

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

“Seleção de estirpes eficientes para fixação biológica de nitrogênio e promoção de crescimento em plantas da espécie *Brachiaria brizantha*.”

Mylenne Calciolari Pinheiro da Silva

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de Concentração:
Microbiologia Agrícola**

**Piracicaba
2010**

Mylenne Calciolari Pinheiro da Silva
Licenciada em Ciências Biológicas

“Seleção de estirpes eficientes para fixação biológica de nitrogênio e promoção de crescimento em plantas da espécie *Brachiaria brizantha*”

Orientadora:
Prof^a Dra. **ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO**

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de Concentração:
Microbiologia Agrícola**

**Piracicaba
2010**

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

Silva, Mylenne Calciolari Pinheiro da

Seleção de estirpes eficientes para fixação biológica de nitrogênio e promoção de crescimento em plantas da espécie *Brachiaria brizantha* / Mylenne Calciolari Pinheiro da Silva. - Piracicaba, 2010.
79 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Bactérias fixadoras de nitrogênio 2. Brachiaria 3. Crescimento vegetal 4. Hormônios vegetais 5. Nitrogenase 6. Sequenciamento genético I. Título

CDD 633.2
S586s

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

Aos meus amados pais, Maria e Marcos, aos meus queridos irmãos Mayna e Marcos Aloysio,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus por me presentear com o dom da vida.

Aos meus pais, Maria Rosália e Marcos Claret, e aos meus irmãos Mayna e Marcos, pelo amor incondicional, paciência, carinho e conselhos. Vocês foram imprescindíveis para que eu chegasse até aqui.

À Professora Elke Cardoso por quem tive a honra de ser orientada desde a graduação. Agradeço pelo voto de confiança, ensinamentos acadêmicos, conselhos e paciência com sua discípula. Sua orientação foi fundamental para meu amadurecimento profissional e pessoal, e aqui deixo registrada toda a minha admiração e gratidão.

Aos técnicos do laboratório de Microbiologia do Solo da ESALQ Denise e Fernando, pela disposição em me ajudar sempre que foi preciso, por me suportarem nos meus dias insuportáveis, pelos momentos de descontração, pelas risadinhas em horas inapropriadas e, sobretudo, pela amizade.

Ao meu amigo Daniel Lammel sempre solícito, pela amizade, sugestões, dicas, risadas, por sempre me motivar e pela grande colaboração e auxílio na condução do meu projeto. Você foi essencial, e o essencial faz valer à pena!

À minha eterna estagiária preferida Aline sempre solícita e querida, pelo auxílio na execução do experimento e momentos de descontração.

Ao meu querido amigo Rafael Vasconcellos, muito obrigada pelos ensinamentos e conselhos desde sempre.

À minha querida amiga Marina Yumi sempre muito atenciosa, obrigada pela ajuda, pelas horas de conversa que me tranquilizaram, pelas críticas que me fortaleceram, e pela sua amizade sincera.

Ao meu amigo Carlão pela disposição e paciência em me ajudar sempre que precisei, e pelas importantes discussões sobre o trabalho.

A toda a família do laboratório de Microbiologia do Solo ESALQ/USP: Jamil, Daniel Bini, Cristiane, Alessandra, Rafael Valadares, André, Tiago, Marcos, Gustavo, Joice, Paulo, Simone, Alexandre, Ana, Fabrício, Fábio, Pilar, Sara, Júlia Wayego, Letícia, Júlia Lima, Patrícia e Priscila. Agradeço a ajuda, as sugestões e às divertidas tardes no Marrom Glacê.

Aos meus amigos de pós-graduação Bianca, Bruna, Nara, Alice, Elisa, Layanne, Vívian, Jose e Luciano pelo companheirismo em todas as situações e por tornarem o período do mestrado mais alegre e divertido.

À Gisele e ao Adriano pela disposição em me ajudar na época de USP inovação.

Ao Prof. Dr. Fernando Dini Andreote pela disposição e prontidão em me ajudar na parte molecular do meu projeto.

Ao Prof. Dr. Ângelo 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 ao aluno de doutorado Thales, pelo auxílio nas análises.

Ao técnico Wladimir Rosignolo pela ajuda com as análises de nitrogênio.

À técnica Valentina de Fátima De Martin, pela ajuda na execução do seqüenciamento de DNA.

À AGRISUS, pela bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro concedido.

À Coordenação do PPG-Microbiologia Agrícola e à ESALQ, pela grande oportunidade.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram diretamente ou indiretamente para o desenvolvimento e realização deste projeto, muito obrigada. Sem vocês nada disto seria possível.

“A cada dia que vivo mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca, e que, esquivando-se do sofrimento, perdemos também a felicidade”

Carlos Drummond de Andrade

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 A espécie <i>Brachiaria brizantha</i>	17
2.2 Bactérias diazotróficas.....	18
2.3 A enzima nitrogenase	19
2.4 Fixação Biológica de Nitrogênio em <i>Brachiaria brizantha</i>	21
2.5 Produção de ácido-indol-acético por bactérias diazotróficas	23
2.6 Estudo da diversidade de micro-organismos	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Áreas de estudo e amostragem	27
3.2 Isolamento e purificação das bactérias diazotróficas	29
3.3 Análise de produção de ácido-indol-acético (AIA).....	32
3.4 Avaliação da atividade da nitrogenase	33
3.5 Eficiência das bactérias em promover o crescimento da <i>Brachiaria brizantha</i>	36
3.6 Identificação dos isolados bacterianos	37
3.6.1 Extração do DNA genômico.....	37
3.6.2 Amplificação do gene 16S rRNA.....	38
3.6.3 Purificação do DNA amplificado	39
3.6.4 Reação de seqüenciamento e purificação	39
3.6.5 Análise das sequencias	40
4 RESULTADOS	41
4.1 Isolamento	41
4.2 Produção de ácido-indol-acético (AIA).....	41
4.3 Atividade da enzima nitrogenase.....	44
4.4 Efeito das bactérias no crescimento da <i>Brachiaria brizantha</i>	48
4.5 Identificação dos isolados bacterianos	52
5 DISCUSSÃO	55

5.1 Isolamento	55
5.2 Produção de ácido-indol-acético (AIA)	56
5.3 Atividade da nitrogenase.....	57
5.4 Promoção do crescimento de <i>Brachiaria brizantha</i>	60
5.5 Identificação dos isolados bacterianos	62
6 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	69

RESUMO

“Seleção de estirpes eficientes para fixação biológica de nitrogênio e promoção de crescimento em plantas da espécie *Brachiaria brizantha*.”

A *Brachiaria brizantha* é considerada uma das forrageiras preferidas entre os agropecuaristas por possuir elevada produção de forragem, tolerância ao calor e ao déficit hídrico, alta resposta à aplicação de fertilizantes, produção em grande massa de raízes e sementes, resistência à cigarrinha das pastagens (exceto as pertencentes ao gênero *Mahanarva*) e boa competição com plantas invasoras. É considerada a principal fonte de alimento para bovinos, sendo utilizada tanto na cria, recria, como na engorda dos animais. As bactérias fixadoras de nitrogênio ou diazotróficas são procariotos capazes de reduzir o N_2 a NH_3 , forma assimilável pelos organismos, e também podem produzir hormônios vegetais, como ácido-indol-acético, que estimulam o crescimento radicular da planta. Estes micro-organismos apresentam grande importância para a manutenção dos ecossistemas. Sua associação com as raízes de plantas e seu efeito promotor quando associados à *Brachiaria brizantha* possibilitaria a recuperação de áreas de pastagens que apresentam deficiência de nitrogênio, o que é um mecanismo ainda pouco explorado. Com o objetivo de estudar esta possibilidade, foram escolhidas três áreas (Nova Odessa-SP, São Carlos-SP e Campo Verde-MT), preferencialmente onde o nitrogênio era limitante, constituídas por pastagem de *Brachiaria brizantha* para a amostragem de solo e raiz. Os três locais demonstraram a ocorrência de diazotróficos, após o isolamento e cultivo das bactérias em meio de cultivo semi-sólido sem adição de nitrogênio na forma combinada (JNFb). Foram obtidas 110 estirpes bacterianas e, após sorteio aleatório, 72 isolados foram mantidos para realização de testes a fim de se avaliar o potencial biotecnológico das bactérias. Destes, 10 demonstraram atividade da nitrogenase quando submetidos ao método de aumento na concentração de nitrogênio total (N-total) em meio de cultura. 57 isolados foram capazes de reduzir o gás acetileno a etileno quando submetidos à técnica de redução de acetileno. As estirpes bacterianas C4 (*Pseudomonas* sp.) e C7 (*Azospirillum* sp.), isoladas da rizosfera de *Brachiaria brizantha* da área de Campo Verde-MT, se destacaram das demais por apresentar atividade da nitrogenase muito superior até a de bactérias diazotróficas que foram incluídas na avaliação como testemunhas positivas. Outros 68 isolados produziram o hormônio vegetal ácido-indol-acético quando cultivados em meio de cultivo LB, na presença de triptofano. A produção variou de 0,39 $\mu\text{g/mL}$ a 195 $\mu\text{g/mL}$ de AIA. Todos os 72 isolados foram utilizados em experimento em casa de vegetação para avaliar o efeito de inoculação em *B. brizantha* quando com eles inoculada. Avaliaram-se a matéria seca da parte aérea e raiz e o teor de nitrogênio total da parte aérea através do método micro-Kjeldhal. Nenhum isolado diferiu significativamente do controle sem inoculação bacteriana que continha a mesma dose de nitrogênio fornecido às plantas. O seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA dos 72 isolados permitiu a caracterização de sete grupos genotípicos: *Stenotrophomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Xanthomonas* sp., *Bacillus* sp., *Rhizobium* sp., *Sphingomonas* sp. e *Azospirillum* sp. O gênero *Stenotrophomonas* sp. predominou (69%) nas três áreas de estudo.

Palavras-chave: Diazotróficos, *Brachiaria brizantha*, Nitrogênio, Nitrogenase, ácido-indol-acético e 16S rRNA

ABSTRACT

“Selection of efficient strains for biological nitrogen fixation and growth promotion of *Brachiaria brizantha*.”

