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

**Cultivo de bactérias da rizosfera da cana-de-açúcar e a
interferência dos exsudatos da planta em seu desenvolvimento**

Danielle Gonçalves dos Santos

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2014**

Danielle Gonçalves dos Santos
Bióloga

**Cultivo de bactérias da rizosfera da cana-de-açúcar e a interferência dos
exsudatos da planta em seu desenvolvimento**

Orientador:
Prof. Dr. **FERNANDO DINI ANDREOTE**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2014

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

Santos, Danielle Gonçalves dos

Cultivo de bactérias da rizosfera da cana-de-açúcar e a interferência dos exsudatos da planta em seu desenvolvimento / Danielle Gonçalves dos Santos. - - Piracicaba, 2014.
86 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Cultivo bacteriano 2. Meios de cultura 3. Diversidade genética 4. Diversidade metabólica 5. Sequenciamento de DNA I. Título

CDD 633.61
S237c

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

*Aos meus pais, Saulo e Edna,
e meus irmãos, Saulo e Daniel.*

Ofereço

*Ao meu esposo, Elton,
por fazer parte da minha vida.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, bênçãos e por ter iluminado meus caminhos.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de realizar o curso.

Ao Professor Dr. Fernando Dini Andreote, pela orientação, apoio e a oportunidade de aprendizagem.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu esposo Elton, pelo companheirismo, amor, a capacidade de me acalmar e fazer feliz.

Aos meus pais, Saulo e Edna, e irmãos Saulo e Daniel, pela educação, conselhos, compreensão e apoio.

A toda minha família e amigos, pelos momentos de desconcentração.

Aos técnicos do laboratório, Denise, Fernando e Sonia, pela amizade e auxílios.

Aos colegas de trabalhos, em especial a Simone pelos ensinamentos e ajuda na execução do trabalho; ao Ademir, Thiago, Joelma e Armando pelos conselhos e ensinamentos imprescindíveis.

Aos demais companheiros de trabalho, Fábio, Doroteia, Polé, Mylenne, Julia, Juliana, Emiliana, Luana, Lucas, Diogo, Pedro, Cristiane, Michele, Danice, Joice, Hernan e demais, por todas as ajudas.

A todos que estiveram presentes de forma direta ou indireta e me ajudaram na conclusão deste trabalho,

OBRIGADA!

"Não é preciso ter olhos abertos para ver o sol, nem é preciso ter ouvidos afiados para ouvir o trovão. Para ser vitorioso você precisa ver o que não está visível."

Sun Tzu

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS	15
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Cana-de-açúcar.....	23
2.2 O ambiente rizosfera	25
2.2.1 O filo Proteobacteria.....	28
2.2.1.1 O gênero <i>Enterobacter</i>	29
2.2.1.2 O gênero <i>Burkholderia</i>	30
2.2.1.3 O gênero <i>Pseudomonas</i>	30
2.2.2 O filo Firmicutes	31
2.2.2.1 O gênero <i>Bacillus</i>	31
2.2.3 O filo Actinobacteria	32
2.2.3.1 O gênero <i>Arthrobacter</i>	32
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivos específicos	35
4 HIPOTESES.....	37
5 MATERIAL E MÉTODOS	39
5.1 Amostragem	39
5.2 Isolamento e cultivo do solo e da rizosfera de cana-de-açúcar.....	40
5.2.1 Meio de cultura TSB (<i>Tryptone Soya Broth</i>).....	40
5.2.2 Meio de cultura MSSC (<i>Mineral Salts Starch Casein</i>)	40
5.2.3 Meio de cultura LAM (<i>Leeds Acinetobacter Medium</i>)	41
5.2.4 Meio de cultura KB (<i>King B</i>)	41
5.2.5 Meio de cultura LGI e JNFb.....	41
5.3 Caracterização e identificação dos isolados bacterianos	42
5.3.1 Coloração de Gram e purificação das linhagens contaminadas.....	43
5.3.2 Extração de DNA dos isolados bacterianos	43
5.3.3 BOX-PCR	44
5.3.4 Sequenciamento parcial 16S rRNA	44
5.3.4.1 Amplificação do gene ribossomal 16S rRNA.....	44

5.3.4.2 Análise das sequências	45
5.3.5 Perfis metabólicos dos isolados determinado por BIOLOG®	46
5.4 Obtenção dos exsudatos radiculares de cana-de-açúcar	47
5.5 Efeito dos exsudatos radiculares sobre o desenvolvimento das bactérias	48
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
6.1 Isolamento microbiano	49
6.2 Caracterização dos isolados bacterianos	50
6.3 Identificação dos isolados	56
6.4 Perfis metabólicos dos isolados determinados por BIOLOG®	64
6.5 Efeito dos exsudatos radiculares sobre o desenvolvimento das bactérias	65
6.5.1 <i>Enterobacter</i> spp.	66
6.5.2 <i>Bacillus</i> spp.	68
6.5.3 <i>Arthrobacter</i> spp.	70
6.5.4 <i>Burkholderia</i> spp.	72
6.5.5 <i>Pseudomonas</i> spp.	74
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
REFERÊNCIAS	79

RESUMO

Cultivo de bactérias da rizosfera da cana-de-açúcar e a interferência dos exsudatos da planta em seu desenvolvimento

A cana-de-açúcar (*S. officinarum*) é uma gramínea perene de grande importância na economia brasileira. Devido a isto, estudos relativos ao aprimoramento das condições de cultivo são de grande interesse, podendo ser uma destas bases um melhor conhecimento sobre as comunidades microbianas associadas à cana-de-açúcar. Sabe-se que a rizosfera é um ambiente de íntima interação entre as plantas e seus respectivos microbiomas, sendo esta relação intermediada pela exsudação radicular. Este estudo teve como objetivo realizar o cultivo de bactérias da rizosfera e do solo de cana-de-açúcar, sendo os isolados obtidos posteriormente caracterizados geneticamente (BOX-PCR e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA) e metabolicamente (BIOLOG®). Os resultados demonstraram que o número de bactérias cultiváveis na rizosfera é maior comparado ao solo, sendo que dentre os isolados destaca-se a maior afiliação taxonômica ao filo Proteobacteria (principalmente as classes γ -proteobacteria e β -proteobacteria). A análise de BOX-PCR mostrou uma grande diversidade genética, mesmo quando comparados isolados obtidos a partir do mesmo meio de cultivo, ou pertencentes ao mesmo grupo taxonômico. Em contrapartida, a análise de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA mostrou que muitos isolados preservam grande similaridade do gene ribossomal analisado. A análise de perfil metabólico corroborou com os dados de BOX-PCR, onde isolados com afiliação taxonômica bastante correlata apresentaram capacidades distintas de utilizar as diversas fontes de carbono avaliadas. Por fim, esta diversidade metabólica se traduziu na obtenção de respostas distintas de isolados pertencentes aos mesmos gêneros bacterianos, isolados do solo ou da rizosfera, quando estes foram cultivados na presença de exsudatos radiculares. De maneira geral, este estudo demonstrou que as plantas de cana-de-açúcar podem influenciar o comportamento das comunidades bacterianas presentes no solo, e indicaram que existe uma grande diversificação dos organismos presentes na rizosfera, sendo a resposta a este ambiente diferenciada de forma independente da afiliação taxonômica dos isolados.

Palavras-chave: Cultivo bacteriano; Meios de cultura; Diversidade genética; Diversidade metabólica; Sequenciamento de DNA

ABSTRACT

Cultivation of bacteria from the rhizosphere of sugarcane and the interference of the roots exudates on its development

The sugarcane plant (*S. officinarum*) is a perennial gamineous with a great importance for the Brazilian economy. Due to this, studies related to the improvement of cultivation conditions are of great importance, indicating that one of these bases must contribute with the better knowledge about the microbial communities associated with sugarcane. It is known that the rhizosphere is an environment that hosts an intimate interaction between plants and their respective microbiomes, being it mediated by the roots exudates. This study aimed to cultivate bacterial isolates from soil and rhizosphere of sugarcane, followed by the genetic (BOX-PCR and partial sequencing of the 16S rRNA gene) and metabolic (BIOLOG[®]) characterization of them. Results demonstrated higher numbers of cultivable bacteria in rhizosphere when compared to soil samples, with the prevalent affiliation of the isolates to the phylum Proteobacteria (specially with the classes γ -proteobacteria and β -proteobacteria). The BOX-PCR results showed a great genetic diversity, even when isolates obtained in the same culture medium or affiliated to the same taxa are compared. In counterpart, the analysis of the 16S rRNA gene sequence indicated that several isolates preserve high similarities in the ribosomal gene. The metabolic profiling results corroborated with the BOX-PCR data, which isolates highly correlated in the taxonomical analyses presented distinct capacities to use the carbon sources that were tested. At the end, this metabolic diversity was evidenced by the distinct behavior of isolates belonging to the same genera, isolated from soils or rhizosphere samples as well, when cultivated in the presence of roots exudates. In general, this study demonstrated that sugarcane plants can influence the behavior of bacterial communities present in soils, and indicated a great diversification of organisms present in the rhizosphere being the response to this environment very particular, regardless of the taxonomical affiliation of the isolates.

Keywords: Bacterial cultivation; Culture media; Genetic diversity; Metabolic diversity; DNA sequencing

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Áreas de cultivo de cana-de-açúcar no Brasil (UNIÃO DAS INDUSTRIAS DE CANA-DE-AÇÚCAR - UNICA, 2014).	23
Figura 2 -	Processo industrial da cana-de-açúcar, os produtos e subprodutos gerados (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).	24
Figura 3 -	Estrutura da rizosfera (LYNCH; LEIJ, 2001)	26
Figura 4 -	Local de coleta das amostras de solo e rizosfera das plantas de cana-de-açúcar utilizadas no presente estudo.	39
Figura 5 -	Esquema ilustrativo da metodologia de diluição seriada utilizada para o isolamento e cultivo de bactérias presentes em amostras de solo e de rizosfera de cana-de-açúcar.	40
Figura 6 -	Sistema de coleta para exsudatos de cana-de-açúcar adaptado de Vasconcelos e colaboradores (2009).	47
Figura 7 -	Quantificação de bactérias cultiváveis em amostras de solo e de rizosfera de cana-de-açúcar por meio do emprego de diferentes meios de cultivo. Os valores apresentados foram estimados em unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de solo, e obtidos por meio de determinação da média de três repetições biológicas. As barras indicam o desvio padrão da média, e a diferença estatística, determinada pelo Teste Turkey ($p < 0,05$) é indicada em cada par de comparações por *. 50	
Figura 8 -	Agrupamento dos isolados bacterianos obtidos no meio de cultivo TSB, determinado pela análise de BOX-PCR. Os perfis de bandas deram origem a uma matriz, e os isolados foram agrupados por meio da análise de <i>Clusters</i> com base no método de similaridade <i>Jaccard</i> . Os símbolos indicam isolados referentes à rizosfera (Rz) e solo (Sl). Isolados indicados com o item * foram submetidos ao sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.	52
Figura 9 -	Agrupamento dos isolados bacterianos obtidos no meio de cultivo MSSC, determinado pela análise de BOX-PCR. Os perfis de bandas deram origem a uma matriz, e os isolados foram agrupados por meio da análise de <i>Clusters</i> com base no método de similaridade <i>Jaccard</i> . Os símbolos indicam isolados referentes à rizosfera (Rz) e solo (Sl).	

- Isolados indicados com o item * foram submetidos ao sequenciamento parcial do gene 16S rRNA..... 53
- Figura 10 - Agrupamento dos isolados bacterianos obtidos no meio de cultivo LAM, determinado pela análise de BOX-PCR. Os perfis de bandas deram origem a uma matriz, e os isolados foram agrupados por meio da análise de *Clusters* com base no método de similaridade *Jaccard*. Os símbolos indicam isolados referentes à rizosfera (Rz) e solo (SI). Isolados indicados com o item * foram submetidos ao sequenciamento parcial do gene 16S rRNA..... 54
- Figura 11 - Agrupamento dos isolados bacterianos obtidos no meio de cultivo KB, determinado pela análise de BOX-PCR. Os perfis de bandas deram origem a uma matriz, e os isolados foram agrupados por meio da análise de *Clusters* com base no método de similaridade *Jaccard*. Os símbolos indicam isolados referentes à rizosfera (Rz) e solo (SI). Isolados indicados com o item * foram submetidos ao sequenciamento parcial do gene 16S rRNA..... 55
- Figura 12 - Agrupamento dos isolados bacterianos obtidos no meio de cultivo LGI e JNFb, determinado pela análise de BOX-PCR. Os perfis de bandas deram origem a uma matriz, e os isolados foram agrupados por meio da análise de *Clusters* com base no método de similaridade *Jaccard*. Os símbolos indicam isolados referentes à rizosfera (Rz) e solo (SI). Isolados indicados com o item * foram submetidos ao sequenciamento parcial do gene 16S rRNA..... 56
- Figura 13 - Frequência dos grupos bacterianos em nível de gênero isolados da cana-de-açúcar identificados pelo sequenciamento parcial do gene 16s rRNA nos diferentes meios de cultura utilizados (TSB, MSSC, LAM, KB e LGI/JNFb)..... 57
- Figura 14 - Filogenia dos isolados classificados no filo Proteobacteria com base na similaridade de aproximadamente 600pb do gene 16S rRNA de acordo com o coeficiente de Neighbor-joining. Os códigos apresentados com os nomes de espécies são referentes ao código das sequências no GenBank. As figuras ● representam isolados da rizosfera e Δ isolados do solo. Os códigos entre parentes na frente de cada isolado represente o meio de cultura no qual foi isolado. A sequência parcial do gene 16S

rRNA de *Arthrobacter* sp foi utilizada como grupo externo para enraizamento da árvore. Os valores de *bootstrap* observados nas árvores foram obtidos com base em 500 sub-amostragens.59

Figura 15 - Filogenia dos isolados classificados no filo Actinobacteria com base na similaridade de aproximadamente 600pb do gene 16S rRNA de acordo com o coeficiente de Neighbor-joining. Os códigos apresentados com os nomes de espécies são referentes ao código das sequências no GenBank. As figuras ● representam isolados da rizosfera e Δ isolados do solo. Os códigos entre parentes na frente de cada isolado represente o meio de cultura no qual foi isolado. A sequência parcial do gene 16S rRNA de *Bacillus* sp foi utilizada como grupo externo para enraizamento da árvore. Os valores de *bootstrap* observados nas árvores foram obtidos com base em 500 sub-amostragens.60

Figura 16 - Filogenia dos isolados classificados no filo Firmicutes com base na similaridade de aproximadamente 600pb do gene 16S rRNA de acordo com o coeficiente de Neighbor-joining. Os códigos apresentados com os nomes de espécies são referentes ao código das sequências no GenBank. As figuras ● representam isolados da rizosfera e Δ isolados do solo. Os códigos entre parentes na frente de cada isolado represente o meio de cultura no qual foi isolado. A sequência parcial do gene 16S rRNA de *Sphingomonas* sp foi utilizada como grupo externo para enraizamento da árvore. Os valores de *bootstrap* observados nas árvores foram obtidos com base em 500 sub-amostragens.61

