrogênio nos grãos aumentou significativamente nos tratamentos inoculados, o que, segundo os autores, já justificaria a inoculação. Sala e colaboradores (2005) também mostraram que o acúmulo de massa seca de trigo

inoculados com *Azospirillum spp.*, *Herbaspirillum spp.* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* não diferiu significativamente do controle não-inoculado, porém a concentração de N na parte aérea foi maior nas plantas inoculadas, sugerindo que a inoculação com bactérias diazotróficas pode trazer benefícios adicionais para as plantas, melhorando a qualidade nutricional do produto final, e não apenas promovendo o crescimento vegetal em si.

Canuto e colaboradores (2003) mostraram que a inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em cana-de-açúcar em casa-de-vegetação não promoveu aumento significativo de massa seca de parte aérea e raízes comparadas aos controles não-inoculados. Em alguns casos, a inoculação promoveu diminuição no crescimento das plantas. O mesmo efeito pode ser observado neste estudo em plantas inoculadas com o equivalente a 30 ou 60 kg de N ha⁻¹.

Como visto no capítulo anterior, muitos dos isolados bacterianos estudados possuem pelo menos um mecanismo potencial de promoção de crescimento vegetal *in vitro* e um ou mais de um mecanismo pode ser o responsável pelo maior crescimento da cana-de-açúcar, nas condições testadas. A capacidade de bactérias da filosfera em produzirem ácido indol-3-acético (AIA) ou biossurfactantes é uma vantagem adaptativa e ainda pode favorecer o crescimento das plantas (LINDOW; BRANDL, 2003; SCHREIBER et al., 2005). As auxinas são os principais hormônios capazes de regular o crescimento de plantas, aumentando o crescimento radicular e melhorando a absorção de nutrientes (LAMBRECHT et al., 2000). Elas são produzidas principalmente no meristema apical das plantas e transportadas por meio de células do parênquima até as raízes (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). A inoculação de bactérias diazotróficas nas folhas poderia alterar o metabolismo das auxinas e favorecer o crescimento de raízes, como observado neste estudo. A maior biomassa de raízes observadas em plantas inoculadas com os isolados E5L, B6F, J8L, I7L e A6L após a inoculação possibilitam uma maior exploração do solo e conseqüentemente maior absorção de nutrientes e água, aumentando a tolerância das plantas a condições de estresse.

Pati e colaboradores (1995) comprovaram que bactérias isoladas da filosfera de arroz (*Azotobacter chroococcum* e *Azomonas macrocytogenes*) inoculadas em sementes de trigo promoveram aumento significativo de raízes adventícias pela produção de AIA e giberelinas. Da mesma maneira, a inoculação de *Gluconacetobacter* e um mutante defeutivo no gene *nif* em cana-de-açúcar

promoveu o crescimento da planta não apenas pela FBN, mas também por outros mecanismos de crescimento (SEVILLA et al., 2001). Com isso, o somatório da FBN e ação de fitormônios de forma conjunta pode ter favorecido o crescimento da cana-de-açúcar.

A concentração de N na parte aérea de todos os tratamentos apresentou uma redução ao longo do tempo. Esses resultados corroboram os apresentados por Oliveira (2009) que também observou concentração de N na parte aérea da cana-de-açúcar decrescendo linearmente até o final do ciclo da cultura.

3.2.2.1.1 Atividade da nitrogenase

As taxas de FBN nas folhas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas foram avaliadas nas três épocas de coleta e oscilaram de 0 a 2,2 mg de N g de folha h⁻¹ 7 DAI (Tabela 3.5). Menores taxas de FBN foram observadas 30 dias após a inoculação com relação as demais épocas avaliadas. Segundo Jagnow (1983) diferentes taxas de redução de acetileno ao longo do desenvolvimento da planta podem estar relacionadas à redução das concentrações inibitórias de N no solo. Além disso, qualquer fator externo durante o desenvolvimento da planta acarretando em redução na taxa fotossintética pode afetar indiretamente a regulação da FBN (PATE, 1977).

Para todos os tratamentos e doses aos 7 DAI, cerca de 50% das amostras inoculadas apresentaram taxas de FBN significativamente superiores em relação as amostras não-inoculadas. Aos 30 DAI, as taxas de FBN não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) entre nenhum dos tratamentos. Aos 60 DAI, 97% das amostras inoculadas apresentaram diferença significativa de FBN em relação ao controle não-inoculado, indicando que a FBN ocorre em taxas elevadas no início e ao final do experimento.

De maneira geral, as plantas apresentaram taxas de FBN elevadas no início do experimento (até 2,2 mg N g⁻¹h⁻¹) nas plantas inoculadas com o isolado A6L, sem adição de N. Aos 30 DAI, a taxa de FBN diminuiu, chegando a valores mínimos de 10 µg de N g⁻¹h⁻¹ em plantas que foram inoculadas com o isolado G4L e adubadas com o equivalente a 60 kg de N ha⁻¹. Aos 60 DAI, a taxa de FBN se elevou novamente, chegando a 1,1 mg N g⁻¹h⁻¹ para os isolados D4F e J8L na ausência de adubação nitrogenada. Freiberg (1998) relatou que a taxa de FBN na filosfera

aumenta de acordo com a idade da folha, da mesma forma que aumenta a densidade dos micro-organismos na filosfera. Porém a redução da taxa de FBN 30 DAI pode ter ocorrido devido ao tempo necessário para os micro-organismos diazotróficos introduzidos se adaptarem ao novo habitat, sendo que esse fator pode influenciar diretamente no processo de FBN (TRINICK, 1982).

A adição de fertilizante nitrogenado interferiu negativamente na atividade da nitrogenase 60 DAI, sendo observadas redução de 30 a 50% no ARA nas plantas que receberam a dose mais elevada de adubo nitrogenado. Resultados similares foram reportados por Gupta e colaboradores (1982) em folhas de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas e com aplicação de diferentes doses de N.

É importante ressaltar que nem todo N fixado pelas bactérias é assimilado pelas plantas. O destino do N fixado por diazotróficos de vida livre é constantemente motivo de questionamento. Uma parte do nitrogênio fixado pode ser perdido rapidamente por desnitrificação, como nos casos relatados em desertos (SKUJINS; KLUBEK, 1978), ou após a morte celular dos micro-organismos, o N pode ser mineralizado como observado em cianobactérias (JONES; WILSON; 1978) ou em bactérias heterotróficas de vida livre (JONES, 1978). Mas de fato, uma grande fração do N fixado fica retido nos ecossistemas, incorporado no solo em compartimentos da matéria orgânica, ou lançado no meio extra celular como N orgânico, o qual pode ser absorvido na filosfera das folhas ou mesmo no solo pelas plantas vasculares, bactérias, cianobactérias ou fungos (JONES, 1978; JONES; WILSON, 1978).

A eficiência do uso do N fornecido para as plantas foi estudado por Andrews e colaboradores (2009) em que foi avaliado a eficiência da assimilação do N fixado por bactérias diazotróficas em comparação a assimilação de NH_4^+ ou NO_3^- . Essa eficiência é dada pela capacidade da planta em converter o N assimilado em massa seca de parte aérea e proteína bruta. Neste trabalho foi reportado que o custo energético envolvido no processo de crescimento das plantas, regulação do pH e assimilação do N são de 5 a 7% maiores quando há fixação de N, comparado a assimilação de NH_4^+ ou NO_3^- , principalmente no caso das leguminosas, devido necessidade de formação dos nódulos radiculares. Já em associação com bactérias de vida livre o custo energético para as plantas é relativamente menor, o que sugere uma maior eficiência do processo de assimilação do N fornecido por bactérias de vida livre.

Tabela 3.5 – Atividade da nitrogenase ($\mu\text{g N g}^{-1}$ de folha h^{-1}) em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas via pulverização foliar e com diferentes doses de N aos 7, 30 e 60 DAI

ISOLADOS	Doses de N	Dias após a inoculação		
		7	30	60
A6L	0	2.285,95 a	26,59 a	259,98 b
	30	667,23 a	27,40 a	1.578,24 a
	60	1.016,51 a	18,70 a	495,77 a
B6F	0	0,00 b	29,53 a	818,70 a
	30	288,65 b	53,04 a	424,21 a
	60	428,34 a	30,00 a	450,28 a
C5L	0	739,42 a	23,08 a	963,78 a
	30	527,91 a	41,75 a	496,15 a
	60	1.143,19 a	45,23 a	273,05 b
C6F	0	356,41 b	26,39 a	937,02 a
	30	347,09 b	25,81 a	783,69 a
	60	289,51 b	16,50 a	695,57 a
D4F	0	109,89 b	38,85 a	1.117,75 a
	30	168,95 b	21,38 a	849,34 a
	60	302,82 b	13,02 a	406,52 b
E5L	0	0,00 b	19,38 a	1.043,17 a
	30	190,18 b	39,73 a	481,44 a
	60	513,38 a	15,21 a	279,14 b
F5L	0	231,49 b	25,42 a	759,40 a
	30	437,18 a	21,49 a	664,07 a
	60	238,01 b	15,01 a	829,20 a
G4L	0	281,36 b	30,26 a	832,83 a
	30	1.016,35 a	37,85 a	488,16 a
	60	869,85 a	10,44 a	341,25 b
I7L	0	447,38 a	45,96 a	1.158,40 a
	30	236,86 b	23,85 a	495,31 a
	60	166,86 b	10,77 a	456,61 a
J8L	0	565,78 a	31,78 a	714,27 a
	30	852,48 a	16,81 a	496,80 a
	60	448,86 a	20,08 a	530,29 a
Não-inoculado	0	166,68 b	23,32 a	400,84 b
	30	392,85 b	7,89 a	145,60 b
	60	0,00 b	7,60 a	47,56 c
CV (%)		52,87	37,77	35,07

Valores correspondem às médias de 3 repetições

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$), na mesma coluna e no mesmo tempo de cultivo.