Brachiaria brizantha is considered one of preferred fodders among farmers for having high forage yield, tolerance to heat and drought, high response to fertilizer application, large production of root mass and seeds, resistance to grassland leafhopper (except those belonging to the genus *Mahanarva*) and good competition with weeds. It is considered the main source of food for cattle, being used in the raising, breeding, and fattening of animals. The nitrogen fixing bacteria or diazotrophs are prokaryotes able to reduce N_2 to NH_3 , which is assimilated by organisms, and may also produce plant hormones such as indole-acetic acid, which stimulates root growth. These micro-organisms have great importance for the maintenance of ecosystems. Their association with plant roots and their promoting effect when combined with *Brachiaria brizantha* enable recovery of nitrogen-deficient grazing areas, which is a mechanism still little explored. Therefore, three areas were chosen (Nova Odessa-SP, Sao Carlos-SP and Campo Verde-MT), preferably where nitrogen was limiting, consisting of *Brachiaria brizantha* from which samples of soil and roots were collected. The three sites showed the occurrence of diazotrophs after the isolation and cultivation of bacteria in semi-solid culture medium with no nitrogen added in the combined form (JNFb). It was obtained 110 bacterial strains and, after the raffle random, 72 were kept isolated for testing in order to assess the biotechnological potential of bacteria. From which, 10 showed nitrogenase activity when subjected to the method of total nitrogen concentration increase (N-total) in the culture medium. 57 isolates were able to reduce acetylene to ethylene when subjected to the acetylene reduction technique. The strains C4 (*Pseudomonas sp.*) and C7 (*Azospirillum sp.*), isolated from the rhizosphere of *Brachiaria brizantha* in the area of Campo Verde-MT, stood out from the others by presenting nitrogenase activity far superior to that of diazotrophs recommended as positive controls. Other 68 isolates produced the plant hormone indole-acetic acid when grown in LB culture medium in the presence of tryptophan. Production ranged from 0.39 μ g/mL to 195 μ g/mL of IAA. All 72 isolates were used in an experiment in a greenhouse to evaluate the effect of inoculation on *B. brizantha*. Evaluations were carried out on dry matter of shoot and root and total nitrogen content of the shoot through the micro-Kjeldahl method. None of the isolates differed significantly from the control without bacterial inoculation which contained the same amount of nitrogen supplied to plants. Partial sequencing of the 16S rRNA of the 72 isolates allowed the characterization of seven genotype groups: *Stenotrophomonas sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Xanthomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Rhizobium*, *Sphingomonas sp.* and *Azospirillum sp.* The genus *Stenotrophomonas sp.* predominated (69%) in the three study areas.

Keywords: Diazotrophs, *Brachiaria brizantha*, Nitrogen, Nitrogenase, Indole-acetic acid and 16S rRNA

1 INTRODUÇÃO

Bactérias diazotróficas são procariotos capazes de reduzir o N_2 a NH_3 , forma assimilável pelas plantas. A associação destas bactérias com a *Brachiaria brizantha* sugere a possibilidade de recuperação das áreas de pastagem com deficiência nutricional de nitrogênio.

As áreas de pastagem no Brasil, entre cultivadas e nativas, ocupam cerca de 180 milhões de hectares. Destas, grande parte é constituída por gramíneas do gênero *Brachiaria*, utilizada para pastoreio de bovinos e produção de feno (SOARES FILHO, 1994)

Dentre as espécies de braquiária utilizadas no Brasil, a *Brachiaria brizantha* possui maior representatividade em áreas de pastagens cultivadas. Possui resistência à cigarrinha das pastagens (exceto às pertencentes ao gênero *Mahanarva*), elevada produção e alta qualidade de forragem, resposta à adubação, boa produção de sementes, boa competição com plantas invasoras e estabelecimento rápido (COSTA et al., 2005).

Esta forrageira possui determinadas exigências nutricionais, apesar de uma grande capacidade de adaptação em solos de média fertilidade. A adubação nitrogenada é um dos atributos mais estudados em pastagens e os adubos nitrogenados são normalmente empregados no seu cultivo, porém, esta prática pode resultar no esgotamento das reservas nutricionais do solo, além de contaminar a água e a atmosfera (REIS, 2007).

Segundo Pereira (1981), algumas espécies de braquiária são capazes de receber nutrientes necessários ao seu desenvolvimento através da fixação biológica do nitrogênio (FBN). Este processo é realizado por uma pequena parcela de procariotos que possuem uma enzima denominada nitrogenase, capaz de reduzir o N-atmosférico para a forma inorgânica combinada (NH_3). Muitas dessas bactérias, conhecidas como diazotróficas, também são capazes de produzir hormônios vegetais, como ácido-indol-acético, que estimulam o crescimento radicular da planta (VANDE BROEK E VANDERLEYDEN, 1995).

O estudo da associação de bactérias diazotróficas com *Brachiaria brizantha* busca alternativas para a recuperação de áreas de pastagens que apresentam deficiência de nitrogênio, o que resulta em diminuir a necessidade de utilização de adubos nitrogenados em forrageiras.

Os objetivos do presente estudo foram:

- ✓ Isolar bactérias rizosféricas e endofíticas das raízes de *Brachiaria brizantha*;

- ✓ Avaliar o caráter diazotrófico dos isolados pelo aumento da concentração de N-total no meio de cultura e através da técnica de redução de acetileno (ARA);
- ✓ Avaliar o potencial dos isolados em produzir hormônio vegetal (AIA);
- ✓ Re-inocular os isolados bacterianos em *Brachiaria brizantha* e avaliar o efeito no crescimento das plantas;
- ✓ Identificar os isolados através do seqüenciamento do gene 16S rRNA.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A espécie *Brachiaria brizantha*

A *B. brizantha* é considerada uma das espécies de maior importância agrônômica. Esta forrageira é cosmopolita, originária de regiões vulcânicas onde os solos geralmente apresentam bons níveis de fertilidade. Desenvolve-se razoavelmente bem em climas tropicais caracterizados com duas estações climáticas (época de seca e chuva) (NUNES et al., 1985).

É descrita como perene, cespitosa, muito robusta e apresenta rizoma curto e encurvado (SOARES FILHO, 1994). Suas folhas são glabras e linear-lanceoladas, com lâminas foliares de 5–30cm de comprimento e 0,6-1,6cm de largura. Possui pubescência na parte inferior de suas folhas e apresenta porte ereto podendo atingir 1,50 a 2,0 m de altura (SOARES FILHO, 1994).

Esta forrageira é caracterizada por possuir elevada produção de forragem, tolerância ao calor e ao déficit hídrico, alta resposta à aplicação de fertilizantes, resistência ao frio e produção em grande massa de raízes e sementes. Estas características lhe cederam o primeiro lugar em área plantada e importância como forrageira para o país (COSTA et al., 2005).

Na década de 70 a *B. brizantha* foi cedida a Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA) para estudos e eventual distribuição no país. Esta espécie possui um ecotipo conhecido como Marandu, introduzida no Brasil por Paul Rankin Raymon em 1967, no município de Ibirarema estado de São Paulo.

Este ecotipo foi liberado em 1984 para comercialização no Brasil pelo Centro de Pesquisa Agropecuário dos Cerrados (EMBRAPA – CPAC). Nesta época a *B. brizantha* cv Marandu foi lançada como uma alternativa a outras espécies que não possuíam características de adaptabilidade a condições de solos de cerrados com média a boa fertilidade (MILES; MAASS; VALLE, 1996).

Estima-se que dos 40 milhões de hectares de pastagens plantadas pertencentes ao gênero *Brachiaria*, aproximadamente 85 % sejam ocupadas pelas espécies *B. brizantha* cv Marandu e *B. decumbens* cv Basilisk. A *B. brizantha* é considerada uma das preferidas entre os agropecuaristas representando atualmente cerca de 80% do volume de vendas de sementes dentre todas as braquiárias (SOARES FILHO, 1994). No estado de São Paulo sua representatividade alcança cerca de 40% da área de pastagens plantadas. A produção de ruminantes no país é essencialmente

baseada na utilização de pastagens como base alimentar do rebanho. O pasto é responsável por aproximadamente 90% da carne bovina e pela maior parte dos 20 bilhões de litros de leite produzidos e consumidos anualmente.

A *B. brizantha* tem sido muito utilizada em sistemas de integração agricultura-pecuária e sistemas consorciados com culturas anuais. O consórcio desta forrageira com milho, arroz ou sorgo é uma alternativa para renovação da pastagem. Este sistema visa à redução dos custos na reforma do pasto podendo ser totalmente ou parcialmente pagos pela produção de grãos colhidos na safra ou pela produção de alimento em forma de silagem. Outro ponto positivo é que no momento da remoção dos grãos, a cobertura vegetal proporcionada pela alta produção de fitomassa da braquiária contribui para a redução da compactação do solo (KICHEL et al., 1999).

Diante de todas estas características a *B. brizantha* é considerada a espécie de braquiária mais utilizada, tanto para a produção pecuária no país, como em sistemas de integração agricultura-pecuária.

2.2 Bactérias diazotróficas

O nitrogênio em forma gasosa ocorre em concentração de 78% da atmosfera terrestre. Este mesmo elemento é um dos maiores limitantes para a manutenção de qualquer forma de vida no planeta, visto que a grande maioria dos seres vivos não tem acesso a este reservatório. Os únicos seres vivos capazes de converter o N-atmosférico a N-combinado são as bactérias conhecidas como diazotróficas. Esta pequena parcela de procarionotes apresenta alta diversidade fisiológica, morfológica, genética e filogenética (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

O processo realizado pelos micro-organismos capazes de reduzir o N-atmosférico a formas inorgânicas assimiláveis, e garantir a resiliência deste processo, é conhecido como fixação biológica do nitrogênio (FBN). Este processo possui grande importância no aspecto econômico e ecológico, e em sistemas agrícolas e florestais (REIS; TEIXEIRA, 2005).

O N-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 (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Devido a sua grande diversidade os micro-organismos diazotróficos são encontrados nos mais diferentes tipos de habitats. A maioria de suas espécies é de vida livre, com ocorrência em todos os tipos de solo, rizosfera e filosfera, águas doces e salgadas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Alguns destes fixadores fazem simbiose com diferentes espécies vegetais, ou estabelecem relações menos especializadas com plantas, sendo denominados de associativos (DÖBEREINER E ALVAHYDO, 1959). Não existe uma diferenciação rígida entre bactérias endofíticas e rizosféricas. Algumas podem ter períodos em que crescem na rizosfera e no rizoplano, seguidos de períodos em que se localizam internamente na planta (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Acredita-se que a fixação biológica de nitrogênio realizada por diazotróficos endofíticos possui uma vantagem sobre os diazotróficos associativos, uma vez que ocupam espaços intimamente ligados ao hospedeiro. Desta forma, tais micro-organismos terão maior acesso às fontes de carbono, podendo transferir muito mais eficientemente para a planta os compostos nitrogenados produzidos. Além desta característica, os endofíticos colonizam nichos protegidos do oxigênio garantindo a funcionalidade da enzima nitrogenase (DOBBELAERE, 2003).