Figura 17 - Filogenia dos isolados classificados no filo Bacteroidetes com base na similaridade de aproximadamente 600pb do gene 16S rRNA de acordo com o coeficiente de Neighbor-joining. Os códigos apresentados com os nomes de espécies são referentes ao código das sequências no GenBank. As figuras ● representam isolados da rizosfera e Δ isolados do solo. Os códigos entre parentes na frente de cada isolado represente o meio de cultura no qual foi isolado. A sequência parcial do gene 16S rRNA de *Arthrobacter* sp foi utilizada como grupo externo para enraizamento da árvore. Os valores de *bootstrap* observados nas árvores foram obtidos com base em 500 sub-amostragens.61

- Figura 18 - Número de isolados bacterianos pertencentes a cada gênero, obtidos a partir do cultivo oriundo de amostras de solo ou rizosfera de cana-de-açúcar. A classificação foi realizada por meio do seqüenciamento parcial do gene 16s rRNA..... 63
- Figura 19 - Caracterização dos isolados da rizosfera (178Rz) e solo (90SI) pertencente ao gênero *Enterobacter*. A) Caracterização genética dos isolados (análise filogenética do gene parcial 16S rRNA e perfil de BOX-PCR); B) Comparação do perfil metabólico dos isolados pela análise de BIOLOG® [apenas valores diferentes estatisticamente ($p < 0,05$ – teste de Tukey) são apresentados, sendo os mesmos transformados em $\log_2$ da razão rizosfera/solo]; C) Comparação das curvas de multiplicação celular de ambos isolados frente as distintas concentrações de exsudatos radiculares (linhas contínuas indicam os tratamentos com exsudatos e as linhas pontilhadas indicam os controles)..... 67
- Figura 20 - Caracterização dos isolados da rizosfera (263Rz) e solo (257SI) pertencente ao gênero *Bacillus* spp. A) Caracterização genética dos isolados (análise filogenética do gene parcial 16S rRNA e perfil de BOX-PCR); B) Comparação do perfil metabólico dos isolados pela análise de BIOLOG® [apenas valores diferentes estatisticamente ($p < 0,05$ – teste de Tukey) são apresentados, sendo os mesmos transformados em $\log_2$ da razão rizosfera/solo]; C) Comparação das curvas de multiplicação celular de ambos isolados frente as distintas concentrações de exsudatos radiculares (linhas contínuas indicam os tratamentos com exsudatos e as linhas pontilhadas indicam os controles)..... 69
- Figura 21 - Caracterização dos isolados da rizosfera (153Rz) e solo (187SI) pertencente ao gênero *Arthrobacter* spp. A) Caracterização genética dos isolados (análise filogenética do gene parcial 16S rRNA e perfil de BOX-PCR); B) Comparação do perfil metabólico dos isolados pela análise de BIOLOG® [apenas valores diferentes estatisticamente ($p < 0,05$ – teste de Tukey) são apresentados, sendo os mesmos transformados em $\log_2$ da razão rizosfera/solo]; C) Comparação das curvas de multiplicação celular de ambos isolados frente as distintas concentrações de exsudatos radiculares (linhas contínuas indicam os tratamentos com exsudatos e as linhas pontilhadas indicam os controles)..... 71

Figura 22 - Caracterização dos isolados da rizosfera (28Rz) e solo (74SI) pertencente ao gênero *Burkholderia* spp. A) Caracterização genética dos isolados (análise filogenética do gene parcial 16S rRNA e perfil de BOX-PCR); B) Comparação do perfil metabólico dos isolados pela análise de BIOLOG® [apenas valores diferentes estatisticamente ($p < 0,05$ – teste de Tukey) são apresentados, sendo os mesmos transformados em $\log_2$ da razão rizosfera/solo]; C) Comparação das curvas de multiplicação celular de ambos isolados frente as distintas concentrações de exsudatos radiculares (linhas contínuas indicam os tratamentos com exsudatos e as linhas pontilhadas indicam os controles).....73

Figura 23 - Caracterização dos isolados da rizosfera (152BRz) e solo (87ASI) pertencente ao gênero *Pseudomonas* spp. A) Caracterização genética dos isolados (análise filogenética do gene parcial 16S rRNA e perfil de BOX-PCR); B) Comparação do perfil metabólico dos isolados pela análise de BIOLOG® [apenas valores diferentes estatisticamente ($p < 0,05$ – teste de Tukey) são apresentados, sendo os mesmos transformados em $\log_2$ da razão rizosfera/solo]; C) Comparação das curvas de multiplicação celular de ambos isolados frente as distintas concentrações de exsudatos radiculares (linhas contínuas indicam os tratamentos com exsudatos e as linhas pontilhadas indicam os controles).....75

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*S. officinarum*) é uma gramínea perene de alta representatividade na economia brasileira devido a sua utilização na produção de biocombustíveis e açúcar. Devido a isto, estudos relativos ao aprimoramento das condições de cultivo são de grande interesse, surgindo diversas fontes de estudos, dentre as quais está à busca por um melhor conhecimento sobre as comunidades microbianas associadas ao processo produtivo da cana-de-açúcar.

A interface dessa associação é representada no ambiente da rizosfera, caracterizada como a fração do solo com elevada concentração de nutrientes oriundos das raízes vegetais, o que gera uma grande abundância microbiana na rizosfera (efeito rizosfera). Os microrganismos da rizosfera estabelecem uma relação bilateral com as plantas, onde as plantas influenciam o desenvolvimento do microbioma (fornecendo principalmente fontes de carbono) e os microrganismos influenciam no desenvolvimento vegetal, suprindo os mesmos com nutrientes, ou protegendo as plantas contra estresses bióticos ou abióticos.

Dentro deste contexto, este trabalho tem como objetivo o cultivo de bactérias do solo rizosférico de cana-de-açúcar, e a verificação da resposta dos isolados encontrados ao cultivo na presença de exsudatos radiculares. Para isto, diversas metodologias foram empregadas, como técnicas de cultivo, caracterização genética dos isolados (BOX-PCR e sequenciamento parcial de genes ribossomais), e análise metabólica dos isolados (realizada por BIOLOG®). Por fim, curvas de multiplicação celular deram suporte às inferências mais importantes do presente estudo, indicando a ocorrência de alterações na multiplicação celular devido à adição de exsudatos radiculares nos meios de cultivo. Os resultados obtidos neste estudo deverão ser à base de uma linha de estudo que busca entender a modulação da fisiologia bacteriana intermediada pela planta hospedeira, bem como as características presentes em organismos capazes de colonizar a rizosfera de cana-de-açúcar.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea perene pertencente ao gênero *Saccharum* spp, que apresenta o metabolismo fotossintético do grupo C4, refletindo em altas concentrações de sacarose e outros compostos fotossintéticos em seu interior. De origem asiática, as primeiras mudas de cana-de-açúcar que chegaram ao Brasil vieram da Ilha da Madeira, no início da colonização portuguesa, por volta de 1515 (DINARDO-MIRANDA, 2008).

Atualmente esta é uma das principais culturas do mundo, sendo cultivada em diversas regiões, como na Índia (23%), China (7%), Tailândia (4%), Paquistão (4%), México (3%), Colômbia (3%), Austrália (2%), Estados Unidos (2%) e nas Filipinas (2%). Em 2011, Cheavegatti-Gianotto e colaboradores (2011) mencionaram o Brasil como o maior produtor de cana-de-açúcar, responsável por 33% da produção mundial.

Figura 1 - Áreas de cultivo de cana-de-açúcar no Brasil (UNIÃO DAS INDÚSTRIAS DE CANA- DE-AÇÚCAR - UNICA, 2014)

Na safra 2014/15, o Brasil cultivou uma área de aproximadamente 9.098,03 mil hectares, principalmente localizados na região Sudeste, onde o estado de São Paulo se enquadra em primeiro lugar (51,43%), seguidos por outros estados

produtores, distribuídos no Centro-Oeste (Goiás, 9,85% e Mato Grosso do Sul, 7,63%), região Sul (Paraná, 7,07%) e Nordeste (Alagoas, 4,41% e Pernambuco, 2,89%) (Figura 1) (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTACIMENTO - CONAB, 2014a).

Além de uma produção em alta escala, a cana-de-açúcar apresenta diversas vantagens na produção do etanol, em comparação com outras culturas. Uma dessas vantagens está associada com a sustentabilidade do sistema, promovendo uma produção mais eficiente de energia e com menor emissão de gases do efeito estufa. Diversas variedades de cana-de-açúcar podem ser colhidas cruas, eliminando as queimadas, que poluem o ar e ameaçam a biodiversidade no campo. Além disso, há a geração de subprodutos (palha e bagaço) que podem ser reciclados e utilizados como fonte de energia para os processos de produção industrial, produção de subprodutos ambientalmente corretos, como os bioplásticos e de nutrientes (Figura 2) (CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA - CTC, 2013).

Figura 2 - Processo industrial da cana-de-açúcar, os produtos e subprodutos gerados (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011)

Nos últimos anos, o aumento da demanda mundial para a produção de energia sustentável gerou um interesse econômico pelo cultivo de cana-de-açúcar. No Brasil, apenas no ano de 2014, 53% da produção foi destinada a produção do etanol; o restante foi destinado para a produção do açúcar (CONAB, 2014b)

Devido a este aumento da importância da cana-de-açúcar, muitos estudos vêm sendo conduzidos com o objetivo de aumentar a produtividade da cana. Uma das ferramentas mais promissoras para esse melhoramento é o estudo das comunidades microbianas associadas à cana-de-açúcar, baseando-se no princípio de que uma total compreensão da relação estabelecida entre plantas e microrganismos pode proporcionar o desenvolvimento de metodologias e estratégias que possibilitam a melhor exploração deste recurso onipresente nas áreas de cultivo, e consequentemente o aumento da produtividade (LUVIZOTTO et al., 2010; MENDES et al., 2007)

2.2 O ambiente rizosfera

As plantas liberam de 5 a 21% de todo o carbono fixado pela fotossíntese em sua exsudação radicular, primariamente composta de açúcares solúveis, lipídeos, aminoácidos e metabólitos secundários (HUANG et al., 2014). Esta liberação de fontes de carbono no solo influencia diretamente o comportamento dos microrganismos, suprimindo-os com esta escassa fonte nutricional nos solos, e buscando dentre estes, os que possuem características complementares ao metabolismo vegetal. Hiltner, em 1904, denominou essa fração de solo que sofre influência direta da exsudação radicular como rizosfera (LYNCH; LEIJ, 2001). Na região rizosférica concentram-se acima de 10^{11} células microbianas por grama de solo, sendo possível se encontrar até 30.000 espécies procarióticas compondo esta comunidade. (BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012; WALKER et al., 2003)

Alguns autores dividem a rizosfera em três zonas distintas: a endorizosfera, o rizoplane e a ectorizosfera (Figura 3). Neste contexto, a endorizosfera inclui porções do córtex e endoderma da planta, sendo a ocupação microbiana desta área realizada no espaço livre entre as células; o rizoplane é a zona superficial da raiz, incluindo a epiderme de raiz e mucilagem; e a ectorizosfera se caracteriza como a zona mais externa, se estendendo a partir do rizoplane para o solo (MCNEAR, 2012; LYNCH; LEIJ, 2012). Quantidades elevadas de ácidos carbônicos e outros

compostos específicos liberados pela planta determinam a extensão desta rizosfera ao redor das raízes vegetais (HARTMANN; ROTHBALLER; SCHMID, 2007).

Figura 3 - Estrutura da rizosfera (LYNCH; LEIJ, 2001)

Os exsudatos liberados pela planta podem ser agrupados em duas classes: os de baixo peso molecular como aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares, compostos fenólicos e outros metabolitos secundários; e os de elevado peso molecular, como proteínas e polissacarídeos. Sua composição é variável, sendo específica para cada espécie de planta, além de sofrer influência direta do estágio de desenvolvimento da planta, de fatores ambientais como solo, pH, temperatura e da presença de microrganismos específicos. Raízes jovens produzem principalmente hidratos de carbono e aminoácidos degradáveis, enquanto raízes mais velhas fornecem fontes de carbono mais recalcitrantes como a celulose. Este conjunto de características gera um grau de especificidade entre microrganismos e plantas (HUANG et al., 2014; LYNCH; LEIJ, 2001).

Em culturas de trigo com diferentes idades e genótipos, foi possível observar uma evolução das comunidades bacterianas nos diferentes “compartimentos” que compõe a rizosfera, mostrando que as comunidades ligadas à superfície radicular foram mais dinâmicas que os presentes no *bulk soil*. Além disso, a abundância bacteriana na rizosfera mostrou-se diminuída com a maturação da planta (DONN et al., 2014). Em outro trabalho, Lynch e Leij (2012) verificaram a competição por

espaço e nutrientes disponíveis como um dos mecanismos que os microrganismos utilizam para proteger as plantas contra patógenos, mostrando que a *Enterobacter cloacae* impediu a germinação dos esporângios de *Pythium ultimum* através da eliminação de compostos voláteis específicos.

Essas interações ocorridas na rizosfera foram avaliadas por Smith (1999), quando investigou as bases genéticas de linhagens recombinantes de tomate em relação à interação de bactérias rizosféricas antagônicas a *Pythium torulosum*. Seus resultados mostraram que a variação genética nas espécies de plantas hospedeiras modificou a microbiota associada à raiz, sugerindo que esta relação pode ser explorada para reforçar as associações benéficas entre plantas e microrganismos da rizosfera.

Em outro estudo, Mendes e colaboradores (2011) mostraram a supressividade gerada pela rizosfera contra o agente causal de doenças em plantas de beterraba (*Rhizoctonia solani*), ligando à supressão da doença a ocorrência de grupos bacterianos como Pseudomonadaceae, Burkholderiaceae, Xanthomonadales e Lactobacillaceae. Neste mesmo trabalho, os autores mostraram que membros do grupo Pseudomonadaceae protegeram as plantas de infecção fúngicas através da produção de um lipopeptídeo clorado codificado por genes *NRPS*.

Em relação à cana-de-açúcar, alguns trabalhos foram desenvolvidos com o objetivo de compreender melhor essa dinâmica observada na rizosfera. Pisa e colaboradores (2011) descreveram uma prevalência de Proteobacteria na rizosfera de cana-de-açúcar em solos que receberam fertilização nitrogenada. Em solos cultivados com cana-de-açúcar, Dini-Andreote e colaboradores (2010) encontraram na comunidade microbiana representantes dos grupos bacterianos como Proteobacteria (34,7%), Actinobacteria (28,1%), Firmicutes (16,2%) e Acidobacteria (9,7%).

