Rafaela de Fátima Neroni

Engenheiro Agrônomo

**Diversidade de bactérias diazotróficas associadas à *Araucaria angustifolia* no
Estado de São Paulo**

Orientadora:

Prof^a. Dra. ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração: Solos e
Nutrição de Plantas**

Piracicaba

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Neroni, Rafaela de Fátima

Diversidade de bactérias diazotróficas associadas à *Araucaria angustifolia* no Estado de São Paulo / Rafaela de Fátima Neroni. - - Piracicaba, 2007.

60 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Árvore florestal 2. Bactérias fixadoras de nitrogênio 3. Filogenia 4. Florestas
5. Reguladores de crescimento vegetal I. Título

CDD 634.975

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

A Deus, pela minha vida e por guiar sempre os meus caminhos.

Aos meus pais, Antonio e Marta, pelo amor, dedicação, confiança
e apoio, que me permitiram chegar até aqui.

À minha irmã Raquel e ao meu cunhado Eduardo, pelo carinho e
companheirismo, principalmente nas horas mais difíceis.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso, por quem tive a honra de ser orientada desde o primeiro ano da graduação. Sua orientação foi preciosa para meu crescimento profissional e pessoal, e aqui deixo registrada toda minha admiração.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia do Solo da ESALQ, Denise Lourdes Colombo Mescolotti e Luis Fernando Baldesin, excelentes profissionais e pessoas muito especiais, pela grande ajuda, prazeroso convívio e, sobretudo, amizade.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira, pela orientação e incentivo em meus primeiros passos na vida científica.

À Dra. Vera Lucia Divan Baldani, pelo treinamento em isolamento e identificação de bactérias diazotróficas em plantas não leguminosas, na Embrapa Agrobiologia.

À Profa. Dra. Helaine Carrer, por permitir o uso das instalações do Laboratório de Biologia Molecular do CEBTEC para os trabalhos de seqüenciamento de DNA, e à técnica Valentina de Fátima De Martin, pela ajuda na execução dos trabalhos.

À Profa. Dra. Siu Mui Tsai e ao técnico Francisco Carlos Montrazi do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA, pelo empréstimo de materiais necessários para a análise de redução de acetileno.

Ao Prof. Dr. Angelo Pedro Jacomino, por permitir o uso do cromatógrafo a gás do Laboratório de Pós-Colheita de Produtos Hortícolas da ESALQ, ao técnico Marcos José Trevisan e a estagiária Gabriela, pelo auxílio nas análises.

Ao técnico Wladimir Rosignolo, pela ajuda com as análises de nitrogênio total e ao Sr. Dorival Grisotto, pela ajuda nas coletas.

Ao “colega de diazotróficos”, Daniel Renato Lammel, pela amizade, carinho, paciência e grande colaboração no trabalho.

Aos colegas Dilmar Baretta e Alessandra Monteiro de Paula, pela amizade, apoio e importantes discussões sobre o trabalho.

Às amigas Maria Elda Ferreira Cesar e Priscila Caceres Petterman, pelo companheirismo em todas as situações e por tornarem o período do mestrado mais alegre.

Aos colegas e amigos de laboratório, Leandro, Fabiana, Mylenne, Rafael, Alexandre, André, Simone, Pilar, Henrique, Maurício e Vitor, pela ajuda e ótimos momentos de convivência.

A todos os colegas de pós-graduação, em especial Carolina Maluche, Rafael Dutra, Lucas Azevedo, Robinson Moresca, Márcio Morais, Gabriel Barth, Adilson de Oliveira, Gean Carlos Matias e Carlos Eduardo Juhász, pelo convívio, amizade e momentos de descontração.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Solos e Nutrição de Plantas, pela oportunidade de realização do curso e ao Prof. Dr. Álvaro Pires da Silva, pela compreensão diante das dificuldades surgidas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro aos trabalhos através do projeto temático do programa Biota “BIODIVERSIDADE VEGETAL E DE ORGANISMOS EDÁFICOS EM

ECOSSISTEMAS DE *Araucaria angustifolia* NATURAIS E IMPACTADOS NO ESTADO DE SÃO PAULO”.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 DESENVOLVIMENTO.....	12
2.1 Revisão Bibliográfica	12
2.1.1 <i>Araucaria angustifolia</i>	12
2.1.2 Fixação biológica de nitrogênio atmosférico e microrganismos diazotróficos.....	14
2.1.3 Nitrogenase	16
2.1.4 Estudo da diversidade de diazotróficos	17
2.1.5 Fixação biológica de nitrogênio em florestas.....	19
2.2 Material e Métodos	20
2.2.1 Localização e caracterização das áreas de estudo.....	20
2.2.2 Amostragem e caracterização física e química das amostras de solo.....	23
2.2.3 Quantificação de bactérias diazotróficas	23
2.2.4 Isolamento e purificação das bactérias	24
2.2.5 Diversidade fenotípica	25
2.2.6 Diversidade genética	26
2.2.7 Avaliação da atividade da nitrogenase	29
2.3 Resultados e Discussão	31
2.3.1 Ocorrência e densidade.....	31
2.3.2 Diversidade fenotípica	32

2.3.3 Diversidade genética	35
2.3.4 Avaliação da presença da nitrogenase.....	45
3 CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXOS.....	57

RESUMO

Araucaria angustifolia é uma espécie arbórea ameaçada de extinção e toda a comunidade viva das Florestas de Araucária deve ser estudada com a finalidade de sua preservação. Bactérias fixadoras de nitrogênio ou diazotróficas apresentam grande importância para a manutenção de ecossistemas, mas sua ocorrência e diversidade nunca foi pesquisada em araucária. Com este objetivo, foram coletadas amostras de solo e raízes de *A. angustifolia* em três áreas no Parque Estadual de Campos do Jordão, SP, as quais demonstraram a ocorrência de bactérias diazotróficas, quando inoculadas em meios de cultura semi-sólidos sem adição de nitrogênio na forma combinada (NFb, JNFb e LGI). Foram recuperados 73 isolados bacterianos, dos quais quatro tiveram o caráter diazotrófico confirmado através do aumento na concentração de nitrogênio total e da análise de redução do acetileno. Os isolados foram classificados em 37 grupos fenotípicos de acordo com a caracterização morfológica das colônias e mudança de pH do meio carbono combinado em 24 horas. O seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA de 62 isolados permitiu a classificação dos mesmos em oito grupos genotípicos: *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Yersinia*, *Xantomonas*, *Janthinobacterium*, *Brevundimonas*, *Brucella* e *Novosphingobium*. Observaram-se divergências comparando-se os resultados fenotípicos e genotípicos, sendo que a avaliação fenotípica mostrou-se inadequada para o agrupamento dos isolados. Os grupos *Pseudomonas* e *Burkholderia* predominaram tanto nas amostras de solo, quanto nas amostras de raízes. A análise filogenética mostrou que a maioria dos isolados estão relacionados a grupos taxonômicos descritos como diazotróficos ou como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio; Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas; Floresta; 16S rRNA; Filogenia

ABSTRACT

Araucaria angustifolia is an environmentally threatened tree and the whole biota of the Araucaria Forest should be investigated with the purpose of its preservation. Nitrogen fixing bacteria (diazotrophic bacteria) are extremely important for the maintenance of ecosystems, but their occurrence and diversity have never been studied in *A. angustifolia*. In our study, soil and Araucaria root samples were collected in three areas in Campos do Jordão State Park, SP, and these samples contained diazotrophic bacteria, as demonstrated by their growth in nitrogen-free semi-solid culture media (NFb, JNFb and LGI). Seventy three bacterial isolates were recovered and four of them had the diazotrophic character confirmed through the increase in the total nitrogen concentration of de media and the acetylene reduction assay. The isolates were classified in 37 phenotypic groups, according to the morphologic characterization of the colonies and change of pH in a combined carbon medium after 24 hours growth. The partial sequencing of the 16S rRNA gene in 62 isolates allowed their classification in eight genotypic groups: *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Yersinia*, *Xhantomonas*, *Janthinobacterium*, *Brevundimonas*, *Brucella* and *Novosphingobium*. Divergences were observed comparing phenotypic and genotypic results, and phenotypic evaluation must be considered inadequate for the grouping of the isolates. *Pseudomonas* and *Burkholderia* were predominated in both the soil and Araucaria root samples. According to the phylogenetic analysis most of the isolates are related to taxonomic groups described as diazotrophs or as plant growth-promoting rhizobacteria.

Keywords: Biological nitrogen fixation; Plant growth-promoting rhizobacteria; Forest; 16S rRNA; Phylogeny

1 INTRODUÇÃO

A *Araucaria angustifolia* é uma espécie de importância sócio-econômica e ambiental nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. No Estado de São Paulo a ocorrência desta conífera está concentrada principalmente na região de Campos do Jordão e, em menor escala, em certas regiões distintas entre si com altitudes superiores a 800m.

Devido à intensa exploração da sua madeira desde o início do século XX e à utilização do uso do solo de floresta para agricultura e pecuária, atualmente restam apenas 2% da área original de Floresta de Araucária em todo país e a *A. angustifolia* é classificada como espécie em perigo de extinção. Este fato alerta sobre a importância de pesquisas para o conhecimento e compreensão desse ecossistema, permitindo ao homem atuar na sua regeneração.

A diversidade de microrganismos tem sido considerada um fator importante na reabilitação e sustentabilidade de ecossistemas, destacando-se os microrganismos diazotróficos, que são responsáveis pela fixação biológica do nitrogênio, principal forma de incorporação de N em ecossistemas naturais. Além da fixação biológica, outros efeitos benéficos são associados aos diazotróficos, como a produção de substâncias promotoras do crescimento vegetal e controle biológico de organismos patogênicos.

Apesar da importância potencial de bactérias diazotróficas em ecossistemas florestais, podendo auxiliar no desenvolvimento de práticas de recuperação e conservação em Florestas de Araucária, evitando a extinção da *A. angustifolia*, estudos destes microrganismos associados a esta espécie ainda não são encontrados na literatura.

Assim, os objetivos do presente estudo foram:

- ✓ Avaliar a ocorrência de microrganismos diazotróficos no solo e nas raízes de árvores de araucária em florestas em três estados de conservação;
- ✓ Avaliar a diversidade fenotípica e genotípica dos isolados dentro de cada ecossistema estudado.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 *Araucaria angustifolia*

A *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze é uma gimnosperma, pertencente à família Araucariaceae e popularmente conhecida como pinheiro-brasileiro, pinheiro-do-Paraná, araucária ou simplesmente pinheiro.

A araucária é uma espécie dióica, apresentando árvores masculinas e femininas, com 10 a 35 m de altura, 50 a 120 cm de diâmetro, troncos retos e quase cilíndricos, casca grossa e resinosa. Apresenta forma de taça nas árvores mais velhas e cônica nas mais jovens. A árvore é longeva atingindo, em média, de 140 a 250 anos de idade (CARVALHO, 1994).

A *A. angustifolia* ocorre naturalmente no Brasil e em pequenas manchas na Argentina (província de Misiones) e no leste do Paraguai (CARVALHO, 1994). É a única espécie do gênero com ocorrência natural no Brasil (SHIMIZU; OLIVEIRA, 1981), sendo característica da Floresta Ombrófila Mista, também conhecida como Floresta de Araucária, Mata de Araucária ou Pinheiral (IBGE, 1992).

A Floresta de Araucária faz parte do bioma da Mata Atlântica (GUERRA et al., 2002), é um tipo de vegetação do Planalto Meridional, ocorrendo em altitudes que vão de 500 m a 1200 m nos estados do Sul do Brasil, e áreas disjuntas ocorrem nos estados de São Paulo e Minas Gerais, em pontos mais elevados da Serra da Mantiqueira (GUERRA et al., 2002). A *A. angustifolia* forma o extrato superior da Floresta Ombrófila Mista, apresentando frequência muito variável, mesmo onde é vegetação dominante.

A araucária produz sementes (pinhões) somente após 15 ou 20 anos de idade, o que dificulta seu melhoramento genético (SHIMIZU; OLIVEIRA, 1981), sua proliferação e conseqüentemente a sua regeneração natural, também prejudicada pelo fato de ser uma espécie pioneira e heliófila, sendo que suas plântulas não conseguem desenvolver-se no interior das florestas devido à baixa luminosidade.

A madeira de araucária é de densidade média ($0,55 \text{ g/cm}^3$) e pode ser utilizada para construções em geral, caixas, fabricação de móveis, cabos de vassouras, palitos

de dente e de fósforo, fabricação de compensados, lápis e outros. Madeiras serradas e laminadas foram exportadas por um longo período para diversos países. A fibra do pinheiro-brasileiro é longa e muito resistente, sendo uma excelente matéria prima para produção de papel e celulose (CARVALHO, 1994; BANDEL, 1966; SANQUETA; TETTO, 1999; GUERRA et al., 2002).