Além da fixação biológica do nitrogênio existem outros tipos de benefícios que podem ser apresentados pelas bactérias diazotróficas rizosféricas e endofíticas. Estes micro-organismos podem atuar como promotores do crescimento de plantas (RPCP), destacando-se a produção de hormônios vegetais, como auxinas, giberelinas e citocininas (BAZZICALUPO; OKON, 2000).

Os sistemas agrícolas têm sofrido mudanças com os objetivos de evitar a degradação do solo e promover a melhoria da qualidade ambiental. O manejo do solo e a exploração da biodiversidade dos sistemas agrícolas têm sido utilizados para aperfeiçoar a produção e a sustentabilidade dos ecossistemas. Nesse sentido, a associação de bactérias diazotróficas com forrageiras pode representar uma alternativa promissora para promoção do crescimento das plantas, manejo do solo e qualidade ambiental (ROESCH et al., 2007).

2.3 A enzima nitrogenase

Segundo Burnes e Hardy (1975), apesar dos micro-organismos diazotróficos possuírem diferentes habitats, todos utilizam a mesma maquinaria bioquímica para realizar a fixação

biológica do nitrogênio, a enzima nitrogenase. Esta enzima é responsável por catalisar o processo de redução do N-atmosférico a N-combinado, forma assimilável pelos seres vivos.

Através de estudos conduzidos por diferentes autores estabeleceu-se a existência de sistemas alternativos da nitrogenase independentes geneticamente: nitrogenase 1, dependente de molibdênio (Mo) e ferro (Fe) e codificada por genes *nif*, nitrogenase 2, dependente de Vanádio (V) e codificada por genes *vnf* e nitrogenase 3, dependente de Ferro (Fe) e codificada por genes *anf* (REIS; TEIXEIRA, 2005; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A fisiologia dos micro-organismos diazotróficos é marcada pelas propriedades inerentes da nitrogenase como: presença de seus componentes estruturais: ferro (Fe), molibdênio (Mo) ou vanádio (V), MgATP para sua atividade, suprimento adequado de poder redutor (a flavodoxina e a ferredoxina), além de um ambiente em que não haja disponibilidade de N- combinado (REIS; TEIXEIRA, 2005).

A nitrogenase, considerada extremamente versátil, além de ser responsável por catalisar a redução do N-atmosférico a N-combinado, também é capaz de reduzir prótons a hidrogênio e pequenas moléculas insaturadas como acetileno, azida e cianeto a formas mais reduzidas (KIM E REES, 1994).

A técnica de redução do acetileno para etileno (ARA) possui grande importância nos estudos de sistemas fixadores. É um método bastante utilizado para determinar o caráter diazotrófico das bactérias através da detecção da presença da atividade da enzima. Esta técnica utiliza cromatografia gasosa para medir a redução do acetileno a etileno. É considerada bastante sensível, de baixo custo, fácil condução e relativamente rápida (BURRIS, 1972; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Contudo o uso desta técnica pode apresentar alguns pontos negativos que devem ser considerados para que a atividade da nitrogenase seja detectada, como por exemplo: dificuldades como o tempo ideal de crescimento dos isolados e um tempo ideal de incubação com o gás acetileno. Estes fatores apresentam grandes variações, de 24 a 192 horas para o período de crescimento dos micro-organismos, e uma a 48 horas para o tempo de incubação com o gás (RENNIE, 1981; CATTELAN et al., 1999; MEHNAZ et al., 2001; ESTRADA-DE LOS SANTOS et al., 2001).

A nitrogenase é extremamente sensível ao oxigênio, podendo ser destruída irreversivelmente quando em contato com este elemento. Este fato apresenta um grande problema

para a maioria dos micro-organismos diazotróficos com exceção daqueles que possuem um metabolismo anaeróbico.

Devido ao fato da fixação de nitrogênio ser estritamente anaeróbica, os diazotróficos aeróbios desenvolveram alguns mecanismos para impedir a interferência do oxigênio no sítio ativo da nitrogenase, como por exemplo: proteção respiratória, produção de exopolissacarídeos e heterocistos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Algumas espécies de diazotróficos aeróbios não apresentam estes mecanismos de proteção contra o oxigênio. Devido a esta característica dependem de ambientes microaerofílicos quando fixam N_2 , ou seja, só podem fazê-lo quando a taxa de dissolução de oxigênio no meio aquoso estiver em equilíbrio com sua taxa de consumo pela respiração, em valores bem inferiores aos 20% da atmosfera livre.

Esta característica permitiu a utilização de meios de cultivo semi-sólidos sem adição de nitrogênio para o isolamento e cultivo de micro-organismos fixadores, uma vez que permite a ocupação de sítios onde a concentração de oxigênio é baixa, sendo suficiente para sua respiração, mas sem excessos que possam afetar a nitrogenase (DÖBEREINER et al., 1995).

Estes estudos revolucionaram as pesquisas sobre a fixação biológica do nitrogênio nas associações entre diazotróficos e plantas não leguminosas (BALDANI et al., 1997).

2.4 Fixação biológica de nitrogênio em *Brachiaria brizantha*

O nitrogênio é um elemento essencial para os organismos vivos, constituinte de moléculas como aminoácidos, ácidos nucléicos, bases nitrogenadas e clorofila (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006; FERREIRA, 2008). As bactérias diazotróficas são responsáveis pela transformação do N-atmosférico a N-combinado através da fixação biológica do nitrogênio (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A contribuição da FBN proveniente da associação de plantas e bactérias diazotróficas é o processo mais significativo de adição de nitrogênio no ecossistema terrestre (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A utilização de micro-organismos fixadores na agricultura pode possibilitar a economia em milhões de dólares de petróleo e gás natural (fontes de energia não-renováveis). Calcula-se que, para a produção de uma tonelada de amônio, sejam necessários seis barris de petróleo (VARGAS; HUNGRIA, 1997).

As bactérias diazotróficas que têm sido descritas como associadas a *B. brizantha* são: *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum amazonense* e *Azospirillum brasiliense*. Estas bactérias também são capazes de produzir alguns hormônios vegetais, como por exemplo, o ácido-indol-acético (AIA) (VANDE BROEK E VANDERLEYDEN, 1995).

A maioria dos experimentos envolvendo o isolamento e a identificação de bactérias fixadoras de nitrogênio com forrageiras foi realizada na década de 60 a 80 (NEYRA E DÖBEREINEIR, 1977). Esta associação pode fornecer à planta parte do nitrogênio responsável pelo seu desenvolvimento através do processo de FBN (REIS, 2002). Algumas espécies de *Brachiaria* podem acumular de 30 a 40 kg N ha⁻¹ via fixação biológica de nitrogênio (BODDEY E VICTORIA, 1986). Segundo Boddey et al. (1983), utilizando a técnica de diluição isotópica de N¹⁵, a gramínea *Paspalum notatum* cv. batatais obteve 10% de seu nitrogênio proveniente da FBN. Utilizando a mesma técnica foi possível observar que *Brachiaria humidicola* e *Brachiaria decumbens* obtiveram de 30 a 40% de seu nitrogênio através da FBN (BODDEY E VICTORIA, 1986).

A inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio em plantas tem potencial de tornar-se uma técnica que pode ser aplicável a sistemas vegetais em condições de déficit hídrico, baixa fertilidade, ou ambas as condições. Esta possibilidade é devido ao efeito hormonal que promove a expansão do sistema radicular da planta (ITZIGSOHN, 2000).

Em diversas partes do mundo foi observado que muitos pastos de forrageiras do gênero *Brachiaria* têm mantido níveis razoáveis de produtividade sem adubação nitrogenada. Esse fenômeno muito provavelmente está relacionado com a contribuição da FBN, uma vez que o ingresso de nitrogênio ao ecossistema terrestre pelas chuvas tem sido considerado baixo.

Embora tenha havido alguns estudos demonstrando a presença de bactérias diazotróficas associadas a *Brachiaria* spp., estes ainda são escassos, e nenhum deles foi conduzido por maior período de tempo. Até o momento há poucos registros de avaliação das populações de micro-organismos diazotróficos inerentes às áreas de pastagens ou em relação aos genótipos de braquiária (REIS et al., 2004).

Existe uma grande necessidade em se pesquisar a contribuição da fixação biológica do nitrogênio e diversidade de micro-organismos diazotróficos que se associam com forrageiras, a fim de se estabelecer o verdadeiro potencial destas bactérias para promover o crescimento das plantas (REIS, 2002).

O estudo detalhado desta associação pode tornar as plantas mais independentes de adubação nitrogenada, possibilitando uma maior economia para o produtor. O uso de biofertilizantes vislumbra a diminuição de fertilizantes nitrogenados considerados poluidores do solo, além de contaminar a água superficial e os lençóis subterrâneos (REIS, 2007).

2.5 Produção de ácido-indol-acético por bactérias diazotróficas

A rizosfera é a região de poucos milímetros de espessura de solo em torno da raiz. Esta área é rica em nutrientes devido à exsudação e deposição de compostos orgânicos pela raiz. O crescimento e atividade microbiana na rizosfera são intensos. Os compostos orgânicos que são liberados pelas raízes são utilizados como fonte de energia e carbono pelos micro-organismos (DOBBELAERE et al., 2003).

As bactérias que se associam à planta, colonizando suas raízes, são conhecidas como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP). Além de colonizar a região do solo sob influência direta do sistema radicular, algumas também são capazes de colonizar os tecidos internos da espécie vegetal (KOKALIS-BURELLE et al., 2006).

As bactérias diazotróficas são classificadas como RPCP e podem estimular o crescimento vegetal através de mecanismos indiretos ou diretos. Dentre os mecanismos de ação indireta estão: produção de antibióticos, antagonismo a fitopatógenos, indução de resistência sistêmica nos vegetais e produção de sideróforos. Já os mecanismos de ação direta são: fixação biológica do nitrogênio, solubilização de fosfatos e produção de hormônios vegetais, como ácido-indol-acético, giberelinas e citocininas (BISWAS et al., 2000).