Poucos são os trabalhos reportando taxas de FBN na filosfera. Um deles é o trabalho reportado por Murty (1984) em que foi observado que na filosfera de diferentes espécies de algodão (*Gossypium hirsutum* L. e *G. herbaceum* L.), a atividade da nitrogenase variou entre 0,18 e 0,78 nmol de C_2H_4 $cm^{-2} h^{-1}$. Neste caso, *Beijerinckia* sp foi observada como o micro-organismo predominante na filosfera das variedades de algodão testadas. Comparando as taxas de FBN na filosfera de cana-de-açúcar, sorgo, bambu e amoreira, Murty (1983) verificou taxas em torno de 174,11; 166,07; 72,32 e 37,36 nmol C_2H_4 $g^{-1} h^{-1}$ respectivamente. O autor relata que a superfície cerosa das folhas de amoreira pode ter relação direta com a menor taxa de FBN observada. Sendo assim, a combinação de dois fatores: a presença de micro-organismo diazotrófico específico com habilidade de colonizar a filosfera e crescer em ambientes limitantes em fontes de C e a permeabilidade das folhas facilitando a entrada de nutrientes, combinam para obtenção de taxas de FBN ideais. Além dos fatores citados, a intensidade luminosa, estresse osmótico, exposição à radiação UV, umidade da folha e disponibilidade de nutrientes também são fatores importantes que podem afetar a FBN na filosfera (BENTLEY, 1987).

Gomez (2012) avaliando a FBN em folhas de bambu da Mata Atlântica, local de origem dos isolados, usando a técnica de redução de acetileno, verificou valores entre 72 e 2.164 nmol etileno g^{-1} de folha h^{-1} . Os valores de ARA observados nas folhas de cana-de-açúcar, neste estudo, chegaram a 5,61 nmol etileno $g^{-1}h^{-1}$ no período de 7 DAI e 1,59 nmol etileno $g^{-1}h^{-1}$ 60 DAI. Essa grande diferença se deve possivelmente a existência de uma grande diversidade de espécies de micro-organismos diazotróficos na filosfera de bambu na Mata Atlântica com capacidade variada de fixar N atmosférico, como mostrado por Gomez (2012) e Andreote (2013). Além disso, a FBN em florestas pode ser maior, pois em áreas onde a demanda e as perdas de N são relativamente altas como na liteira em decomposição, a FBN poderia ser favorecida (HEDIN et al., 2009).

Resultados apresentados por Gupta e colaboradores (1982) que realizaram o mesmo teste de redução de acetileno em plantas de arroz inoculadas com micro-organismos diazotróficos epifíticos mostraram que as taxas de FBN variaram de 664 a 816 nmol g^{-1} de folha h^{-1} , porém os autores relatam uma redução drástica da atividade da nitrogenase quando era aplicado fertilizante nitrogenado mineral, reduzindo os benefícios que as bactérias diazotróficas traziam.

A análise da atividade da nitrogenase na filosfera de plantas inoculadas é muito importante, pois nem sempre o potencial que os isolados expressam nos testes *in vitro* é verificado quando em contato com a planta. Em meio de cultura são dadas todas as condições para que a bactéria expresse seu potencial máximo, como nutrientes, temperatura e ausência de competição com outros micro-organismos. O mesmo não acontece quando os micro-organismos estão no ambiente natural. Características como capacidade de adaptação e competitividade são importantes quando se pensa em utilizar um micro-organismo como inoculante. Assim, a dinâmica da população dos diferentes isolados foi avaliada na superfície das folhas de cana-de-açúcar usando qPCR para determinar a variação do número de cópias do gene rRNA 16S.

3.2.2.1.2 Dinâmica da população bacteriana na superfície das folhas de cana-de-açúcar inoculadas

O monitoramento do número de cópias do gene rRNA 16S por PCR em tempo real (qPCR) é uma técnica de alta sensibilidade que permitiu determinar a dinâmica da população das bactérias inoculadas na superfície das folhas, com base na relação de valores de *Ct* (*Cycle threshold*) e de curvas padrão de DNA do micro-organismo alvo (D'HAENE; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010). O objetivo principal da análise de qPCR utilizando oligonucleotídeos específicos para o gênero *Klebsiella* foi verificar a presença dos mesmos na filosfera de cana-de-açúcar ao longo dos 2 meses de experimento.

Com base nos resultados apresentados na Figura 3.3, é possível verificar que o elevado número de cópias do gene rRNA 16S de todos os isolados foi elevado durante todo o tempo do experimento, indicando que as bactérias inoculadas sobreviveram na filosfera da cana-de-açúcar.

Os isolados A6L, C5L, I7L, J8L, G4L e C6F apresentaram elevado número de cópias do gene rRNA 16S por massa foliar no início do experimento (até $2,6 \cdot 10^9$). Para esses isolados, aos 30 DAI, houve uma redução no número de cópias do gene rRNA 16S, e aos 60 DAI o número de cópias volta a aumentar. O número de cópias do gene rRNA 16S dos isolados E5L, F5L e D4F diminuiu ao longo do tempo. Já o número de cópias do gene rRNA 16S do isolado B6F se manteve constante durante todo o experimento. Apenas o isolado C6F 7 DAI apresentou número de cópias do

gene rRNA 16S significativamente superior aos demais tratamentos, e nos tempos seguintes essa diferença não foi significativa ($p < 0,05$). Nos controles não-inoculados não foi detectado cópias do gene rRNA 16S dos isolados do gênero *Klebsiella* com os iniciadores selecionados, sugerindo que a FBN observada em alguns desses tratamentos pode estar associada a presença de outras bactérias epifíticas ou mesmo endofíticas porém aparentemente em menores quantidades. Assim, nos tratamentos inoculados, parte da FBN pode estar sendo realizada por bactérias diferentes das inoculadas.

Os resultados sugerem que o número de bactérias na superfície das folhas de cana-de-açúcar aumentou de acordo com o crescimento das folhas, já que os cálculos levam em consideração a massa fresca das plantas em todos os tempos de avaliação. Além disso, as taxas de FBN nas folhas apresentadas anteriormente foram menores 30 DAI, momento em que se observa uma redução no número de cópias do gene rRNA 16S na maioria dos casos. Isso fica evidente quando se compara a taxa de FBN em plantas inoculadas com o isolado G4L 30 DAI, com o número de cópias do gene rRNA 16S do isolado neste período ($2.8.10^6$) as quais foram as menores observadas em todas as doses de N aplicadas. Porém, o mesmo comportamento não é observado em todos os tratamentos.

Considerando-se as diferentes doses de nitrogênio aplicados no solo, não foram observadas diferenças significativas entre o número de cópias do gene rRNA 16S de *Klebsiella* entre os tratamentos, sugerindo que a aplicação de fertilizante no solo não foi um fator determinante na sobrevivência dos isolados na filosfera de cana-de-açúcar.

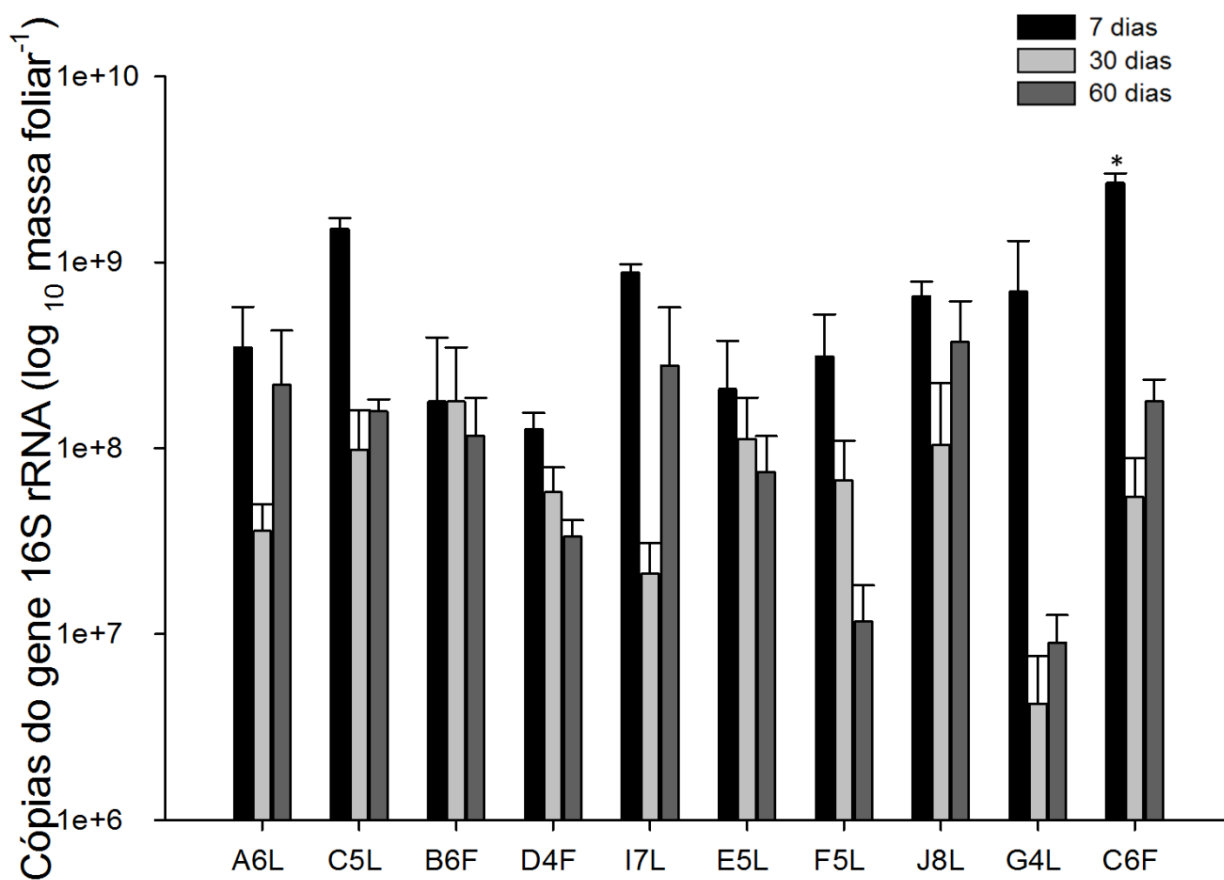


Figura 3.3 – Quantificação do gene rRNA 16S dos isolados inoculados em cana-de-açúcar aos 7,30 e 60 DAI em condições de casa-de-vegetação. Os valores são médias de três repetições e as barras representam o desvio padrão da média.