A resina, exsudada principalmente da casca, serve para a fabricação de vernizes, terebentina, acetona, ácido pirolenhoso e outros produtos químicos. Finalmente, o pinhão é muito apreciado na alimentação humana, de animais domésticos e da fauna silvestre que também é responsável pela sua dispersão. Entre os animais da fauna silvestre que se alimentam da araucária, destacam-se a gralha-azul, o serelepe e os porcos-do-mato (MATTOS, 1994).

A exploração da *A. angustifolia* se intensificou a partir de 1934, tendo seu auge nas décadas de 50 a 70 (MATTOS, 1994). Com o intenso desmatamento e consumo da araucária, sem preocupações com o reflorestamento das áreas exploradas, o abastecimento de matéria-prima para a indústria foi prejudicado e para contornar este problema iniciaram-se programas de reflorestamento utilizando essências exóticas, especialmente as do gênero *Pinus*, que passaram a ocupar as áreas originalmente cobertas com a Floresta de Araucária (GUERRA et al., 2002).

Além da atividade madeireira, a agricultura e a pecuária foram grandes responsáveis pelo desmatamento e destruição das florestas de pinheiro-do-Paraná (SANQUETTA; TETTO, 2000). No Estado de São Paulo, as reservas foram esgotadas entre 1930 e 1940 e no Estado do Paraná, em 1977, as matas remanescentes correspondiam a apenas 4,3% da área original (SHIMIZU; OLIVEIRA, 1981).

Assim, devido ao intenso processo de exploração predatória de sua madeira e ao avanço das áreas de agricultura e pecuária sobre as áreas de floresta, a *A. angustifolia* foi incluída na lista da FAO de espécies que necessitam de atenção e na lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (BRASIL, 1992). Atualmente, estima-se que os remanescentes ocupem em torno de 2% da sua área original (GUERRA et al. 2002).

No Estado de São Paulo a araucária está na categoria das espécies denominadas como criticamente em perigo de extinção (SÃO PAULO, 1998). Neste

estado, os pinheiros ocorrem em certas regiões distintas entre si. Ao sul, a área de ocorrência desta conífera está limitada pela divisa com o Estado do Paraná, de Itararé para leste, até cerca de Apiaí. Seguindo para o norte, a oeste da Serra de Paranapiacaba, em direção a Capão Bonito e Buri, ocorre uma faixa estreita que passa pela esquerda de Ribeirão Branco. Nos arredores de São Paulo, passando por Mogi das Cruzes, Paraibuna e Bocaina e, ainda, pelo leste do estado, encontra-se a araucária (MATTOS, 1994). Ocupava grande parte da Serra da Mantiqueira, mas atualmente existem somente dois maciços no estado, ou seja, áreas ainda preservadas, uma localizada no Parque Estadual de Campos do Jordão, município de Campos do Jordão e outra no Parque Estadual Turístico do Alto do Ribeira, no município de Apiaí.

2.1.2 Fixação biológica de nitrogênio e microrganismos diazotróficos

O nitrogênio (N) é um elemento químico presente abundantemente na atmosfera na forma de N_2 , porém, a maioria dos seres vivos não consegue incorporá-lo nesta forma a esqueletos de carbono. Apenas uma pequena parcela de procariotos é capaz de reduzir o N_2 para a forma combinada NH_3 , que pode então tornar-se disponível para plantas e outros organismos. Estes microrganismos são conhecidos como fixadores de N_2 ou diazotróficos e o processo é denominado como fixação biológica do nitrogênio (FBN) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; REIS; TEIXEIRA, 2005).

O N_2 atmosférico também pode ser fixado naturalmente mediante descargas elétricas na atmosfera, e de forma artificial através de processos industriais utilizados para a produção de fertilizantes. No entanto, o processo biológico contribui com a maior parte do nitrogênio fixado atualmente no planeta, cerca de 65% do total (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A maioria das espécies de fixadores de N_2 é de vida livre, ocorrendo em todos os tipos de solo, na rizosfera e filosfera de plantas, em águas doces e salgadas e no trato intestinal de certos animais. Alguns fixadores são encontrados em simbiose com várias espécies vegetais, enquanto outros estabelecem relações menos especializadas com plantas, sendo denominados de associativos. Algumas bactérias diazotróficas podem, além de colonizar abundantemente a rizosfera, ocorrer endofiticamente, ou seja, invadir

o córtex e colonizar tecidos internos em diversas espécies vegetais (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Baldani et al. (1997) propuseram a distinção em endófito facultativo e obrigatório para diferenciar, respectivamente, bactérias capazes de sobreviver no solo e estabelecer-se nas raízes daquelas com baixa capacidade de sobreviver no solo e capazes de colonizar raízes e parte aérea.

De modo geral, as bactérias fixadoras de N_2 têm importância tanto no aspecto ecológico como no econômico, em sistemas agrícolas e florestais. No Brasil, salienta-se a importância da FBN com o exemplo da simbiose rizóbio-soja, que dispensa totalmente a adubação nitrogenada sem causar perda de produtividade.

Além da FBN, outros tipos de benefícios têm sido apresentados para bactérias diazotróficas como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs), destacando-se a produção de fitormônios, como auxinas, giberelinas e citocininas (BAZZICALUPO; OKON, 2000).

Existem diversos mecanismos através dos quais RPCPs podem facilitar diretamente o desenvolvimento de seus hospedeiros: fixação de nitrogênio atmosférico e fornecimento às plantas; síntese de sideróforos que podem solubilizar e seqüestrar o ferro do solo e fornecê-lo à planta; síntese de diversos fitormônios; solubilização de minerais, como o fósforo, aumentando sua disponibilidade para as plantas; e síntese de alguns componentes de baixo peso molecular ou enzimas, ainda não bem caracterizados, que podem modular o crescimento e desenvolvimento da planta (LODEWYCKX et al., 2002). Os mecanismos indiretos usados pelas RPCPs incluem produção de antibióticos contra bactérias patogênicas, redução de ferro disponível para fitopatógenos na rizosfera, síntese de enzimas que provocam lise da parede celular de fungos, e competição com microrganismos prejudiciais por locais nas raízes das plantas (LUCY et al., 2004). Uma RPCP pode afetar o crescimento e o desenvolvimento de plantas usando um ou mais mecanismos. Provavelmente, o aspecto mais estudado da promoção do crescimento de plantas, em rizobactérias, é a fixação de nitrogênio (LODEWYCKX et al., 2002).

2.1.3 Nitrogenase

A enzima que catalisa o processo de redução do N_2 atmosférico a NH_3 é denominada nitrogenase. Atualmente, são conhecidos três tipos de nitrogenase: nitrogenase-1, que possui molibdênio (Mo) e ferro (Fe); nitrogenase-2, em que o vanádio (V) substitui o Mo; e nitrogenase-3, que só tem Fe (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; REIS; TEIXEIRA, 2005).

A nitrogenase é uma enzima extremamente versátil, pois, além do N_2 , catalisa a redução de vários outros substratos, entre eles o acetileno (C_2H_2). A atividade de redução do acetileno para etileno (C_2H_4) tem particular importância nos estudos de sistemas fixadores de N_2 . A técnica, que utiliza cromatografia gasosa para medir o etileno, é bastante sensível, relativamente rápida, de baixo custo e fácil condução, podendo ser utilizada em estudos qualitativos para detectar a presença da enzima e, conseqüentemente, de um organismo fixador (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; BURRIS, 1972).

A fisiologia dos microrganismos diazotróficos é marcada pelas propriedades inerentes da nitrogenase que são: alta sensibilidade ao oxigênio; necessidade dos metais Fe, Mo ou V, seus componentes estruturais; suprimento adequado de poder redutor; MgATP para sua atividade; e ambiente em que o N combinado não esteja disponível (REIS; TEIXEIRA, 2005).

Para conciliar o processo de fixação de N_2 , estritamente anaeróbio, e seu metabolismo, os diazotróficos aeróbios desenvolveram vários mecanismos para proteger o sítio de ação da nitrogenase da interferência do O_2 (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Entretanto, algumas espécies de diazotróficos aeróbios, como *Azospirillum* spp. e *Herbaspirillum* spp., não apresentam mecanismos de proteção contra o O_2 e por isso são microaerofílicos quando fixam N_2 . Em meios de cultivo sem adição de N, com consistência semi-sólida, estas bactérias ocupam sítios onde a concentração de O_2 é baixa, sendo suficiente para sua respiração, sem excessos que possam afetar a nitrogenase. Nessa faixa, formam-se películas que movem-se em direção à superfície, conforme as células se multiplicam atingindo número suficientemente elevado para escoar o O_2 excessivo que se acumula em volta das mesmas, ativando assim a

nitrogenase (DÖBEREINER et al., 1995; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Esta descoberta revolucionou e ampliou as pesquisas sobre todos os aspectos da fixação biológica do nitrogênio nas associações entre diazotróficos e plantas não leguminosas (BALDANI et al., 1997).

2.1.4 Estudo da diversidade de diazotróficos

A fixação biológica de N_2 é mediada por uma parcela dos procariotos que, apesar de relativamente pequena, apresenta alta diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

O conceito de diversidade de espécies está relacionado com a identidade e distribuição das mesmas em uma dada região ou hábitat (COLEMAN; WHITMAN, 2003).

O estudo de diversidade de procariotos é extremamente complexo, visto que a definição de espécie para estes organismos é uma questão ainda em aberto. À medida que novas tecnologias vão surgindo, os estudos vão progredindo, abrangendo novidades e, conseqüentemente, as teorias vão se modificando e aperfeiçoando (GEVERS et al. 2005).

Atualmente, uma espécie procariótica é considerada como um grupo de estirpes, incluindo a estirpe-padrão, que é caracterizado por certo grau de consistência fenotípica, apresentando 70% ou mais de homologia DNA-DNA e mais de 95% de similaridade entre seqüências do gene 16S rRNA. Neste contexto, destaca-se a importância da taxonomia polifásica, que tem como objetivo integrar diferentes tipos de dados e informações fenotípicas, genéticas e filogenéticas sobre os microrganismos e essencialmente indicar uma taxonomia de consenso (GEVERS et al. 2005).

Com o avanço da Biologia Molecular, tornou-se possível identificar bactérias no solo e em plantas sem a necessidade de isolá-las. Para isso, após a extração do DNA total, são empregados *primers* para amplificação específica dos genes 16S rRNA bacterianos por PCR (reação em cadeia da polimerase) (WEISBURG, 1991) e o DNA amplificado é então clonado e posteriormente analisado por seqüenciamento. No entanto, esta metodologia é restrita às seqüências já presentes nos bancos de dados. Além disso, mesmo que as seqüências de DNA permitam avaliar a extensão da

diversidade nos procariotos, para compreender inteiramente as propriedades fenotípicas e funcionais destes organismos ainda é necessário isolar culturas puras (COLEMAN; WHITMAN, 2003).

Como as espécies diazotróficas que se associam a plantas não leguminosas não formam estruturas anatômicas diferenciadas, como os nódulos das leguminosas, seu isolamento é feito colocando-se amostras de solo, rizosfera, raiz ou outro material vegetal em meios de cultura semi-sólidos sem adição de N, seletivos para cada espécie. Entre estes meios destacam-se o NFb para *Azospirillum lipoferum* e *A. brasilense*, o LGI para *A. amazonense* e o JNFb para *Herbaspirillum spp.* As espécies endofíticas são isoladas desinfestando-se superficialmente as amostras vegetais, com cloramina-T, água sanitária ou outros produtos. Frequentemente, mais de uma espécie e até mais de um gênero são encontradas na mesma espécie vegetal. Além disso, outras espécies não detectadas pelo meio de cultivo utilizado ou espécies não cultiváveis podem estar presentes (DÖBEREINER et al., 1995; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

O estudo da diversidade de diazotróficos pode ser realizado através de caracterizações fenotípicas e fisiológicas, baseadas em características culturais, ou genotípicas, baseada em técnicas moleculares.

Nas caracterizações fenotípicas destacam-se a observação da morfologia das colônias e características celulares, como tamanho e motilidade. As caracterizações fisiológicas geralmente são feitas através de testes de uso de fontes de carbono, de tolerância à salinidade e de atividade da nitrogenase (WEBER et al., 1999; MELLONI, 2001; NÓBREGA et al., 2000; RODRIGUES et al., 2006).

Quanto à caracterização genética, existe uma grande variabilidade de técnicas, sendo que a maioria envolve o uso da PCR, como a amplificação de genes conservados, como o gene *nif* (relacionado à fixação de nitrogênio) e, principalmente, o gene 16S rRNA. Após a amplificação os fragmentos podem ser digeridos com enzimas de restrição, como nas técnicas ARDRA e RLFP, ou podem ser seqüenciados, sendo comum a combinação de técnicas (CRUZ et al., 2001; ESTRADA-DE LOS SANTOS et al., 2001).