O hormônio vegetal ácido-indol-acético (AIA) é um composto que pode auxiliar no crescimento da parte aérea da planta e de suas raízes, aumentando a absorção de nutrientes e água. A produção deste regulador de crescimento faz parte do metabolismo de muitas bactérias diazotróficas. Acredita-se que o ácido-indol-acético seja encontrado como metabólito microbiano em 80% das bactérias isoladas da rizosfera (ZAHAROVA et al., 1999).

Existem diversas vias de biossíntese para produção de AIA em plantas e micro-organismos, dentre elas estão as que são dependentes do L-triptofano e as vias que são independentes desse aminoácido. As vias independentes podem ocorrer a partir dos seguintes precursores: 3-indolacetamida, ácido 3-indolpirúvico e 3-indolacetonitrilo (PATTEN E GLICK, 1996).

Outro efeito que o ácido-indol-acético produzido pelas bactérias diazotróficas podem exercer sobre as plantas é a detoxificação celular que é causada por elevadas concentrações de L-triptofano, aminoácido utilizado como precursor da síntese de AIA (MANULIS et al., 1998).

Processos de identificação e seleção de micro-organismos capazes de produzir hormônios vegetais são freqüentemente utilizados em laboratórios. Geralmente utiliza-se o método colorimétrico, no qual a concentração dos compostos indólicos é estimada com uma curva-padrão, previamente preparada com quantidades conhecidas de ácido-indol-acético comercial (BRIC et al., 1991).

2.6 Estudo da diversidade de micro-organismos

Os micro-organismos compreendem muito da biodiversidade terrestre e desempenham funções importantes nos ciclos biogeoquímicos e no funcionamento dos ecossistemas. Vêm sendo explorados há muitos anos por apresentarem grande valor biotecnológico na produção de fármacos, antibióticos, enzimas, corantes, entre outras substâncias químicas. Também são muito importantes na agricultura para o aumento da fertilização dos solos através da fixação biológica do nitrogênio e solubilização de fosfatos.

Apesar de sua grande importância, estima-se que menos de 5% dos micro-organismos existentes no planeta foram identificados, caracterizados e descritos na literatura. Esta dificuldade de se estudar a diversidade em amostras ambientais deve-se em grande parte às técnicas tradicionais utilizadas no isolamento e cultivo dos micro-organismos. Estes procedimentos são hoje considerados inadequados, já que apenas uma pequena fração dos micro-organismos é cultivável e os meios de cultivo artificiais não são capazes de reproduzir com precisão os diferentes nichos ecológicos (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006).

Com a evolução da biologia molecular houve um avanço nos estudos da microbiologia ambiental e da ecologia do solo. Através do desenvolvimento de metodologias moleculares foi possível aprimorar a análise da biodiversidade microbiana. A caracterização genética dos organismos é baseada na compreensão de suas relações e interações com o ambiente através do estudo de suas moléculas representativas. Dentre elas estão os ácidos nucleicos, como RNA (ácido ribonucléico) e DNA (ácido desoxirribonucléico) (AMANN et al., 1995).

Dentre as técnicas moleculares que ganharam grande importância na identificação de micro-organismos encontram-se: extração do DNA genômico, o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) e amplificação de regiões conservadas do gene com primers universais para posterior seqüenciamento (AMANN et al., 1995).

Estes avanços na biologia molecular permitiram que a genotipagem dos micro-organismos progredisse consideravelmente nos últimos anos, permitindo não só grandes avanços nos domínios da identificação, classificação e diagnóstico, mas também no estudo de sua evolução e filogenia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Áreas de estudo e amostragem

Os locais onde se realizaram as coletas de solo e raízes de *B. brizantha* foram: Instituto de Zootecnia de Nova Odessa – SP, Embrapa Pecuária Sudeste São Carlos – SP e Fazenda Marabá, em Campo Verde – MT. Os solos destas áreas são classificados, respectivamente, como: Latossolo Vermelho distrófico, Latossolo Vermelho Amarelo e Latossolo Vermelho Amarelo distrófico. Os locais foram georreferenciados com o auxílio de um GPS (Sistema de Posicionamento Global) e estão representados nas figuras 1, 2 e 3:



Figura 1 - Área de coleta de solo e raiz de *B. brizantha* no município de Nova Odessa – SP. Coordenada central S22°46'11.0 e W047°16'54.6



Figura 2 - Área de coleta de solo e raiz de *B. brizantha* na Embrapa Pecuária Sudeste, município de São Carlos – SP. Coordenada central: S21°57'20.3 e W047°49'43.0



Figura 3 - Área de coleta de solo e raiz de *B. brizantha* na Fazenda Marabá, no município de Campo Verde – MT. Coordenada central: S151601.9 e W550748.8

Foram escolhidas três áreas constituídas por pastagem de *B. brizantha* para a amostragem de solo e raiz, a fim de aumentar a probabilidade de diversidade no isolamento dos micro-organismos. Os locais foram preferencialmente onde o nitrogênio era limitante (solo deficiente que não foi adubado). Nestas condições poderia haver uma maior chance de se encontrar bactérias eficientes em promover o crescimento das plantas.

De cada área de estudo coletaram-se 12 amostras retiradas nas profundidades de 0-20 cm para solo e superficialmente para raízes de *B. brizantha*, aleatoriamente demarcadas. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas, 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 dos solos coletados em diferentes áreas de pastagem de *B. brizantha*. Nova Odessa-SP (NO), São Carlos-SP (SC) e Campo Verde – MT (CV)

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	-----	-----	-----	%	-----
NO	4,2	38	6	2,1	7	7	52	32,8	17	50,2
SC	5,1	45	8	1,7	20	16	31	50,6	9,3	40,1
CV	4,7	47	3	0,7	24	10	45	50,25	4,98	44,77

3.2 Isolamento e purificação das bactérias diazotróficas

O isolamento das bactérias diazotróficas rizosféricas baseou-se nas técnicas descritas por Döbereiner et al. (1995) e Bashan et al. (1993). Com o auxílio de uma pinça, um pedaço de raiz com solo rizosférico aderido de aproximadamente 1 cm foi transferido para frascos de penicilina contendo 5 ml de meio de cultivo semi- sólido JNFb (Tabela2), sem a adição de nitrogênio (DÖBEREINER et al., 1995).

Tabela 2 - Composição química do meio de cultura JNFb utilizado para o isolamento e crescimento de bactérias diazotróficas isoladas de *B. brizantha*

CONSTITUINTE	JNFb
Ácido málico (g L ⁻¹)	5,0
K ₂ HPO ₄ (g L ⁻¹)	0,6
KH ₂ PO ₄ (g L ⁻¹)	1,8
MgSO ₄ .7H ₂ O (g L ⁻¹)	0,2
NaCl (g L ⁻¹)	0,1
CaCl ₂ .2H ₂ O (g L ⁻¹)	0,02
Extrato de levedura (mg L ⁻¹) *	20
CuSO ₄ .5H ₂ O (mg L ⁻¹)	0,08
ZnSO ₄ .7H ₂ O (mg L ⁻¹)	2,4
H ₃ BO ₃ (mg L ⁻¹)	2,8
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (mg L ⁻¹)	2,0
MnSO ₄ .H ₂ O (mg L ⁻¹)	2,35
Na ₂ FeEDTA (mg L ⁻¹)	65,6
Biotina (mg L ⁻¹)	0,1
Pyridoxol – HCl (mg L ⁻¹)	0,2
KOH (g L ⁻¹)	4,5
Azul de bromotimol (mL, solução 0,5% em 0,2N KOH) **	2
pH	5,8
Agar (g L ⁻¹)	
- consistência semi-sólida	2,2
- consistência sólida	16
NH ₄ Cl ₃	1

* Usado no meio sólido como fonte de nitrogênio. ** 5 g de azul de bromotimol e 11,22 g KOH em 1000 mL de água.

As bactérias diazotróficas endofíticas foram isoladas segundo metodologia de Döbereiner et al. (1995) e Araújo et al. (2002). Para isto, 1g de raiz foi submetido à desinfestação superficial com cloramina-T a 1% por 15 minutos, seguido de lavagem com água esterilizada por 5 minutos e transferência para uma solução tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0).

As raízes desinfestadas foram maceradas no almofariz em 3 ml de solução salina 85%, a fim de se evitar a diluição dos endófitos e diminuir a probabilidade do isolamento de microorganismos de baixa frequência (ARAÚJO, 2002). Alíquotas de 0,1 ml foram inoculadas em frascos de penicilina contendo 5 ml de meio de cultivo semi - sólido JNFb, sem a adição de nitrogênio (DÖBEREINER et al., 1995).

Todos os frascos contendo o meio de cultivo inoculado com as bactérias rizosféricas e endofíticas foram incubados a 28°C por seis dias, avaliando-se posteriormente a presença ou ausência de crescimento bacteriano pela formação de película característica no meio de cultura (Figura 4).



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

Com o auxílio de uma alça de platina transferiu-se uma quantidade das culturas retiradas dos frascos de penicilina para novo frasco contendo o meio semi-sólido JNFb e incubou-se a 28°C até que uma nova película fosse formada. Então, as culturas foram riscadas em placas contendo o meio sólido JNFb, acrescido de 16 g de ágar e 20 mg de extrato de levedura, e incubadas a 28°C durante cinco dias.

Seis colônias visualmente diferentes crescidas em cada placa foram transferidas para um novo meio semi-sólido JNFb e, após a formação da película, foram riscadas em placas de petri contendo o meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA).

Este processo foi repetido várias vezes até se obter culturas puras, as quais foram mantidas no meio JNFb sólido e armazenadas nos meios líquidos JNFb e CC (tabela 3) com glicerol 50% (1:1) a -20 °C (RENNIE, 1981; DÖBEREINER et al., 1995).