Outro estudo utilizou bactérias isoladas da rizosfera e do interior das raízes e caules da cana-de-açúcar, mostrando a habilidade destas bactérias de produzirem ácido indol-acético, hormônio de crescimento vegetal, promovendo o desenvolvimento da planta, o que certamente pode resultar num aumento da produtividade (MENDES et al., 2007). Na mesma linha de pensamento, Castro-González e colaboradores (2011) encontraram em bactérias do gênero *Burkholderia* características de produção de crescimento para plantas, via processos como: realização de biossíntese de compostos indólicos, solubilização de fosfato e

produção de siderófitos. Esta alta relação foi confirmada por Costa e colaboradores (2014) ao verificar a composição do microbioma da raiz em diferentes variedades de cana-de-açúcar, observando que as comunidades presentes se diferem entre as variedades da planta e no solo.

O termo microbioma de raiz surgiu por meio de uma analogia com o microbioma humano, designando um conjunto de organismos (ou genes) que estabelece uma complexa rede de interações com a planta, atuando para a manutenção dos processos fisiológicos das mesmas (BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012; WALKER et al., 2003).

Como descrito acima, as plantas determinam a composição dos seus microbiomas por meio dos exsudatos que liberam nos solos. Estes estimulam ou reprimem especificamente membros da comunidade microbiana, modelando um microbioma específico ao genótipo da planta. Esta relação gerou uma série de inferências sobre o papel do microbioma sobre as plantas, variando de interações neutras para benéficas ou deletérias, de patogênicos a simbioses (DOORNBOS; LOON; BAKKER, 2012; HUANG et al., 2014).

Pode-se ainda verificar que cada ambiente, ou cada indivíduo, apresentam microbiomas articulares, sendo dividido entre os diferentes grupos de organismos, ou diferentes ambientes que compartilham certa similaridade, um “core-microbiano”, o qual desempenha os papéis centrais do microbioma no local estudado (GOPAL; GUPTA; THOMAS, 2013). Apesar da elevada especificidade das plantas em relação aos microrganismos, alguns grupos podem ser descritos como prevalentes, ou grupos “core” no ambiente rizosférico. Dentre esses, se destaca o filo Proteobacteria, que apresentam uma alta prevalência devido a sua rápida multiplicação, resultado da elevada plasticidade metabólica apresentada pela maioria dos organismos que compõem esse grupo (PHILIPPOT et al., 2013). Outros grupos microbianos têm sido mencionados em diversos trabalhos como predominantes em cana-de-açúcar, como os pertencentes aos filos Firmicutes e Actinobacterias (COSTA et al., 2014; DINI-ANDREOTE et al., 2010; MENDES et al., 2007; PHILIPPOT et al., 2013; PISA et al., 2011).

2.2.1 O filo Proteobacteria

O filo Proteobacteria é o maior em diversidade metabólica e em abundância na maioria dos solos e associado às plantas. Este filo é constituído por bactérias

encontradas em diversos ambientes, com importância médica, industrial e agrícola. Morfologicamente, representam a maioria das bactérias gram-negativas e incluem grupos com formas de bastonetes, cocos, espirilos e helicoidais. Com bases em sequências do gene ribossomal 16s rRNA este filo é dividido em seis classes, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria, e Zetaproteobacteria, que hospedam mais de 520 gêneros e mais de 2 mil espécies (MADIGAN et al., 2012; MADSEN, 2008; TALARO; CHESS, 2008). Muitos gêneros pertencentes a esse filo têm sido descritos como prevalentes na rizosfera de diversas plantas, inclusive na rizosfera da cana-de-açúcar, como os gêneros *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Burkholderia*. (BENEDUZI et al., 2013; CASTRO-GONZÁLEZ et al., 2011; TAGHAVI et al., 2010; TORRES-RUBIO et al., 2000)

2.2.1.1 O gênero *Enterobacter*

O gênero *Enterobacter* é composto atualmente por 22 espécies. Apesar da forte associação das bactérias pertencentes a esse gênero a patogenicidade em humanos, muitas dessas espécies foram reconhecidas como não patogênicas. Estas apresentam outras atividades, como por exemplo, a promoção do crescimento de plantas (MADHAIYAN et al., 2010; SANDERS; SANDERS, 1997).

As *Enterobacter* spp apresentam morfologia de bastonetes gram-negativos e metabolismo aeróbio facultativo, além de serem capazes de fermentar glicose (MADIGAN et al., 2012). Em trabalho realizado com a rizosfera de trigo, milho, tabaco e trevo, Haichar e colaboradores (2008) descrevem o gênero *Enterobacter* como um importante grupo, principalmente com base na maior versatilidade e onipresença destas bactérias nas plantas analisadas, sugerindo possuir um papel importante das mesmas no funcionamento da rizosfera.

Este grupo também é conhecido por interagir e exercer efeitos benéficos sobre o crescimento da planta, produzindo fito-hormônios, realizando a fixação biológica do nitrogênio e atividades de biocontrole, além de melhorar a captação de fosfato e estimular a micorrização de plantas (MADHAIYAN et al., 2010; VASSILEVA et al., 1999).

2.2.1.2 O gênero *Burkholderia*

O gênero *Burkholderia* foi descrito pela primeira vez em 1950 por Walter Burkholder (MOORE; WILLIAMS, 2005). Estas bactérias são bastonetes gram-negativos pertencentes à classe das Betaproteobacteria. É um grupo bastante heterogêneo, onde algumas espécies são capazes de causar desde doenças em plantas, animais e no homem, enquanto outras são utilizadas como agentes de controle biológico (MADIGAN et al., 2012).

O gênero *Burkholderia* contém mais de 30 espécies encontrados em diversos habitats, como solo, água, animais, seres humanos e ambientes. A espécie *Burkholderia cenocepacia* foi inicialmente escolhida como a espécie-tipo do gênero. Atualmente, essa espécie apresenta-se como um complexo, compreendendo inúmeras novas espécies similares fenotipicamente (PERIN; ARAUJO; REIS, 2006).

Nos últimos anos houve um crescente interesse na comunidade científica relacionado ao complexo *Burkholderia cenocepacia*, principalmente devido a suas habilidades para promover o crescimento de diferentes plantas, como milho, arroz e outros grãos, e na supressão de muitos fitopatógenos aumentando, portanto o rendimento das culturas. Em cana-de-açúcar, muitas estirpes associadas a esse gênero já foram descritas, principalmente associada ao processo de fixação biológica de nitrogênio (CASTRO-GONZÁLEZ et al., 2011; LUVIZOTTO et al., 2010; SALLES; VAN ELSAS; VAN VEEN, 2006). No entanto, muitas estirpes pertencentes a esse complexo também foram encontradas em áreas hospitalares como causadoras de fibrose cística, demonstrando a importância desse grupo em diferentes ecossistemas (SANTOS; BUSTILLOS-CRISTALES; CABALLERO-MELLADO, 2001).

2.2.1.3 O gênero *Pseudomonas*

Pseudomonas é um gênero dentro da classe Gamaproteobacteria. São bastonetes gram-negativos que estão organizados em mais de 100 espécies e foram divididas em diversas linhagens. Metabolicamente são aeróbicas obrigatórias, mas muitas espécies podem crescer sob condições anóxicas, utilizando como aceptor final de elétrons o nitrato, fumarato, entre outros. Normalmente possuem necessidades nutricionais simples com capacidades de utilizar muitos compostos orgânicos diferentes como fonte de carbono e energia. Algumas espécies utilizam mais de 100 compostos distintos (MADIGAN et al., 2012).

As *Pseudomonas* são ecologicamente importantes nos solos e nos corpos de água por exercerem papéis fundamentais para a manutenção do ambiente, como a degradação de muitos compostos de baixo peso molecular, derivados da decomposição de materiais vegetais e animais, e atuarem como importantes agentes de biorremediação no ambiente. Contudo, algumas espécies são patógenas humanas oportunistas, como *Pseudomonas syringae* e *Pseudomonas aeruginosa*, (LOPER et al., 2012). Neste mesmo contexto, Nichols e colaboradores (2012), apresentaram cepas de *Pseudomonas* que foram capazes de metabolizar e detectar quimiotoxicamente moléculas de furano, utilizado industrialmente como solventes e precursores químicos.

Outros trabalhos realizados com *Pseudomonas fluorescens*, avaliaram a importância destes organismos na produção vegetal. Num destes estudos, a eficiência agronômica de bactérias desta espécie foi demonstrada como inoculante, o qual aumentou o diâmetro médio das espigas de milho (ZUCARELI et al., 2011). Esta mesma espécie isolada de solo rizosférico foi responsável pela supressividade de solos agrícolas para doença de trigo, onde apresentaram a inibição do patógeno devido à produção do antibiótico 2,4-diacetylphloroglucinol. (MAVRODI et al., 2011)

2.2.2 O filo Firmicutes

Os Firmicutes compõe um grupo extenso de bactérias gram-positivas, contendo mais de 220 gêneros e 1.500 espécies, dentre as quais ocorre uma alta diversidade fenotípica e metabólica, incluindo bactérias termófilas, bastonetes e cocos gram-negativos, fotoprotíficas, quimiolitotróficas, aeróbicas, anaeróbicas, termofílicas e os micoplasmas, que não possuem uma parede celular (MADSEN, 2008; TORTORA; FUNKE; CASE, 2007). Molecularmente, este filo se caracteriza pela baixa porcentagem de G+C em seus genomas, sendo também presente alguns grupos de organismos formadores de endósporos, como *Clostridium* e *Bacillus*, grupos de importância médica, *Staphylococcus* e *Enterococcus*, e industrial, como *Lactobacillus* (TORTORA; FUNKE; CASE, 2007).

2.2.2.1 O gênero *Bacillus*

Este gênero é composto por bactérias formadoras de endoesporos, aeróbicas ou facultativas, em forma de bastonetes, caracterizadas como gram-positivas. Em algumas espécies, a coloração rósea pode aparecer no teste de Gram (como ocorre

nas gram-negativas) depois de terem atingido certo período de cultivo. (GREGERSEN, 1978; MADIGAN et al., 2012)

Segundo a “*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*”, este gênero atualmente possui 290 espécies e 7 subespécies (EUZÉBY, 1997). A maioria das espécies de *Bacillus* são saprófitas, mas o gênero inclui bactérias classificadas como termófilas, psicrófilas, acidófilas, halotolerante e alcalifílicas, com representantes capazes de se multiplicar em temperaturas, valores de pH e concentrações de sal em que a maioria dos outros organismos não possuem atividade metabólica (TURNBULL, 1996).

Muitos *Bacillus* spp produzem enzimas hidrolíticas, polissacarídeos, e outras moléculas de interesse biotecnológico. Diversas espécies deste gênero são conhecidas por produzirem, quando em fase estacionária, antibióticos como: bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina e circulina (MADIGAN et al., 2012).

Também deve ser citada a importância deste gênero na produção vegetal, onde o maior exemplo está na espécie *Bacillus thuringiensis*, que pode causar doença fatal em larvas de diferentes grupos de insetos pragas, sendo esta comercialmente utilizada como inseticida biológico (MADIGAN et al., 2012). Outros estudos mostraram que *Bacillus* spp possuem alto potencial para controlar a doença da murcha do tomate (SINGH et al., 2013).

2.2.3 O filo Actinobacteria

As bactérias alocadas no filo Actinobacteria apresentam alta diversidade morfológica, fisiológica e genética, sendo unificadas pela característica genética de alta porcentagem de G+C em seus genomas, e pela característica morfológica de serem aeróbicas e gram-positivas. Este filo pode ser dividido em dois grandes grupos fenotípicos: unicelulares não esporuladas e filamentosas esporuladas, as unicelulares incluem algumas aeróbicas em forma predominante de cocos, enquanto as filamentosas incluem com esporângios multicelulares (MADIGAN et al., 2012; MADSEN, 2008).

2.2.3.1 O gênero *Arthrobacter*

O gênero *Arthrobacter* é um grupo heterogêneo pertencente ao filo Actinobacteria, composto por bactérias unicelulares, as quais apresentam

diversidade nutricional, podendo decompor herbicidas, cafeína, nicotina, fenóis e outros compostos orgânicos incomuns (MADIGAN et al., 2012).

Descrita por Conn em 1928, a primeira espécie deste gênero foi representada pela *Arthrobacter globiformis*, caracterizada por ser extremamente numerosas em solos e como uma variação morfológica incomum, são bastonetes com coloração gram-negativo quando jovens e cocos gram-positivos em culturas antigas (ESCHBACH et al., 2003; JONES; KEDDIE, 2006).

Em seres humanos, algumas espécies do gênero *Arthrobacter* são consideradas patógenos oportunistas, como *Arthrobacter cummingsii*, *Arthrobacter woluwensis*, *Arthrobacter creatinolyticus*, *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter luteolus* e *Arthrobacter albus* (WAUTERS et al., 2000).

Como são bactérias aeróbicas obrigatórias, Eschbach e colaboradores (2003) investigaram alguns membros de *Arthrobacter nicotianae* para atividade de nitrato redutase induzida via respiração anaeróbia, verificando que algumas cepas desta espécie também utilizaram como receptores de elétrons fumarato, dimetil-sulfoxido ou óxido de trimetilamina.

3 OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivo realizar o isolamento e o cultivo de bactérias a partir do solo cultivado e da rizosfera de cana-de-açúcar, sendo posteriormente os isolados caracterizados genética e metabolicamente, e estudados quanto à influência dos exsudatos radiculares em sua multiplicação.

3.1 Objetivos específicos

Dentro do objetivo geral descrito acima, os objetivos específicos que compõem o presente estudo são:

- Isolar grupos bacterianos por meio de métodos dependentes de cultivo a partir de solo e da rizosfera de cana-de-açúcar;
- Caracterizar a diversidade genética dos isolados por meio de BOX-PCR;
- Caracterizar a diversidade metabólica de alguns isolados por meio da análise de utilização de diferentes fontes de carbono (BIOLOG®);
- Identificar alguns dos isolados obtidos por meio de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA;
- Obter exsudatos radiculares de cana-de-açúcar;
- Analisar o efeito dos exsudatos sobre o desenvolvimento de isolados com mesma afiliação taxonômica, porém oriundos do solo ou da rizosfera.

4 HIPOTEESES

Este trabalho se desenvolveu sob a hipótese que bactérias que habitam a rizosfera de cana-de-açúcar possuem características genéticas e metabólicas específicas, e que estas possuem sua multiplicação celular modulada pelos exsudatos radiculares da planta.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Amostragem

As amostras de solo e rizosfera foram coletadas em agosto do ano de 2013, em área de cultivo de cana-de-açúcar (variedade SP-3250), localizada na Estação Experimental Fazenda Areão, pertencente à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ). No momento da coleta as plantas apresentavam aproximadamente 300cm de altura, e não havia sinais de doenças ou deficiências de nutrientes. A coleta do solo (*bulk soil*) e do solo rizosférico foi realizada em três pontos distintos (A, B e C), dando origem a três amostras de solo e três amostras de rizosfera, utilizadas nas etapas posteriores (Figura 4).