*Indica diferença significativa entre a quantidade de cópias do gene rRNA 16S do isolado comparado aos demais isolados aos 7 DAI ($p < 0.05$)

Pouco se conhece sobre a dinâmica das populações de bactérias de vida livre inoculadas na filosfera de plantas. Pesquisas realizadas por Pati e Chandra (1981) mostravam que a pulverização de bactérias de vida livre em folhas de trigo promoveram o crescimento das plantas por meio principalmente da FBN. Mas, após o reisolamento das bactérias inoculadas, foi verificada uma queda significativa do número de bactérias, com relação a população no tempo inicial. Sendo assim, os autores sugerem que nem toda bactéria diazotrófica de vida livre é capaz de sobreviver na filosfera das plantas. O mesmo foi relatado por Sengupta e colaboradores (1978) que utilizaram bactérias de vida livre isoladas do solo, e inocularam na superfície das folhas porém, não obtiveram resultados satisfatórios.

A colonização da filosfera é dependente da exsudação de nutriente pela planta, injúrias no tecido foliar causadas por insetos, ou aporte de nutrientes pela água da chuva (YANG et al., 2001). Avaliando o tempo de sobrevivência de *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum sp* inoculadas em toletes de cana-de-açúcar, Muthukumarasamy e colaboradores (2006) mostraram que aos 180 dias após a inoculação, a população de *Herbaspirillum sp* se manteve estável, já a população de *Gluconacetobacter* foi reduzida, com relação à população inicial, indicando a maior estabilidade de bactérias de *Herbaspirillum* comparadas a de *Gluconacetobacter*. Também com objetivo de verificar o período de sobrevivência de um conjunto de bactérias aplicadas em toletes de cana-de-açúcar juntamente com um polímero de carboximetilcelulose, Silva e colaboradores (2012) constataram que as 5 bactérias (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*) inoculadas juntas ou individualmente foram capazes de sobreviver por 90 dias, beneficiando tanto no crescimento das plantas quanto na concentração de N na parte aérea.

Dessa maneira, os resultados apresentados neste trabalho contribuem para o melhor entendimento do comportamento de bactérias introduzidas na filosfera de cana-de-açúcar, e mostraram que a aplicação das bactérias via pulverização foliar é uma técnica eficaz, confirmando que a população microbiana inoculada se manteve em níveis elevados até o final do experimento.

3.2.2.2 EXPERIMENTO 2. Inoculação de bactérias diazotróficas encapsuladas em micro-esferas de alginato em cana-de-açúcar micropropagada

Este experimento teve a mesma abordagem e o mesmo planejamento experimental do experimento anterior, mudando apenas a forma de aplicação do inoculante e a variedade de cana-de-açúcar. Deste modo, todas as plantas que receberam o inoculante bacteriano encapsulado individualmente também receberam o equivalente a 0, 30 e 60 kg de N ha⁻¹ de fertilizante nitrogenado, e também foram avaliados 7, 30 e 60 DAI.

Concomitantemente à inoculação das microesferas em solo, o inóculo encapsulado em polímero de alginato foi avaliado para determinar a viabilidade das bactérias após o encapsulamento. Após 7 dias, todos os isolados encapsulados apresentaram, em meio de cultivo, aproximadamente 10⁶ UFC por esfera, resultado similar ao obtido por Ivanova e colaboradores (2006).

Aos 7 DAI, sem adição de fertilizante nitrogenado e com o equivalente a 60 kg de N ha⁻¹ não foram verificados ganhos significativos de massa seca de parte aérea das plantas inoculadas em comparação aos controles sem inoculação. Na presença do equivalente a 30 kg de N ha⁻¹, 40% das plantas inoculadas apresentaram médias de massa seca de parte aérea significativamente superiores ao controle sem inoculação (p<0,05).

Aos 30 DAI, não foi observada diferença significativa dos tratamentos inoculados em comparação aos controles não inoculação com relação ao acúmulo de massa seca na parte aérea.

Aos 60 DAI e na ausência de adubação nitrogenada, as plantas inoculadas com os isolados C5L, D4F e E5L produziram biomassa aérea significativamente superior (p<0,05) do que os demais tratamentos e controle e sem inoculação. Com adição do equivalente a 30 kg N ha⁻¹, 60% dos tratamentos apresentaram massa seca de parte aérea estatisticamente superior (p<0,05) ao controle. Com o equivalente a 60 kg de N ha⁻¹, 70% dos tratamentos inoculados também apresentaram médias superiores (p<0,05) em relação ao controle sem inoculação. O tratamento que recebeu as micro-esferas contendo o isolado E5L e o equivalente a 60 kg N ha⁻¹ apresentou a maior massa seca de parte aérea 60 DAI, comparado com o controle não-inoculado que recebeu a mesma dose de N, ou mesmo ao tratamento não-inoculado que não recebeu adubação nitrogenada. Os resultados

obtidos sugerem que a inoculação de bactérias diazotróficas encapsuladas em micro-esferas de alginato foi eficiente em promover aumentos significativos da parte aérea da cana-de-açúcar inoculada mesmo com adição de N na forma de uréia, principalmente aos 60 DAI.

Com relação ao aumento de massa seca de raízes, aos 7 DAI não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 3.7).

Aos 30 DAI foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) no incremento de massa seca de raízes somente para os tratamentos com o biofertilizante e com o equivalente a 30 kg de N ha⁻¹, onde 40% deles apresentaram médias superiores ao tratamento controle.

Aos 60 DAI foram verificados que 50% dos tratamentos inoculados na presença do equivalente a 60 kg de N ha⁻¹ apresentaram médias estatisticamente superiores ($p < 0,05$) aos controles não-inoculados (Tabela 3.7).

Segundo Bashan & Levanony (1990), ganhos de aproximadamente 20% atribuídos à inoculação com bactérias diazotróficas seria considerado significativo para comercialização e aplicação de um inoculante na agricultura. Neste experimento, 30 DAI, a planta inoculada com o isolado D4F apresentou um ganho de 120%, comparado ao tratamento controle não-inoculado. Aos 60 DAI, as plantas inoculadas com o isolado J8L também apresentaram ganhos de 72% comparados aos tratamentos não inoculados, indicando assim, incremento significativo atribuído à inoculação do solo com micro-esferas de alginato contendo bactérias diazotróficas.

Tabela 3.6- Médias de massa seca de parte aérea (MSPA)(g) em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas encapsuladas em microesferas de alginato e com diferentes doses de N aos 7, 30 e 60 DAI

ISOLADOS	Doses de N	Dias após a inoculação		
		7	30	60
A6L	0	2,06 a	6,27 a	20,87 b
	30	2,08 a	10,17 a	22,23 b
	60	1,76 a	8,88 a	30,84 a
B6F	0	1,07 a	6,52 a	20,02 b
	30	1,08 b	9,17 a	31,12 a
	60	1,41 a	10,41 a	22,32 b
C5L	0	1,28 a	6,32 a	28,03 a
	30	1,72 a	8,66 a	31,91 a
	60	1,24 a	8,85 a	33,24 a
C6F	0	1,13 a	5,36 a	17,07 b
	30	1,15 b	7,49 a	24,37 b
	60	1,19 a	6,33 a	21,46 b
D4F	0	1,41 a	7,73 a	27,47 a
	30	1,71 a	7,84 a	34,00 a
	60	1,06 a	7,83 a	30,45 a
E5L	0	1,13 a	6,22 a	24,91 a
	30	1,41 b	8,26 a	36,05 a
	60	1,01 a	8,54 a	37,74 a
F5L	0	1,08 a	6,66 a	17,45 b
	30	1,32 b	9,09 a	18,97 b
	60	0,99 a	8,58 a	36,91 a
G4L	0	1,96 a	5,95 a	18,41 b
	30	1,89 a	5,77 a	26,61 b
	60	1,08 a	7,96 a	24,31 b
I7L	0	1,17 a	7,05 a	20,51 b
	30	1,22 b	8,31 a	37,51 a
	60	1,23 a	8,83 a	33,11 a
J8L	0	1,23 a	5,34 a	15,81 b
	30	1,39 b	6,23 a	29,11 a
	60	1,73 a	7,39 a	28,89 a
Não-inoculado	0	1,02 a	5,01 a	13,18 b
	30	1,28 b	7,51 a	21,16 b
	60	1,28 a	7,02 a	19,53 b
CV (%)		31,71	22,02	21,68

Valores correspondem às médias de 3 repetições

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$), na mesma coluna e na mesma dose de N

Tabela 3.7- Médias de massa seca de raízes (MSR) (g) em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas encapsuladas em esferas de alginato e com diferentes doses de N aos 7, 30 e 60 DAI

ISOLADOS	Doses de N	Dias após a inoculação		
		7	30	60
A6L	0	6,01 a	9,16 a	11,34 a
	30	5,75 a	11,12 a	15,33 a
	60	5,46 a	10,89 a	17,12 c
B6F	0	5,08 a	8,08 a	16,22 a
	30	4,36 a	10,62 b	20,71 a
	60	5,72 a	11,2 a	20,99 b
C5L	0	4,82 a	7,54 a	14,88 a
	30	4,96 a	13,24 a	20,48 a
	60	4,78 a	14,51 a	20,98 b
C6F	0	5,75 a	6,81 a	14,26 a
	30	5,19 a	8,27 b	20,49 a
	60	5,7 a	8,38 a	16,3 c
D4F	0	4,97 a	10,77 a	17,29 a
	30	4,59 a	14,84 a	19,64 a
	60	4,63 a	11,16 a	18,36 c
E5L	0	4,86 a	6,26 a	16,62 a
	30	5,81 a	8,45 b	20,48 a
	60	4,73 a	10,62 a	20,37 b
F5L	0	5,25 a	6,76 a	12,97 a
	30	4,94 a	8,35 b	18,37 a
	60	5,37 a	8,41 a	17,47 c
G4L	0	5,83 a	8,56 a	15,91 a
	30	4,42 a	6,06 b	18,93 a
	60	5,45 a	11,19 a	19,17 c
I7L	0	5,21 a	7,48 a	13,78 a
	30	4,82 a	10,99 a	20,21 a
	60	4,12 a	11,58 a	23,62 b
J8L	0	5,01 a	4,51 a	13,5 a
	30	5,32 a	8,93 b	19,67 a
	60	5,96 a	9,03 a	26,19 a
Não-inoculado	0	5,11 a	9,85 a	13,58 a
	30	6,08 a	6,74 b	13,27 a
	60	5,21 a	9,91 a	15,21 c
CV (%)		19,27	27,38	25,04

Valores correspondem às médias de 3 repetições

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$), na mesma coluna e na mesma dose de N.