Tabela 3 - Composição química do meio de cultura CC utilizado para a realização da análise de determinação do caráter diazotrófico das estirpes bacterianas isoladas de *B. brizantha*

CONSTITUINTE	CC
Sacarose (g L ⁻¹)	5,0
Manitol (g L ⁻¹)	5,0
Lactato de sódio (mL, 50%, v/v)	0,6
K ₂ HPO ₄ (g L ⁻¹)	0,8
KH ₂ PO ₄ (g L ⁻¹)	1,8
MgSO ₄ .7H ₂ O (g L ⁻¹)	0,2
NaCl (g L ⁻¹)	0,1
CaCl ₂ .2H ₂ O (g L ⁻¹)	0,02
Extrato de levedura (mg L ⁻¹) *	20
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (mg L ⁻¹)	2,0
Na ₂ FeEDTA (mg L ⁻¹)	65,6
Biotina (mg L ⁻¹)	0,1
PABA (mg L ⁻¹)	0,01
Azul de bromotimol (mL, solução 0,5% em 0,2N KOH)**	2
pH	7
Agar (g L ⁻¹)	
- consistência semi-sólida	2,2
- consistência sólida	16

* Usado no meio CC semi-sólido e líquido como fonte de nitrogênio. ** 5 g de azul de bromotimol e 11,22 g KOH em 1000 mL de água.

Ao todo foram obtidos 110 isolados bacterianos entre rizosféricos e endofíticos. Devido à inviabilidade em se trabalhar com um número tão grande de estirpes bacterianas, de cada um dos 12 pontos de coleta das áreas de estudo, sorteou-se um isolado endofítico e um isolado rizosférico, totalizando 72 isolados bacterianos para realização dos testes bioquímicos. As áreas experimentais de Nova Odessa-SP, São Carlos-SP e Campo Verde-MT, ficaram representadas por 12 isolados rizosféricos e 12 isolados endofíticos cada uma, em um total de 24 estirpes por área de estudo.

Assim, as análises de identificação do potencial biotecnológico das bactérias descritos a seguir foram realizadas com apenas 72 isolados de um total de 110.

3.3 Análise de produção de ácido-indol-acético (AIA)

A análise de produção de ácido-indol-acético foi realizada através do método colorimétrico descrito por Bric et al. (1991). Para isto, cada um dos 72 isolados foi inoculado em tubo de ensaio contendo 3 ml do meio de cultivo Luria Bertani (LB) composto pelos seguintes reagentes (g L⁻¹):

triptona, 10; extrato de levedura, 5; cloreto de sódio, 5; suplementado com 1 g L^{-1} de L-triptofano (precursor para a síntese do ácido-indol-acético).

Os tubos foram incubados a 28°C por dois dias sob constante agitação de 150 rpm. Utilizaram-se três réplicas para cada isolado bacteriano. Após o período de incubação sob agitação, 1.5mL de cada cultura homogeneizada foi transferida para tubos eppendorf e centrifugado a 12.000 rpm por dois minutos.

Os tubos foram retirados da centrífuga e 100 μl do sobrenadante foram transferidos para microplacas de elisa e adicionados 100 μl do reagente de Salkowski, constituído por: 1 ml de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5 M (1.35g/10ml) adicionado a 49 ml de HClO_4 (35%) (GORDON E WEBER, 1951). Vinte minutos após a adição do reagente foi realizada a leitura da placa no comprimento de onda de 530 nm, utilizando o aparelho microplate reader Cary ® 50 (Varian. Walnut Creek. CA. USA).

A concentração dos compostos indólicos foi estimada com uma curva-padrão previamente preparada com quantidades conhecidas de ácido-indol-acético comercial (0; 25; 50; 100; 150; 200 $\mu\text{g/ml}$ de AIA puro). A coloração rosa indica a produção do hormônio vegetal. Os dados expressos em $\mu\text{g/ml}$ foram transformados para raiz quadrada e submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey a 5% de significância para comparação de médias através do programa estatístico SAS versão 9.1.

3.4 Avaliação da atividade da nitrogenase

A análise do caráter diazotrófico das bactérias foi realizada através do método de aumento na concentração de nitrogênio total (N-total) no meio de cultura e confirmada através da técnica de redução de acetileno (ARA).

As análises foram realizadas através da utilização do meio de cultivo semi-sólido CC (Tabela 3) por possuir três fontes de carbono e 100 mg L^{-1} de extrato de levedura utilizado como fonte de fatores orgânicos de crescimento e “iniciador” de nitrogênio sem inibir a redução de acetileno (RENNIE, 1981).

Para determinação de acúmulo de nitrogênio cada um dos isolados bacterianos, em triplicata, foi inoculado em meio de cultivo semi-sólido CC, contido em frasco de penicilina. Após sete dias 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 72 horas (NERONI, 2007).

Então, as culturas liofilizadas foram homogeneizadas com o auxílio de uma espátula e alíquotas de aproximadamente 10 mg foram utilizadas para determinação da concentração de nitrogênio total em analisador elementar NCS Soil Analyzer Flash EA 1112 (Thermo Electron Corporation).

O meio de cultivo CC sem a inoculação de bactérias foi utilizado como controle. As estirpes-tipo de *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae* e um isolado pertencente ao gênero *Burkholderia* da Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas da Embrapa Agrobiologia foram utilizadas 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.

A confirmação do caráter diazotrófico das estirpes bacterianas foi realizada através da técnica de redução de acetileno (ARA). Para isto, com auxílio de uma alça de platina uma colônia pura de cada isolado foi inoculada em meio de cultura CC líquido e cultivada por 24h a 28°C sob constante agitação (150rpm).

Uma alíquota de $20\mu\text{l}$ da suspensão foi, em triplicata, inoculada em frascos de penicilina com capacidade de 15 ml contendo 5 ml do meio semi-sólido CC e incubada durante 24h a 28°C . Após a formação da película característica na superfície do meio de cultivo, os frascos foram fechados com rolhas de borracha perfurável (tipo *sub Seal*) e lacrados com lacres metálicos para evitar a perda do gás (Figura 5).



Figura 5 - Frascos de penicilina vedados com rolhas de borracha perfurável (tipo *sub seal*) e lacrados com lacres metálicos para evitar a perda do gás acetileno

Com auxílio de uma seringa 10% da fase gasosa do frasco (1 ml) foi retirada e a mesma quantidade de gás acetileno, com pureza de 98-99% foi injetado.

Devido às grandes variações de tempo de incubação com o gás acetileno descritas por na literatura, optou-se por um tempo de 1h, a fim de não superestimar a atividade da enzima e evitar possíveis problemas como a possibilidade de conversão do gás acetileno a etileno pela composição das rolhas utilizadas para vedar os frascos.

Para a obtenção da concentração de gás etileno formado no frasco, 1 ml da fase gasosa foi retirada com seringa modelo Gastight, marca Hamilton de 2,5 ml, e injetado em um cromatógrafo a gás marca Thermo Finnigan, modelo Trace 2000GC, com duas colunas Porapack N. O tempo de corrida para a determinação da concentração de etileno foi de 1 minuto.

Nesta análise o meio de cultura semi-sólido CC sem bactérias inoculadas e um isolado bacteriano sabidamente não fixador de N₂ foram utilizados como controle negativo do método (NERONI, 2007). As estirpes-tipo de *A. brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae* e um isolado pertencente ao gênero *Burkholderia* da Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas da Embrapa Agrobiologia foram utilizadas como controle positivo e qualitativo do método.

Os valores de redução de acetileno obtidos em ppm (mg/L) foram transformados para micromol por hora de incubação ($\mu\text{mol h}^{-1}$), utilizando-se o seguinte cálculo:

Para se ter 1 mol de qualquer gás são necessários 22,4 L ou 22400 ml de gás.

1 mol ---- 22400 mL de gás

V_1 ----- 1 mL (volume de gás injetado no cromatógrafo)

$V_1 = 4,46428 \times 10^{-5}$ moles

Valor da área do pico do etileno puro é igual a $4,46428 \times 10^{-5}$ moles

Exemplo:

Pico etileno 120000000 ----- $4,46428 \times 10^{-5}$ moles

Pico amostra 90000000 ----- V_2

$V_2 = 3,348 \times 10^{-5}$ moles p/ 1h (tempo que incubou)

Onde, V_1 é o número de mols contidos em 1ml de gás etileno padrão que foi injetado no cromatógrafo. V_2 é o número de mols contidos em 1 ml de gás de cada amostra injetado no cromatógrafo. Os dados foram transformados para \log_{10} 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.

3.5 Eficiência das bactérias em promover o crescimento de *B. brizantha*

Para avaliar a eficiência das bactérias diazotróficas em promover o crescimento da *B. brizantha* foi realizado um experimento em casa de vegetação com duração de 2 meses e meio.

Inicialmente, as sementes de *B. brizantha* foram desinfestadas através da imersão em etanol 70% por 5 minutos, seguido de imersão em hipoclorito de sódio 5% por 20 minutos e posterior lavagem em água esterilizada. Após a desinfestação as sementes tiveram sua dormência quebrada pela imersão em ácido sulfúrico concentrado por 13 minutos, lavadas em água corrente, mantidas por 60 minutos em recipiente contendo 200 ml de água para total eliminação do ácido (DIAS E TOLEDO, 1993).

As sementes foram semeadas em bandejas contendo o substrato areia e vermiculita (proporção de 2:1) autoclavado. Após 2 semanas 2 mudas contendo aproximadamente 3 cm foram transplantadas para cada um dos vasos com capacidade de 700 ml contendo o mesmo substrato autoclavado utilizado para germinação das sementes.

Para a produção do inoculante foram utilizadas as 72 estirpes bacterianas cultivadas em 2 ml de meio CC líquido a 28°C sob constante agitação até saturação visual do meio (1-2 dias). Os inoculantes foram armazenados a 4°C até o momento de sua utilização (LAMMEL, 2007).

Na primeira semana as plantas foram irrigadas com solução de Hoagland com 1/3 de nitrogênio e após este período de adaptação houve a inoculação de 2 ml das suspensões bacterianas nos vasos. Os inóculos foram novamente adicionados ao solo dos vasos com plantas após 1 mês e meio de experimento.

Além dos vasos contendo as diferentes estirpes de *B. brizantha*, foram utilizados três controles contendo plantas não inoculadas com bactérias: um irrigado com solução de Hoagland completa, outro irrigado com solução de Hoagland com 1/3 de nitrogênio e por fim um irrigado com solução de Hoagland sem nitrogênio.

Foi adotado um delineamento experimental inteiramente casualizado com 75 tratamentos (72 estirpes bacterianas mais 3 controles). Foram utilizadas quatro repetições por tratamento, sendo que cada vaso representou uma parcela, totalizando 300 parcelas (Figura 6).