Figura 4 - Local de coleta das amostras de solo e rizosfera das plantas de cana-de-açúcar utilizadas no presente estudo

As amostras de solo foram coletadas nas entrelinhas de cultivo, onde há menor influência da atividade radicular da planta. Foi observado no momento da amostragem que o solo da entrelinha apresentava-se coberto com a palhada da cultura. As amostras de rizosfera (ou solo rizosférico) foram obtidas por remoção do solo associado ao sistema radicular da planta por agitação manual. O solo que permaneceu aderido após este procedimento (camada com aproximadamente entre 1 e 3mm sobre a raiz) foi considerado como solo rizosférico.

5.2 Isolamento e cultivo do solo e da rizosfera de cana-de-açúcar

O isolamento de bactérias a partir das amostras de solo ou rizosfera foi realizado com alíquotas de 10g de material (solo ou rizosfera), utilizados no preparo de suspensões celulares por meio de agitação (300rpm por 1 hora) em solução salina (NaCl 0,85%). A partir destas suspensões foi realizada a metodologia da diluição seriada (Figura 5) e o cultivo de bactérias foi promovido em diferentes meios de cultura, numa tentativa de abranger a maior diversidade possível de isolados a partir das amostras analisadas.

Figura 5 - Esquema ilustrativo da metodologia de diluição seriada utilizada para o isolamento e cultivo de bactérias presentes em amostras de solo e de rizosfera de cana-de-açúcar

5.2.1 Meio de cultura TSB (*Tryptone Soya Broth*)

Este meio de cultivo é amplamente utilizado para o cultivo de bactérias heterotróficas do solo, sendo composto por (em g.L⁻¹): caseína enzimaticamente hidrolisada (17,0), peptona da soja (3,0), dextrose (2,5), cloreto de sódio (5,0), fosfato dipotássico (2,5) e ágar (12,0). O cultivo foi conduzido em aerobiose, a 28 °C por 24 horas.

Tanto este, como os demais meios de cultivo a serem descritos foram esterilizados anteriormente ao uso por autoclavagem a 121°C, 1atm por 20 min. Além destes procedimentos, foi também comum a todos os meios de cultivo a adição de 1ml de ciclohexamina (50µg.ml⁻¹), utilizada com o intuito de inibir o desenvolvimento de organismos eucariotos (principalmente fungos).

5.2.2 Meio de cultura MSSC (*Mineral Salts Starch Casein*)

Este meio de cultivo foi descrito como eficiente no isolamento de microrganismos produtores de amilase e proteases (VASCONCELLOS et al., 2010).

Este meio de cultura é constituído (em g.L⁻¹) por amido solúvel (10,0), KNO₃ (2,0), caseína (0,30), NaCl (2,0), K₂HPO₄ (2,0), MgSO₄.7H₂O (0,05), CaCO₃ (0,02), FeSO₄.7H₂O (0,01) e ágar (12,0). O pH foi ajustado para 7,0 - 7,5 e o cultivo conduzido em aerobiose, a 28 °C por 24 horas.

5.2.3 Meio de cultura LAM (*Leeds Acinetobacter Medium*)

Este meio de cultivo é descrito como eficiente para o isolamento e o cultivo de bactérias afiliadas ao gênero *Acinetobacter* em ambientes hospitalares, em amostras ambientais pode ocorrer o isolamento de *Pseudomonas* spp, *Proteus* spp, *Citrobacter* spp e *Burkholderia* spp (JAWAD et al., 1994). A composição deste meio de cultivo é (em g.L⁻¹): caseína ácida hidrolisada (15,0); peptona de soja (5,0); cloreto de sódio (5,0); glicose (5,0); sacarose (5,0); manitol (5,0); fenilalanina (1,0); sulfato de amônio férrico (0,4); vermelho de fenol (0,02); ágar (12,0) e agente seletivo (0,035). O pH final foi 7,0 ± 0,2, e o cultivo foi conduzido sob aerobiose, a 28 °C por 24 horas.

Para aumentar a especificidade do cultivo, foram adicionados ao meio de cultura como agente seletivo, estreptomicina (35µg.ml⁻¹) e ampicilina (35µg.ml⁻¹), buscando a inibição do desenvolvimento de grupos bacterianos gram-positivos e gram-negativos (não relacionados à *Acinetobacter*), além de ciclohexamina (50µg.ml⁻¹), utilizada com o intuito de inibir o desenvolvimento de organismos eucariotos (principalmente fungos).

5.2.4 Meio de cultura KB (*King B*)

Este meio de cultivo foi selecionado por ser descrito como recomendado para isolamento e cultivo de bactérias produtoras de siderófilos como afiliadas ao gênero *Pseudomonas* e solubilizadores de fosfato (ALMEIDA; ALMEIDA, 2006; DHANRAJ, 2013). A composição deste meio de cultura é bastante simples, sendo esta feita por (em g.L⁻¹): peptona proteose (20,0), fosfato dipotássico hidrogênio (1,5), sulfato de magnésio (1,5) e glicerol (15mL), adicionados de ágar (12). O cultivo conduzido em aerobiose, a 28 °C por 24 horas.

5.2.5 Meio de cultura LGI e JNFb

Os meios de cultivo LGI e JNFb foram utilizados na busca do isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio (BENEDUZI et al., 2013). O meio de cultura LGI é

composto por (em cada litro): 20g de açúcar cristal, 2ml de solução de fosfato de potássio dibásico (1% p/v), 6ml de solução de fosfato de potássio monobásico (10% p/v), 2ml de solução de sulfato de magnésio hidratado (10% p/v), 2ml de solução de cloreto de cálcio dihidratado (1% p/v), 2ml de solução de molibdato de sódio dihidratado (0,1% p/v), 1ml de solução de cloreto férrico hexahidratado (1% p/v), 5ml de solução de azul de bromotimol (0,5% em 0,2N de KOH), 1ml de solução de vitamina para meios de cultura (WEBER et al., 1999). O pH foi ajustado para 5,5 usando solução de ácido acético a 10% e foi adicionado 12g por litro de ágar. O cultivo conduzido em aerobiose, a 28 °C por 24 horas.

O meio JNFb é composto (em cada litro) por: 5g de ácido málico, 6ml de solução de fosfato de potássio dibásico (10% p/v), 18ml de solução de fosfato de potássio monobásico (10% p/v), 2ml de solução de sulfato de magnésio hidratado (10% p/v), 2ml de solução de cloreto de cálcio dihidratado (1% p/v), 1ml de solução de cloreto de sódio (10% p/v), 4ml de solução de ferro EDTA (1,64% p/v), 2ml de solução de azul de bromotimol (0,5% em 0,2n de KOH), 1ml de solução de vitamina para Meios de Cultura (WEBER et al., 1999), 2mL de solução de micronutrientes (WEBER et al., 1999) para meio de cultura. O pH foi ajustado para 5,8 usando solução de ácido acético a 10% e adicionado 12g de ágar (VIDEIRA et al., 2009). O cultivo conduzido em aerobiose, a 28 °C por 24 horas.

Após o desenvolvimento das colônias em todos os meios de cultivo, estas foram quantificadas (em números de unidades formadoras de colônia por grama de solo), dando origem a uma comparação entre abundância dos grupos cultivados nos diferentes meios de cultivo, em amostras de solo e da rizosfera de cana-de-açúcar.

5.3 Caracterização e identificação dos isolados bacterianos

Os isolados obtidos, a partir do cultivo de suspensões celulares em diferentes diluições sobre diferentes meios de cultivo, foram submetidos a um processo de caracterização e identificação taxonômica. A caracterização morfológica dos isolados foi baseada no teste de Gram, enquanto que a caracterização molecular foi realizada por meio da análise de BOX-PCR. De maneira complementar, alguns isolados foram identificados por meio do sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S rRNA.

5.3.1 Coloração de Gram e purificação das linhagens contaminadas

A coloração de Gram foi realizada com base em cultivos dos isolados obtidos, sendo esta consistida de um esfregaço da colônia bacteriana em uma lamina com 10 a 20µl de água destilada autoclavada. Em seguida o material foi fixado com o auxílio do calor de uma chama. As células fixadas foram então submetidas à coloração com solução cristal de violeta, seguida de lavagem em água destilada esterilizada, e imersão em lugol. Após esta coloração as células foram lavadas em água destilada e imersas em solução de etanol concentrado. A lavagem final ocorreu em água destilada e a coloração final das células foi promovida por imersão em solução de safranina (1%). As lâminas foram então secas ao ar e observadas com microscópio óptico (100X).

5.3.2 Extração de DNA dos isolados bacterianos

A partir dos isolados cultivados e purificados foram realizadas extrações do DNA celular, utilizando protocolo descrito por ARAUJO et al. (2002) com algumas modificações. Brevemente, uma amostra de 2mL de cultura bacteriana (desenvolvida por 24h) foi utilizada. A biomassa foi inicialmente precipitada por centrifugação (10min a 12,000g), e ressuspensão em 500µl de tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0). A esta suspensão foram adicionados 0,5g de pérolas de vidro (*Glass Beads* de 0,1mm de diâmetro) e 10µl de solução 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS). As células foram agitadas por 15 minutos em vortex, e após foi adicionado 500µl de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). A mistura foi homogeneizada por vortex (5s) e centrifugada em a 12.000g por 5 minutos. Após a separação, foi retirada a parte superior e transferida para um novo tubo. Foi então adicionada uma alíquota de 40µl de acetato de sódio 5M pH 5,2 e 400µl de isopropanol, seguindo homogeneização e incubação da mistura por 5 minutos a 4°C. A solução foi centrifugada por 5 min a 12.000g e o sobrenadante foi descartado. O material precipitado foi lavado com 500µl de etanol 70% gelado, submetido à centrifugação por 2 minutos a 12.000g, descarte do sobrenadante, e seco ao ar. Após seco, o material precipitado foi ressuspensionado em 50µL de água esterilizada e colocado a 4°C por 24 horas. O produto final foi verificado em eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) com tampão TAE 1X juntamente com o peso molecular *GeneRuler DNA Ladder 1kb* (Invitrogen). A eletroforese foi realizada a 10V.cm⁻¹,

corada com solução de brometo de etídeo e fotodocumentado em luz ultravioleta. Os DNAs extraídos foram mantidos a -20°C.

5.3.3 BOX-PCR

O DNA extraído foi utilizado para a avaliação dos perfis de variabilidade genômica por meio da técnica de BOX-PCR, onde é possível visualizar e comparar os diferentes perfis de bandas apresentados pelos isolados. Esta técnica é conduzida por meio de uma reação de amplificação do DNA dos isolados em um volume final de 25 µL. Esta reação é composta por: 1µl de DNA (50ng), 5µl de água Milli-Q autoclavada, 10µl de dNTP's (2,5mM), 3,5µl de MgCl₂ (25mM), 2,5µl de *Taq* Buffer (10x), 2,5µl de DMSO (100%), 0,4µl de *Taq* DNA polimerase (5 U.µL⁻¹) e 0,1µl (100mM) do *primer* BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (VERSALOVIC et al., 1994).

A amplificação foi realizada em um termociclador *Veriti*® (Life Technologies, EUA), utilizando os seguintes ciclos: desnaturação inicial (95°C por 2 minutos), 35 ciclos compostos por duas desnaturações (94°C por 2 minutos e 92°C por 30 segundos), anelamento (50° C por 1 minuto) e extensão inicial (72° C por 8 minutos), finalizando a reação com a extensão final (72 °C por 10 minutos).

A partir da reação de amplificação, uma alíquota de 12µl do produto foi verificada em eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) com tampão TAE 1X juntamente com o padrão molecular *GeneRuler DNA Ladder 1kb* (Invitrogen). A eletroforese foi realizada a 8V.cm⁻¹, corada com solução de *GelRed*TM 1000x e fotodocumentado em luz ultravioleta.

Os perfis de *amplicons* gerados foram analisados pelo programa *ImageQuant TL Software* (GE Healthcare Life Sciences). A partir das matrizes geradas foram realizadas análises de *Clusters* pelo programa PAST (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001) com base no método de similaridade *Jaccard* para todos os isolados obtidos.

5.3.4 Sequenciamento parcial 16S rRNA

5.3.4.1 Amplificação do gene ribossomal 16S rRNA

A partir dos agrupamentos formados pela técnica BOX-PCR foi selecionado um isolado por *cluster*, formados para cada meio de cultura, totalizando 95 isolados.

Estes foram submetidos à identificação taxonômica por meio de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. A amplificação parcial do gene 16S rRNA foi realizada de acordo com JÚNIOR et al. (2013) utilizando os *primers* pR 1387 (5' CGG TGT GTA CAA CGC CCG GGA ACG 3') e p027 (5' GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3'), numa reação com volume final de 50µL, onde foram utilizados 1µL de DNA (aprox. 50ng), 31,8µL de água Milli-Q autoclavada, 4µL de dNTP's (2,5mM), 7,5µL de MgCl₂ (25mM), 5µL de *Taq* Buffer (10x), 0,5µL de *Taq* DNA polimerase (5U.µL⁻¹) e 0,1µL (100mM) de cada *primer*. A amplificação foi realizada em um termociclador *Applied Biosystems Veriti®* utilizando os seguintes ciclos: desnaturação inicial (94°C por 4 minutos), 30 ciclos compostos por desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (63°C por 1 minuto) e extensão inicial (72°C por 1 minuto), finalizando a reação com a extensão final (72°C por 10 minutos).

Uma alíquota de 5µL do produto foi verificada em eletroforese de gel de agarose 1% (p/v) com tampão TAE 1X juntamente com o peso molecular *GeneRuler DNA Ladder 1kb* (Invitrogen). A corrida foi realizada a 10V.cm⁻¹, corada com solução de *GelRed™* 1000x e fotodocumentado em luz ultravioleta.

As amostras amplificadas foram purificadas com o kit *PureLink® PCR Purification* (Invitrogen, Brasil) de acordo com o protocolo do fornecedor. Após a purificação, uma alíquota de 1µL de cada amostra foi quantificado em eletroforese em gel de agarose 1,7% (p/v) com tampão TAE 1X juntamente com peso molecular *GeneRuler DNA Ladder 1kb* (Invitrogen) e *MassRuler Low Range DNA Ladder* (Invitrogen). A concentração de todas as amostras foram ajustadas para 50ng.µL⁻¹.

As amostras foram encaminhadas para laboratório de Biotecnologia Animal no Departamento de Zootecnia (ESALQ/USP) para o sequenciamento automatizado utilizando a técnica de Sanger, onde foi utilizado o *primer reverse* pR 1387 (5' CGG TGT GTA CAA CGC CCG GGA ACG 3') como a base para reação de sequenciamento (*Genetic Analyzer ABI PRISM377*, Applied Biosystems Inc.).