Dentre todas estas técnicas, as que utilizam o seqüenciamento têm apresentado grande destaque, já que os dados podem ser submetidos a bancos de dados mundiais,

permitindo comparação de resultados de pesquisadores de todo o mundo.

2.1.5 Fixação biológica de nitrogênio em florestas

Ao contrário das plantas cultivadas, muito pouco é conhecido sobre a FBN e sobre bactérias diazotróficas associadas a espécies florestais como a araucária.

A FBN por bactérias de vida livre e bactérias associativas já foi demonstrada em solo sob florestas por Limmer e Drake (1996).

Segundo Kahind et al. (1997), a importância da FBN na natureza pode ser vista melhor em ecossistemas que ainda não atingiram o clímax. Nos primeiros estádios da sucessão primária em solo contendo pouca matéria orgânica, o N é o nutriente mais limitante para a produtividade e os microrganismos fixadores de N_2 são os grandes responsáveis pela acumulação de N na biomassa microbiana e na planta, assim como na matéria orgânica do solo. Entretanto, mesmo nos últimos estádios da sucessão primária da floresta poderão existir benefícios provenientes da FBN em situações em que o N se torna limitante.

Em florestas com predominância de coníferas no Oregon, Estados Unidos, observou-se atividade de fixação de nitrogênio em bactérias encontradas em resíduos de madeira no solo e estas foram identificadas como pertencentes ao gênero *Azospirillum* em quase todas as amostras (CRAWFORD et al., 1997).

Rózcki et al. (1999) realizaram estudos sobre a ocorrência, identificação e potencial de atividade de nitrogenase de bactérias diazotróficas no solo e nas raízes de Pinus e Carvalho. A maioria das bactérias isoladas das raízes destas plantas pertencia ao gênero *Pseudomonas* e *Bacillus* e demonstraram atividade da nitrogenase.

Chanway (1998) encontrou populações de bactérias diazotróficas endofíticas em árvores de Pinus de até 10^5 unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de planta, observou atividade de redução de acetileno e, ainda, que algumas estirpes se mostraram eficientes em promover o crescimento de mudas de Pinus. O autor sugere que o benefício causado pelas bactérias isoladas possa estar relacionado ao controle de microrganismos indígenas do solo que afetam negativamente o desenvolvimento das plântulas.

Moreira-Souza et al. (2004) verificaram que a *A. angustifolia* é colonizada por fungos micorrízicos arbusculares e ocorre grande diversidade de espécies a ela associadas em condições de floresta nativa. Segundo Crawford et al. (1997), a absorção seletiva de nutrientes propiciada pela micorriza e a exsudação pela planta de substâncias ricas em carbono, conjuntamente com a baixa tensão de oxigênio na micorrizosfera, propicia uma estimulação seletiva de bactérias fixadoras de N_2 microaerofílicas e disponibiliza nitrogênio para as plantas.

A presença de bactérias capazes de fixar N_2 na micorrizosfera tem demonstrado a importância e o potencial das interações microbianas. Mais informações são necessárias para compreensão da ecologia na micorrizosfera e da capacidade funcional desses microrganismos. Existem possibilidades de co-inoculação, possibilitando múltiplos benefícios às árvores (GRAYSTON et al., 1997).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Localização e caracterização das áreas de estudo

As amostras de solo e raízes de araucária foram coletadas em três áreas representativas de ecossistema de *A. angustifolia*, dentro do Parque Estadual de Campos do Jordão, situado a 22° 44' latitude Sul e 45° 27' longitude Oeste, com altitude média de aproximadamente 1500 m. O relevo é suave ondulado, com declividade média de 0,1702 m m⁻¹. O solo nas três áreas é um Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico. O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é subtropical de altitude, mesotérmico e úmido (Cfb). A maior precipitação concentra-se no verão, sendo que no mês de fevereiro podem ocorrer mais de 240 mm, enquanto em setembro ocorrem aproximadamente 88 mm; a temperatura média pode variar de 17,5°C em fevereiro a 11,5°C em junho.

As áreas selecionadas foram: 1. floresta nativa com predominância de araucária, em clímax, com pouca interferência antrópica (NF); 2. reflorestamento de araucária plantado em 1959 (R); 3. reflorestamento de araucária plantado em 1959, em cujo histórico consta a ocorrência de um incêndio acidental intenso em julho de 2001 (RF).

Todas as áreas estão localizadas em toposequência e altitudes semelhantes. A área NF (Figura 1) é composta basicamente por *A. angustifolia* e por diversas espécies arbustivas, herbáceas e arbóreas pertencentes às famílias Aquifoliaceae, Araucariaceae, Asteraceae, Cyatheaceae, Lauraceae, Myrsinaceae, Myrtaceae, Podocarpaceae, Rhamnaceae, Rosaceae, Simaroubaceae, Solanaceae, Symplocaceae, Vochysiaceae e Winteraceae. A área R (Figura 2) apresenta várias árvores de *Podocarpus lambertii* Klotz, mas a predominância é de *A. angustifolia*. Devido ao incêndio, a área RF (Figura 3) apresenta menor densidade de *A. angustifolia* e um predomínio de gramíneas *Aristida longiseta* e da composta *Braccharis trimera* (Compositae).

As áreas foram georeferenciadas usando GPS. A floresta nativa localiza-se a 22° 41' 29" latitude Sul e 45° 27' 52" longitude Oeste, com altitude média de aproximadamente 1467 m; o reflorestamento de araucária localiza-se a 22° 39' 31" latitude Sul e 45° 26' 34" longitude Oeste, com altitude média de aproximadamente 1559 m; e o reflorestamento de araucária com ocorrência de um incêndio acidental localiza-se a 22° 39' 49" latitude Sul e 45° 26' 58" longitude Oeste, com altitude média de aproximadamente 1549 m

Figura 1 - Floresta nativa com predominância de araucária, em clímax, com pouca interferência antrópica (NF). Campos do Jordão, 2006

Figura 2 - Reflorestamento de araucária plantado em 1959 (R). Campos do Jordão, 2006

Figura 3 - Reflorestamento de araucária plantado em 1959, em cujo histórico consta a ocorrência de um incêndio accidental intenso em julho de 2001 (RF). Campos do Jordão, 2006

2.2.2 Amostragem e caracterização física e química das amostras de solo

De cada área, coletaram-se três amostras de solo e raízes, compostas de cinco subamostras retiradas nas profundidades de 0-20 cm para solo e superficialmente para raízes ao redor de árvores de *A. angustifolia* previamente demarcadas. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, mantidas em caixas de isopor com gelo e transportadas ao laboratório no prazo de 24 horas. Parte das amostras de solo foi utilizada para análise das características químicas e físicas nos Laboratórios de Fertilidade e Física do Solo do Departamento de Ciência do Solo da ESALQ/USP (Tabela 1).

Tabela 1 - Características químicas e físicas do solo em áreas com floresta nativa de araucária (NF), reflorestamento de araucária impactado (RF) ou não pela queima accidental (R) no Parque Estadual de Campos do Jordão.

Área	pH CaCl_2	MO*	P	K	Ca	Mg	H + Al	Areia total	Silte	Argila dispersa
		g dm ⁻³	mg dm ⁻³	-----	mmolc ³ dm ⁻³	-----	-----	-----	%	-----
NF	3,6	101	16	2,4	2	2	201	73	6	21
R	3,7	102	11	2,0	4	2	179	50	8	42
RF	3,9	89	13	2,0	2	2	161	47	17	36

* MO = Matéria orgânica.

2.2.3 Quantificação de bactérias diazotróficas

A contagem de bactérias diazotróficas foi feita por meio do método do número mais provável (NMP). As amostras de raízes foram submetidas à desinfestação superficial com cloramina-T a 1% por 15 minutos (DÖBEREINER et al., 1995), seguindo-se a lavagem com água esterilizada por 5 minutos e a transferência para uma solução tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0), lavando-se posteriormente com água esterilizada. As raízes desinfestadas (10 g) foram trituradas em liquidificador com 90 mL de solução salina por 1 minuto e as amostras de solo (10 g) foram homogeneizadas com 90 mL de solução salina durante 20 minutos. Em seguida, foram feitas diluições seriadas em solução salina (10^{-2} a 10^{-5}) e a inoculação de 0,1 mL de cada diluição em frascos de penicilina que continham 5 mL dos meios de cultura semi-sólidos, sem adição de nitrogênio na forma combinada, NFb, LGI e JNFb, preparados conforme Döbereiner et

al. (1995) (Anexo A). Foram utilizados três frascos por diluição, os quais foram incubados a 28°C por seis dias, avaliando-se, posteriormente, a presença ou ausência de crescimento bacteriano pela formação de película característica nos meios de cultura (Figura 4).

Figura 4 - Película característica do crescimento de bactérias diazotróficas em meio semi-sólido sem adição de nitrogênio

Utilizou-se a tabela de McCrady (DÖBEREINER et al., 1995) para determinar, pelo método estatístico, o NMP de bactérias diazotróficas por grama de amostra, seguindo-se a transformação dos dados para $\log(\text{NMP}+1)$ e a análise de variância com comparação das médias pelo teste de Tukey a 5% de significância, por meio do programa estatístico SAS versão 9.1.

2.2.4 Isolamento e purificação das bactérias

O isolamento baseou-se nas técnicas descritas por Döbereiner et al. (1995). Para obtenção dos isolados, transferiu-se com uma alça de platina uma quantidade das culturas retiradas dos frascos de maior diluição para um novo meio semi-sólido e incubou-se novamente a 28°C até que uma nova película fosse formada. Então, as culturas foram riscadas em placas contendo os meios seletivos sólidos, acrescidos de 16 g de agar e 20 mg de extrato de levedura. Após cinco dias de incubação a 28°C, as

colônias visualmente diferentes crescidas em cada placa foram transferidas para um novo meio semi-sólido e, após a formação da película, foram riscadas em placas de meio de cultura batata-dextrose-agar (BDA). Este processo foi repetido várias vezes para obtenção de culturas puras, as quais foram mantidas nos meios NFb, JNFb ou LGI sólidos e armazenadas nos mesmos meios líquidos com glicerol 50% (1:1) a -20 °C (DÖBEREINER et al., 1995).

2.2.5 Diversidade fenotípica

Para estudo da diversidade fenotípica-cultural, após a purificação final de todas as culturas obtidas no processo de isolamento, foi feita a caracterização morfológica das colônias em meio de cultura BDA após sete dias de crescimento a 28°C, observando-se o tamanho da colônia (diâmetro medido com régua), cor da borda, cor do centro, elevação, borda e detalhe ótico das mesmas em microscópio esterioscópico. Os isolados também foram inoculados em meio carbono combinado (CC) líquido, preparado conforme Rennie (1981) (Anexo A), incubados a 28°C em agitador a 220 rpm e classificados de acordo com a mudança de pH do meio em 24 horas.

Estirpes-tipo de *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae* e de um isolado pertencente ao gênero *Burkholderia*, da Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas da Embrapa Agrobiologia, foram utilizadas como padrões de crescimento bacteriano, sendo cultivadas e caracterizadas nas mesmas condições. A estirpe de *Burkholderia* foi incluída como padrão, pois foi relatado seu isolamento em meios similares aos utilizados neste estudo (BALDANI, 1996).

Com os grupos fenotípicos culturais dos isolados foi calculado o índice de diversidade de Shannon (H) para as diferentes áreas de estudo por meio da fórmula (1), onde p_i = abundância relativa dos isolados em cada grupo (MELLONI et al., 2006). Também foi calculada a equivalência de Shannon (J), dividindo-se o valor de H de cada área pelo maior valor de H calculado entre elas (MAGURRAN, 1988).

$$H = - \sum (p_i \ln p_i) \quad (1)$$

Todos os isolados e estirpes-tipo foram agrupados em dendrograma pelo método *Complete Linkage* e Distância Euclidiana (EVERITT, 1993), pelo programa STATISTICA. Para isso, atribuíram-se os seguintes valores às características dos isolados e das estirpes-tipo: tamanho (1- 1 mm, 2- 2 mm, 3- 3 mm, 4- 4 mm, 5- 5 mm, 6- 6 mm); cor da borda (1- creme claro, 2- creme, 3- creme escuro); cor do centro (1- branca, 2- creme, 3- bege); elevação (1- plana, 2- convexa, 3- umbilicada); borda (1- inteira, 2- ondulada, 3- denteada); detalhe ótico (1- transparente, 2- translúcida, 3- opaca); mudança de pH do meio (1- ácido, 2- neutro, 3- alcalino).