Figura 6 - Experimento de promoção de crescimento de plantas de *B. brizantha* conduzido em casa de vegetação após a inoculação das suspensões bacterianas

As plantas foram irrigadas diariamente e quando necessário, mais de uma vez ao dia, com água destilada autoclavada, recebendo uma vez por semana, fertilização básica de solução de Hoagland sem a adição de nitrogênio (HOAGLAND E ARNON, 1950).

Após 2 meses e meio de experimento avaliou-se a promoção do crescimento das plantas pelo aumento da matéria seca da parte aérea e raiz quando comparadas com os controles (plantas não inoculadas). Foi realizada a análise do teor de nitrogênio total da parte aérea através do método micro-Kjeldhal, metodologia empregada para a determinação do teor de nitrogênio em materiais biológicos (MALAVOLTA et al., 1989).

Os dados obtidos 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.

3.6 Identificação dos isolados bacterianos

3.6.1 Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi feita através da utilização do Kit Bacterial Genomic DNA Isolation da Norgen Biotek Corporation, seguindo as instruções do fabricante.

A eficácia da metodologia utilizada foi comprovada através da visualização do DNA em gel de agarose (Invitrogen) a 1% p/v em tampão TAE 1X (400 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1 MM EDTA), durante 40 minutos a 50V. Utilizou-se 1kb de DNA ladder (Invitrogen) como padrão de tamanho e de concentração das bandas formadas. O gel de agarose contendo o DNA extraído foi visualizado em transiluminador com luz ultravioleta, escaneado e registrado no densitômetro Storm 845 (GE Healthcare, Waukesha, Wisconsin, USA).

3.6.2 Amplificação do gene 16S rRNA

O gene 16S rRNA foi parcialmente amplificado através da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Foram utilizados dois diferentes oligonucleotídeos iniciadores: pR1387 (5' CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG 3') (HEUER et al., 1997) e p027 (5' GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3') (LANE et al., 1985). A reação de amplificação com um volume final de 50 µl consistiu na seguinte mistura: 1 µl de DNA (20ng), 7,5 µl MgCl₂ (25mM), 4 µl de dNTP's (2,5mM), 0,1 µl dos *primers* pR1387 e p027 (100mM), 5 µl Taq Buffer (10X), 0,5 µl de *Taq* DNA polimerase (5 U.µL⁻¹) e 31,8 µl de água milli-Q autoclavada.

A amplificação foi realizada em um termociclador Gene Pro Thermal Cycler modelo TC-E*. Foram utilizados os seguintes ciclos: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos; 35 ciclos de desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (63°C por 1 minuto), extensão (72°C por 1 minuto); e uma extensão final a 72°C por 10 minutos (ODEE et al., 2002).

Após a amplificação do gene 16S rDNA 2 µl do produto de PCR foi avaliado em gel de agarose (Invitrogen) a 1% p/v em tampão TAE 1X (400 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1 MM EDTA), durante 50 minutos a 50V. Utilizou-se 1kb de DNA ladder (Invitrogen) como padrão de tamanho e de concentração das bandas formadas. O gel de agarose foi visualizado em transiluminador com luz ultravioleta, scaneado e fotodocumentado no densitômetro Storm 845 (GE Healthcare, Waukesha, Wisconsin, USA).

3.6.3 Purificação do DNA amplificado

A purificação dos produtos de PCR (16S rDNA) para posterior sequenciamento foi realizada utilizando o Kit Invisorb Fragment CleanUp (50 reações), seguindo as instruções do fabricante (Invitek).

Após a purificação, 2 µl do produto de PCR foi avaliado por eletroforese em gel de agarose a 1% p/v em tampão TAE 1X (400 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1 mM EDTA), durante 50 minutos a 50V.

Utilizou-se 1kb de DNA ladder (Invitrogen) como padrão de tamanho e de concentração das bandas formadas. O gel de agarose foi visualizado em transiluminador com luz ultravioleta, scaneado e fotodocumentado no densitômetro Storm 845 (GE Healthcare, Waukesha, Wisconsin, USA).

3.6.4 Reação de sequenciamento e purificação

Para a realização da reação de sequenciamento utilizou-se 100ng de DNA purificado, 2 µl de ET Terminator (*GE Health Care - "General Electrics Health Care"*), 2 µl do Tampão "Save Money" (200 mM Tris-HCl pH 9,0; 5mM MgCl₂.6H₂O), 1µl dos oligonucleotídeos 63F (5' GGA TCC CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC 3') e 704R (5' CTG CTG CCT CCC GTA GG 3') (5 pmol) e água ultra-pura autoclavada para completar o volume final de 10 µl.

A reação foi conduzida em um termociclador Gene Pro Thermal Cycler, utilizando-se 25 ciclos: desnaturação (95°C por 20 segundos), anelamento (55°C por 15 segundos) e extensão (60°C por 1 minuto).

Após o término da reação de seqüenciamento, o produto de PCR foi purificado com acetato de sódio, segundo as instruções do fabricante (*GE Health Care*). Então, utilizaram-se 10µl de formamida para ressuspender o precipitado e em seguida este foi submetido ao seqüenciador automático ABI-3100 (*Applied Biosystems*), seguindo instruções do fabricante.

3.6.5 Análise das sequencias

A determinação das sequencias consenso foi realizada utilizando-se o programa Codoncode Aligner v. 2.0.4 (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA). Foram considerados somente os nucleotídeos com valor de qualidade de sequenciamento maior ou igual a 500. Em seguida foi feita uma busca de similaridade no banco de dados *GenBank* através do programa BLASTn. Este programa esta disponível no site NCBI (National Center for Biotechnology Information – www.ncbi.nlm.nih.gov). Foi identificada a similaridade das sequencias dos isolados obtidos no presente trabalho com as sequencias existentes no banco de dados.

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento

Ao todo foram obtidas 110 estirpes bacterianas isoladas de raiz e solo rizosférico de amostras de *B. brizantha* provenientes de três diferentes áreas de coleta de amostras: Nova Odessa-SP, São Carlos-SP e Campo Verde-MT (Tabela 4).

Tabela 4 - Número total de estirpes bacterianas por área de estudo isoladas de amostras de raiz e solo rizosférico de *B. brizantha* coletadas em três diferentes áreas: Nova Odessa-SP, São Carlos-SP e Campo Verde-MT

Áreas de coleta	Rizosféricos	Endofíticos	Total
Nova Odessa – SP	23	22	45
São Carlos – SP	18	14	32
Campo Verde – MT	18	15	33
TOTAL	-	-	110

4.2 Produção de ácido-indol-acético (AIA)

Das 72 estirpes sorteadas para avaliações mais detalhadas, 68 foram capazes de produzir o hormônio vegetal ácido-indol-acético quando cultivadas em meio de cultivo LB, na presença do aminoácido L-triptofano (BRIC et al., 1991). Os isolados produziram AIA em proporções que variaram de 0,39µg/mL a 195 µg/mL do meio de cultura.

As estirpes isoladas da área de Nova Odessa-SP produziram de 2,19µg/mL (NOE7) a 53,80µg/mL (NOE12) de ácido-indol-acético (Figura 7).

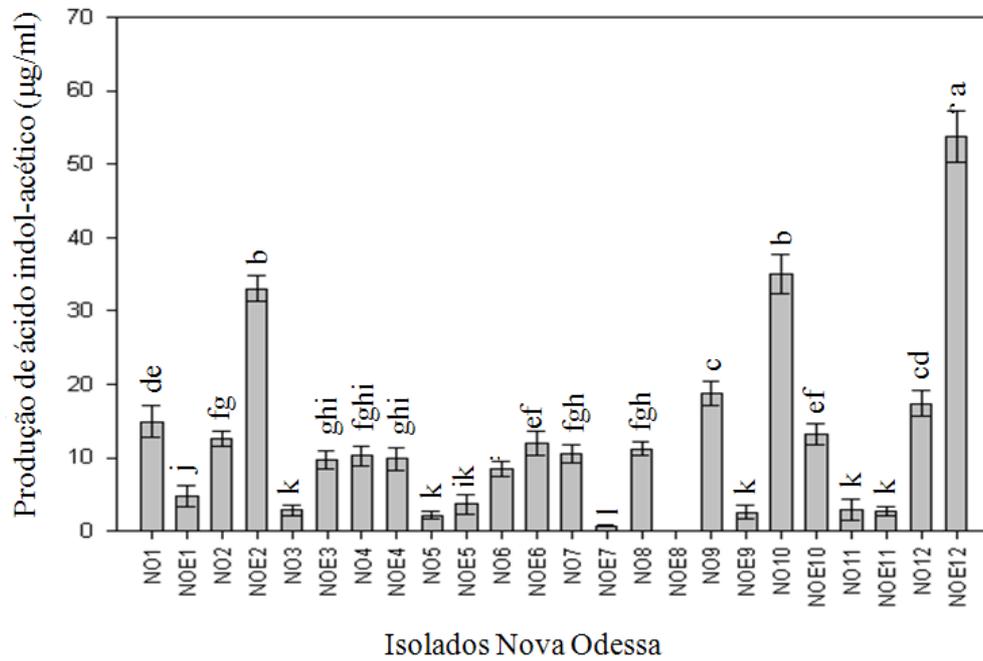


Figura 7 - Produção do hormônio vegetal ácido-indol-acético por bactérias diazotróficas isoladas da raiz e solo rizosférico de *B. brizantha* coletadas em uma área localizada na cidade de Nova Odessa-SP

As estirpes isoladas da área de São Carlos-SP produziram 1,05µg/mL (Ee9) a 45,31µg/mL (Ee2) de AIA (Figura 8).