5.3.4.2 Análise das sequências

Os dados resultantes foram analisados utilizando o programa *CLC Genomics Workbench* (CLCbio, a QIAGEN Company), onde através da ferramenta *Quality Trimming* as sequências foram avaliadas e sequências de baixa qualidade foram eliminadas (qualidade Phred menor que 20 e tamanho mínimo de 200 bases).

As sequências válidas foram submetidas à afiliação taxonômica, realizada inicialmente por meio do *RDP Classifier*. Adicionalmente, todas as sequências obtidas foram comparadas com as disponíveis no GenBank (nr/nt) por meio de BLASTn (*Basic Local Alignment Search tool*). As sequências com maior similaridade com as obtidas no presente estudo foram então utilizadas para a inferência com base em árvores filogenéticas. Estas foram obtidas por meio do uso do programa *MEGA6* (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0), onde as sequências foram alinhadas, e as árvores foram obtidas utilizando o método estatístico Neighbor-Joining com base nos parâmetros Kimura-2, sendo a confiabilidade dos ramos formados determinada pela análise de *bootstrap*, obtido com base em 500 sub-amostragens randômicas.

5.3.5 Perfis metabólicos dos isolados determinado por BIOLOG®

As mesmas estirpes utilizadas nos testes de curva de crescimento foram submetidas à análise do perfil metabólico de utilização de fontes de carbono, utilizando as placas de *BIOLOG® EcoPlate* (Hayward, CA), seguindo a metodologia descrita por JONES; CHASE; HARRIS (1993) modificado. Os pré-inóculos foram obtidos em TSB 10%, cultivadas por 48 horas, a 28°C e sob agitação de 150rpm. Após esse período, 25mL da cultura pré-inóculo foi centrifugada a 15°C por 20 minutos a 12.000g. As células precipitadas foram suspensas em TSB 10% fresco dando origem a uma suspensão celular com absorvância a OD₍₅₆₀₎ de 0,1. Esta suspensão foi então cultivada por 5 horas sob a mesma condição anterior.

Após a incubação, 25mL das células foram centrifugadas e lavadas duas vezes em tampão PBS (por 1 hora de incubação cada lavagem) em temperatura ambiente e rotação de 150rpm. Após as lavagens, as células foram utilizadas para formar uma suspensão celular com OD₍₅₆₀₎ igual a 0,2. Em seguida, 150µl dessa suspensão bacteriana foi transferida para cada poço das microplacas de *BIOLOG® EcoPlate* (Hayward, CA), que foram posteriormente incubadas por 16h a 28°C. Após esse período foi realizada a leitura das placas no equipamento *Varian Cary 50 Bio UV/Vis Spectrophotometer* (McKinley Scientific) em OD de 550nm.

Os resultados obtidos foram normalizados através do PAST (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001) e comparados em relação aos carboidratos consumidos por cada estirpe analisada. A significância das diferenças observadas foi determinada pelo teste-T. Para as fontes de carbono que apresentaram diferenças significativas,

foi realizado o cálculo de razão rizosfera/solo, que possibilitou observar o consumo preferencial destes compostos nos nichos comparados.

5.4 Obtenção dos exsudatos radiculares de cana-de-açúcar

A metodologia utilizada para a extração dos exsudatos foi adaptada da EMBRAPA - Sete Alagoas/MG (VASCONCELOS et al., 2009).

Foram coletados colmos de cana-de-açúcar na mesma variedade da planta de onde foi coletado solo rizosférico utilizado para o isolamento microbiano. Os colmos foram superficialmente desinfetados de acordo com Kuklinsky-Sobral e colaboradores (2004), se procedendo da seguinte forma: lavagem em etanol 70% por 1min, solução de hipoclorito de sódio (2% disponível Cl⁻) por 3min, etanol 70% por 30s e duas lavagens em água destilada esterilizada. Estes foram então 'germinados' em areia esterilizada (autoclavagem por 2h, a 121°C e 1atm), em um sistema fechado, composto por um funil de Buchner vedado, 200mL de água destilada e um becker para suporte.

O experimento foi composto por quatro sistemas com plântulas (Figura 6). No período entre a montagem do experimento e as coletas todos os sistemas foram regados com 50mL de água destilada esterilizada.

Figura 6 - Sistema de coleta para exsudatos de cana-de-açúcar adaptado de Vasconcelos e colaboradores (2009)

A primeira coleta foi realizada com treze dias após a montagem do experimento. Neste momento, em todos os sistemas foram realizadas lavagens da

areia com 200mL de água destilada esterilizada, e os extratos retirados foram reservados. Todos os sistemas foram vedados novamente e após três dias foram adicionados em cada sistema um volume de 50mL de solução Hoagland & Arnon modificada (SARRUGE, 1975).

A segunda coleta foi coletada com vinte seis dias após a montagem do experimento, seguindo as mesmas características da primeira coleta e os extratos foram reservados.

5.5 Efeito dos exsudatos radiculares sobre o desenvolvimento das bactérias

A verificação dos efeitos dos exsudatos radiculares nas bactérias foi realizada através de curvas de multiplicação celular com estirpes pertencentes a cada gênero microbiano presente na rizosfera e sua correspondente no solo. Estas foram caracterizadas por meio da determinação de suas curvas de multiplicação, comparando os meios de cultivo adicionados ou não dos exsudatos radiculares. Para isto, cada isolado avaliado foi cultivado sob as seguintes condições:

- 10µl de exsudatos e 90µl meio de cultura TSB 10%;
- 20µl de exsudatos e 80µl meio de cultura TSB 10%;
- 50µl de exsudatos e 50µl meio de cultura TSB 10%;
- 100µl de meio de cultura TSB 10%;
- 10µl de água esteril e 90µl meio de cultura TSB 10%;
- 20µl de água esteril e 80µl meio de cultura TSB 10%;
- 50µl de água esteril e 50µl meio de cultura TSB 10%;

Em todos os sistemas foram inoculados 1µl de suspensão bacteriana a absorvância de 0,2(OD_{600nm}). Todas as curvas de multiplicação celular foram realizadas em quadruplicadas, com leituras em absorvância com comprimento de onda 600nm (ZHANG et al., 2014) realizadas no equipamento *Varian Cary 50 Bio UV/Vis Spectrophotometer* (McKinley Scientific). As leituras foram realizadas em intervalos de 2horas, totalizando 30horas de cultivo, onde as culturas permaneceram incubadas sob agitação de 150rpm e temperatura de 28°C. Os resultados obtidos foram normalizados com os valores das amostras brancos (sistemas sem inoculação da suspensão bacteriana).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Isolamento microbiano

O isolamento de bactérias revelou em todos os meios de cultivo utilizados maiores valores médios do número de colônias (e consequentemente UFC.g^{-1} de solo) nas amostras da rizosfera (Figura 7), sendo observada diferença estatística para esta comparação em 3 dos 6 meios de cultivo empregados (MSSC, JNFb e LGI). Os valores médios mais próximos entre os nichos explorados (solo ou rizosfera) foram observados para o meio de cultivo TSB. Essa maior abundância bacteriana está em pleno acordo com a literatura, que correlaciona o mesmo com a maior concentração de compostos carbônicos, que são utilizados pelos microrganismos na região rizosférica (BAIS et al., 2006; BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012).

Numa análise mais detalhada, verifica-se que o meio MSSC possui como fonte de carboidrato o amido, a principal fonte de carboidrato de algumas espécies de plantas, sendo provável a ocorrência de organismos produtores de enzimas amilolíticas dentre as colônias obtidas neste meio cultura, como descrito na literatura (OLIVEIRA et al., 2007). Já os meios de cultivo JNFb e LGI possuem apresentam baixas concentrações de nitrogênio em suas composições, sendo portanto utilizados para o isolamento de microrganismos fixadores de nitrogênio (BENEDUZI et al., 2013; CAVALCANTE; DÖBEREINER, 1988). Isto dá suporte à inferência de que a ocorrências de bactérias diazotróficas é maior na rizosfera de cana-de-açúcar do que no solo adjacente (*bulk soil*), corroborando dados anteriormente descritos (DAKORA; PHILLIPS, 2002).

Figura 7 - Quantificação de bactérias cultiváveis em amostras de solo e de rizosfera de cana-de-açúcar por meio do emprego de diferentes meios de cultivo. Os valores apresentados foram estimados em unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de solo, e obtidos por meio de determinação da média de três repetições biológicas. As barras indicam o desvio padrão da média, e a diferença estatística, determinada pelo Teste Turkey ($p < 0,05$) é indicada em cada par de comparações por *

6.2 Caracterização dos isolados bacterianos

O isolamento e a purificação das colônias bacterianas deu origem a uma coleção bacteriana composta de 616 isolados bacterianos, sendo 215 oriundos de amostras de solo, e 401 isolados obtidos a partir de amostras de rizosfera (Tabela 1). Estes foram inicialmente caracterizados pela coloração de Gram, resultando na observação de 31,2% de isolados gram-negativos no solo e 53,1% na rizosfera e de isolados gram-positivos correspondendo a 68,8% no solo e 46,9% na rizosfera.

Tabela 1 - Número de isolados obtidos do solo e rizosfera de cana-de-açúcar. Os valores em Total correspondem à soma dos isolados encontradas no solo ou rizosfera e na caracterização de Gram

	<i>Gram-negativos</i>	<i>Gram-positivos</i>	Total
Solo	67	148	215
Rizosfera	213	188	401
Total	280	336	616

O favorecimento dos microrganismos gram-negativos na rizosfera foi mencionado por Moreira e Siqueira (2006) em culturas de trigo e soja, os quais sugerem que estes organismos possuem alta taxa de multiplicação celular, sendo,

portanto, mais aptos a responder à adição de aminoácidos e açúcares solúveis, além de serem capazes de produzir e resistir a diversos antibióticos abundantes na rizosfera. Cardoso, Tsai e Neves (1992) mencionaram que este aumento se deve principalmente ao incremento na abundância de bactérias do filo Proteobacteria na rizosfera, como observado em diversas culturas, por exemplo, milho (GARCÍA-SALAMANCA et al., 2013), beterraba (PHILIPPOT et al., 2013) e cana-de-açúcar (DINI-ANDREOTE et al., 2010).

Estes resultados deram suporte à caracterização de um grupo de 280 isolados por meio da técnica de BOX-PCR, como utilizado em outros estudos que buscam uma melhor caracterização de culturas bacterianas (HUNGRIA et al., 2008; LEE; WONG, 2009; MARQUES et al., 2008; SOARES JÚNIOR et al., 2013). Este método foi inicialmente descrito por Versalovic, Koeuth e Lupski (1991) e consiste na determinação do perfil de DNA após a amplificação com primers que anelam em regiões repetitivas e conservadas do DNA (rep-PCR), gerando assim um perfil de bandas característico para cada agrupamento de isolados.

Se observarmos no índice de similaridade de aproximadamente 0,2 (20%) nos diagramas de similaridade entre os perfis de BOX-PCR, pode-se perceber que nos meios de cultura TSB (Figura 8), MSSC (Figura 9) e LAM (Figura 10) maiores números de grupos foram formados, enquanto que nos meios KB (Figura 11) e LGI/JNFb (Figura 12) há a ocorrência de menores números de grupos. Este fato está correlacionado com a seleção exercida pelos meios de cultivo no processo de isolamento. De maneira geral, os resultados da análise de BOX-PCR indicaram uma alta diversidade genética entre os isolados obtidos, com formação de um total de 95 grupos, mesmo com uma baixa estridência (0,2 de similaridade).

Figura 8 - Agrupamento dos isolados bacterianos obtidos no meio de cultivo TSB, determinado pela análise de BOX-PCR. Os perfis de bandas deram origem a uma matriz, e os isolados foram agrupados por meio da análise de *Clusters* com base no método de similaridade *Jaccard*. Os símbolos indicam isolados referentes à rizosfera (Rz) e solo (SI). Isolados indicados com o item * foram submetidos ao sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Figura 9 - Agrupamento dos isolados bacterianos obtidos no meio de cultivo MSSC, determinado pela análise de BOX-PCR. Os perfis de bandas deram origem a uma matriz, e os isolados foram agrupados por meio da análise de *Clusters* com base no método de similaridade *Jaccard*. Os símbolos indicam isolados referentes à rizosfera (Rz) e solo (Sl). Isolados indicados com o item * foram submetidos ao sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Figura 10 - Agrupamento dos isolados bacterianos obtidos no meio de cultivo LAM, determinado pela análise de BOX-PCR. Os perfis de bandas deram origem a uma matriz, e os isolados foram agrupados por meio da análise de *Clusters* com base no método de similaridade *Jaccard*. Os símbolos indicam isolados referentes à rizosfera (Rz) e solo (SI). Isolados indicados com o item * foram submetidos ao sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Figura 11 - Agrupamento dos isolados bacterianos obtidos no meio de cultivo KB, determinado pela análise de BOX-PCR. Os perfis de bandas deram origem a uma matriz, e os isolados foram agrupados por meio da análise de *Clusters* com base no método de similaridade *Jaccard*. Os símbolos indicam isolados referentes à rizosfera (Rz) e solo (Sl). Isolados indicados com o item * foram submetidos ao sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Figura 12 - Agrupamento dos isolados bacterianos obtidos no meio de cultivo LGI e JNFb, determinado pela análise de BOX-PCR. Os perfis de bandas deram origem a uma matriz, e os isolados foram agrupados por meio da análise de *Clusters* com base no método de similaridade *Jaccard*. Os símbolos indicam isolados referentes à rizosfera (Rz) e solo (SI). Isolados indicados com o item * foram submetidos ao sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

6.3 Identificação dos isolados

Os resultados da identificação de 95 isolados, com base no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, revelou a afiliação dos isolados obtidos em cada meio de cultura (Figura 13). Pode-se observar nesta análise que o meio de cultura TSB apresenta a maior diversidade taxonômica dos isolados (17 grupos), o que está devido ao fato deste meio de cultura apenas selecionar bactérias heterotróficas, independentes das demais características. No outro extremo, observa-se a baixa diversidade taxonômica dos isolados obtidos dos meios de cultivo KB e LGI/JNFb, com 5 e 3 grupos, respectivamente. Nestes meios de cultivo, a menor diversidade é esperada uma vez que estes são seletivos para produtores de sideróforos e fixadores de nitrogênio. É importante destacar que os perfis de diversidade encontrados corroboram os resultados de BOX-PCR.

Figura 13 - Frequência dos grupos bacterianos em nível de gênero isolados da cana-de-açúcar identificados pelo sequenciamento parcial do gene 16s rRNA nos diferentes meios de cultura utilizados (TSB, MSSC, LAM, KB e LGI/JNFb)

A afiliação taxonômica mais detalhada dos isolados foi realizada por meio da determinação de árvores filogenéticas (Figuras 14, 15, 16 e 17), realizadas separadamente para os isolados afiliados aos filos Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes.