2.2.6 Diversidade genética

Extração do DNA genômico

A extração do DNA das células dos isolados bacterianos foi feita a partir de colônias cultivadas em meio BDA, as quais foram transferidas com um palito de madeira para poços de microplaca plástica contendo 100 µl de H₂O esterilizada cada. A microplaca foi então selada com adesivo esterilizado, homogeneizada até a formação de uma suspensão de células e levada para um termociclador, elevando-se a temperatura para 100°C por 5 minutos para ocorrer a lise das células (adaptado de ODEE et al., 2002). Após este processo a microplaca foi colocada em uma caixa de isopor com gelo para utilização da suspensão de DNA e restos celulares na reação em cadeia da polimerase (PCR).

Amplificação do gene 16S rRNA

O gene 16S rRNA foi parcialmente amplificado por PCR utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores de reação (*primers*) Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTG GCGGC – 3') (YOUNG et al., 1991) e Y3 (5'-CTAGACCCCACTTCAGCATTGTT CCAT– 3') (CRUZ et al., 2001). A reação de amplificação ocorreu em uma mistura que continha 5 µl da suspensão de DNA, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP (adenina, citosina, timina e guanina), 125 nM dos *primers* Y1 e Y3, 1 X de tampão *Taq* (75mM de Tris-HCl

(pH 8.8 a 25°C), 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% de Tween 20) e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase, sendo o volume completado com água ultra-pura autoclavada para 50 µl. As condições de termociclagem foram: desnaturação inicial a 93°C por 2 minutos; 35 ciclos de desnaturação (93°C por 45 segundos), anelamento (62°C por 45 segundos), extensão (72°C por 2 minutos); e uma extensão final a 72°C por 2 minutos (ODEE et al., 2002).

Purificação do DNA amplificado

A purificação do DNA amplificado foi feita com acetato de amônio (CROUSE; AMORESE, 1987). Foram adicionados 30 µl de acetato de amônio 7,5 M e 100 µl de etanol absoluto aos produtos da PCR, seguido de homogeneização e centrifugação a 2250 x g por 45 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado totalmente e o precipitado lavado com a adição de 150 µl de etanol 70% e centrifugação a 2250 x g por 15 minutos a 4°C. Após descarte do sobrenadante, o precipitado foi seco por 1 hora a 37°C e ressuspendido em 15 µl de H_2O (adaptado de PISA, 2006).

Eletroforese em gel de agarose

Para avaliação do amplificado com relação ao sucesso da reação, tamanho e concentração aproximada, uma alíquota de 3 µl da amostra preparada no item anterior foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE (400 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1 mM EDTA) contendo $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de brometo de etídeo (ALVES, 2005). Foram utilizados 1kb de DNA ladder (*Invitrogen*) e pGEM, como padrão de tamanho e de concentração das bandas formadas, respectivamente. O gel foi submetido à corrida de 8 V por cm por 1 hora. O DNA amplificado foi visualizado em transiluminador com luz ultravioleta e registrado por uma câmera digital acoplada.

Reação de seqüenciamento

Na reação de seqüenciamento foram utilizados 100 ng de DNA amplificado e purificado, 2 µl de ET Terminator (*GE Health Care* - “*General Electrics Health Care*”), 2 µl de Tampão “Save Money” (200 mM Tris-HCl pH 9,0; 5mM MgCl₂.6H₂O), 5 pmol do *primer* Y1 e água ultra-pura autoclavada para completar o volume de 10 µl (ALVES, 2005). A reação foi conduzida em termociclador com 30 ciclos de: desnaturação (95 °C por 20 segundos), anelamento (55 °C por 15 segundos) e extensão (60 °C por 1 minuto). O produto foi então purificado com acetato de sódio, seguindo instruções do fabricante (*GE Health Care*).

Após purificação o precipitado foi ressuspendido em 10 µl de formamida e submetido ao seqüenciador automático ABI-3100 (*Applied Biosystems*), seguindo instruções do fabricante.

Processamento e análise das seqüências

O cromatograma obtido pelo seqüenciador foi processado pelo programa Phred (EWING; GREEN, 1998), que gera arquivos que contêm explicitamente as bases lidas pelo seqüenciador (arquivo.fasta) e valores de qualidade para cada uma delas (arquivo.qual). O comando “trim” foi utilizado para eliminar as extremidades de baixa qualidade das seqüências.

As seqüências foram então alinhadas entre si utilizando o programa ClustalW e foram eliminadas as extremidades não alinhadas devido aos diferentes tamanhos de comprimento das seqüências. Utilizando-se este alinhamento, foi construída uma árvore de similaridade das seqüências, utilizando o programa Mega 3.1 (método UPGMA, p-distance) e a partir desta árvore foram formados os grupos genotípicos, agrupando-se as bactérias que possuíam seqüências com 95% de similaridade, ou mais, em grupos distintos (GEVERS et al., 2005).

A partir dos grupos formados foi selecionada uma seqüência de cada grupo, usando como critério o maior tamanho e a melhor qualidade das seqüências visualizadas individualmente através dos arquivos .fasta e .qual gerados pelo programa

Phred. As bactérias das quais foram obtidas estas seqüências foram consideradas como estirpes tipo de cada grupo genotípico.

As seqüências das estirpes tipo foram submetidas à identificação com o programa CLASSIFIER, disponível no *site* do Ribossomal Data Project II (RDPII; COLE, 2005), sendo identificadas ao nível de gênero. Todos os isolados pertencentes a cada grupo genotípico receberam a mesma identificação da estirpe tipo de seu grupo.

Com os grupos genotípicos formados foi calculado o índice de diversidade de Shannon (MELLONI et al., 2006) para cada área estudada.

Utilizando o programa ClustalW, as seqüências das estirpes tipo de cada grupo genotípico foram alinhadas com seqüências de espécies de bactérias pertencentes aos gêneros identificados, as quais foram obtidas no *site* do RDPII. A partir deste alinhamento, foi construída a árvore filogenética utilizando o método “*Neighbor-Joining*” de distâncias calculadas pelo método Jukes e Cantor (CRUZ et al., 2001), através do programa Mega 3.1. A análise *bootstrap* foi realizada com 1000 replicações, sendo utilizada a árvore consenso de *bootstraps*.

2.2.7 Avaliação da atividade da nitrogenase

Em testes preliminares de atividade de redução de acetileno (ARA), houve dificuldade de estabelecer um tempo ideal de crescimento dos isolados e um tempo ideal de incubação com o gás acetileno para que a atividade da nitrogenase fosse detectada. Na literatura consultada o tempo de crescimento varia de 24 a 192 horas e o tempo de incubação com acetileno de uma a 48 horas (RENNIE, 1981; LIFSHITZ et al., 1986; CATTELAN et al., 1999; MEHNAZ et al., 2001; ESTRADA-DE LOS SANTOS et al., 2001; DONATE-CORREA et al., 2004; RODRIGUES et al., 2006). Como, no presente estudo, seria inviável avaliar a ARA com diferentes tempos de crescimento e incubação com o acetileno em todos os isolados, a capacidade de fixação de N₂ “in vitro” destes foi avaliada pelo aumento na concentração de nitrogênio total (N-total) nas culturas puras.

Para tal, cada isolado foi repicado para o meio semi-sólido em que foi recuperado (JNFb, NFb ou LGI) e para o meio semi-sólido CC, contidos em frascos de penicilina. Além de três fontes de carbono, o meio CC contém 100 mg L⁻¹ de extrato de levedura,

utilizado como fonte de fatores orgânicos de crescimento e como “iniciador” de nitrogênio, que promove o crescimento sem inibir a redução de acetileno (RENNIE, 1981). Após uma semana de crescimento a 28°C, as culturas foram homogeneizadas por agitação manual, congeladas a -80°C e submetidas ao processo de liofilização por cerca de 48 horas. Depois de liofilizadas as culturas foram novamente homogeneizadas com o auxílio de uma espátula e alíquotas de aproximadamente 10 mg foram utilizadas para determinação da concentração do N-total em analisador elementar NCS Soil Analyzer Flash EA 1112 (Thermo Electron Corporation).

Foram utilizadas três repetições por isolado e os meios de cultura JNFb, NFb, LGI e CC sem bactérias inoculadas foram utilizados como controle. As estirpes-tipo de *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae* e de um isolado pertencente ao gênero *Burkholderia* foram utilizados como controle qualitativo do método.

Os dados, expressos em porcentagem, foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey a 5% de significância para comparação de médias através do programa SAS versão 9.1.

Para confirmação da atividade da nitrogenase “in vitro”, os isolados que apresentaram aumento na concentração de N-total na análise anterior foram submetidos ao teste de redução de acetileno. Frascos de penicilina contendo as culturas puras crescidas no meio CC a 28°C por 48 horas foram vedados com tampas de borracha e foi injetado gás acetileno na proporção de 10% do volume total. Após 1 hora de incubação a 28°C, amostras de gás foram retiradas dos frascos e analisadas em cromatógrafo a gás quanto à formação de etileno.

Nesta análise o meio de cultura CC sem bactérias inoculadas e um isolado que não apresentou aumento na concentração de N-total foram utilizados como controle negativo e as estirpes-tipo de *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae* e de um isolado pertencente ao gênero *Burkholderia* foram utilizadas como controle qualitativo do método. Foram utilizadas 3 repetições por isolado e os dados expressos em ppm de $C_2H_4 \text{ h}^{-1} \text{ cultura}^{-1}$ foram transformados para $\log_{10}$ (ppm de $C_2H_4 \text{ h}^{-1} \text{ cultura}^{-1}$) e submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey a 5% de significância para comparação de médias através do programa SAS versão 9.1.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Ocorrência e densidade

A densidade de microrganismos diazotróficos nas amostras de solo e raízes avaliadas através dos meios de cultura JNFb, LGI e NFb está apresentada na Tabela 2. Verificou-se que houve crescimento de bactérias nos três meios de cultura, tanto para as amostras de solo quanto para as amostras de raízes, das três áreas estudadas. Esta informação é de extrema relevância já que é a primeira vez que se relata a ocorrência destas bactérias em ecossistemas de *A. angustifolia* (NERONI; CARDOSO, 2007).

Houve diferença significativa na densidade destes microrganismos entre as áreas estudadas somente quando o meio de cultura LGI foi utilizado. Contudo, não se pode afirmar que tais resultados são representativos, pois são dados relativos a uma única coleta, representando o que estava ocorrendo naquele momento, e alguns dos coeficientes de variação obtidos na análise estatística foram muito altos. Portanto, considerando a dinâmica dos microrganismos no solo e na rizosfera, e as habituais flutuações numéricas ao longo do tempo, seriam necessárias coletas em diferentes épocas do ano para verificar se existe ou não diferença significativa na densidade de bactérias diazotróficas entre estas áreas.

Tabela 2 - Ocorrência e densidade de microrganismos diazotróficos em amostras de solo e raízes de *A. angustifolia* coletadas em diferentes áreas no Parque Estadual de Campos do Jordão, avaliadas através dos meios de cultura JNFb, LGI e NFb.

Área	Raízes			Solo		
	JNFb (NMP x 10 ²)	LGI bactérias g ⁻¹ raiz fresca	NFb	JNFb (NMP x 10 ²)	LGI bactérias g ⁻¹ solo seco	NFb
NF	1,97 a	2,13 ab	0,48a	2,56a	6,54a	2,76a
R	0,55 a	0,90b	1,00a	5,02a	2,38b	1,08a
RF	38,25 a	83,65a	39,90a	2,17a	2,96ab	3,39a
C.V.%	30,29	31,24	28,74	19,78	6,19	15,27

(NF) floresta nativa de araucária; (R) reflorestamento de araucária; (RF) reflorestamento de araucária impactado pela queima accidental. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Na Tabela 2, os maiores valores de densidade de bactérias diazotróficas foram obtidos nas amostras de raízes em RF, o que poderia ser explicado pelo fato de ocorrer

predomínio de gramíneas nesta área, as quais são consideradas plantas hospedeiras comuns destas bactérias. Ainda, como esta área sofreu o impacto de um incêndio, grande parte do nitrogênio deste ecossistema pode ter sido perdido por volatilização e talvez ela apresente maior demanda deste nutriente que os outros ecossistemas, com maior estímulo à fixação biológica do nitrogênio.

2.3.2 Diversidade fenotípica

Foram obtidos 73 isolados bacterianos a partir de amostras de solo e raízes de *A. angustifolia*, utilizando os meios de cultura JNFb, NFb e LGI (Tabela 3). Das áreas R e RF, foram obtidos isolados tanto das amostras de solo quanto das amostras de raízes, nos três meios de cultura utilizados. Já da área NF, não se obtiveram isolados a partir de amostras de solo no meio LGI, embora tenha sido registrada a ocorrência de microrganismos diazotróficos (Tabela 2).

Tabela 3 - Número total de isolados por área de estudo, obtidos nos meios de cultura JNFb, LGI e NFb a partir de amostras de solo e raízes de *A. angustifolia* coletadas no Parque Estadual de Campos do Jordão.