A concentração de N na parte aérea das plantas inoculadas não apresentou diferenças significativas em relação aos controles não-inoculados 7 e 30 DAI. Porém 60 DAI, foi verificado aumento significativo na concentração de N na parte aérea em relação as plantas que não receberam inoculante ($p < 0,05$, Tabela 3.8). A adição do equivalente a 60 kg de N ha^{-1} resultou em 40% dos tratamentos com médias significativamente superiores ($p < 0,05$) aos controles não inoculados. Plantas inoculadas com os isolados A6L e E5L apresentaram concentração de N na parte aérea estatisticamente superior ao controle não-inoculado e ao demais tratamentos inoculados.

São escassos os trabalhos que relatam a promoção de crescimento vegetal por bactérias encapsuladas inoculadas no solo. Rekha e colaboradores (2007) testando a inoculação de *Pseudomonas putida* CC-FR2-4 e *Bacillus subtilis* CC-pg104 encapsulados verificaram que o procedimento de encapsulamento não inibiu os efeitos benéficos dos isolados. De forma semelhante, o encapsulamento e inoculação de *Enterobacter* no solo promoveu significativo crescimento das plantas principalmente quando associado à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares devido ao potencial de solubilização de P apresentado pela bactéria (VASSILEVA et al., 1999), sugerindo assim que o encapsulamento de bactérias promotoras de crescimento de plantas é uma técnica promissora e pode trazer muitos benefícios para as plantas hospedeiras.

Testando várias formulações para produção de inoculante, Trivedi e colaboradores (2005) constataram que a inoculação de bactérias imobilizadas em polímeros de alginato promoveu maior crescimento de milho principalmente em regiões de clima frio. Foi verificado um aumento significativo da planta inoculada comparada ao controle não inoculado, principalmente com relação ao aumento de massa radicular, o que possibilitou um melhor estabelecimento da cultura. De forma semelhante, foram observados aumentos significativos de raízes de cana-de-açúcar inoculadas em ambos os ensaios testados, sugerindo então que as bactérias diazotróficas da Mata Atlântica podem contribuir de forma significativa para o crescimento das raízes e estabelecimento da cultura inoculada tanto na forma líquida quanto encapsulado.

Tabela 3.8 – Médias de concentração de N (g.kg^{-1}) na parte aérea de cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas encapsuladas em esferas de alginato e com diferentes doses de N aos 7, 30 e 60 DAI

ISOLADOS	Doses de N	Dias após a inoculação		
		7	30	60
A6L	0	13,18 a	6,99 a	5,00 a
	30	13,86 a	9,18 a	5,15 a
	60	15,73 a	10,50 a	8,63 a
B6F	0	15,31 a	8,39 a	4,97 a
	30	18,03 a	9,06 a	6,54 a
	60	17,46 a	10,85 a	5,18 c
C5L	0	13,82 a	7,84 a	4,69 a
	30	15,13 a	12,27 a	6,20 a
	60	14,19 b	9,34 a	7,07 b
C6F	0	14,08 a	9,45 a	5,63 a
	30	13,95 a	12,54 a	5,83 a
	60	14,15 b	10,28 a	6,86 b
D4F	0	13,95 a	8,18 a	5,54 a
	30	15,05 a	10,96 a	5,70 a
	60	15,50 a	10,08 a	5,11 c
E5L	0	14,76 a	8,45 a	5,29 a
	30	14,45 a	9,11 a	4,69 a
	60	15,24 a	9,31 a	9,40 a
F5L	0	15,17 a	8,69 a	5,33 a
	30	12,13 a	8,67 a	5,26 a
	60	15,33 a	11,56 a	5,08 c
G4L	0	15,14 a	8,62 a	5,31 a
	30	13,38 a	9,38 a	6,66 a
	60	13,45 b	9,37 a	6,18 c
I7L	0	13,75 a	7,73 a	5,12 a
	30	15,11 a	7,89 a	4,43 a
	60	13,00 b	8,73 a	4,80 c
J8L	0	12,15 a	10,60 a	5,32 a
	30	13,98 a	12,31 a	6,96 a
	60	14,91 a	11,83 a	4,91 c
Não-inoculado	0	15,01 a	9,20 a	5,24 a
	30	14,37 a	8,14 a	5,23 a
	60	15,62 a	10,98 a	5,08 c
CV (%)		12,87	19,43	8,76

Valores correspondem às médias de 3 repetições

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$), na mesma coluna e na mesma dose de N

Não somente o encapsulamento das bactérias promotoras de crescimento tem mostrado bons resultados, mas também outras formulações foram relatadas com grande eficiência na promoção de crescimento vegetal. Uma formulação suplementada com quitina e a bactéria *Bacillus subtilis* utilizadas no tratamento de sementes de amendoim e feijão guandu mostrou não só uma promoção do crescimento das plantas, mas também eficiência no controle biológico contra fungos patogênicos (MANJULA, PODILE, 2001).

A resposta positiva da planta, principalmente depois de 60 DAI, pode ter sido causada pela liberação lenta das bactérias que foram imobilizadas nas micro-esferas de alginato. Segundo Schoebitz e colaboradores (2013) o encapsulamento de rizobactérias oferece as vantagens de liberação controlada das bactérias e proteção contra estresses bióticos e abióticos no solo. Utilizando marcadores moleculares Trivedi e colaboradores (2005) verificaram que um inoculante formulado com polímero de alginato apresentou uma baixa colonização das raízes de milho nas fases iniciais do desenvolvimento da planta e foi aumentando o número de células colonizando as raízes ao logo das semanas, comparados a formulação líquida que apresentou alta população nas raízes nas fases iniciais e reduziu com o passar do tempo. Essa maior capacidade de sobrevivência e colonização da rizosfera em etapas mais tardias do desenvolvimento das plantas com inoculação de células imobilizadas de bactérias promotoras de crescimento já foram reportadas em outros trabalhos (HAMMAD; EL-MOHANDES, 1999).

O uso de polímeros biodegradáveis com finalidade de manter células bacterianas de inoculantes viáveis por mais tempo é uma prática que vem sendo estudada há algum tempo. Estudos apontam que a utilização de polímeros biodegradáveis que promovem o encapsulamento de células bacterianas e só liberam após sua degradação favorecem a multiplicação e sobrevivência dos micro-organismos quando aplicados ao solo (DENARDIN; FREIRE, 2000), protegendo as células contra estresses ambientais.

Wu e colaboradores (2011), a fim de reduzir o estresse salino sofrido pela população bacteriana inoculada no solo, verificaram que bactérias do gênero *Klebsiella* após serem encapsuladas tinham maior taxa de sobrevivência se comparadas as bactérias livres inoculadas em solos cultivados com algodão, e proporcionavam maior crescimento da planta. Posteriormente, Wu e colaboradores (2014) confirmaram a eficácia da tecnologia, mostrando que bactérias encapsuladas sobreviviam melhor à inoculação em solos com alta salinidade e proporcionavam melhor germinação de semente de algodão, comparadas a bactérias livres. Com isso, possivelmente a aplicação de fertilizantes nitrogenados no solo apresentou menor influência na atividade das bactérias diazotróficas

do que se as bactérias tivessem sido aplicadas livremente no solo, promovendo de forma mais eficiente o crescimento da cana-de-açúcar. Altas doses de fertilizantes nitrogenados já foram sugeridas como responsáveis pela diminuição do número populacional de bactérias fixadora de N em variedades de cana-de-açúcar cultivadas no México (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1999).

Silva e colaboradores (2009), aplicando uma mistura de bactérias diazotróficas em campo juntamente com polímero carboximetilcelulose e amido, verificaram o aumento da produtividade de colmos e massa seca da cana-de-açúcar aos 11 meses após o plantio, indicando que o uso de polímeros pode beneficiar na sobrevivência das bactérias no solo e conseqüentemente possibilitar que as bactérias inoculadas promovam o crescimento das plantas por mais tempo ou em momentos tardios do desenvolvimento das plantas.

3.2.2.2.1 Determinação da atividade da nitrogenase

As taxas de FBN no solo inoculado com micro-esferas contendo bactérias diazotróficas oscilaram entre 0 e 4 g de N g⁻¹ h⁻¹ (Tabela 3.9). Aos 7 DAI, todas as amostras testadas apresentaram atividade da nitrogenase, sendo que foram observadas as maiores taxas de FBN comparados aos demais tempos avaliados, chegando a 4 g de N g⁻¹ h⁻¹ no tratamento inoculado com o isolado I7L. No momento desta avaliação, as micro-esferas estavam íntegras no solo. Aos 30 DAI, a atividade da nitrogenase não foi detectada em alguns dos tratamentos. As taxas de FBN chegaram ao máximo a 84 mg de N h⁻¹ em média, nas plantas inoculadas com o isolado E5L sem a aplicação de N mineral. Aos 60 DAI, foram observadas taxas de FBN variando de 0 a 13 mg de N g⁻¹ h⁻¹.

Aos 30 DAI, não foi possível detectar as esferas íntegras no solo, indicando que elas se degradaram. Também foi possível verificar que a aplicação de N mineral interferiu na atividade da nitrogenase dos isolados inoculados principalmente 30 e 60 DAI, em comparação com solos que não receberam adubação nitrogenada.

De maneira geral, solos inoculados e sem adubação nitrogenada apresentaram maiores taxas de FBN em comparação aos tratamentos com adubação ($p < 0,05$). Novos testes serão realizados testando, por exemplo, outros veículos que possam ter maior durabilidade no solo impedindo que as esferas se degradem com facilidade.