Pode-se observar que os isolados afiliados ao filo Proteobacteria (Figura 14) foram os mais abundantes entre os isolados obtidos no presente estudo. Este grupo bacteriano apresenta uma elevada diversidade metabólica, realizando funções importantes para o crescimento e o desenvolvimento da planta, como solubilização de fósforo, produção de hormônios vegetais e fixação de nitrogênio (MADIGAN et al., 2012). A prevalência dos organismos pertencentes ao filo Proteobacteria indica novamente a seleção de organismos benéficos pela planta pela exsudação radicular, corroborando diversos trabalhos apontaram este grupo como prevalentes na rizosfera de diversas plantas, inclusive na rizosfera da cana-de-açúcar (COSTA et al., 2014; DINI-ANDREOTE et al., 2010; MENDES et al., 2007).

Beneduzi e colaboradores (2013) isolaram bactérias afiliadas ao filo Proteobacteria do solo rizosférico de cana-de-açúcar com propriedades de promover

o crescimento das plantas, como a produção de compostos indólicos, solubilização de fosfato e produtores sideróforos, dentre as quais se destacam as pertencentes aos gêneros *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, e *Stenotrophomonas*. De maneira similar, Mehnaz (2013) listou diversos membros de Proteobacteria com atividades importantes relacionadas ao desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar, com destaque para os gêneros *Burkholderia* (hospedando isolados capazes de realizar fixação de nitrogênio, fitormônios e sínteses de vitaminas) e *Pseudomonas* (descritas como importantes na solubilização de fosfato, produção de sideróforos e antibióticos). É importante observar no presente estudo a afiliação de isolados oriundos de ambos ambientes (solo e rizosfera) como pertencentes aos gêneros *Enterobacter*, *Burkholderia* e *Pseudomonas*.

Figura 14 - Filogenia dos isolados classificados no filo Proteobacteria com base na similaridade de aproximadamente 600pb do gene 16S rRNA de acordo com o coeficiente de Neighbor-joining. Os códigos apresentados com os nomes de espécies são referentes ao código das sequências no GenBank. As figuras ● representam isolados da rizosfera e Δ isolados do solo. Os códigos entre parentes na frente de cada isolado represente o meio de cultura no qual foi isolado. A sequência parcial do gene 16S rRNA de *Arthrobacter sp* foi utilizada como grupo externo para enraizamento da árvore. Os valores de *bootstrap* observados nas árvores foram obtidos com base em 500 sub-amostragens

Os demais filos são relacionados com a coloração gram-positivo, sendo estes descritos nos solos por apresentarem diversas características favoráveis a colonização deste ambiente, como a maior resistência a estresses ambientais (por formarem esporos), e a maior competitividade (promovida pela produção de compostos com atividade antagônica aos demais organismos) (MADIGAN et al., 2012; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Figura 15 - Filogenia dos isolados classificados no filo Actinobacteria com base na similaridade de aproximadamente 600pb do gene 16S rRNA de acordo com o coeficiente de Neighbor-joining. Os códigos apresentados com os nomes de espécies são referentes ao código das sequências no GenBank. As figuras ● representam isolados da rizosfera e △ isolados do solo. Os códigos entre parenteses na frente de cada isolado representam o meio de cultura no qual foi isolado. A sequência parcial do gene 16S rRNA de *Bacillus sp.* foi utilizada como grupo externo para enraizamento da árvore. Os valores de *bootstrap* observados nas árvores foram obtidos com base em 500 sub-amostragens

Figura 16 - Filogenia dos isolados classificados no filo Firmicutes com base na similaridade de aproximadamente 600pb do gene 16S rRNA de acordo com o coeficiente de Neighbor-joining. Os códigos apresentados com os nomes de espécies são referentes ao código das sequências no GenBank. As figuras ● representam isolados da rizosfera e △ isolados do solo. Os códigos entre parentes na frente de cada isolado represente o meio de cultura no qual foi isolado. A sequência parcial do gene 16S rRNA de *Sphingomonas* sp foi utilizada como grupo externo para enraizamento da árvore. Os valores de *bootstrap* observados nas árvores foram obtidos com base em 500 sub-amostragens

Figura 17 - Filogenia dos isolados classificados no filo Bacteroidetes com base na similaridade de aproximadamente 600pb do gene 16S rRNA de acordo com o coeficiente de Neighbor-joining. Os códigos apresentados com os nomes de espécies são referentes ao código das sequências no GenBank. As figuras ● representam isolados da rizosfera e △ isolados do solo. Os códigos entre parentes na frente de cada isolado represente o meio de cultura no qual foi isolado. A sequência parcial do gene 16S rRNA de *Arthrobacter* sp foi utilizada como grupo externo para enraizamento da árvore. Os valores de *bootstrap* observados nas árvores foram obtidos com base em 500 sub-amostragens

Costa e colaboradores (2014) avaliaram a rizosfera de cana-de-açúcar e encontraram esses filos como os mais abundantes, corroborando com os resultados encontrados por Dini-Andreote e colaboradores (2010). A prevalência de organismos afiliados a estes filos na rizosfera é o reflexo da seleção por organismos que apresentam características positivas para o crescimento neste nicho. Bactérias afiliadas ao filo Actinobacteria já foram descritas como produtoras de ácido indol-acético, quitinase e capazes de solubilizar fosfato de cálcio (VASCONCELLOS et al 2010). Na rizosfera de cana-de-açúcar, Ratón e colaboradores (2012) isolaram cepas do filo Firmicutes, pertencente à classe Bacilli, e descreveram a capacidade destes isolados em inibir os agentes patogênicos *Curvularia* e *Fusarium*, com atividades poligalacturonase, pectatoliase e endoglucanase, além da solubilização do fosfato de cálcio.

Numa análise mais detalhada dos resultados do presente estudo, observa-se que foram isoladas bactérias afiliadas a 26 gêneros distintos: *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Chryseobacterium*, *Sinorhizobium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudokineococcus*, *Leifsonia*, *Luteibacter*, *Lysobacter*, *Massilia*, *Methylocella*, *Micrococcineae*, *Nocardia*, *Paenibacillus*, *Pectobacterium*, *Pedobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Telluria* e *Variovorax*, sendo o gênero *Enterobacter* o que apresentou o maior número de isolados, independente de ser amostra de solo ou de rizosfera (Figura 18). Esta figura também permite a observação da colonização preferencial de cada gênero no ambiente solo ou rizosfera. Observa-se, por exemplo, que os gêneros *Enterobacter*, *Bacillus*, *Arthrobacter* e *Burkholderia*, possuem mais isolados oriundos da rizosfera, ao passo que o gênero *Pseudomonas* é mais representado por isolados cultivados a partir de amostras de solo.

Figura 18 - Número de isolados bacterianos pertencentes a cada gênero, obtidos a partir do cultivo oriundo de amostras de solo ou rizosfera de cana-de-açúcar. A classificação foi realizada por meio do seqüenciamento parcial do gene 16s rRNA

Alguns destes gêneros já foram descritos como abundantes na rizosfera de diversas plantas. Gomes e colaboradores (2001) avaliaram a diversidade da rizosfera de milho em diferentes idades, e verificaram que além de ocorrer uma mudança no perfil da comunidade em relação à idade da planta, também há uma população predominante, encontrada em todas as fases do crescimento das plantas, composta de *Arthrobacter*. Mendes e colaboradores (2007) avaliaram a diversidade de bactérias endofíticas cultiváveis de cana-de-açúcar, e descreveram a afiliação taxonômica dos isolados como pertencentes aos gêneros de *Burkholderia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, e *Microbacterium*, representados nesta ordem de abundância.

Apesar da prevalência desses gêneros, a resposta de cada um destes isolados a exsudação da planta pode ser diferenciada e específica, podendo apresentar apresentarem respostas diferentes dentro da mesma espécie de planta. Costa e colaboradores (2014) mostraram que membros da classe *Bacilli* possuem respostas específicas para distintas variedades da planta cana-de-açúcar.

6.4 Perfis metabólicos dos isolados determinados por BIOLOG®

Na avaliação dos perfis de consumo de fontes de carbono por meio da metodologia BIOLOG® foram utilizados isolados da rizosfera e do solo dos gêneros mais abundantes encontrados (*Enterobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Arthrobacter* e *Pseudomonas*) (Tabela 2). Os resultados mostraram uma grande variabilidade metabólica dentre os isolados avaliados, sendo que a partir das 32 fontes de carbono analisadas, apenas 3 foram metabolizadas por todos os isolados (ácido pirúvico metil éster, D-manitol e D-xilose). Estes, e outros carboidratos degradados por alguns dos isolados, são componentes de exsudatos de diversas plantas, como ácido D-galactônico e lactona, D-ácido málico, glicose-1-fosfato, ácido glicil-L-glutâmico, L-arginina, L-asparagina, L-fenilalanina, L-serina, L-treonina, α -D-lactose e ácido γ -hidroxibutírico (DAKORA; PHILLIPS, 2002; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Em cana-de-açúcar, Buckeridge, Dantas e Souza (2011) mencionaram componentes encontrados nos tecido da planta, como glucuronoarabinoxilanas, xiloglucano, mannanos e fenilpropanoide, estes são basicamente formados por arabinose, ácido glucurônico, xilose, ácido ferúlico, galactose e glucose, o que pode explicar a utilização da xilose por todos os isolados avaliados. Em relação às outras fontes de carbono (ácido pirúvico metil éster e D-manitol), estas são associadas ao ciclo do ácido cítrico e atuam como fonte de carbono e energia. Williamson e colaboradores (2002) descrevem o manitol como um osmoprotetor celular, podendo este ser importante para a sobrevivência bacteriana em ambientes com alto estresse osmótico, como os solos agrícolas.

Tabela 2 - Perfil de carbonos avaliados através do BIOLOG® dos gêneros bacterianos de maior abundância isolados de cana-de-açúcar. As estripes de cada gênero estão numeradas e com Rz ou SI pertencem a rizosfera e solo respectivamente. Os símbolos + mencionam a degradação do carboidrato considerando $OD_{(560)} > 0,1$ e o símbolo - $OD_{(560)} < 0,1$

Carboidratos	<i>Pseudomonas</i>		<i>Bacillus</i>		<i>Enterobacter</i>		<i>Burkholderia</i>		<i>Arthrobacter</i>	
	152Rz	87SI	263Rz	257SI	178Rz	90SI	28Rz	74SI	153Rz	187SI
2-Hydroxy Benzoic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Hydroxy Benzoic Acid	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D,L- α -Glycerol Phosphate	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+
D-Cellobiose	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
D-Galactonic Acid γ -Lactone	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+
Dgalacturonic Acid	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+
Dglucosaminic Acid	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Malic Acid	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose-1-Phosphate	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
Glycyl-Lglutamic Acid	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
i-Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Itaconic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arginine	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
L-Asparagine	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
LPhenylalanine	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
L-Serine	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
L-Threonine	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
N-Acetyl-DGlucosamine	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Phenylethylamine	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Putrescine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyruvic Acid Methyl Ester	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 40	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
Tween 80	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+
α -Cyclodextrin	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
α -D-Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -Ketobutyric Acid	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
β -Methyl-DGlucoside	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
γ -Hydroxybutyric Acid	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

6.5 Efeito dos exsudatos radiculares sobre o desenvolvimento das bactérias

A observação dos efeitos dos exsudatos radiculares sobre o desenvolvimento das bactérias foi realizado através de curvas de multiplicação celular, obtidas com os isolados expostos ao uso dos exsudatos da planta como fonte de nutrientes. Esta análise buscou a comparação de perfis de multiplicação de isolados com afiliação taxonômica similar, porém isolados de ambientes distintos. Os gêneros bacterianos representados nesta análise foram os mais abundantemente encontrados: *Enterobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Arthrobacter* e *Pseudomonas*.

6.5.1 *Enterobacter* spp.

Os isolados 178Rz (rizosfera) e 90SI (solo) possuem perfis genéticos bastante similares (Figura 19a). Porém, na análise de BIOLOG®, das 31 fontes de carbonos analisados, 14 foram utilizadas de maneira diferenciada entre os isolados (Figura 19b), sendo que o isolado da rizosfera apresentou a capacidade de consumir uma maior variedade de fontes de carbono quando comparada ao isolado do solo.

Em relação à curva de multiplicação celular, ambos os isolados apresentaram uma indução no desenvolvimento quando na presença de exsudatos da planta, sendo o perfil desta resposta bastante similar (Figura 19c). O isolado da rizosfera (178Rz) entrou na fase estacionária em um menor espaço de tempo quando comparado ao resultado obtido na análise do isolado do solo (90SI). Observa-se também, que o isolado do solo apresenta formação de uma maior biomassa após o ciclo de cultivo, como indicado pelos maiores valores de absorbância para este isolado na fase estacionária da cultura. Além disso, pode-se observar um melhor crescimento (multiplicação celular mais rápida) de ambos os isolados nas concentrações menores de exsudatos radiculares (10 e 20%), sendo a multiplicação dos mesmos inibidos na maior concentração destes compostos (50%).

Conclui-se com isto que, apesar de estes isolados estarem relacionados filogeneticamente (Figura 19a), estes possuem um perfil metabólico distinto, o que dá base a observação de respostas singulares ao contato com os exsudatos da planta.

Figura 19 - Caracterização dos isolados da rizosfera (178Rz) e solo (90SI) pertencente ao gênero *Enterobacter* spp. A) Caracterização genética dos isolados (análise filogenética do gene parcial 16S rRNA e perfil de BOX-PCR); B) Comparação do perfil metabólico dos isolados pela análise de BIOLOG® [apenas valores diferentes estatisticamente ($p < 0,05$ – teste de Tukey) são apresentados, sendo os mesmos transformados em log₂ da razão rizosfera/solo]; C) Comparação das multiplicações celulares de ambos os isolados frente às distintas concentrações de exsudatos radiculares (linhas contínuas indicam os tratamentos com exsudatos e as linhas pontilhadas indicam os controles)

6.5.2 *Bacillus* spp.

Os isolados 263Rz (rizosfera) e 257SI (solo) possuem perfis genéticos bastante similar (Figura 20a). Na análise de BIOLOG®, das 31 fontes de carbonos analisados, 17 foram utilizadas de maneira diferenciada entre os isolados (Figura 20b), sendo que o isolado da rizosfera apresentou a capacidade de consumir variedades de fontes de carbono maior quando comparada ao isolado do solo.

Em relação à curva de multiplicação celular, ambos os isolados apresentaram uma indução no desenvolvimento quando na presença do exsudato da planta, mas o perfil desta resposta foi bastante distinta (Figura 20c). O isolado da rizosfera (263Rz) apresentou fase estacionária definida quando comparada ao resultado obtido na análise do isolado do solo (257SI). Observa-se que o isolado do solo apresenta formação de uma maior biomassa após o ciclo de cultivo, como indicado pelos maiores valores de absorbância para este isolado. Além disso, pode-se observar que o isolado da rizosfera apresenta uma multiplicação celular melhor nas concentrações menores de exsudatos (10 e 20%) enquanto que o isolado do solo a multiplicação celular é melhor nas concentrações maiores (20% e 50%).