Área	Raízes			Solo			Total
	JNFb	LGI	NFb	JNFb	LGI	NFb	
NF	6	3	2	2	0	3	16
R	1	3	3	3	2	5	17
RF	9	7	7	10	1	6	40

(NF) floresta nativa de araucária; (R) reflorestamento de araucária; (RF) reflorestamento de araucária impactado pela queima accidental.

Pela Tabela 3, a área da qual se obteve o maior número de isolados foi RF, assim como observado para a densidade de diazotróficos (Tabela 2), o que provavelmente facilitou o isolamento. A maior parte dos isolados foram obtidos a partir de amostras de solo (60,3% do total) e 42,5% dos isolados foram obtidos no meio JNFb, seguido pelo meio NFb, com 35,6% dos isolados, e por último o meio LGI (21,9% do total).

Trinta e sete grupos fenotípicos culturais foram formados (Tabela 4), sendo 49,3% dos isolados pertencentes aos grupos 1, 6, 14, 17, 18 e 32.

Tabela 4 - Descrição dos grupos fenotípicos culturais e número total de isolados por grupo, obtidos de amostras de solo e raízes de *A. angustifolia* coletadas em diferentes áreas no Parque Estadual de Campos do Jordão

Grupos fenotípicos	Características culturais *							Número total de isolados
	1	2	3	4	5	6	7	
Grupo 1	2	creme claro	bege	plana	ondulada	opaca	alcalino	4
Grupo 2	2	creme claro	bege	plana	ondulada	translúcida	alcalino	2
Grupo 3	2	creme claro	bege	plana	inteira	opaca	alcalino	2
Grupo 4	2	creme claro	bege	plana	inteira	opaca	ácido	1
Grupo 5	1	creme claro	bege	plana	denteada	translúcida	ácido	1
Grupo 6	1	creme claro	creme	plana	ondulada	opaca	alcalino	11
Grupo 7	2	creme claro	creme	plana	ondulada	opaca	ácido	1
Grupo 8	2	creme claro	creme	plana	ondulada	opaca	neutro	1
Grupo 9	1	creme claro	creme	plana	ondulada	translúcida	alcalino	2
Grupo 10	2	creme claro	creme	plana	ondulada	transparente	ácido	1
Grupo 11	2	creme claro	creme	plana	inteira	translúcida	alcalino	1
Grupo 12	2	creme claro	creme	convexa	inteira	opaca	alcalino	1
Grupo 13	2	creme escuro	creme	plana	inteira	opaca	ácido	1
Grupo 14	3	creme claro	bege	plana	ondulada	opaca	alcalino	12
Grupo 15	3	creme claro	bege	plana	denteada	translúcida	alcalino	1
Grupo 16	3	creme claro	bege	plana	inteira	opaca	alcalino	1
Grupo 17	3	creme claro	bege	convexa	inteira	opaca	alcalino	3
Grupo 18	3	creme claro	creme	plana	ondulada	opaca	alcalino	3
Grupo 19	3	creme claro	creme	plana	inteira	opaca	alcalino	2
Grupo 20	3	creme claro	creme	plana	inteira	translúcida	alcalino	2
Grupo 21	3	creme claro	creme	plana	denteada	translúcida	alcalino	1
Grupo 22	3	creme claro	creme	convexa	ondulada	transparente	ácido	1
Grupo 23	4	creme claro	branca	plana	ondulada	translúcida	ácido	1
Grupo 24	3	creme escuro	creme	plana	inteira	opaca	neutro	1
Grupo 25	4	creme escuro	creme	plana	denteada	opaca	ácido	1
Grupo 26	4	branca	branca	plana	inteira	translúcida	ácido	1
Grupo 27	3	branca	creme	plana	inteira	opaca	ácido	1
Grupo 28	5	creme claro	creme	plana	ondulada	translúcida	alcalino	2
Grupo 29	5	creme claro	creme	plana	ondulada	opaca	alcalino	1
Grupo 30	5	creme claro	creme	convexa	inteira	opaca	ácido	1
Grupo 31	5	creme claro	creme	umbilicada	ondulada	opaca	neutro	1
Grupo 32	5	creme claro	bege	plana	ondulada	opaca	alcalino	3
Grupo 33	5	creme claro	bege	plana	ondulada	translúcida	alcalino	1
Grupo 34	6	creme claro	bege	convexa	inteira	opaca	ácido	1
Grupo 35	6	creme claro	bege	convexa	inteira	opaca	alcalino	1
Grupo 36	5	branca	branca	plana	inteira	transparente	alcalino	1
Grupo 37	5	branca	branca	plana	inteira	translúcida	ácido	1

* 1 - tamanho, em mm; 2 - cor da borda; 3 - cor do centro; 4 - elevação; 5 - borda; 6 - detalhe ótico; 7 - modificação do pH do meio carbono combinado.

Na Figura 5, encontra-se o número total de isolados obtidos por área de estudo em função dos grupos fenotípicos culturais. É evidente a obtenção de grupos fenotípicos distintos por área de estudo, indicando que, possivelmente, houve efeito da atividade

antrópica na seleção de microrganismos. Somente os grupos 6, 14 e 18 estão presentes nas três áreas, sendo os dois primeiros os mais freqüentes. A área RF foi a que apresentou maior riqueza de grupos fenotípicos (20), seguida de NF e R com, respectivamente, 14 e 13 grupos fenotípicos distintos.

Figura 5 - Número total de isolados por área de estudo (NF - floresta nativa de araucária, R - reflorestamento de araucária, RF - reflorestamento de araucária impactado pela queima acidental), em função dos grupos fenotípicos culturais

Com os grupos fenotípicos culturais dos isolados foi calculado o índice de diversidade de Shannon e equivalência de Shannon em cada área de estudo (Tabela 5). Pôde-se observar que RF apresentou maior diversidade de grupos fenotípicos bacterianos, porém os valores do índice para as três áreas foram bem próximos.

Tabela 5 - Índice de diversidade de Shannon (H) e equivalência de Shannon (J) para os grupos fenotípicos culturais formados em áreas com floresta nativa de araucária (NF), reflorestamento de araucária impactado (RF) ou não pela queima acidental (R) no Parque Estadual de Campos do Jordão

Área	H	J
NF	0,531	0,619
R	0,631	0,735
RF	0,858	1,000

A Figura 6 mostra o dendrograma com as distâncias de ligação entre os grupos fenotípicos culturais dos isolados e estirpes tipo de *Azospirillum brasilense* (sp7), *A.*

lipoferum (sp59) e *Herbaspirillum seropedicae* (Z67), além de um isolado do gênero *Burkholderia* (M130), construído de acordo com as suas características culturais. Os grupos fenotípicos 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 e 37 formaram agrupamento com M130 e se isolaram dos demais grupos, os quais formaram agrupamento com as estirpes tipo sp59, sp7 e Z67. A estirpe tipo sp7 apresentou as mesmas características culturais do grupo fenotípico 19 e grande similaridade com o grupo 18. Os grupos 9 e 25 apresentaram grande similaridade com as estirpes Z67 e sp59, respectivamente.

Figura 6 - Dendrograma apresentando as distâncias de ligação entre os grupos fenotípicos culturais dos isolados obtidos de amostras de solo e raízes de *A. angustifolia* coletadas em diferentes áreas no Parque Estadual de Campos do Jordão. Z67, sp7, sp59 e M130 correspondem, respectivamente, às estirpes tipo de *Herbaspirillum seropedicae*, *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum* e a um isolado do gênero *Burkholderia*

2.3.3 Diversidade genética

A maior parte das bactérias isoladas tiveram o gene 16S rRNA parcialmente seqüenciado e, a partir da análise de similaridade das seqüências obtidas (fragmento de 450 pb), foram formados oito grupos genotípicos a 95% de similaridade (Figura 7).

Figura 7 - Árvore de similaridade entre as seqüências do gene 16S rRNA dos isolados obtidos de amostras de solo e raízes de *A. angustifolia* coletadas em diferentes áreas no Parque Estadual de Campos do Jordão. G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7 e G8 referem-se aos grupos genotípicos formados a 95% de similaridade

Para cada grupo foi escolhida uma estirpe tipo, cuja identificação no banco de dados RDPII é apresentada na Tabela 6. O grupo 7 apresentou baixo índice de confiabilidade (58% com *Brucella*), entretanto, como não foi possível um maior detalhamento deste grupo, adotou-se este gênero provisoriamente.

Tabela 6 - Estirpes tipo selecionadas, identificação no banco de dados RDPII (seguida do índice de confiabilidade) e taxonomia adotada para cada grupo genotípico formado a partir dos isolados obtidos de amostras de solo e raízes de *A. angustifolia* coletadas em diferentes áreas no Parque Estadual de Campos do Jordão

Grupos genotípicos	Estirpes tipo	Identificação RDP II	Taxonomia adotada
Grupo 1	S21317	<i>Pseudomonas</i> [100%]	<i>Pseudomonas</i> sp.
Grupo 2	S22272	<i>Yersinia</i> [92%]	<i>Yersinia</i> sp.
Grupo 3	S31151	<i>Xanthomonas</i> [96%]	<i>Xanthomonas</i> sp.
Grupo 4	S21316	<i>Janthinobacterium</i> [100%]	<i>Janthinobacterium</i> sp.
Grupo 5	S31322	<i>Burkholderia</i> [100%]	<i>Burkholderia</i> sp.
Grupo 6	R12260	<i>Brevundimonas</i> [100%]	<i>Brevundimonas</i> sp.
Grupo 7	S32155	<i>Brucella</i> [58%]	<i>Brucella</i> sp.
Grupo 8	S32274	<i>Novosphingobium</i> [100%]	<i>Novosphingobium</i> sp.

Na Tabela 7, os isolados foram identificados com seus grupos fenotípicos, genotípicos e com a taxonomia adotada, sendo classificados por grupo genotípico. Comparando-se os grupos fenotípicos e genotípicos, verifica-se que não houve relação entre eles. Para um mesmo grupo genotípico, observou-se mais de um grupo fenotípico relacionado (caso dos grupos *Pseudomonas* sp., *Yersinia* sp. e *Burkholderia* sp.) e vice-versa (caso dos grupos fenotípicos 6, 9, 14, 19 e 20).

Tabela 7 - Identificação dos isolados, obtidos a partir de amostras de solo e raízes *A. angustifolia* coletadas em diferentes áreas no Parque Estadual de Campos do Jordão, com seus grupos fenotípicos, genotípicos e com a taxonomia adotada. A ordenação foi feita por grupos genotípicos

(continua)

Isolado*	Grupo fenotípico	Grupo genotípico	Taxonomia adotada
R12302	14	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
R23305	20	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
R32307	14	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
R32308	1	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
R32309	2	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
R32310	14	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
R33311	2	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
R33312	1	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
S12314	6	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
S13315	6	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
S21317	6	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
S21318	6	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
S23319	6	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
S23320	28	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
S31321	15	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
S32325	6	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
S33326	21	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
R31136	14	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
R32137	32	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
R32138	32	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
R32139	33	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
R33140	14	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
R33141	14	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
R33143	14	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
S23147	8	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
S23148	18	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
S31149	6	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
S32152	13	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
S32154	18	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
S33157	9	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
S33158	28	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
R32266	1	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
R32268	32	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
R32369	14	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
R33271	3	1	<i>Pseudomonas</i> sp.
R22303	27	2	<i>Yersinia</i> sp.
R22304	34	2	<i>Yersinia</i> sp.
S12313	30	2	<i>Yersinia</i> sp.
R13129	37	2	<i>Yersinia</i> sp.
R22134	26	2	<i>Yersinia</i> sp.
R22262	23	2	<i>Yersinia</i> sp.
S22272	5	2	<i>Yersinia</i> sp.
S31151	6	3	<i>Xanthomonas</i> sp.
S21316	31	4	<i>Janthinobacterium</i> sp.