Apesar da técnica de imobilização por encapsulamento de bactérias ser uma prática utilizada por muitos anos e apresentar bons resultados, o teste de redução de acetileno em solos inoculados com micro-esferas contendo bactérias diazotróficas ainda não havia sido reportado.

Os resultados deste trabalho sugerem que o processo de imobilização de bactérias diazotróficas de vida livre para produção de um inoculante é uma alternativa eficaz aos inoculantes atualmente disponíveis no mercado, uma vez que promoveu aumentos significativos de massa seca de parte aérea, raízes e concentração de N na variedade de cana-de-açúcar estudada e nas condições testadas e, além disso, apresentou elevada taxa de FBN no solo inoculados com as micro-esferas de alginato.

Tabela 3.9 – Atividade da nitrogenase ($\text{mg N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) em solo inoculado com esferas contendo bactérias diazotrófica isoladas da Mata Atlântica e diferentes doses de adubação nitrogenada

ISOLADOS	Doses de N	Dias após a inoculação		
		7	30	60
A6L	0	332,64 b	8,59 b	13,81 a
	30	2.461,00 a	2,44 b	3,04 b
	60	1.010,31 b	0,00 b	1,98 b
B6F	0	2.806,30 a	19,07 b	5,96 a
	30	1.516,14 a	11,33 a	0,56 b
	60	250,83 b	13,14 a	1,47 b
C5L	0	3.018,42 a	2,32 b	12,60 a
	30	1.156,74 a	1,04 b	0,31 b
	60	398,93 b	0,79 b	4,67 a
C6F	0	2.353,27 a	0,52 b	9,17 a
	30	1.126,68 a	1,28 b	3,16 b
	60	2.041,30 a	0,00 b	0,00 b
D4F	0	1.445,61 a	1,08 b	2,63 b
	30	278,34 b	0,00 b	0,25 b
	60	1.906,24 a	0,00 b	0,00 b
E5L	0	865,26 b	84,86297 a	6,98 a
	30	612,35 b	7,56 b	1,53 b
	60	1.984,58 a	0,46 b	4,61 a
F5L	0	3.686,04 a	13,03 b	3,46 b
	30	2.023,54 a	0,38 b	1,43 b
	60	774,98 b	0,61 b	10,23 a
G4L	0	2.010,25 a	4,76 b	11,99 a
	30	1.907,23 a	1,07 b	11,07 a
	60	1.757,34 a	1,69 b	0,72 b
I7L	0	261,74 b	4,35 b	1,60 b
	30	298,43 b	0,67 b	2,90 b
	60	4.281,09 a	1,26 b	0,00 b
J8L	0	936,45 b	10,24 b	11,70 a
	30	1.999,10 a	4,10 b	0,00 b
	60	1.468,31 a	0,93 b	2,81 b
Não-inoculado	0	224,04 b	2,60 b	0,00 b
	30	368,32 b	1,53 b	0,62 b
	60	388,04 b	0,00 b	0,00 b
CV(%)		62,58	144,52	89,23

Valores correspondem às médias de 3 repetições

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$), na mesma coluna e na mesma dose de N

3.2.2.2.2 Dinâmica da população bacteriana no solo

A dinâmica da população bacteriana dos solos inoculados foi determinada por qPCR usando iniciadores específicos para *Klebsiella*. Aos 7 DAI, amostras de solo ainda apresentavam as micro-esferas visíveis, como citado anteriormente, e a análise por qPCR confirmou a presença das bactérias inoculadas.

Aos 7 DAI foi observado no solo inoculado com o isolado A6L até $6 \cdot 10^{10}$ bactérias por grama de solo. Aos 30 e 60 DAI, não foi possível detectar as micro-esferas no solo, porém foi realizado o monitoramento no solo inoculado e foi confirmada a presença dos isolados em todos os tempos. A presença de 10^9 e 10^{10} bactérias por grama de solo tanto 30 dias quanto 60 DAI foi confirmada para todos os isolados (Figura 3.4).

Assim como no ensaio de inoculação via pulverização foliar, no presente ensaio pode-se observar a presença de cópias do gene 16S rRNA de bactérias pertencentes aos gênero *Klebsiella*, o mesmo dos isolados inoculados, aos 60 DAI, mesmo após a degradação das esferas. O comportamento de 7 dos 10 isolados foi de declínio no número de cópias do gene rRNA 16S ao longo do ensaio. Apenas os isolados C5L, D4F e E5L aumentaram sua população ao final do experimento porém essa diferença não foi significativa para nenhum dos isolados analisados. De modo geral, houve pouca variação da quantidade de bactérias no solo. As amostras de solo apresentaram entre 10^9 e 10^{10} bactérias por grama de solo durante todo o experimento.

Diferentemente do que foi observado no ensaio anterior, foram observadas cópias do gene rRNA 16S de *Klebsiella* com os iniciadores selecionados no solos dos tratamentos não-inoculados com as bactérias diazotróficas, porém em menores quantidades ($5 \cdot 10^8$). Por se tratar de um solo que não foi esterilizado, e as bactérias utilizadas no inoculante pertencerem a um grupo de micro-organismos que naturalmente em solos tropicais (THALLER et al. 1995; WIDMER et al, 1999), era esperado que se detectasse a presença de cópias desse gene no solo não inoculado, porém os dados de taxa de FBN nessas amostras indicam uma fixação extremamente baixas, quando foram detectadas. Dessa forma pode-se sugerir que algumas bactérias nativas do solo utilizado neste ensaio, mesmo sendo do mesmo gênero das bactérias inoculadas, não contribuíram efetivamente para o crescimento da planta quanto as bactérias inoculadas.

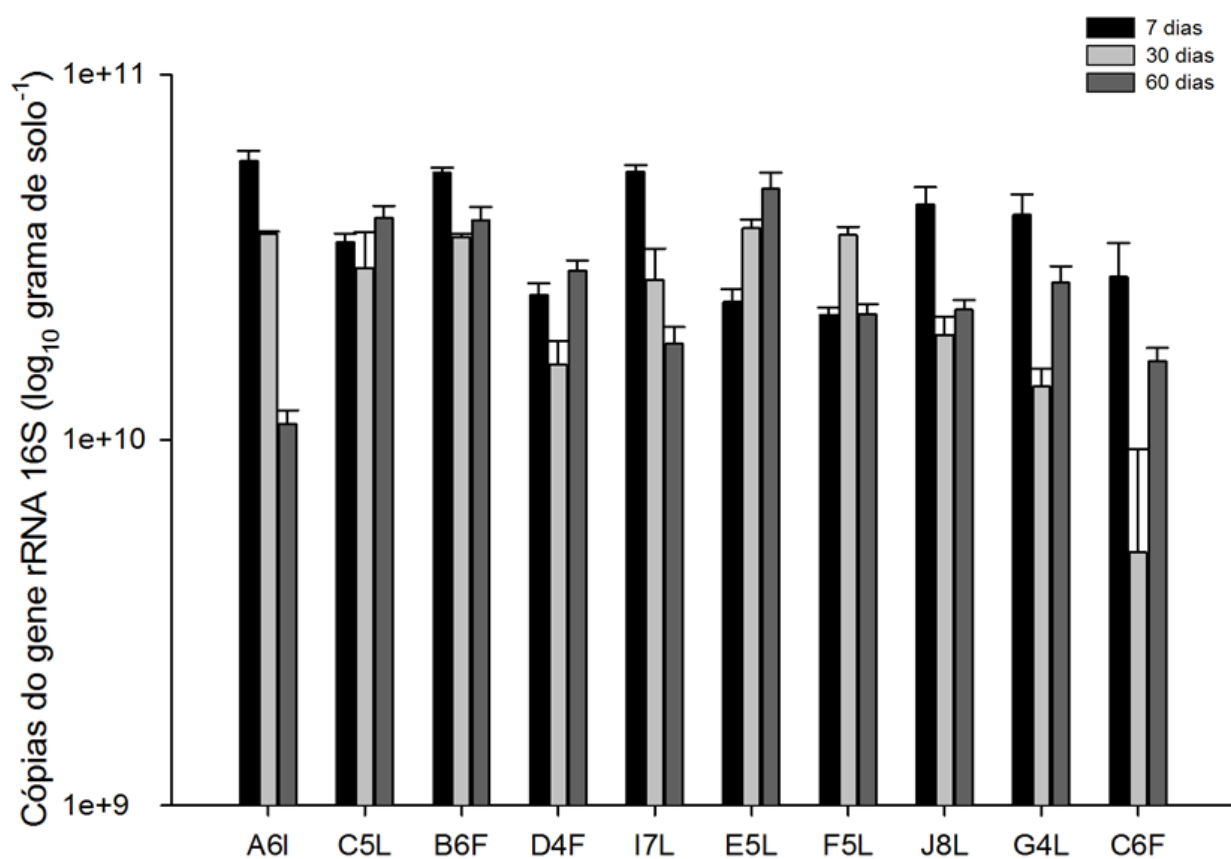


Figura 3.4 – Quantificação do gene rRNA 16S dos isolados inoculados no solo com cana-de-açúcar aos 7,30 e 60 DAI em condições de casa-de-vegetação. Os valores são médias de três repetições e as barras representam o desvio padrão das médias

Bashan e colaboradores (2002) verificaram que mesmo com uma redução da população bacteriana durante o processo de encapsulamento, durante os 16 dias de experimento houve uma multiplicação das bactérias no interior das micro-esferas. Além disso, segundo os autores, o tempo de degradação das esferas de alginato contendo bactérias promotoras de crescimento em solo úmido seria em torno de 15 dias.

Resultados semelhantes aos apresentados neste estudo foram observados por Joe e colaboradores (2012), que avaliaram a sobrevivência de *Azospirillum brasilense* após o encapsulamento em associação com milho sob condições de campo. Houve uma redução no número de células da bactéria inoculada, mas mesmo assim, as bactérias quando encapsuladas se mostraram mais eficientes quando comparadas com bactérias não encapsuladas durante os 12 meses de experimento.