Conclui-se que apesar de estarem relacionados filogeneticamente, esses isolados possuem um perfil de consumo dos carboidratos diferenciados, sendo essa diferença refletida no comportamento dessas estirpes quando em contato com o exsudato da planta.

Figura 20 - Caracterização dos isolados da rizosfera (263Rz) e solo (257SI) pertencente ao gênero *Bacillus* spp. A) Caracterização genética dos isolados (análise filogenética do gene parcial 16S rRNA e perfil de BOX-PCR); B) Comparação do perfil metabólico dos isolados pela análise de BIOLOG® [apenas valores diferentes estatisticamente ($p < 0,05$ – teste de Tukey) são apresentados, sendo os mesmos transformados em $\log_2$ da razão rizosfera/solo]; C) Comparação das curvas de multiplicação celular de ambos isolados frente as distintas concentrações de exsudatos radiculares (linhas contínuas indicam os tratamentos com exsudatos e as linhas pontilhadas indicam os controles)

6.5.3 *Arthrobacter* spp.

Os isolados 153Rz (rizosfera) e 187SI (solo) possuem perfis filogenéticos bastante similar, mas apresentam perfis de BOX-PCR bastante diferenciados (Figura 21a). Nas análises de BIOLOG®, das 31 fontes de carbonos analisados, 07 foram utilizados de maneira diferenciada entre os isolados (Figura 21b), sendo que o isolado da rizosfera apresentou capacidade de consumir uma maior variedade de fontes de carbonos quando comparada ao isolado do solo.

Em relação à curva de multiplicação celular, ambos os isolados apresentaram uma indução no desenvolvimento quando na presença do exsudato da planta, sendo o perfil desta resposta bastante similar (Figura 21c). Ambos os isolados entraram na fase estacionária no mesmo período e apresentaram uma melhor taxa de crescimento nos tratamentos com maior concentração de exsudatos radiculares (50%).

Conclui-se com isto que, apesar de estarem relacionados filogeneticamente esses isolados possuem consideráveis diferenças estruturais em seus genomas, como indicado pela análise de BOX-PCR (Figura 21a), o que pode dar suporte a observada diferenciação metabólica entre os mesmos. No entanto, frente aos exsudatos radiculares as respostas foram similares, mostrando que algumas características genéticas/metabólicas devem ser similares a ambos isolados.

Figura 21 - Caracterização dos isolados da rizosfera (153Rz) e solo (187SI) pertencente ao gênero *Arthrobacter* spp. A) Caracterização genética dos isolados (análise filogenética do gene parcial 16S rRNA e perfil de BOX-PCR); B) Comparação do perfil metabólico dos isolados pela análise de BIOLOG® [apenas valores diferentes estatisticamente ($p < 0,05$ – teste de Tukey) são apresentados, sendo os mesmos transformados em $\log_2$ da razão rizosfera/solo]; C) Comparação das curvas de multiplicação celular de ambos isolados frente as distintas concentrações de exsudatos radiculares (linhas contínuas indicam os tratamentos com exsudatos e as linhas pontilhadas indicam os controles)

6.5.4 *Burkholderia* spp

Os isolados 28Rz (rizosfera) e 74SI (solo) possuem perfis filogenéticos bastante similar, mas apresentam perfis muito distintos na análise de BOX-PCR (Figura 22a). Na análise de BIOLOG®, das 31 fontes de carbono analisados, 19 deles foram utilizados de maneira diferenciada entre os isolados (Figura 22b), sendo que o isolado do solo apresentou capacidade de consumir uma maior variedade de fontes de carbono quando comparada ao isolado da rizosfera.

Em relação à multiplicação celular, os isolados apresentaram comportamentos diferenciados na presença do exsudato (Figura 22c). O isolado da rizosfera (28Rz) entrou na fase estacionária em um menor espaço de tempo quando comparado ao resultado obtido na análise do isolado do solo (74SI). Observa-se também, que o isolado do solo apresenta formação de uma maior biomassa após o ciclo de cultivo, como indicado pelos maiores valores de absorbância para este isolado. Além disso, pode-se observar um melhor crescimento do isolado do solo em todas as concentrações de exsudatos radiculares, sendo ausente e diferenciação no isolado oriundo da rizosfera.

Conclui-se com isto que, apesar de estarem relacionados filogeneticamente, esses isolados possuem apenas uma pequena similaridade genética e metabólica, o que dá base a observação de respostas diferenciadas ao contato com os exsudatos da planta. É ainda importante relatar neste caso a ausência de resposta do isolado da rizosfera aos exsudatos radiculares, o que é bastante intrigante. Possivelmente, este isolado não tenha como essência de sua colonização da rizosfera, o estabelecimento de interações benéficas com a planta, mas possa estar nesta região atuando de forma oportunista. Um fato que suporta esta sugestão é sua grande capacidade de multiplicação frente a todas as condições de cultivo avaliadas (Figura 22C), caracterizando-o como um típico organismo estrategista K.

Figura 22 - Caracterização dos isolados da rizosfera (28Rz) e solo (74SI) pertencente ao gênero *Burkholderia* spp. A) Caracterização genética dos isolados (análise filogenética do gene parcial 16S rRNA e perfil de BOX-PCR); B) Comparação do perfil metabólico dos isolados pela análise de BIOLOG® [apenas valores diferentes estatisticamente ($p < 0,05$ – teste de Tukey) são apresentados, sendo os mesmos transformados em $\log_2$ da razão rizosfera/solo]; C) Comparação das curvas de multiplicação celular de ambos isolados frente as distintas concentrações de exsudatos radiculares (linhas contínuas indicam os tratamentos com exsudatos e as linhas pontilhadas indicam os controles)

6.5.5 *Pseudomonas spp*

Os isolados 152Rz (rizosfera) e 87ASl (solo) possuem perfis filogenéticos bastante similares, mas também se diferenciam na comparação pela metodologia de BOX-PCR (Figura 23a). Na análise de BIOLOG®, das 31 fontes de carbono analisados, 08 foram utilizados de maneira diferenciada entre os isolados (Figura 23b), sendo que ambos os isolados apresentaram a capacidades de consumir o mesmo número de variedades de fontes de carbono, porem distintas.

Em relação à curva de multiplicação celular, ambos os isolados apresentaram uma indução no desenvolvimento quando na presença de exsudatos da planta, sendo o perfil desta resposta similar (Figura 23c). Ambos os isolados entraram na fase estacionária no mesmo período de tempo. Observa-se também, que o isolado da rizosfera apresenta formação de uma maior biomassa após o ciclo de cultivo, como indicado pelos maiores valores de absorbância para este isolado. Além disso, pode-se observar um melhor crescimento de ambos os isolados nas concentrações menores de exsudatos radiculares (10 e 20%), sendo a multiplicação dos mesmos inibidos na maior concentração destes compostos (50%).

Conclui-se com isso que, apesar de estarem relacionados filogeneticamente esses isolados possuem um perfil de BOX-PCR e metabólico distinto, porem com respostas similares ao contato com os exsudatos da planta.

Figura 23 - Caracterização dos isolados da rizosfera (152BRz) e solo (87ASI) pertencente ao gênero *Pseudomonas* spp. A) Caracterização genética dos isolados (análise filogenética do gene parcial 16S rRNA e perfil de BOX-PCR); B) Comparação do perfil metabólico dos isolados pela análise de BIOLOG® [apenas valores diferentes estatisticamente ($p < 0,05$ – teste de Tukey) são apresentados, sendo os mesmos transformados em $\log_2$ da razão rizosfera/solo]; C) Comparação das curvas de multiplicação celular de ambos isolados frente as distintas concentrações de exsudatos radiculares (linhas contínuas indicam os tratamentos com exsudatos e as linhas pontilhadas indicam os controles)

Os resultados obtidos com os testes de interação de isolados pertencentes aos diferentes gêneros selecionados indicam a relação estreita e específica que ocorre entre os microrganismos presentes na rizosfera e as plantas. Os exsudatos de raízes compreendem uma mistura complexa de nutrientes, onde os microrganismos interagem com produtos vegetais nos exsudatos radiculares, disponibilizando nutrientes e outros componentes para a planta (DAKORA; PHILLIPS, 2002). Como

observado nos dados descritos, cada isolado bacteriano por ter atividades específicas, degradando componentes diferenciados liberados pelas raízes, e ocupando estrategicamente seu nicho ecológico.

Esta alta abundância de nutrientes favoreceu para que todos os isolados do solo obtivessem crescimento positivo na curva de multiplicação celular, mas podemos destacar que os isolados do solo referentes aos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia* e *Arthrobacter* tiveram um crescimento maior nas concentrações mais elevadas de exsudatos (50%), este comportamento não foi observado nas estirpes da rizosfera, no qual tiveram crescimento mais elevado nas concentrações de 10% e 20%. Para Moreira e Siqueira (2006) microrganismos presentes no solo possuem uma capacidade maior de serem estimulados por compostos orgânicos. Para os mesmos autores, no ambiente natural, a rizosfera possui uma elevada e diversificada microbiota, consequentemente onde também ocorre um aumento das relações antagônicas em relação ao solo, o que pode favorecer o desenvolvimento de organismos com outras características além daquelas relacionadas à resposta aos exsudatos radiculares.

Num olhar integrativo dos resultados obtidos, pode-se observar que a maioria dos isolados de rizosfera (3 dos 5 avaliados) foram capazes de utilizar a fonte de carbono fenilalanina, enquanto que no solo os isolados foram mais eficientes no uso das fontes de glicogênio (3 dos 5 isolados avaliados). Os gêneros que representam os dois grupos com comportamento diferenciado são *Pseudomonas* e *Arthrobacter*.

Com os dados podemos verificar que cada gênero, e até mesmo comparando membros do mesmo gênero, respondem de maneira diferenciada à presença dos exsudatos. Este comportamento pode ser atribuído às pressões seletivas exercidas pelo ambiente ao qual foram isolados. Abby e Daubin (2007) mencionaram que estudos comparativos de genomas revelaram que os cromossomos bacterianos estão sobre pressões seletivas no qual modelam sua organização. Esta plasticidade dos organismos que compõem a microbiota consequentemente modula seu comportamento. Belkum e Scherer (1998) mencionaram que as regiões intergênicas, representadas na análise de BOX-PCR, têm participação nos processos de evolução adaptativa, intermediando a interação dos microrganismos com o ambiente, acumulando mutações ou sendo regiões alvo de trocas genéticas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho veio a contribuir para um melhor entendimento sobre os microrganismos encontrados na rizosfera de cana-de-açúcar. Sua concepção está no fato de que apesar das novas tecnologias de acesso ao mundo microbiano serem altamente eficientes, ainda há uma presente necessidade de se realizar experimentos com os organismos ativos, dando estes bases mais sólidas para inferências sobre o metabolismo microbiano e a interação dos mesmos com as plantas. Assim sendo, o estudo da comunidade microbiana presente nos solos utilizando metodologias dependentes de cultivo é de grande importância, pois essa metodologia nos permite uma melhor compreensão do seu metabolismo, do seu comportamento e das suas respostas às modificações ambientais (DINI-ANDREOTE; VAN ELSAS, 2013).

Assim sendo, os resultados obtidos atingiram os objetivos propostos, dando base às seguintes conclusões:

- Número de microrganismos cultiváveis na rizosfera é maior comparado ao solo;
- O grupo prevalecente entre os isolados da rizosfera é o filo Proteobacteria;
- Existe uma grande diversidade genética e metabólica, mesmo dentro dos gêneros bacterianos isolados do solo e da rizosfera;
- Todos os isolados testados consomem ácido pirúvico metil éster, manitol e xilose;
- Isolados da rizosfera possuem preferência pelo consumo de fenilalanina, enquanto que isolados do solo usam preferencialmente glicogênio;
- Cada isolado possui suas características peculiares, possuindo comportamentos metabólicos diferentes.

De maneira geral, este estudo demonstrou que as plantas de cana-de-açúcar podem influenciar o comportamento das comunidades bacterianas presentes no solo, e estes apresentam respostas bastante singulares à presença dos exsudatos radiculares, os quais modulam diferencialmente a multiplicação celular dos organismos componentes do ambiente rizosférico.

REFERÊNCIAS

- ABBY, S.; DAUBIN, V. Comparative genomics and the evolution of prokaryotes. **Trends in microbiology**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 135–141, 2007.
- ALMEIDA, G.; ALMEIDA, E.A. de. Production of yellow-green fluorescent pigment by *Pseudomonas fluorescens*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, p. 411–419, 2006.
- ARAUJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.; ELSAS, J.D.; VUURDE, J.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 68, n. 10, p. 4906–4914, 2002.
- BAIS, H.; WEIR, T.L.; PERRY, L.G.; GILROY, S.; VIVANCO, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 233–266, 2006.
- BELKUM, A. van; SCHERER, S. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. **Microbiology and Molecular Biology**, Washington, v. 62, n. 2, p. 275–293, 1998.
- BENEDUZI, A.; MOREIRA, F.; COSTA, P.B.; VARGAS, L.K.; LISBOA, B.B.; FAVRETO, R.; BALDANI, J.I.; PASSAGLIA, L.M.P. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 63, p. 94–104, 2013.
- BERENDSEN, R.L.; PIETERSE, C.M.J.; BAKKER, P.A.H.M. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 478–86, 2012.
- BUCKERIDGE, M.S.; DANTAS, W.; SOUZA, A.P. Routes for cellulosic ethanol in Brazil. In: CORTEZ, L.A.B. **Sugarcane bioethanol: R&D for productivity and sustainability**. São Paulo: Cortez LAB, 2010. p. 365–380.
- CARDOSO, E.; TSAI, S.; NEVES, M. **Microbiologia do solo**. Campinas: SBCS, 1992. 360 p.
- CASTRO-GONZÁLEZ, R.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; RAMÍREZ-TRUJILLO, A.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; CABALLERO-MELLADO, J. High diversity of culturable *Burkholderia* species associated with sugarcane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 345, n. 1/2, p. 155–169, 2011.
- CAVALCANTE, V.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 31, p. 23–31, 1988.
- CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA. **Energia sustentável**. Disponível em: <<http://www.ctcanavieira.com.br/energiasustentavel.html>>. Acesso em: 15 set. 2014.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; ABREU, H.M.C.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J.C.; BURNQUIST, W.L.; CRESTE, S.; DI CIERO, L.; FERRO, J.A.; FIGUEIRA, A.V.O.; SOUSA FILGUEIRAS, T.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; GUZZO, E.C.; HOFFMANN, H.P.; ANDRADE LANDELL, M.G.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; CASTRO REINACH, F.; ROMANO, E.; SILVA, W.J.; CASTRO SILVA FILHO, M.; CÉSAR ULIAN, E. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, Brasília, v. 4, n. 1, p. 62–89, Mar. 2011.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTACIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira cana-de-açúcar. **Observatório Agrícola**, Brasília, v. 1 - SA, n. 2318-7921, p. 23, 2014a.