Tabela 7 - Identificação dos isolados, obtidos a partir de amostras de solo e raízes *A. angustifolia* coletadas em diferentes áreas no Parque Estadual de Campos do Jordão, com seus grupos fenotípicos, genotípicos e com a taxonomia adotada. A ordenação foi feita por grupos genotípicos

(conclusão)			
Isolado*	Grupo fenotípico	Grupo genotípico	Taxonomia adotada
R31306	17	5	<i>Burkholderia</i> sp.
S31322	36	5	<i>Burkholderia</i> sp.
S31323	17	5	<i>Burkholderia</i> sp.
S32324	9	5	<i>Burkholderia</i> sp.
R13130	4	5	<i>Burkholderia</i> sp.
R13131	7	5	<i>Burkholderia</i> sp.
R13133	10	5	<i>Burkholderia</i> sp.
S31150	6	5	<i>Burkholderia</i> sp.
S32153	19	5	<i>Burkholderia</i> sp.
R12259	14	5	<i>Burkholderia</i> sp.
R13261	20	5	<i>Burkholderia</i> sp.
R23264	14	5	<i>Burkholderia</i> sp.
R31265	17	5	<i>Burkholderia</i> sp.
R32267	6	5	<i>Burkholderia</i> sp.
R32270	16	5	<i>Burkholderia</i> sp.
R12260	24	6	<i>Brevundimonas</i> sp.
S32155	19	7	<i>Brucella</i> sp.
S32274	22	8	<i>Novosphingobium</i> sp.
R12301	1	nd	nd
R12127	14	nd	nd
R12128	3	nd	nd
R31135	35	nd	nd
R33142	14	nd	nd
S11144	18	nd	nd
S12145	29	nd	nd
S22146	12	nd	nd
S33156	11	nd	nd
R23263	25	nd	nd
S23273	6	nd	nd

* O código dos isolados corresponde, respectivamente, ao tipo de amostra utilizada (S - solo, R - raiz), à área de coleta (1 - floresta nativa de araucária, 2 - reflorestamento de araucária, 3 - reflorestamento de araucária impactado pela queima acidental), ao número da repetição dentro de cada área (1, 2 ou 3), ao meio de cultura utilizado (1- JNFb, 2 - LGI, 3 - NFb) e ao número de estoque (01 a 74).

Na Figura 6, observa-se que os diferentes fenótipos relacionados a um único genótipo (Tabela 7) não estão agrupados, ao passo que houve grande similaridade entre fenótipos relacionados a genótipos distintos. Além disto, houve maior similaridade dos isolados obtidos com estirpes tipo de *Azospirillum* e *Herbaspirillum*, que com o isolado de *Burkholderia*, sendo que, dentre estes gêneros, somente o último está presente entre os isolados pela análise genotípica. Isto demonstra que a utilização de características fenotípicas para a discriminação de grupos é arriscada, já que através

dela pode-se separar isolados geneticamente similares em grupos diferentes e/ou reunir isolados geneticamente diferentes em um mesmo grupo.

A frequência relativa dos grupos genotípicos nas três áreas estudadas está apresentada na Figura 8. O grupo *Pseudomonas* sp. dominou em RF, representando cerca de 70% da ocorrência total, seguido pelo grupo *Burkholderia* sp. com mais de 20% da ocorrência. Em R, os grupos mais frequentes foram *Pseudomonas* sp. com 50% da ocorrência e *Yersinia* sp. com 36%. Já em NF, o grupo mais frequente foi *Burkholderia* sp. (45%), seguido por *Pseudomonas* sp. (27%) e *Yersinia* sp. (18%). Somente os grupos *Pseudomonas* sp. e *Burkholderia* sp. ocorreram em todas as áreas. Como o grupo *Yersinia* sp. está presente em R com alta frequência relativa e não ocorre em RF, possivelmente este grupo foi afetado pela queima acidental. Os grupos *Brevundimonas* sp. e *Janthinobacterium* sp. foram exclusivos das áreas NF e R, respectivamente, e os grupos *Brucella* sp., *Novosphingobium* sp. e *Xanthomonas* sp. só ocorreram em RF.

Figura 8 - Frequência relativa dos grupos genotípicos formados a partir dos isolados seqüenciados em cada área de estudo (NF - floresta nativa de araucária, R - reflorestamento de araucária, RF - reflorestamento de araucária impactado pela queima acidental)

Utilizando-se o índice de diversidade de Shannon e equivalência de Shannon, observou-se que R apresentou menor diversidade de grupos genotípicos que NF e RF, cujos valores de H e J ficaram bem próximos (Tabela 7). A maior diversidade de bactérias isoladas das áreas NF e RF pode estar associada a maior diversidade de plantas encontradas nestas áreas.

Tabela 8 - Índice de diversidade de Shannon (H) e equivalência de Shannon (J) para os grupos genotípicos formados em áreas com floresta nativa de araucária (NF), reflorestamento de araucária impactado (RF) ou não pela queima acidental (R) no Parque Estadual de Campos do Jordão

Área	H	J
NF	0,319	1,000
R	0,158	0,496
RF	0,266	0,834

A Figura 9 mostra a frequência relativa dos grupos genotípicos por tipo de amostra utilizada para a recuperação dos isolados, ou seja, solo ou raízes de *A. angustifolia* coletados nas áreas de estudo.

Figura 9 - Frequência relativa dos grupos genotípicos formados a partir de isolados seqüenciados por tipo de amostra (solo ou raízes de *A. angustifolia* coletadas em diferentes áreas no Parque Estadual de Campos do Jordão)

O grupo *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp. e *Yersinia* sp. ocorreram tanto nas amostras de solo, quanto nas amostras de raízes, sendo os dois primeiros os mais freqüentes em ambas. Donate-Correa et al. (2005), estudando rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) na rizosfera da planta leguminosa *Chamaecytisus proliferus*, constataram que *Pseudomonas* e *Burkholderia* estavam presentes em altas proporções na maior parte das amostras. Estes dois gêneros também tiveram destaque entre endobactérias isoladas de ectomicorrizas de *Pinus sylvestris* (IZUMI et al., 2006).

O grupo *Brevundimonas* sp. ocorreu somente nas raízes, enquanto *Xanthomonas* sp., *Janthinobacterium* sp., *Brucella* sp. e *Novosphingobium* sp. só ocorreram no solo, sendo todos estes grupos representados por apenas um isolado cada.

Segundo Lodewyckx et al. (2002), na prática, a diferença entre bactérias endofíticas que residem na raiz e bactérias que colonizam o rizoplane é geralmente determinada pela técnica de esterilização superficial aplicada. Os mesmos autores afirmam que com exceção de bactérias transmitidas por sementes, as quais já estão presentes na planta, os endófitos potenciais devem primeiro colonizar a superfície da raiz antes de entrarem na planta, o que pode explicar a estreita relação entre bactérias endofíticas e rizosféricas, ou seja, muitas bactérias endofíticas facultativas também podem sobreviver na rizosfera.

Como as raízes utilizadas neste estudo foram desinfestadas superficialmente com cloramina-T a 1% (DÖBEREINER et al., 1995), existem evidências de que os isolados obtidos a partir das mesmas sejam endofíticos. Para demonstrar conclusivamente a característica endofítica dessas bactérias, é necessário utilizar técnicas para identificá-las “in situ”. Porém, mesmo que as bactérias não sejam endofíticas, apresentando somente crescimento rizosférico, sua importância na associação com raízes de araucária não deve ser negligenciada. Gyaneshwar et al. (2002) demonstraram que bactérias rizosféricas são mais prováveis de serem benéficas do que as endofíticas.

As seqüências do gene 16S rRNA das estirpes tipo de cada grupo genotípico foram alinhadas com seqüências de espécies pertencentes aos gêneros identificados, sendo, com este alinhamento, construída a árvore filogenética “*Neighbor-joining*” (Figura 10).

Figura 10 - Árvore filogenética mostrando a relação entre seqüências do gene 16S rRNA de estirpes pertencentes aos grupos genotípicos formados (G1 a G8) e estirpes representantes dos gêneros identificados (referência de acesso entre parênteses), construída pelo método "Neighbor-joining". A árvore foi enraizada utilizando a seqüência do gene 16S rRNA de *Thermodesulfobacterium thermophilum*. Os valores de *bootstrap* estão indicados nas ramificações

Através do uso de filogenia baseada no gene 16S rRNA pôde-se observar que *Pseudomonas* sp. (G1) agrupou-se com *P. putida*, relatada como rizobactéria promotora do crescimento de plantas (RPCP) em espécies arbóreas (LUCY et al., 2004) e como diazotrófica por Donate-Correa et al. (2005), e está proximamente relacionada a *P. monteilli*, descrita por Duponnois e Plenchette (2003) como capaz de promover simbiose entre *Acacia holosericea* e fungos ecto e endomicorrízicos. *Yersinia* sp. (G2) formou agrupamento com *Rahnella aquatilis*, uma bactéria diazotrófica associada a rizosfera de milho e trigo (BERGE et al., 1991). *Xanthomonas* sp. (G3) está relacionado ao fitopatógeno *X. arboricola*.

Janthinobacterium sp. (G4) está relacionado a *J. lividum*, uma bactéria comum em solo e água de regiões temperadas, e a *J. agaricidamnossom* (LINCOLN et al., 1999) identificada como patógeno de *Agaricus bisporus*, um cogumelo cultivado. Segundo estes autores, o gênero *Janthinobacterium* apresenta elevado grau de similaridade da seqüência do gene 16S rDNA com membros dos gêneros *Herbaspirillum*, o que também foi verificado no presente trabalho.

Burkholderia sp. (G5) apresentou estreita relação com *B. phenazinium* e *B. glathei*, bactérias de solo que exibem interações não patogênicas com plantas (COENYE; VANDAMME, 2003). Embora a habilidade de fixar N₂ não seja relatada como uma característica comum em *Burkholderia*, Estrada-De Los Santos et al. (2001) encontraram uma grande riqueza de espécies diazotróficas deste gênero, demonstrada com a avaliação da atividade de redução de acetileno e confirmada com a presença de genes *nifHDK*.

Brevundimonas sp. (G6) está relacionado a *B. vesicularis*, espécie encontrada por Donate-Correa et al. (2005) em solo rizosférico e não rizosférico da planta leguminosa *Chamaecytisus proliferus*.

Brucella sp. (G7) está relacionado a *Brucella melitensis*. Segundo Martínez-Romero et al. (2000), o gênero *Brucella* inclui patógenos de animais e humanos e apresenta uma relação muito próxima a *Rhizobium* spp., sendo o agrupamento destes gêneros verificado no presente estudo. Entretanto, vale ressaltar que *Brucella* sp. apresentou baixa similaridade quando classificado pelo site RDPII e deve ser melhor estudado, sendo que pode tratar-se de outro gênero.

Novosphingobium sp. (G8) agrupou-se com *Sphingomonas subterranea* e *S. capsulata*. *Novosphingobium* foi proposto por Takeuchi et al. (2001) como um novo gênero para as espécies *Sphingomonas aromaticivorans*, *Sphingomonas capsulata*, *Sphingomonas rosa*, *Sphingomonas stygia*, *Sphingomonas subarctica* e *Sphingomonas subterranea*, após análises filogenéticas e quimiotaxonômicas. Os habitats descritos por estes autores para este novo gênero foram solo, raízes de roseira, espécimes clínicos, água destilada estocada e sedimentos de planície litorânea.

As espécies *Rahnella aquatilis*, *Janthinobacterium agaricidamnosum* e *Burkholderia glathei* relacionadas aos grupos genotípicos formados neste estudo, foram encontradas também entre isolados de ectomicorriza de *Pinus sylvestris* (IZUMI et al., 2006).

É importante lembrar que para o estudo de filogenia foram utilizadas seqüências de apenas 450 pb e a identificação dos isolados foi feita apenas ao nível de gênero, o que pode ter tornado a árvore imprecisa. Para uma adequada identificação e filogenia dos isolados seria necessário o seqüenciamento completo do gene 16S rRNA, o que provavelmente levaria a candidatos a espécies novas.

Entretanto, este estudo permitiu relacionar as bactérias isoladas de solo e raízes de araucária a grupos taxonômicos descritos como RPCP, diazotróficas ou não, fato que pode ter grande implicação ecológica e prática na preservação e na restauração de Florestas de Araucária.

2.3.4 Avaliação da presença da nitrogenase

Dos 73 isolados obtidos, quatro demonstraram atividade da nitrogenase “in vitro”, avaliada pelo aumento na concentração de N-total nas culturas puras, e confirmada pelo teste de redução de acetileno (Tabela 9). A concentração de N-total nas culturas puras de todos os isolados e das estirpes-tipo de *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae* e de um isolado pertencente ao gênero *Burkholderia*, utilizados como controle qualitativo do método é apresentada no Anexo 2.

Tabela 9 - Concentração de nitrogênio total (N-total) em culturas puras de bactérias diazotróficas após 7 dias de crescimento em meio JNFb, LGI ou CC, a 28°C, e atividade de redução de acetileno (ARA) nas mesmas após 48 horas de crescimento em meio CC, a 28°C

Isolado	Taxonomia adotada	N-total*			ARA*
		JNFb	LGI	CC	(ppm etileno h ⁻¹ cultura ⁻¹) CC
S32153	<i>Burkholderia</i> sp.	0,2135a	n.a.	0,2482b	25,40 a
S32154	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,1407b	n.a.	0,2596b	22,19 a
S32155	<i>Brucella</i> sp.	0,1068b	n.a.	0,2648b	16,25 a
S32274	<i>Novosphingobium</i> sp.	n.a.	0,2189a	0,3712a	15,54 a
Controle		0,0999b	0,1550b	0,1544c	3,74 b
R33140**	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,1004	n.a.	0,1532	2,84 b
C.V.%		15,97	2,02	8,65	13,45

(n.a.) não avaliado. * Médias de três repetições. ** Utilizado como controle negativo no ensaio de ARA por não ter apresentado aumento na concentração de N-total, não foi considerado na análise estatística de N-total. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os quatro isolados que demonstraram atividade da nitrogenase foram provenientes de amostras de solo da área RF, três do meio JNFb e um do meio LGI. Na avaliação do aumento de N-total nas culturas puras, os quatro isolados diferiram do controle quando avaliados em meio CC, enquanto nos meios de isolamento, somente os isolados S32153 e S32274 diferiram dos controles.