Tittabutr e colaboradores (2007) analisando a sobrevivência de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* em inoculantes na forma líquida, turfosa ou com polímeros como o alginato de sódio, concluíram que a adição de alginato de sódio permitiu a sobrevivência das células bacterianas por maior tempo comparado com o inoculante turfoso ou apenas na forma líquida sem aditivos, porém não houve diferença de produtividade dos diferentes inoculantes quando aplicados no campo.

Comparando o carvão mineral com o alginato como veículos para inoculantes contendo bactérias que solubilizam fosfatos, Viveganandan e Jauhri (2000) confirmaram que o alginato apresentou menor perda de umidade, promovendo uma maior sobrevivência de *Pseudomonas e Bacillus* ao longo de 12 meses e, além disso, suportou melhor as variações de temperatura. Utilizando a mesma técnica de encapsulamento, trabalhos desenvolvidos com bactérias oxidantes de enxofre encapsuladas mostraram alta atividade oxidativa quando encapsuladas em matriz de alginato, resultando em um aumento de até 5350% de SO_4^{2-} no solo (LUCHETA, 2010).

Além das vantagens citadas do uso de alginato como veículo para biofertilizante, esse produto é de fácil obtenção por ser o polímero marinho mais abundante do mundo e capaz de suportar altas densidades de populações bacterianas (YOUNG et al., 2006). Com isso, fica claro que a utilização de polímeros de alginato como veículo de biofertilizantes contendo bactérias diazotróficas de vida livre é uma técnica viável que possibilitou a sobrevivência das bactérias por todo o período de realização do experimento, podendo ser aplicada na agricultura com objetivo de promover o crescimento da cultura e ainda reduzir a adubação nitrogenada.

Apesar das plantas de cana-de-açúcar neste experimento terem apresentado aumento significativos de massa seca de parte aérea, raízes e concentração de N principalmente 60 dias após a inoculação, no experimento anterior, com inoculação foliar foram observados efeitos significativos aos 7 DAI, mostrando que a eficiência do inoculante depende do veículo de inoculação e do ambiente no qual o mesmo é aplicado.

É fundamental a realização de ensaios em campo testando as duas técnicas de inoculação separadamente ou em conjunto, pois em condições de casa-de-vegetação pode-se verificar que cada técnica de inoculação atua em um momento diferente do desenvolvimento da cultura. Com a inoculação de bactérias diazotróficas de vida livre nas folhas favorecendo o crescimento da cana-de-açúcar no início do desenvolvimento da cultura e a inoculação de bactérias imobilizadas no solo favorecendo o crescimento da cana-de-açúcar mais tardiamente, as plantas podem apresentar um melhor desenvolvimento, pois a FBN ocorreria por períodos mais prolongados, contribuindo de forma mais efetiva para o crescimento e desenvolvimento da cultura.

3.3 Conclusões

A inoculação em cana-de-açúcar com bactérias diazotróficas isoladas da filosfera e liteira de bambu da Mata Atlântica via pulverização foliar mostrou um efeito precoce na promoção de crescimento de raízes e na concentração de N na parte aérea de cana-de-açúcar micropropagada enquanto que a inoculação de bactérias imobilizadas em esferas de alginato promoveu o crescimento da cana-de-açúcar principalmente 60 dias após a inoculação.

De modo geral, as taxas de FBN das amostras inoculadas nos dois experimentos apresentaram grande variabilidade, o que sugere que as bactérias inoculadas possuem diferentes capacidades de fixar N *in vivo*. As doses de N aplicadas interferiram na atividade da nitrogenase dos isolados. Apesar disso, todos os 10 isolados testados apresentaram capacidade de promoção de biomassa de parte aérea ou radicular ou de aumentar a concentração de N na parte aérea, sugerindo a possibilidade de utilização das bactérias isoladas da filosfera de bambu da Mata Atlântica na produção de biofertilizantes para cana-de-açúcar.

Os inoculantes contendo bactérias diazotróficas isoladas da filosfera de bambu da Mata Atlântica foram apresentados atividade de promoção de crescimento em condições de casa-de-vegetação, tanto na fase inicial do desenvolvimento da cultura quanto mais

tardiamente (60 dias após a inoculação). Testes em condições de campo são necessários para determinar sua eficiência agrônômica em condições usuais de cultivo e em diferentes condições edafoclimáticas.

Referências

- ANDREOTE, A.P.D. **Filosfera da Mata Atlântica**: isolamento e sistemática de cianobactérias, bioprospecção e caracterização da comunidade diazotrófica. 2013. 153p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- AZIZ, Z.F.A.; SAUD, H.M.; RAIN, K.A.; AHMED, O.H. Variable responses on early development of shallot (*Allium ascalonicum*) and mustard (*Brassica juncea*) plants to *Bacillus cereus* inoculation. **Malaysian Journal of Microbiology**, Minden, v. 8, n. 1, p. 47–50, 2012.
- BAREA, J.M. Mycorrhiza/bacteria interactions on plant growth promotion. In: OGOSHI, A.; KOBAYASHI, K; HOMMA, Y. ; KODAMA, F. ; KONDO, N.;AKINO, S. (Ed.), **Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-present status and future prospects**. Sapporo, Japan: Faculty of Agriculture, Hokkaido Univerisity, 1997. p.150-158,
- BASHAN, Y. Significance of timing and level of inoculation with rhizosphere bacteria on wheat plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.18, p.297–301, 1986.
- BASHAN, Y.; LEVANONY, H.; MITIKU, G. Changes in proton efflux of intact wheat roots induced by *Azospirillum brasilense* Cd. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa v.35, p.691–697, 1989.
- BASHAN, Y. ; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**., Ottawa, v.36, p.591-605, 1990.
- BASHAN, Y, HERNANDEZ, J.; LEYVA, L.A.; BACILIO, M. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 35, n. 5, p. 359–368, 2002.
- BENTLEY, B.L. Nitrogen fixation by epiphylls in a tropical rainforest. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St Louis, v. 74, p. 234-241, 1987.
- BESSEMS, E.P.M. Nitrogen fixation in the phyllosphere of Gramineae. **Agriculture Research Report**, Wageningen. n. 786, p.1-68, 1973.
- BISWAS, J.C.; LADHA,J.K.; DAZZO,F.B.; YANNI,Y.G.; ROLFE, B.G. Rhizobial Inoculation Influences Seedling Vigor and Yield of Rice. **Agronomy Journal**, Madison, v. 92, n. 5, p. 880, 2000.
- BOYE, K.; HANSEN, D. S. Sequencing of 16S rDNA of Klebsiella: taxonomic relations within the genus and to other Enterobacteriaceae. **International journal of medical microbiology : IJMM**, Jena, v. 292, n. 7-8, p. 495–503, fev. 2003.

BRONSON, K.F.; NEUE, H.U.; SINGH, U.; ABAO, E.B. Automated chamber measurements of methane and nitrous oxide flux in a flooded rice soil. 1. Residue, nitrogen, and water management. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 61, n. 3, p. 981-987, 1997.

BUCHER, C.A.; REIS, V.M. Biofertilizante contendo bactérias diazotróficas. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 17p. (Documentos, 247,)

CANELLAS, L.P. BALMORI, D.M.; MÉDICI, L.O.; AGUIAR, N.A.; CAMPOSTRINI, E.; ROSA, R.C.C.; FAÇANHA, A.R.; OLIVARES, F.L. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v. 366, n. 1/2, p. 119–132, ago. 2013.

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

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Intenção de plantio e segundo levantamento de grãos, safra 2014/2015**. Brasília, 2014, 18p. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_04_10_09_00_57_boletim_cana_portugues_-_4o_lev_-_13.pdf >. Acesso em: 13 jun. 2014.

DENARDIN, N.D.; FREIRE, J.R.J. Assessment of polymers for the formulation of legume inoculants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, UK, v.16, n.3, p. 215-217, 2000.

D'HAENE, B.; VANDESOMPELE, J.; HELLEMANS, J. Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. **Methods**, San Diego, v. 50, n. 4, p. 262–270, 2010.

FAO . **Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação**. World Agriculture Towards 2030/2050 Interim Report. Roma: FAO: Global Perspective Unit. 2006.

FREIBERG, E. Microclimatic parameters influencing nitrogen fixation in the phyllosphere in a Costa Rican premontane rain forest. **Oecologia**, Berlin, New York, Springer, v.117, p.9-18, 1998.

FUENTES-RAMIREZ, L.E.; CABALLERO-MELLADO, J., SEPÚLVEDA, J., MARTÍNEZ-ROMERO, E. Colonization of sugarcane by *Gluconacetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilisation. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam v. 29, p.117–128, 1999.

GOMEZ, S.P.M. **Diversidade de bactérias diazotróficas e fixação biológica do nitrogênio na Mata Atlântica**. 2012. 107p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

GOVINDARAJAN, M.; KWON, S.-W.; WEON, H.-Y. Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella* sp. GR9.

World Journal of Microbiology and Biotechnology, Oxford, v. 23, n. 7, p. 997-1006, 2007.

GUPTA, R.P.; GHAI, J.; GHAI, S.K.; KALRA, M.S. Studies on nitrogenase activity and exopolysaccharide production in *Rhizobium* isolates of mungbean (*Vigna radiata* L.) and gram (*Cicer arietinum* Linn). **Indian Journal Of Experimental Biology**, New Delhi, v. 20, p.835-837,1982.

HAMMAD, A.M.M.; EL-MOHANDES, M.A.O. Controlling fusarium wilt disease of cucumber plants via antagonistic microorganisms in free and immobilized states. **Microbiological Research**,Jena,v.154,p.113–117, 1999.

HARDY, R.W.F.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E.K.; BURNS, R.C. The acetylene/ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. **Plant Physiology**, Urbana, v. 43, p. 1185-1207, 1968.

HEDIN, L.O. BROOKSHIRE, E.N.J.; MENGE, D.N.L.;BARRON, A.R. The Nitrogen Paradox in Tropical Forest Ecosystems. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, v. 40, n. 1, p. 613-635, 2009.

ISLAM, M.R.; SULTANA, T.;JOE, M.M.; YIM, W.;CHO, J.C.; SA, T. Nitrogen-fixing bacteria with multiple plant growth-promoting activities enhance growth of tomato and red pepper. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 53, p. 1004-1015, 2013.