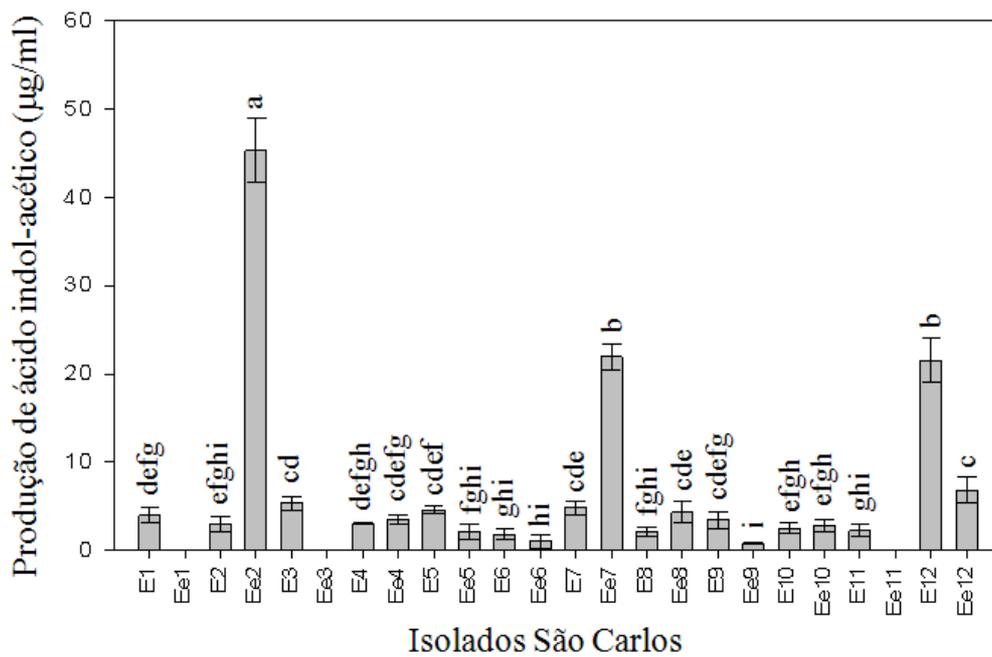


Figura 8 - Produção do hormônio vegetal ácido-indol-acético por bactérias diazotróficas isoladas da raiz e solo rizosférico de *B. brizantha* coletadas em uma área localizada na cidade de São Carlos-SP

Já as estirpes bacterianas isoladas da área de Campo Verde-MT apresentaram uma produção de 5,82 µg/mL (Ce11A) a 195,40 µg/mL (C9D) de AIA (Figura 9).

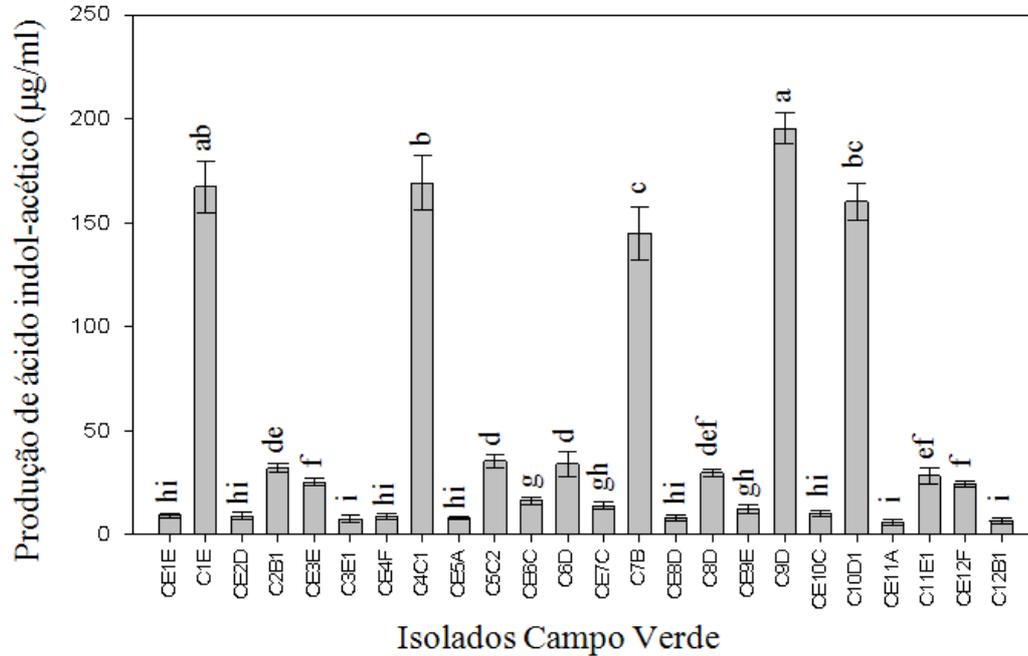


Figura 9 - Produção do hormônio vegetal ácido-indol-acético por bactérias diazotróficas isoladas da raiz e solo rizosférico de *B. brizantha* coletadas em uma área localizada na cidade de Campo Verde-MT

As maiores concentrações de ácido-indol-acético encontradas no presente estudo foram aquelas das estirpes provenientes de Campo Verde – MT. As maiores produtoras foram: C9 (*Sphingomonas* sp.), C4 (*Pseudomonas* sp.), C1 (*Azospirillum* sp.), C10 (*Azospirillum* sp.) e C7 (*Azospirillum* sp.). Durante 48h de crescimento em meio de cultivo contendo o precursor para a síntese de AIA (L-triptofano), produziram respectivamente 195,40, 169,32, 167,19, 160,28 e 145,18 µg/ml de ácido-indol-acético (Figura 10).

Apenas 4 isolados não produziram o hormônio vegetal, um de Nova Odessa-SP (NOe8) e três de São Carlos-SP (Ee1, Ee3 e Ee11).

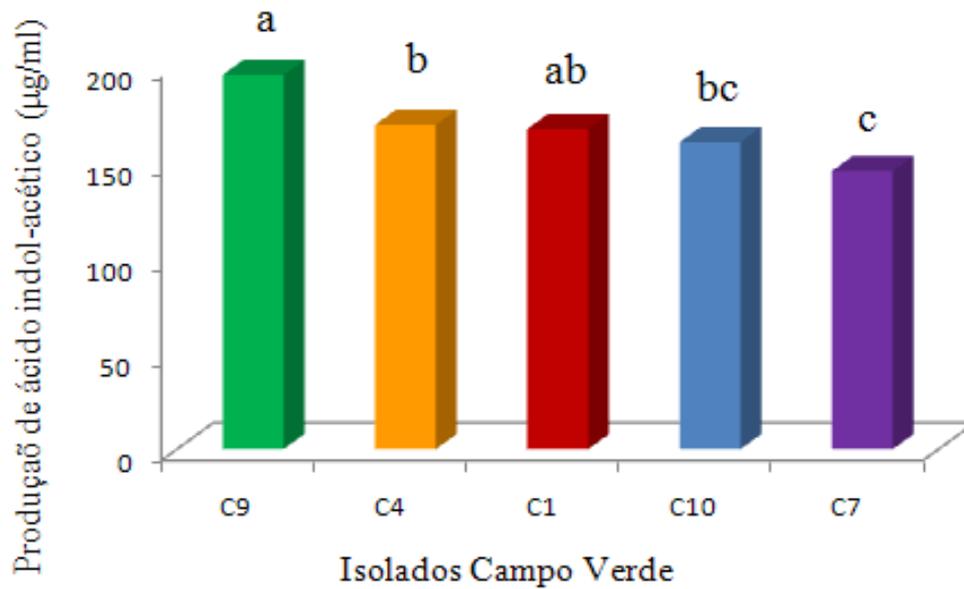


Figura 10 - Produção do hormônio vegetal ácido-indol-acético por bactérias diazotróficas isoladas da rizosfera de *B. brizantha* coletada em área localizada na cidade de Campo Verde-MT

4.3 Atividade da enzima nitrogenase

Das 72 estirpes bacterianas sorteadas que foram isoladas de raiz e solo rizosférico de *B. brizantha*, 10 apresentaram atividade da nitrogenase *in vitro*, quando submetidas ao método de aumento na concentração de N, quando cultivadas em culturas puras (tabela 5).

Tabela 5 - Concentração de nitrogênio em culturas puras de bactérias diazotróficas isoladas de raiz e rizosfera de *B. brizantha*, após 7 dias de crescimento em meio CC, a 28°C. NO (Nova Odessa-SP), SC (São Carlos-SP) e CV (Campo verde-CV)

Isolados NO	N-Total (%)*
NOE7(<i>Stenotrophomonas</i> sp.)	0,1566ab
NOE8(<i>Stenotrophomonas</i> sp.)	0,1666a
Br	0,1166c
Isolados SC	N-Total (%)*
E2(<i>Stenotrophomonas</i> sp.)	0.1500a
E3(<i>Rhizobium</i> sp.)	0.1500a
E4(<i>Stenotrophomonas</i> sp.)	0.1500a
E10(<i>Stenotrophomonas</i> sp.)	0.1466ab
E11(<i>Stenotrophomonas</i> sp.)	0.1466ab
E12(<i>Sphingomonas</i> sp.)	0.1533a
Br	0,1166c
Isolados CV	N-Total (%)*
C9(<i>Sphingomonas</i> sp.)	0,1700a
CE11(<i>Stenotrophomonas</i> sp.)	0,1633ab
Br	0,1166c

*Média de três repetições

A concentração de N de todas as estirpes bacterianas comparada com o controle (Br) contendo o meio de cultivo CC sem a inoculação de bactérias, está representada na tabela 6.

Tabela 6 - Concentração de nitrogênio total (N-Total) em culturas puras de bactérias diazotróficas isoladas da raiz e rizosfera de *B. brizantha*, após 7 dias de crescimento em meio CC a 28°C. NO (Nova Odessa-SP), SC (São Carlos-SP) e CV (Campo verde-MT)

(continua)					
Isolados NO	N-Total (%)*	Isolados SC	N-Total (%)*	Isolados CV	N-Total (%)*
NO1	0.1166c	E1	0.1366abc	C1	0.1500abc
NO2	0.1233c	E2	0.1500a	C2	0.1300abc
NO3	0.1300bc	E3	0.1500a	C3	0.1500abc
NO4	0.1266bc	E4	0.1500a	C4	0.1466abc
NO5	0.1266bc	E5	0.1400abc	C5	0.1366abc
NO6	0.1200c	E6	0.1400abc	C6	0.1533abc
NO7	0.1200c	E7	0.1400abc	C7	0.1266abc
NO8	0.1166c	E8	0.1400abc	C8	0.1400abc
NO9	0.1200c	E9	0.1400abc	C9	0.1700a
NO10	0.1200c	E10	0.1466ab	C10	0.1566abc

Tabela 6 - Concentração de nitrogênio total (N-Total) em culturas puras de bactérias diazotróficas isoladas da raiz e rizosfera de *B. brizantha*, após 7 dias de crescimento em meio CC a 28°C. NO (Nova Odessa-SP), SC (São Carlos-SP) e CV (Campo verde-MT)

(conclusão)