Estrada-De Los Santos et al. (2001), avaliando isolados obtidos de amostras de solo rizosférico e tecidos de plantas de milho e café quanto à atividade de redução de acetileno, observaram que vários isolados que não haviam apresentado atividade em meio com ácido azelaico como única fonte de carbono, foram capazes de reduzir acetileno em meio com três fontes de carbono (ácido málico, glicose e manitol). No presente trabalho, algo semelhante foi verificado com dois isolados obtidos (S32154, S32155), os quais não apresentaram aumento na concentração de N-total em meio JNFb, que contém ácido málico como única fonte de carbono, mas demonstraram este aumento em meio CC, que contém sacarose, lactato de sódio e manitol como fontes de carbono (Tabela 9).

Estrada-De Los Santos et al. (2001) também verificaram que a habilidade de fixação de N₂ entre diferentes diazotróficos do gênero *Burkholderia*, isolados de milho e café, variou em relação à fonte de carbono utilizada. Todos os isolados avaliados foram capazes de fixar N₂ com frutose, manitol, malato e succinato como única fonte de

carbono, mas esta capacidade foi variável com outras fontes de carbono (glicose, sacarose, glicerol, azelato, benzoato e propionato).

Além da fonte de carbono, vários outros fatores, como pressão de oxigênio, tempo e temperatura de incubação, afetam a atividade da nitrogenase, sendo que muitas bactérias fixadoras não demonstram tal habilidade, exceto sob condições especiais de crescimento (YOUNG, 1992; LIFTSHITZ et al., 1986).

No teste de redução de acetileno, a estirpe-tipo *A. lipoferum*, descrita como diazotrófica e por isso utilizada como controle qualitativo do método, não apresentou ARA (2,90 ppm de etileno h⁻¹ cultura⁻¹), o que demonstra a dificuldade de estabelecer condições adequadas para que todos os isolados apresentem atividade ótima da nitrogenase em um mesmo ensaio, podendo levar a resultados inconstantes de ARA.

Assim, considerando a grande diversidade dos isolados obtidos no presente estudo e a utilização de poucas fontes diferentes de carbono, com condições de crescimento restritas para avaliação da atividade da nitrogenase, é possível que existam mais diazotróficos entre os isolados obtidos, capazes de fixar N₂ em condições não avaliadas. Para confirmar esta hipótese, poderia ser feito um novo estudo da atividade da nitrogenase, testando diferentes fontes de carbono, faixas de temperatura e período de cultivo dos isolados.

Outra forma de avaliar o caráter diazotrófico dos isolados seria por meio da amplificação por PCR do gene *nifH*, que expressa a subunidade da enzima nitrogenase. Esta técnica dispensa testes que envolvem a atividade da nitrogenase, já que independente das condições ambientais este gene sempre está presente nos organismos diazotróficos. O ideal seria a combinação de técnicas que avaliam a presença do gene e a atividade da enzima.

Em termos quantitativos, os quatro isolados apresentaram ARA relativamente baixa em comparação às estirpes-tipo *Azospirillum brasilense*, *Burkholderia* sp. e *Herbaspirillum seropedicae*, que apresentaram, respectivamente, os valores 286,45, 246,88 e 160,65 ppm de etileno h⁻¹ cultura⁻¹.

Entretanto, vale ressaltar que a atividade de redução de acetileno foi utilizada no presente estudo como uma avaliação qualitativa, apenas para detectar a presença da nitrogenase, sendo que o uso desta técnica para avaliações quantitativas ou

comparativas da FBN requer adequações, que envolvem, além das condições já discutidas para a atividade da nitrogenase, a padronização da quantidade de inóculo, o tempo de incubação com o gás acetileno e o controle utilizado (LIFSHITZ et al., 1986; GILLER, 1987; VESSEY, 1994).

Portanto, para concluir se as bactérias isoladas a partir de solo e raízes de *A. angustifolia* neste estudo contribuem para o crescimento desta espécie através da fixação de N_2 , seriam necessários ensaios de inoculação na planta, além de testes adequados para quantificar a FBN. Também seria interessante avaliar os isolados em relação a outros mecanismos de promoção de crescimento, como produção de fitormônios, produção de antibióticos, etc, que podem contribuir na preservação de florestas saudáveis e, principalmente, na recuperação e revegetação das degradadas.

3 CONCLUSÕES

Foram isolados 73 bactérias potencialmente diazotróficas a partir de amostras de solo e raízes de *A. angustifolia*. Destas, quatro demonstraram a atividade da enzima nitrogenase “in vitro” pelo aumento da concentração do N-total e pela ARA. Esta é a primeira vez que se relata a ocorrência destas bactérias associadas a *A. angustifolia*.

Houve divergência entre as avaliações fenotípica e genotípica. Os índices de diversidade na avaliação fenotípica foram maiores, porém esta mostrou-se inadequada para o agrupamento dos isolados, por agrupar genótipos distintos ou separar genótipos semelhantes.

Considerando a avaliação genotípica, a área de reflorestamento de araucária apresentou a menor diversidade de isolados e a de mata nativa a maior.

Foram formados oito grupos genotípicos identificados como *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp., *Yersinia* sp., *Xhantomonas* sp., *Janthinobacterium* sp., *Brevundimonas* sp., *Brucella* sp. e *Novosphingobium* sp. Estes grupos estão relacionados a bactérias diazotróficas e a rizobactérias promotoras do crescimento de plantas já descritas.

Para caracterizar detalhadamente a função dos isolados e a contribuição dos mesmos no ecossistema de araucária são necessários mais estudos, especialmente sobre o efeito dessas bactérias no crescimento e desenvolvimento da *A. angustifolia*.

REFERÊNCIAS

- ALVES, H.S. **Seqüenciamento e análise do genoma cloroplastidial de eucalipto (*Eucalyptus grandis*)**. 2005. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- BALDANI, V.L.D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de inoculação e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica**. 1996. 265 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 1996.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, R.S.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non legumes plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.29, n. 5/6, p. 911-922, May/June 1997.
- BANDEL, G. **O pinheiro brasileiro *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze**. Piracicaba: ESALQ, 1966. 66 p.
- BAZZICALUPO, M.; OKON, Y. Associative and endophytic symbiosis. In: PEDROSA, F.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E. (Ed.). **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dodrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 409-410.
- BERGE, O.; HEULIN, T.; ACHOUAK, W. *Rahnella aquatilis*, a nitrogen-fixing enteric bacterium associated with the rhizosphere of wheat and maize. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 37, n. 3, p. 195–203, Mar. 1991.
- BRASIL. Portaria nº. 06-N, de 15 de janeiro de 1992. Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. **Diário Oficial (da República Federativa do Brasil)**, Brasília, 23 jan. 1992. p. 870-872.
- BURRIS, R. H. Nitrogen fixation assay - methods and techniques. **Methods in Enzymology**, New York, v.24B, p.415–431, 1972.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Brasília: EMBRAPA, SPI, 1994. 639 p.

CATTELAN, A. J.; HARTEL, P.G.; FUHRMANN, J.J. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 63, n. 6, p. 1670-1680, Nov. 1999.

CHANWAY, C.P. Bacterial endophytes: ecological and practical implications. **Sydowia**, Horn, v. 50, n. 2, p.149-170, Dec. 1998.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 9, p. 719-729, Sept. 2003.

COLE, J.R.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; WANG, Q.; KULAM, D.M; McGARRELL, D.M.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. The Ribosomal Database Project (RDP-II): Sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, p. 294-296, Jan. 2005.

COLEMAN, D.C.; WHITMAN, W.B. Linking species richness, biodiversity and ecosystem function in soil systems. **Pedobiologia**, Jena, v. 49, n. 6, p. 479-497, Nov. 2005.

CRAWFORD, R.H.; LI, C.Y.; FLOYD, M. Nitrogen fixation in root-colonized large woody residue of Oregon coastal forests. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 92, n. 1/3, p. 229-234, May 1997.

CROUSE J.; AMORESE, D. Ethanol precipitation: ammonium acetate as an alternative to sodium acetate. **Focus**, Rockville, v. 19, n. 1, p. 13-16, 1997.

CRUZ, L.M.; SOUZA, E.M.; WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. 16S ribossomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 5, p. 2375-2379, May 2001.

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

DONATE-CORREA, J.; LÉON-BARRIOS, M.; PÉREZ-GALDONA, R. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Islands. **Plant and Soil**, The Hague, v. 266, n. 1/2, p. 261-272, Jan. 2005.

DUPONNOIS, R.; PLENCHETTE, C. A mycorrhiza helper bacterium enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian *Acacia* species. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 13, n. 2, p. 85–91, Apr. 2003.

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

EVERITT, B.S. **Cluster analysis**. New York: John Wiley, Sons, 1993. 170p.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998

GEVERS, D.; COHAN, F.M.; LAWRENCE, J.G.; SPRATT, B.G.; COENYE, T.; FEIL, E.J.; STACKEBRANDT, E.; PEER, Y. van de; VANDAMME, P.; THOMPSON, F.L.; SWINGS, J. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, p. 733-739, Sep. 2005.

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

GILLER, K.E.; BEARE, M.H.; LAVELLE, P.; IZAC, M.N.; SWIFT, M.J. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 6, n. 1, p. 3-16, Aug. 1997.

GRAYSTON, S.J.; VAUGHAN, D.; JONES, D. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparason with annual plants: The importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 5, p. 29-56, Jan. 1997.

GUERRA, M.P.; SILVEIRA, V.; REIS, M.S. dos; SCHNEIDER, L. Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia*). In: SIMÕES, L. L.; LINO, C. F. (Ed.). **Sustentável mata atlântica**. São Paulo: SENAC, 2002. p. 85-101.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E.K.; REDDY, P.M.; LADHA, J.K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium tolerant rice varieties. **New Phytologist**, Cambridge, v. 154, n. 1, p. 131-146, Apr. 2002.

HONG, Y.; PASTERNAK, J.J.; GLICK, B.R. Biological consequences of plasmid transformation of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 37, n. 10, p. 796-799, Oct. 1991.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Manual técnico da vegetação brasileira**. Rio de Janeiro, 1992. 92 p. (Série Manuais Técnicos em Geociências, 1).

IZUMI, H.; ANDERSON, I.C.; ALEXANDER, I.J.; KILLHAM, K.; MOORE, E.R.B. Endobacteria in some ectomycorrhiza of Scots pine (*Pinus sylvestris*). **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 34-43, Apr. 2006.

KAHINDI, J.H.P.; WOOMER, P. GEORGE, T.; MOREIRA, F.M.S.; KARANJA, N.K.; GILLER, K.E. Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: The role of nitrogen-fixing bacteria. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 6, n. 1, p. 55-76, Aug. 1997.

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

LIMMER, C.; DRAKE, H.L. Nonsymbiotic N₂-fixation in acid and pH-neutral forest soils: Aerobic and anaerobic differentials. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.28, n. 2, p.177-183, Feb. 1996.

LINCOLN, S.P.; FERMOR, T.R.; TINDALL, B.J. *Janthinobacterium agaricidamnosum* sp. nov., a soft rot pathogen of *Agaricus bisporus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 49, p. 1577-1589, Oct. 1999.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E.R.B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; LELIE, D. van der. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 21, n. 6, p. 583-606, Nov./Dec. 2002.

LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B.R. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 86, p. 1-25, Aug. 2004.

MAGURRAN, A.E. **Ecological diversity and its measurement**. Princeton: Princeton University Press, 1988. 179 p.

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J.; GÁNDARA, B.; ROGEL, M.A.; LÓPEZ-MERINO, A.; WANG, E.T.; FUENTES-RAMIREZ, L.E.; TOLEDO, I.; MARTINEZ, L.; HERNANDEZ-LUCAS, I.; MARTÍNEZ ROMERO, J. Ecological, phylogenetic and taxonomic remarks on diazotrophs and related genera. In: PEDROSA, F.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E. (Ed.). **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dodrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 155-160.

MATTOS, J.R. **O pinheiro brasileiro**. 2.ed. Lages: Artes Gráficas Princesa, 1994. 225 p.