IVANOVA, E.; TEUNOU, E.;PONCELET, D. Alginate based macrocavities as inoculants carriers for production of nitrogen biofertilisers. In: BALKAN SCIENTIFIC CONFERENCE OF BIOLOGY.2005. Bulgaria, Plovdiv. **Proceedings...**Bulgaria, Plovdiv, 2005. p.19–21.

JAGNOW, G.C. Nitrogenase (C₂H₂) activity in non-cultivated and cereal plants; influence of nitrogen fertilizer on population and activity of nitrogen fixing bacteria . **Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde**, Weinheim, v.146, p.217–227, 1983.

JOE, M.M. KARTHIKEYAN, B.; CHAUHAN, P.S.; SHAGOL, C.; ISLAM R., DEIVEEKASUNDARAM, M.; SA, T. Survival of *Azospirillum brasilense* flocculated cells in alginate and its inoculation effect on growth and yield of maize under water deficit conditions. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 50, p. 198–206, 2012.

JONES, K. The fate of nitrogen fixed by a free-living blue green alga. In :Granhall,V. (Ed) Environmental Role of Nitrogen fixing Blue-green Algae and Asymbiotic bacteria. **Ecological Bulletin**, Stockohlm, v.26, p. 199-205, 1978.

JONES, K.; WILSON, R.E. The fate of nitrogen fixed by a free-living blue green alga. In :Granhall,V. (Ed) Environmental Role of Nitrogen fixing Blue-green Algae and Asymbiotic bacteria. **Ecological Bulletin**, Stockohlm, v.26, p.158-163, 1978.

KLOEPPER, J.W., LIFSHITZ, R., ZABLOTOWICZ, R.M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.7, p.39–43. 1989.

KNOTH, J. L.; HYUNGKIM, S.; ETTL, G.J.; DOTY, S. Effects of cross host species inoculation of nitrogen-fixing endophytes on growth and leaf physiology of maize. **GCB Bioenergy**, London, v. 5, n. 4, p. 408–418, 2013.

KOGEL, A.Z.; FRANKEN, P.; HUCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite – what decides? **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.9, p.358-363, 2006.

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; BROEK, A.V.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 8, n. 7, p. 298-300, 2000.

LINDOW, S.E.; BRANDL, M.T. MINIREVIEW, **Microbiology of the Phyllosphere. Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 4, p. 1875–1883, 2003.

LUCHETA, A.R. **Oxidação Microbiológica do Enxofre Elementar no Solo**. 2010. 178p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

MANJULA, K.; PODILE, A.R. Chitin-supplemented formulations improve biocontrol and plant growth promoting efficiency of *Bacillus subtilis* AF 1. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.7, p. 618–625, 2001.

MURTY, M.G. Nitrogen fixation (acetylene reduction) in the phyllosphere of some economically important plants. **Plant and Soil**, The Hague, v.73, p.151-153, 1983.

MURTY, M.G. Phyllosphere of Cotton as a Habitat for Diazotrophic Microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, n. 4, p. 713–718, 1984.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Diazotrophic associations in sugar cane cultivation in South India. **Tropical Agriculture**, Kerala v.76, p.171–178, 1999.

_____. Influence of fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 2, p. 7-14, 2006.

NJOLOMA, J.; TANAKA, K.; SHIMIZU, T.; NISHIGUCHI, T.; ZAKRIA, M.; AKASHI, R.; OOTA, M.; AKAO, S. Infection and colonization of aseptically micropropagated sugarcane seedlings by nitrogen-fixing endophytic bacterium, *Herbaspirillum* sp. B501gfp1. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.43, p. 137-143, 2006.

OLIVEIRA, A.L.M.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v.45, p.106-113, 2009.

PATI, B.R.; CHANDRA, K. Effect of spraying nitrogen-fixing phyllospheric bacterial isolates on wheat plants. **Plant and Soil**, The Hague, v.61, p.419-427, 1981.

_____. Impact of selected phyllospheric diazotrophs on the growth of wheat seedlings and assay of the growth substances produced by the diazotrophs, **Microbiological Research**, Jena, v.150, p.121-127, 1995.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. Regulando o crescimento e o desenvolvimento: os hormônios vegetais. In: RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. (Ed.) **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.28, 2001. p.646-675.

REKHA, P.D.; LAI, W.A.; ARUN, A.B.; YOUNG, C.C. Effect of free and encapsulated *Pseudomonas putida* CC-FR2-4 and *Bacillus subtilis* CC-pg104 on plant growth under gnotobiotic conditions. **Bioresource Technology**, New York, v. 98, n. 2, p. 447–451, 2007.

RODRIGUES, N.J.; MALAVOLTA, J.R.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* Tipo B. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 2, p. 16, 1986.

SALA, V.M.R.; FREITAS, S.S.; DONZELI, V.P.; FREITAS, J.G.; GALLO, P.B. ; SILVEIRA, A.P.D.S. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.29, p.345-352, 2005.

SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas para crescimento de plantas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.1, p. 231-234, 1975.

SCHOEBITZ, M.; LÓPEZ, M. D.; ROLDÁN, A. Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil–plant fertilization. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 33, n. 4, p. 751–765, 2013.

SCHREIBER, L.; KRIMM, U., KNOLL, D., SAYED, M., AULING, G., AND KROPPESTEDT, R. M. Plant-microbe interactions: identification of epiphytic bacteria and their ability to alter leaf surface permeability. **The New Phytologist**, London , v. 166, n. 2, p. 589–594, 2005.

SENGUPTA, B.; SEM, S.P. Two-way Exchange of metabolites between Phyllosphere nitrogen fixing micro-organisms and the host plant. (Botany Section). INDIAN SCIENCE CONGRESS ASSOCIATION, 66;.1978. " Hyderabad. **Proceedings...** Hyderabad, 1978. 18p.

SEVILLA, M.; BURRIS, R.H.; GUNAPALA, N.; KENNEDY, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and ¹⁵N₂ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and nif- mutant strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, US, v.14, p.358–366, 2001.

SILVA, M.F.; OLIVEIRA, P.J.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G.; REIS, V.M. Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 11, p. 1437–1443, 2009.

SILVA, M.F.; ANTÔNIO, C.S.; OLIVEIRA, P.J.; XAVIER, G.R. RUMJANEK, N.G.; SOARES, L.H.B.; REIS, V.M. Survival of endophytic bacteria in polymer-based inoculants

and efficiency of their application to sugarcane, **Plant and Soil**, The Hague, v.356, p.231–243, 2012.

SILVEIRA, A.P.D.; SILVA, L.R.; AZEVEDO, I.C.; OLIVEIRA, E.; MELETTI, L.M.M. Desempenho de fungos micorrízicos arbusculares na produção de mudas de maracujazeiro-amarelo, em diferentes substratos. **Bragantia**, Campinas, v.62, n.1, p.89-99, 2003.

SKUJINS, J.; KLUBEK, B. Nitrogen fixation and cycling by blue-green algae-lichens crusts in arid rangeland soils, In: GRANDHALL, U. (Ed) **Environmental role of nitrogen fixing blue-green algae and symbiotic bacteria.**, Stockholm:Swedish Natural Resources Council, 1978. p.164-171. (Ecology Bulletin 26).

SUDHAKAR, P.; CHATTOPADHYAY, G.N.; GANGWAR, S.K.; GHOSH, J.K. Effect of foliar application of *Azotobacter*, *Azospirillum* and *Beijerinckia* on leaf yield and quality of mulberry (*Morus alba*). **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 134, p.227-234, 2000.

THALLER, M.C.; BERLUTTI, F.; SCHIPPA, S.; IORI, P.; PASSARIELLO, C.; ROSSOLINI, G.M. Heterogeneous patterns of acid phosphatases containing low-molecular-mass Polipeptides in members of the family *Enterobacteriaceae* **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v.4, p.255–261, 1995.

TITABUTR, P.; PAYAKAPONGA, W.; TEAUMROONG, N.; SINGLETON, P.W.; BOONKERD, N. Growth, Survival and Field Performance of *Bradyrhizobial* Liquid Inoculant Formulations with Polymeric Additives. **Science Asia**, Bangkok, v. 33, p. 69–77, 2007.

TRINICK, M.J. Competition between rhizobial strains for nodulation. In: VINCENT, J.M., (Ed.). **Nitrogen fixation in legumes**. Sidney: Academic Press, 1982. p.229-238.

TRIVEDI, P.; PANDEY, A.; PALNI, L.M.S. Carrier-based preparations of plant growth-promoting bacterial inoculants suitable for use in cooler regions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.21, p.941–945, 2005.

VARGAS, L. CARVALHO, T.L.G.; FERREIRA, P.C.G.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; HEMERLY, A.S. Early responses of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings to inoculation with beneficial diazotrophic bacteria are dependent on plant and bacterial genotypes. **Plant and Soil**, The Hague v. 356, p. 127–137, 2012.

VASSILEVA, M. AZCON, R.; BAREA, J.M.; VASSILEV, N. Effect of encapsulated cells of *Enterobacter* sp on plant growth and phosphate uptake. **Bioresource Technology**, New York, v. 67, p. 229–232, 1999.

VIVEGANANDAN, G.; JAUHRI, K. S. Growth and survival of phosphate-solubilizing bacteria in calcium alginate. **Microbiological Research**, Jena, v. 155, n. 3, p. 205-207, 2000.

WIDMER, F.; SHAFFER, B.T.; PORTEOUS, L.A.; SEIDLER, R.J. Analysis of

litter at a Douglas fir forest site in the Oregon Cascade nifH gene pool complexity in soil and Mountain Range. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, p.374-380, 1999.

WU, Z.S.; ZHAO, Y.F.; KALEEM, I.; LI, C. Preparation of calcium-alginate micro- capsuled microbial fertilizer coating *Klebsiella oxytoca* Rs-5 and its performance under salinity stress, **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 47,p. 152-159, 2011.

WU,Z.; PENG,Y.;GUO,L.; LI, C. Root colonization of *encapsulated Klebsiella oxytoca* Rs-5 on cotton plants and its promoting growth performance under salinity stress, **European Journal of Soil Biology**, Paris, v.60 p.81-87 , 2014.