_____. Perspectivas para a agropecuária. **Perspectiva Agropecuária**, Brasília, v. 2, n. 2318/3241, p. 155, 2014b.

COSTA, D.; DIAS, A.C.F.; DURRER, A.; ANDRADE, P.A.M.; GUMIERE, T.; ANDREOTE, F.D. **Composição diferencial das comunidades bacterianas na rizosfera de variedades de cana-de-açúcar**. Campinas, SBCS, 2014. No prelo.

DAKORA, F.; PHILLIPS, D. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 245, p. 35–47, 2002.

DHANRAJ, B.N. Bacterial diversity in sugarcane (*Saccharum Officinarum*) rhizosphere of saline soil. **International Research Journal of Biological Sciences**, Lake Haven, v. 2, n. 2, p. 60–64, 2013.

DINARDO-MIRANDA, L.L. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agronômico, 2008. 882 p.

DINI-ANDREOTE, F.; ANDREOTE, F.D.; COSTA, R.; TAKETANI, R.G.; VAN ELSAS, J.D.; ARAUJO, W.L. Bacterial soil community in a Brazilian sugarcane field. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 336, n. 1/2, p. 337–349, 2010.

DINI-ANDREOTE, F.; VAN ELSAS, J.D. Back to the basics: the need for ecophysiological insights to enhance our understanding of microbial behaviour in the rhizosphere. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 373, n. 1/2, p. 1–15, 2013.

DONN, S.; KIRKEGAARD, J. A.; PERERA, G.; RICHARDSON, A. E.; WATT, M. Evolution of bacterial communities in the wheat crop rhizosphere. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 10, p. 1–34, 2014.

DOORNBOS, R.; LOON, L. van; BAKKER, P. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere: a review. **Agronomy for sustainable**, Paris, v. 32, n. 1, p. 227–243, 2012.

ESCHBACH, M.; MÄBITZ, H.; ROMPF, A.; JAHN, D. Members of the genus *Arthrobacter* grow anaerobically using nitrate ammonification and fermentative processes: anaerobic adaptation of aerobic bacteria abundant in soil. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 223, n. 2, p. 227–230, 2003.

EUZÉBY, J. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 47, p. 590–592, 1997.

GARCÍA-SALAMANCA, A.; MOLINA-HENARES, M.A.; VAN DILLEWIJN, P.; SOLANO, J.; PIZARRO-TOBÍAS, P.; ROCA, A.; DUQUE, E.; RAMOS, J.L. Bacterial diversity in the rhizosphere of maize and the surrounding carbonate-rich bulk soil. **Microbial Biotechnology**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 36–44, 2013.

GOMES, N.; HEUER, H.; SCHÖNFELD, J.; COSTA, R.; MENDONÇA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 232, p. 167–180, 2001.

GOPAL, M.; GUPTA, A.; THOMAS, G.V. Bespoke microbiome therapy to manage plant diseases. **Frontiers in Microbiology**, Madison, v. 4, p. 355, Dec. 2013.

GREGERSEN, T. Rapid method for distinction of gram-negative from gram-positive bacteria. **European Journal of Applied Microbiology and Biochemistry**, New York, v. 7, p. 123–127, 1978.

HAICHAR, F.E.Z.; MAROL, C.; BERGE, O.; RANGEL-CASTRO, J.I.; PROSSER, J.I.; BALESDENT, J.; HEULIN, T.; ACHOUAK, W. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. **The ISME Journal**, New York, v. 2, n. 12, p. 1221–1230, 2008.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.; RYAN, P. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis University of Oslo. **Paleontologia Electronica**, v. 4, n. 1, 9 p., 2001. Disponível em: <<http://folk.uio.no/ohammer/past/>>. Acesso em: 13 jun. 2014.

HARTMANN, A.; ROTHBALLER, M.; SCHMID, M. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 312, n. 1/2, p. 7–14, 2007.

HUANG, X.; CHAPARRO, J.M.; REARDON, K.F.; ZHANG, R.; SHEN, Q.; VIVANCO, J.M. Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. **Botany**, Ottawa, v. 92, n. 4, p. 267–275, 2014.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L.M.O.; MENNA, P.; BANGEL, E.V. **Caracterização genética de rizóbios e outras bactérias giazotróficas e promotoras do crescimento de plantas por Seropédica: Embrapa CNPAB**, 2008. 12 p. (Documentos, 79).

JAWAD, A.; HAWKEY, P.M.; HERITAGE, J.; SNELLING, A.M. Description of leeds acinetobacter medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp., and comparison with Herellea agar and Holton's agar. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 10, p. 2353–2358, 1994.

JONES, D.; KEDDIE, R. The genus *Arthrobacter*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. **The prokaryotes**. Berlin: Springer-Verlag, 2013. p. 945–960.

JONES, J.B.; CHASE, S.R.; HARRIS, G.K. Evaluation of the biology GN microplate system for identification of some plant-pathogenic bacteria. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, p. 553–558, 1993.

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

LEE, A.; WONG, E. Optimization and the robustness of BOX A1R PCR for DNA fingerprinting using trout lake *E. coli* isolates. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology**, Vancouver, v. 13, p. 104–113, Apr. 2009.

LOPER, J.E.; HASSAN, K.; MAVRODI, D.V.; DAVIS, E.W.; LIM, C.K.; SHAFFER, B.T.; ELBOURNE, L.D.H.; STOCKWELL, V.O.; HARTNEY, S.L.; BREAKWELL, K.; HENKELS, M.D.; TETU, S.G.; RANGEL, L.I.; KIDARSA, T.; WILSON, N.L.; VAN DE MORTEL, J.E.; SONG, C.; BLUMHAGEN, R.; RADUNE, D.; HOSTETLER, J.B.; BRINKAC, L.M.; DURKIN, S.; KLUEPFEL, D.; WECHTER, W.; ANDERSON, A.J.; KIM, Y.C.; PIERSON, L.S.; PIERSON, E.; LINDOW, S.E.; KOBAYASHI, D.Y.; RAAIJMAKERS, J.M.; WELLER, D.M.; THOMASHOW, L.S.; ALLEN, A.E.; PAULSEN, I.T. Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 8, n. 7, p. e1002784, 2012.

LUVIZOTTO, D.M.; MARCON, J.; ANDREOTE, F.D.; DINI-ANDREOTE, F.; NEVES, A.A.C.; ARAUJO, W.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. Genetic diversity and plant-growth related features of *Burkholderia* spp. from sugarcane roots. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 10, p. 1829–1836, 2010.

LYNCH, J.M.; LEIJ, F.; LYNCH, J.M.; LEIJ, F. Rhizosphere. **eLS**, West Sussex, n. 2002, p. 1-10, 2001.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; LEE, J.; SARAVANAN, V.S.; LEE, K.; SANTHANAKRISHNAN, P. Enterobacter arachidis sp. nov., a plant-growth-promoting diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of groundnut. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 60, pt. 7, p. 1559–1564, 2010.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.M.; STAHL, D.A.; CLARK, D.P. **Brock biology of microorganisms**. 13th ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2012. 1155 p.

MADSEN, E. **Environmental microbiology**: from genomes to biogeochemistry. Singapore: Blackwell, 2008. 490 p.

MARQUES, A.; MARCHAISON, A. GARDAN, L.; SAMSON, R. BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae*: *P. viridiflava* group. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 1, p. 106–115, 2008.

MAVRODI, D.V.; JOE, A.; MAVRODI, O.V.; HASSAN, K.; WELLER, D.M.; PAULSEN, I.T.; LOPER, J.E.; ALFANO, J.R.; THOMASHOW, L.S. Structural and functional analysis of the type III secretion system from *Pseudomonas fluorescens* Q8r1-96. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 193, n. 1, p. 177–189, 2011.

MCNEAR, D.H. The rhizosphere: rottes, soil and everything in between. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, n. 3, p. 1–13, 2012.

MEHNAZ, S. Microbes: friends and foes of sugarcane. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 53, n. 12, p. 954–971, 2013.

MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.; ARAUJO, W.L.; RAAIJMAKERS, J.M. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 22, p. 7259–7267, 2007.

MOORE, J.E.; WILLIAMS, F. Cicero and *Burkholderia cepacia*. **Emergency Medicine News**, Princeton, v. 27, n. 9, p. 17, Sept. 2005.

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

NICHOLS, N.N.; LUNDE, T.; GRADEN, K.C.; HALLOCK, K.; KOWALCHYK, C.K.; SOUTHERN, R.M.; SOSKIN, E.J.; DITTY, J.L. Chemotaxis to furan compounds by furan-degrading *Pseudomonas* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 17, p. 6365–6368, 2012.

OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S.; CHAGAS-JÚNIOR, A.F. Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 61–66, 2007.

PERIN, L.; ARAUJO, J.; REIS, V. **O gênero *Burkholderia***: um importante componente da comunidade microbiana. Seropédica: Embrapa CNPAB, 2006. 18 p. (Documentos, 219).

PHILIPPOT, L.; RAAIJMAKERS, J.M.; LEMANCEAU, P.; VAN DER PUTTEN, W.H. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 11, n. 11, p. 789–799, 2013.

PISA, G.; MAGNANI, G.S.; WEBER, H.; SOUZA, E.M.; FAORO, H.; MONTEIRO, R.A.; DAROS, E.; BAURA, V.; BESPALHOK, J.P.; PEDROSA, F.O.; CRUZ, L.M. Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 44, n. 12, p. 1215–1221, 2011.

RATÓN, T.; YANO, R.; GÁMEZ, O.R.; FLOH, E.L.; DIAZ, M.J.S.; BARBOSA, H.R. Isolation and characterisation of aerobic endospore forming Bacilli from sugarcane rhizosphere for the selection of strains with agriculture potentialities. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 4, n. 28, p. 1593–1603, 2012.

SALLES, J.F.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VEEN, J.A. Effect of agricultural management regime on *Burkholderia* community structure in soil. **Microbial Ecology**, New York, v. 52, n. 2, p. 267–279, 2006.

SANDERS, W.E.; SANDERS, C.C. Enterobacter spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 10, n. 2, p. 220–241, 1997.

SANTOS, P.E.L.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 6, p. 2790–2798, 2001.

SARRUGE, J.R. Solução nutritiva. **Summa Phytopathologia**, Piracicaba, v. 1, n. 3, p. 231–233, 1975.

SINGH, D.; YADAV, D.K.; SINHA, S.; MONDAL, K.K. Genetic diversity of iturin producing strains of *Bacillus* species antagonistic to *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt disease in tomato. **African Journal of Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 48, p. 5459–5470, 2013.

SMITH, K. Genetic basis in plants for interactions with disease-suppressive bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, p. 4786–4790, 1999.

SOARES JÚNIOR, F.L.; DIAS, A.C.F.; FASANELLA, C.C.; TAKETANI, R.G.; SOUZA LIMA, A.O.; MELO, I.S.; ANDREOTE, F.D. Endo- and exoglucanase activities in bacteria from mangrove sediment. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 3, p. 969–976, 2013.

TAGHAVI, S.; VAN DER LELIE, D.; HOFFMAN, A.; ZHANG, Y.B.; WALLA, M.D.; VANGRONSVELD, J.; NEWMAN, L.; MONCHY, S. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 6, n. 5, p. e1000943, 2010.

TALARO, K.; CHESS, B. **Foundations in microbiology**. 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2008. 937 p.

TORRES-RUBIO, M.G.; VALENCIA-PLATA, S.A.; BERNAL-CASTILLO, J.; MARTÍNEZ-NIETO, P. Isolation of *Enterobacteria*, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., producers of indole-3-acetic acid and siderophores, from Colombian rice rhizosphere. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, Mexico, v. 42, p. 171–176, 2000.

TORTORA, G.; FUNKE, B.; CASE, C. **Microbiology**: an introduction. 10th ed. San Francisco: Pearson Education, 2007. 960 p.

TURNBULL, P.C.B. *Bacillus*. In: BARON S. **Medical microbiology**. 4th ed. Galveston: University of Texas Medical Branch, 1996. p. 1-16.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Area de cana-de-açúcar**. 2014. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/mapa-da-producao/>>. Acesso em: 15 ago. 2014.

VASCONCELLOS, R.; SILVA, M.C.P.; RIBEIRO, C.M.; CARDOSO, E.J.B.N. Isolation and screening for plant growth-promoting (PGP) actinobacteria from *Araucaria angustifolia* rhizosphere soil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, p. 743–746, Dec. 2010.

VASCONCELOS, M.; ROCHA, M.C.; MIRANDA, G.V.; SCHAFFERT, R.E. **Metodologia de avaliação de exsudados radiculares em linhagens de sorgo submetidos ao estresse de fósforo**. Seropédica: Embrapa CNPAB, 2009. 6 p. (Documentos, 115).

VASSILEVA, M.; AZCON, R.; BAREA, J.M.; VASSILEV, N. Effect of encapsulated cells of *Enterobacter* sp on plant growth and phosphate uptake. **Bioresource Technology**, Essex, v. 67, n. 3, p. 229–232, 1999.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M. 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.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, Vancouver, v. 19, n. 24, p. 6823–6831, 1991.

WALKER, T.; BAIS, H.P.; GROTEWOLD, E.; VIVANCO, J.M. Root exudation and rhizosphere biology. **Plant Physiology**, Washington, v. 132, p. 44–51, May 2003.

WAUTERS, G.; CHARLIER, J.; JANSSEN, M.; DELMÉE, M. Identification of *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter luteolus* sp. nov., and *Arthrobacter albus* sp. nov., isolated from human clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 6, p. 2412–2415, 2000.

WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. **Bactérias diazotróficas em abacaxizeiros e bananas: técnicas de inoculação e monitoramento**. Seropédica: Embrapa CNPAB, 1999. 18 p. (Série Documentos, 35).

WILLIAMSON, J.; JENNINGS, D.B.; GUO, W.W.; PHARR, D.M. Sugar alcohols, salt stress, and fungal resistance: polyols—multifunctional plant protection. **Journal of the American Statistical Association**, New York, v. 127, n. 4, p. 467–473, 2002.

ZHANG, N.; WANG, D.; LIU, Y.; LI, S.; SHEN, Q.; ZHANG, R. Effects of different plant root exudates and their organic acid components on chemotaxis, biofilm formation and colonization by beneficial rhizosphere-associated bacterial strains. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 374, n. 1/2, p. 689–700, 2014.

ZUCARELI, C.; CIL, I.R.; PRETE, C.E.C.; PRANDO, A.M. Eficiência agronômica da inoculação à base de *Pseudomonas fluorescens* na cultura do milho. **Revista Agrarian**, Dourados, v. 4, n. 1984/2538, p. 152–157, 2011.