MEHNAZ, S.; MIRZA, M.S.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; BANO, A.; MALIK, K.A. Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rizosphere of rice. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, n. 2, p. 110-117, Feb. 2001.

MELLONI, R.; MOREIRA, F.M.S.; NÓBREGA, R.S.A.; SIQUEIRA, J.O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, p. 235-246, mar./abr. 2006.

MELLONI, R.; NÓBREGA, R.S.A.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Densidade e diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita, em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, n. 1, p. 85-93, fev. 2004.

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

MOREIRA-SOUZA, M.; TRUFEM, S.F.B.; GOMES-DA-COSTA, S.M.; CARDOSO, E.J.B.N. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Araucaria angustifolia* (Bert.) O.Ktze. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 13, n. 4, Aug. 2003.

NERONI, R.F.; CARDOSO, E.J.B.N. Occurrence of diazotrophic bacteria in *Araucaria angustifolia*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, n. 3, p.303-304, May/June 2007.

NÓBREGA, R.S.A.; MOREIRA, F.M.S. SIQUEIRA, J.O.; LIMA, A.S. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solo em reabilitação após mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, p. 269-279, mar./abr. 2004.

ODEE, D.W.; HAUKKA, K.; MCINROY, S.G.; SPRENT, J.I.; SUTHERLAND, J.M.; YOUNG J.P.W. Genetic and symbiotic characterization of rhizobia isolated from tree and herbaceous legumes grown in soils from ecologically diverse sites in Kenya. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 34, n. 6, p. 801-811, June 2002.

PISA, G. **Identificação molecular de bactérias de solo cultivado de Campo Belo do Sul (SC) Capazes de nodular feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2006. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S. Fixação biológica de nitrogênio - estado de arte. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. **Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 151- 180.

REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 19, n. 3, p. 227-247, May/June 2000.

RENNIE, E.M. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (nitrogen-fixing) bacteria in soils. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 27, n. 1, p. 8-14, Jan. 1981.

RODRIGUES, L.S.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 275-284, fev. 2006.

RÓZYCKI, H.; DAHM, H.; STRZELCZYK, E.; LI, C.Y. Diazotrophic bacteria in root-free soil and the root zone of pine (*Pinus sylvestris* L.) and oak (*Quercus robur* L.). **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 12, n. 3, p. 239-250, July 1999.

SANQUETA, C.R.; TETTO, A.F. **Pinheiro-do-Paraná: lendas e realidades**. Curitiba: Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná, 1999. 112 p.

SÃO PAULO. Secretaria Estadual do Meio Ambiente. **Espécies da flora ameaçadas de extinção no Estado de São Paulo: lista preliminar**. São Paulo, 1998. 24 p.

SHIMIZU, J.Y.; OLIVEIRA, Y.M.M. **Distribuição, variação e usos dos recursos genéticos da araucária no sul do Brasil**. Curitiba: EMBRAPA, URPFCS, 1981. 9 p. (EMBRAPA, URFPCS. Documentos, 4).

TAKEUCHI, M.; HAMANA, K.; HIRAISHI, A. Proposal of the genus *Sphingomonas* sensu strictu and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 51, n. 4, p. 1405-1417, July 2001.

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

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.L. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, n. 2, p. 697-703, Jan. 1991.

YOUNG, J.P.W.; DOWNER, H.L.; EARDLY, B.D. Phylogeny of photrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA segment. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, n. 7, p. 2271-2277, Apr. 1991.

ANEXOS

Anexo A - Composição química dos meios de cultura utilizados para o crescimento de bactérias diazotróficas

Constituinte	Meios			
	NFb ¹	JNFb ¹	LGI ¹	CC (RENNIE, 1981)
Sacarose (g L ⁻¹)			5,0	5,0
Manitol (g L ⁻¹)				5,0
Lactato de sódio (mL, 50%, v/v)				0,6
Ácido málico (g L ⁻¹)	5,0	5,0		
K ₂ HPO ₄ (g L ⁻¹)	0,5	0,6	0,2	0,8
KH ₂ PO ₄ (g L ⁻¹)		1,8	0,6	0,2
MgSO ₄ .7H ₂ O (g L ⁻¹)	0,2	0,2	0,2	0,2
NaCl (g L ⁻¹)	0,1	0,1		0,1
CaCl ₂ .2H ₂ O (g L ⁻¹)	0,02	0,02	0,02	0,06
Extrato de levedura (mg L ⁻¹) ²	50	20	20	100
CuSO ₄ .5H ₂ O (mg L ⁻¹)	0,08	0,08		
ZnSO ₄ .7H ₂ O (mg L ⁻¹)	2,4	2,4		
H ₃ BO ₃ (mg L ⁻¹)	2,8	2,8		
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (mg L ⁻¹)	2,0	2,0	0,002	25,0
MnSO ₄ .H ₂ O (mg L ⁻¹)	2,35	2,35		
Na ₂ FeEDTA (mg L ⁻¹)	65,6	65,6	65,6	28,00
Biotina (mg L ⁻¹)	0,1	0,1	0,1	0,005
Pyridoxol – HCl (mg L ⁻¹)	0,2	0,2	0,2	
PABA (mg L ⁻¹)				0,01
KOH (g L ⁻¹)	4,5	4,5		
Azul de bromotimol (mL, solução 0,5% em 0,2N KOH) ⁴	2	2	5	2
pH	6,5 a 6,8	5,8	6,0 a 6,2	7,0
Agar (g L ⁻¹)				
- consistência semi-sólida	2,2	2,2	2,0	2,2
- consistência sólida	16	16	16	16
NH ₄ Cl ³	1	1		
KNO ₃ ³			1	

¹ Os significados das siglas dos meios de cultura são apresentados na referência bibliográfica citada no trabalho (Döbereiner et al., 1995) e seguem abaixo:

NFb – Foi inicialmente denominado Fb, referente às iniciais do pesquisador Fábio Pedrosa, que o desenvolveu. Com a sua modificação, o mesmo passou a chamar-se NFb, onde a consoante N significa novo.

JNFb – Foi desenvolvido a partir do meio NFb e a consoante J refere-se ao nome da pesquisadora Johanna Döbereiner.

LGI – O meio foi desenvolvido a partir do meio LG (Lipman, J.G., 1904). A consoante I refere-se ao nome do pesquisador José Ivo Baladani, que promoveu o ajuste do meio para o isolamento do *Azospirillum amazonense*.

² Usado nos meios sólidos como fonte de nitrogênio, e também no meio CC semi-sólido e líquido

³ Usados nos meios líquidos como fonte de nitrogênio. No meio CC líquido o extrato de levedura é a fonte de nitrogênio. Nos meios semi-sólidos supõe-se que o nitrogênio provém da fixação biológica.

⁴ 5 g de azul de bromotimol e 11,22 g KOH em 1000 mL de água.

Anexo B - Concentração de N-total (%) em culturas puras de bactérias isoladas de amostras de solo e raízes de *A. angustifolia* coletadas em diferentes áreas no Parque Estadual de Campos do Jordão e das estirpes-tipo Z67 (*Herbaspirillum seropedicae*), sp59 (*Azospirillum lipoferum*), sp7 (*A. brasilense*) e M130 (*Burkholderia* sp.), após 7 dias de crescimento em meio JNFb, LGI ou CC, a 28°C

(continua)

Isolado	N-total %			
	NFb	JNFb	LGI	CC
controle	0,11802	0,0999	0,15509	0,15446
sp7	0,44156	n.a.	n.a.	0,22304
sp59	0,30416	n.a.	n.a.	0,63604
Z67	n.a.	0,70479	n.a.	1,17780
M130	n.a.	0,19575	n.a.	0,45688
R12301	0,12274	n.a.	n.a.	0,16803
R12302	0,12424	n.a.	n.a.	0,17168
R22303	0,11333	n.a.	n.a.	0,16877
R22304	0,1149	n.a.	n.a.	0,17280
R23305	0,12257	n.a.	n.a.	0,16771
R31306	0,13344	n.a.	n.a.	0,17886
R32307	0,12483	n.a.	n.a.	0,16822
R32308	0,12465	n.a.	n.a.	0,16513
R32309	0,1216	n.a.	n.a.	0,16024
R32310	0,11948	n.a.	n.a.	0,16711
R33311	0,11282	n.a.	n.a.	0,15872
R33312	0,12149	n.a.	n.a.	0,17446
S12313	0,11584	n.a.	n.a.	0,16209
S12314	0,12254	n.a.	n.a.	0,16731
S13315	0,11571	n.a.	n.a.	0,17623
S21316	0,12049	n.a.	n.a.	0,17092
S21317	0,12106	n.a.	n.a.	0,16685
S21318	0,11745	n.a.	n.a.	0,16196
S23319	0,11733	n.a.	n.a.	0,16049
S23320	0,11461	n.a.	n.a.	0,16659
S31321	0,10963	n.a.	n.a.	0,14697
S31322	0,12279	n.a.	n.a.	0,16254
S31323	0,11901	n.a.	n.a.	0,15878
S32324	0,12793	n.a.	n.a.	0,15545
S32325	0,11953	n.a.	n.a.	0,17022
S33326	0,11885	n.a.	n.a.	0,17309
R12127	n.a.	0,11067	n.a.	0,16559
R12128	n.a.	0,11633	n.a.	0,16416
R13129	n.a.	0,10266	n.a.	0,16451
R13130	n.a.	0,10891	n.a.	0,17899
R13131	n.a.	0,09096	n.a.	0,17068
R13133	n.a.	0,11682	n.a.	0,17328
R22134	n.a.	0,09189	n.a.	0,17749
R31135	n.a.	0,09406	n.a.	0,16089
R31136	n.a.	0,11483	n.a.	0,17936

Anexo B - Concentração de N-total (%) em culturas puras de bactérias isoladas de amostras de solo e raízes de *A. angustifolia* coletadas em diferentes áreas no Parque Estadual de Campos do Jordão e das estirpes-tipo Z67 (*Herbaspirillum seropedicae*), sp59 (*Azospirillum lipoferum*), sp7 (*A. brasilense*) e M130 (*Burkholderia* sp.), após 7 dias de crescimento em meio JNFb, LGI ou CC, a 28°C

Isolado	N-total %			
	NFb	JNFb	LGI	CC
R32137	n.a.	0,1003	n.a.	0,16382
R32138	n.a.	0,10222	n.a.	0,16529
R32139	n.a.	0,1086	n.a.	0,16987
R33140	n.a.	0,09273	n.a.	0,17196
R33141	n.a.	0,10048	n.a.	0,15325
R33142	n.a.	0,09173	n.a.	0,18475
R33143	n.a.	0,08916	n.a.	0,16779
S11144	n.a.	0,09225	n.a.	0,16351
S12145	n.a.	0,1017	n.a.	0,17153
S22146	n.a.	0,10005	n.a.	0,16719
S23147	n.a.	0,10543	n.a.	0,15987
S23148	n.a.	0,0886	n.a.	0,16479
S31149	n.a.	0,09897	n.a.	0,15958
S31150	n.a.	0,08809	n.a.	0,16903
S31151	n.a.	0,09948	n.a.	0,16652
S32152	n.a.	0,11951	n.a.	0,16677
S32153	n.a.	0,21351	n.a.	0,24828
S32154	n.a.	0,1407	n.a.	0,25960
S32155	n.a.	0,10682	n.a.	0,26483
S33156	n.a.	0,09847	n.a.	0,16293
S33157	n.a.	0,09582	n.a.	0,17296
S33158	n.a.	0,09621	n.a.	0,16880
R12259	n.a.	n.a.	0,15297	0,17039
R12260	n.a.	n.a.	0,16089	0,16607
R13261	n.a.	n.a.	0,16602	0,13834
R22262	n.a.	n.a.	0,16033	0,17720
R23263	n.a.	n.a.	0,16199	0,16196
R23264	n.a.	n.a.	0,17966	0,15824
R31265	n.a.	n.a.	0,17452	0,15834
R32266	n.a.	n.a.	0,16021	0,16246
R32267	n.a.	n.a.	0,16573	0,16548
R32268	n.a.	n.a.	0,167	0,16952
R32369	n.a.	n.a.	0,16181	0,17385
R32270	n.a.	n.a.	0,16821	0,16989
R33271	n.a.	n.a.	0,1617	0,16887
S22272	n.a.	n.a.	0,1652	0,17643
S23273	n.a.	n.a.	0,16827	0,16465
S32274	n.a.	n.a.	0,21894	0,37126

* O código dos isolados corresponde, respectivamente, ao tipo de amostra utilizada (S - solo, R - raiz), à área de coleta (1 - floresta nativa de araucária, 2 - reflorestamento de araucária, 3 - reflorestamento de araucária impactado pela queima acidental), ao número da repetição dentro de cada área (1, 2 ou 3), ao meio de cultura utilizado (1- JNFb, 2 - LGI, 3 - NFb) e ao número de estoque (01 a 74)