YANG, C.H.; CROWLEY, D.E.; BORNEMAN, J.; KEEN, N.T. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, p. 3889–3894, 2001

YOUNG, C.; REKHA, P.D.; LAI, W.A.; ARUN, B.A. Encapsulation of Plant Growth-Promoting Bacteria in Alginate Beads Enriched With Humic Acid. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.95, p.76-83, 2006.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando o bioma Mata Atlântica, poucos são os estudos que relatam a contribuição da comunidade microbiana na ciclagem dos elementos, principalmente o nitrogênio. Ainda mais escassos são os estudos e descrições da diversidade de micro-organismos diazotróficos que colonizam a filosfera de espécies vegetais da Mata Atlântica.

Dentro deste contexto, foi realizado um isolamento em meio de cultura isento de N de bactérias epifíticas da superfície de folhas e liteira de bambu da Mata Atlântica. Os isolados foram caracterizados e foi confirmado o potencial biotecnológico dos mesmos em testes *in vitro*. Estes apresentaram potenciais mecanismos de promoção de crescimento vegetal *in vitro* como fixação biológica de nitrogênio, produção de AIA, sideróforos, ACC desaminase, quitinases e solubilização de fosfatos.

A técnica de isolamento permitiu a seleção de grupos de micro-organismos diazotróficos e através do sequenciamento do gene rRNA 16S, foi observada alta similaridade à família *Enterobacteriaceae* e alguns isolados ao gênero *Klebsiella*, importante grupo de bactérias fixadoras de N. Dessa forma observou-se que bactérias do gênero *klebsiella* tem importante contribuição na promoção de crescimento de gramíneas. Além disso o gene *nifH* foi confirmado em alguns dos isolados, confirmando o caráter diazotrófico dos mesmos.

Devido a grande demanda por tecnologias que visem uma produção agrícola mais sustentável, foi testada a inoculação das bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar micropropagada com objetivo de avaliar o potencial das mesmas em promover o crescimento das plantas e analisar a possibilidade de reduzir o uso de adubação nitrogenada.

Foram observados resultados positivos com a inoculação de bactérias diazotróficas selecionadas na superfície das folhas de cana-de-açúcar micropropagada, uma vez que foram observados incrementos de massa seca de parte aérea, raízes e concentração de N, principalmente nas fases precoces do desenvolvimento da cultura.

O encapsulamento das bactérias em micro-esferas de alginato e posterior inoculação no solo onde foram transplantadas mudas de cana-de-açúcar micropropagadas, também apresentou incrementos significativos de massa seca na parte aérea, raízes e concentração de N em fases tardias do desenvolvimento da cultura, com redução de até 50% da adubação nitrogenada recomendada.

Este trabalho gerou importantes informações não somente sobre alguns grupos de bactérias que colonizam a superfície de folhas e liteiras de bambu da Mata Atlântica, mas também sugere a possibilidade de aplicação dessas bactérias na agricultura, na forma de biofertilizante, com diferentes veículos de aplicação, como foi o caso da aplicação de forma líquida por pulverização foliar ou por encapsulamento em micro-esferas de alginato e inoculação no solo.

O uso de um consórcio com as bactérias isoladas da Mata Atlântica para produção do biofertilizante ou mesmo o veículo de aplicação do biofertilizante que será utilizado, líquido ou encapsulado, para inoculação em cana-de-açúcar ou em outras gramíneas de interesse agrônômico, dependerá de resultados em condições de campo para confirmação dos resultados observados em casa-de-vegetação, e validação da viabilidade do inoculante para futuras aplicações na agricultura.

ANEXOS

Anexo A - Meio de cultura para bactérias diazotróficas assimbiontes (DOBEREINER et al., 1995).

Glicose.....	20g
K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5g
FeEDTA.....	4mL
NaMoO ₄ .2H ₂ O.....	0,02g
CaCO ₃	3g
Azul de Bromotimol.....	2,5mL
Agar.....	18g

Completar com água destilada para 1L

Ajustar pH para 7,5

Anexo B – Meio de cultura Dyg's (RODRIGUES NETO et al., 1986)

Glicose.....	2g
Ácido málico.....	2g
Peptona.....	1,5g
Extrato de levedura.....	2g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄	0,5g
Ácido glutâmico.....	1,8g

Completar com água destilada para 1L

Ajustar pH para 7,5

Anexo C – Meio de cultura JNFb (DOBEREINER et al., 1995).

Ácido Málico	5g
K ₂ HPO ₄	0,6g
KH ₂ PO ₄	1,8g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,2g
NaCl.....	0,1g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,02g
NaMoO ₄ .2H ₂ O.....	0,002g
Azul de Bromotimol (0,5% em 2N de KOH)	2mL
FeEDTA (1,64%)	4mL
KOH.....	4,5g
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,00008g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0024g

Completar com água destilada para 1L

Ajustar pH para 7,5

Anexo D - meio de cultura M9

Na ₂ HPO ₄	6g
KH ₂ PO ₄	3g
NaCl	0,5g
MgSO ₄	1mL
CaCl ₂	10mL
Glicose.....	2g
Ágar.....	15g

Completar com agua destilada para 1L

Ajustar pH para 7,5

Anexo E- Meio de cultura para produção de quitinase (Hsu; Lockwood, 1975)

Quitina Coloidal	4g
K ₂ HPO ₄	0,7g
KH ₂ PO ₄	0,3g
MgSO ₄ .5H ₂ O.....	0,5g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01g
ZnSO ₄	0,001g
MnCl ₂	0,001g
Ágar.....	20g

Completar com agua destilada para 1L

Ajustar pH para 7,0

Anexo F- Caracterização morfológica dos isolados bacterianos obtidos de Folhas e liteiras de bambu da Mata Atlântica

(Continua)

Identificação	Parcela de origem	Amostra de origem	Consistência	Cor	pH
A4F	A4	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
A5F	A5	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
A6F	A6	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
A7F	A7	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
A7FA	A7	Folha	Gomosa	branca	Ácido
A8F	A8	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
B2F	B2	Folha	Gomosa	branca	Ácido
B4F	B4	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
B5F	B5	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
B6F	B6	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
B7F	B7	Folha	Gomosa	branca	Ácido
C1F	C1	Folha	Gomosa	amarela	Ácido

Anexo F- Caracterização morfológica dos isolados bacterianos obtidos de Folhas e liteiras de bambu da Mata Atlântica

(Continua)

Identificação	Parcela de origem	Amostra de origem	Consistência	Cor	pH
C4F	C4	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
C5F	C5	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
C6F	C6	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
C7F	C7	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
D4F	D4	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
D4FA	D4	Folha	Gomosa	branca	Ácido
D5F	D5	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
D6F	D6	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
D7F	D7	Folha	Gomosa	branca	Ácido
E4F	E4	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
E5F	E5	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
E6F	E6	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
E6FA	E6	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
E7F	E7	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
G4F	G4	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
G5F	G5	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
G6F	G6	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
G7F	G7	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
G8F	G8	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
G8FA	G8	Folha	Gomosa	branca	Ácido
H3F	H3	Folha	Gomosa	branca	Ácido
H4F	H4	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
H5F	H5	Folha	Gomosa	branca	Ácido
H6F	H6	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
H7F	H7	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
H8F	H8	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
I4F	I4	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
I5F	I5	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
I6F	I6	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
I7F	I7	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
I8F	I8	Folha	Gomosa	branca	Ácido
J1F	J1	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
J3F	J3	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
J4F	J4	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
J5F	J5	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
J6F	J6	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
J7F	J7	Folha	Gomosa	amarela	Ácido
J8F	J8	Folha	Gomosa	branca	Ácido
A2L	A2	Folha	Gomosa	branca	Ácido
A3L	A3	Folha	Gomosa	branca	Ácido
A5L	A5	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
A6L	A6	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido

Anexo F- Caracterização morfológica dos isolados bacterianos obtidos de Folhas e liteiras de bambu da Mata Atlântica

(Continua)

Identificação	Parcela de origem	Amostra de origem	Consistência	Cor	pH
A7L	A7	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
B2L	B2	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
B5L	B5	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
B6L	B6	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
B7L	B7	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
B8L	B8	Liteira	Gomosa	branca	Ácido
C1L	C1	Liteira	Gomosa	branca	Ácido
C3L	C3	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
C4L	C4	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
C6L	C6	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
C5L	C5	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
C7L	C7	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
C9L	C9	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
D0L	D0	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
D3L	D3	Liteira	Gomosa	branca	Ácido
D4L	D4	Liteira	Gomosa	branca	Ácido
D5L	D5	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
D6L	D6	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
D9L	D9	Liteira	Gomosa	branca	Ácido
E2L	E2	Liteira	Gomosa	branca	Ácido
E4L	E4	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
E5L	E5	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
E6L	E6	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
E7L	E7	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
E9L	E9	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
F0L	F0	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
F2L	F2	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
F4L	F4	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
F5L	F5	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
F6L	F6	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
F7L	F7	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
F8L	F8	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
G2L	G2	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
G4L	G4	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
G4LA	G4	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
G5L	G5	Liteira	Gomosa	branca	Ácido
G6L	G6	Liteira	Gomosa	branca	Ácido
G7L	G7	Liteira	Gomosa	branca	Ácido
G9L	G9	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
H0L	H0	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
H2L	H2	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido

Anexo F- Caracterização morfológica dos isolados bacterianos obtidos de Folhas e liteiras de bambu da Mata Atlântica

(Conclusão)

Identificação	Parcela de origem	Amostra de origem	Consistência	Cor	pH
H4L	H4	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
H5L	H5	Liteira	Gomosa	branca	Ácido
H5LA	H5	Liteira	Gomosa	branca	Ácido
H6L	H6	Liteira	Gomosa	branca	Ácido
H7L	H7	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
I1L	I1	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
I4L	I4	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
I5L	I5	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
I6L	I6	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
I7L	I7	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
I7la	I7	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
I8L	I8	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
J3L	J3	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
J4L	J5	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
J6L	J6	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
J7L	J7	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
J8L	J8	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
J9L	J9	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido
J5L	J5	Liteira	Gomosa	amarela	Ácido