Isolados NO	N-Total (%)*	Isolados SC	N-Total (%)*	Isolados CV	N-Total (%)*
NO11	0.1300bc	E11	0.1466ab	C11	0.1200bc
NO12	0.1300bc	E12	0.1533a	C12	0.1466abc
NOE1	0.1233c	Ee1	0.1400abc	CE1	0.1300abc
NOE2	0.1233c	Ee2	0.1400abc	CE2	0.1400abc
NOE3	0.1200c	Ee3	0.1366abc	CE3	0.1266abc
NOE4	0.1166c	Ee4	0.1300abc	CE4	0.1466abc
NOE5	0.1233c	Ee5	0.1300abc	CE5	0.1333abc
NOE6	0.1300bc	Ee6	0.1333abc	CE6	0.1366abc
NOE7	0.1566ab	Ee7	0.1400abc	CE7	0.1333abc
NOE8	0.1666a	Ee8	0.1233bc	CE8	0.1266abc
NOE9	0.1400abc	Ee9	0.1400abc	CE9	0.1433abc
NOE10	0.1300bc	Ee10	0.1366abc	CE10	0.1366abc
NOE11	0.1366abc	Ee11	0.1333abc	CE11	0.1633ab
NOE12	0.1266bc	Ee12	0.1366abc	CE12	0.1500abc
Controle	0.1166c	Controle	0.1166c	Controle	0.1166c

*Média de três repetições. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

A confirmação do caráter diazotrófico das estirpes foi realizada através da técnica de redução de acetileno (ARA). A maioria das estirpes diferiu significativamente dos controles contendo meio de cultura sem a inoculação de bactérias (Br) e do controle inoculado com um isolado sabidamente não diazotrófico (sem acúmulo de nitrogênio no meio de cultivo e sem atividade de redução de acetileno) (*Pseudomonas* sp.) (NERONI, 2007) (Tabela 7).

Tabela 7 - Atividade de redução de acetileno em culturas puras de bactérias diazotróficas isoladas de raiz e rizosfera de *B. brizantha*, após 24 h de crescimento em meio CC, a 28°C. NO (Nova Odessa-SP), SC (São Carlos-SP) e CV (Campo verde-MT)

(continua)

Isolados NO	ARA*($\mu\text{mol h}^{-1}$)	Isolados SC	ARA*($\mu\text{mol h}^{-1}$)	Isolados CV	ARA*($\mu\text{mol h}^{-1}$)
NO1	293,3fgh	E1	351,3cde	C1	1679,5cdef
NO2	-	E2	1777,8ab	C2	645,6jk
NO3	-	E3	2310,8a	C3	522,1ijk
NO4	1112,7bc	E4	3135,6a	C4	8143,9a
NO5	288,1fgh	E5	2086,9a	C5	613,1hijk
NO6	412,4efg	E6	426,4cd	C6	337,7kl

Tabela 7 - Atividade de redução de acetileno em culturas puras de bactérias diazotróficas isoladas de raiz e rizosfera de *B. brizantha*, após 24 h de crescimento em meio CC, a 28°C. NO (Nova Odessa-SP), SC (São Carlos-SP) e CV (Campo verde-MT)

(conclusão)					
Isolados NO	ARA*($\mu\text{mol h}^{-1}$)	Isolados SC	ARA*($\mu\text{mol h}^{-1}$)	Isolados CV	ARA*($\mu\text{mol h}^{-1}$)
NO7	364,8fg	E7	1861,6a	C7	7766,8a
NO8	-	E8	1532,3ab	C8	1081,0efgh
NO9	314,0fgh	E9	1359,6ab	C9	639,1jk
NO10	-	E10	1920,9a	C10	4990,5ab
NO11	-	E11	1586,6ab	C11	468,8jk
NO12	275,4fgh	E12	2872,0a	C12	461,4jkl
NOE1	1404,9abc	Ee1	1700,7ab	CE1	2363,3cd
NOE2	518,2def	Ee2	1862,7a	CE2	1247,3defgh
NOE3	-	Ee3	2633,1a	CE3	1283,1defg
NOE4	159,5h	Ee4	3128,1a	CE4	916,8efghij
NOE5	900,2cd	Ee5	1903,1a	CE5	1211,4defgh
NOE6	903,4cd	Ee6	1864,1a	CE6	38,4n
NOE7	990,5bcd	Ee7	2133,7a	CE7	907,0efghij
NOE8	1135,4bc	Ee8	1850,0ab	CE8	1133,9defgh
NOE9	1087,6bc	Ee9	747,3bc	CE9	1050,7efghi
NOE10	-	Ee10	2750,8a	CE10	1385,4cdef
NOE11	723,9cde	Ee11	1518,5ab	CE11	646,1ghijk
NOE12	1303,5bc	Ee12	2046,6a	CE12	806,4fghij
Br	218,0gh	Br	218,0de	Br	218,0lm
<i>Burkholderia</i> ¹	1363,2bc	<i>Burkholderia</i> ¹	1363,2ab	<i>Burkholderia</i> ¹	1363,2cdef
<i>H. seropedicea</i> ¹	2786,8a	<i>H. seropedicea</i> ¹	2786,8a	<i>H. seropedicea</i> ¹	2786,8bc
<i>A. brasilense</i> ¹	1950,5ab	<i>A. brasilense</i> ¹	1950,5a	<i>A. brasilense</i> ¹	1950,5cde
<i>Pseudomonas sp</i> ²	163,6h	<i>Pseudomonas sp</i> ²	163,6e	<i>Pseudomonas sp</i> ²	163,6m

*Média de três repetições. ¹ Estirpes – tipo da Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas da Embrapa Agrobiologia. ² Controle negativo por não ter apresentado aumento na concentração de N-total e atividade de redução de acetileno. - amostras perdidas.

As estirpes bacterianas C4 (*Azospirillum sp.*) e C7 (*Azospirillum sp.*) isoladas da rizosfera de *B. brizantha* da área de Campo Verde-MT se destacaram das demais por apresentar diferença significativa quando comparadas às estirpes-tipo da Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas da Embrapa Agrobiologia (Figura 11).

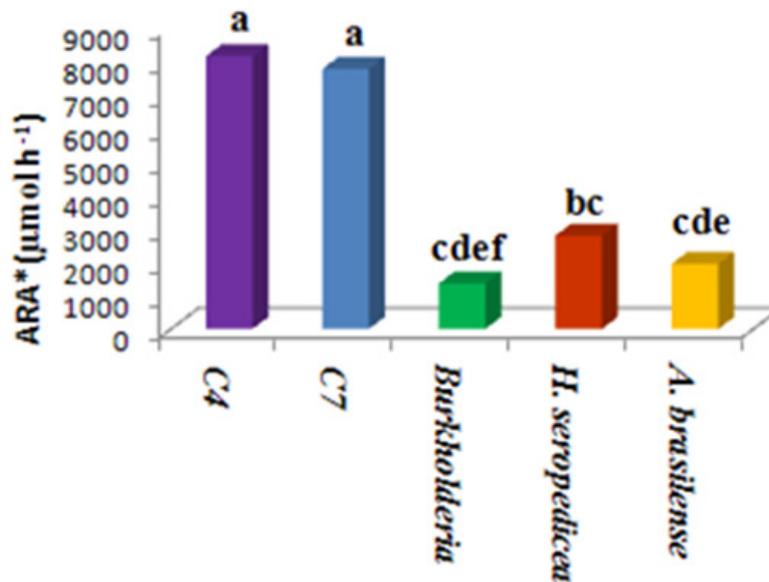


Figura 11 - Atividade de redução de acetileno em culturas puras de bactérias diazotróficas isoladas da rizosfera de *B. brizantha* da área de Campo Verde-MT após 24 h de crescimento em meio CC a 28°C

4.4 Efeito das bactérias no crescimento da *B. brizantha*

Após 2 meses e meio de condução do experimento em casa de vegetação as plantas de *B. brizantha* foram coletadas para avaliação do efeito no seu crescimento quando inoculadas com as suspensões bacterianas isoladas no presente trabalho.

Os dados de crescimento obtidos pela determinação da matéria seca da parte aérea das plântulas inoculadas com as estirpes isoladas das áreas de Nova Odessa-SP, São Carlos-SP e Campo Verde-MT, apresentaram respectivamente a seguinte variação: 1,0 a 1,63 g, 0,86 a 1,66g e 0,98 a 1,56g (Tabela 8).

Tabela 8 - Matéria seca da parte aérea (MSPA) das plantas de *B. brizantha*. NO (Nova Odessa-SP), SC (São Carlos-SP) e CV (Campo verde-MT)

Isolados NO	MSPA*	Isolados SC	MSPA*	Isolados CV	MSPA*
NO1	1.07b	E1	0.86b	C1	1.14b
NO2	1.12b	E2	1.24b	C2	1.11b
NO3	1.09b	E3	1.20b	C3	1.10b
NO4	1.06b	E4	1.11b	C4	1.19b
NO5	1.15b	E5	1.12b	C5	1.19b
NO6	1,16b	E6	1.18b	C6	1.03b
NO7	1.13b	E7	1.09b	C7	1.02b
NO8	1.18b	E8	1.19b	C8	1.15b
NO9	1.05b	E9	1.08b	C9	1.08b
NO10	1.07b	E10	1.14b	C10	1.16b
NO11	1.19b	E11	1.18b	C11	1.06b
NO12	1.18b	E12	1.16b	C12	1.08b
NOE1	1.18b	Ee1	1.17b	CE1	1.16b
NOE2	1,63b	Ee2	1.19b	CE2	1.22b
NOE3	1.13b	Ee3	1.66b	CE3	1.13b
NOE4	1.22b	Ee4	1.11b	CE4	1.10b
NOE5	1.02b	Ee5	1.14b	CE5	1.20b
NOE6	1.14b	Ee6	1.21b	CE6	0.98b
NOE7	1.07b	Ee7	1.31b	CE7	1.17b
NOE8	1.06b	Ee8	1.16b	CE8	1.26b
NOE9	1.23b	Ee9	1.15b	CE9	1.22b
NOE10	1.06b	Ee10	1.22b	CE10	1.08b
NOE11	1.07b	Ee11	1.16b	CE11	1.16b
NOE12	1.00b	Ee12	1.21b	CE12	1.13b
Solução completa	4.27a	Solução completa	4.27a	Solução completa	4.27a
Solução 1/3 de N	1.07b	Solução 1/3 de N	1.07b	Solução 1/3 de N	1.07b
Solução sem N	0.41c	Solução sem N	0.41c	Solução sem N	0.41c

*Média de quatro repetições. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

Os dados de crescimento obtidos pela determinação da matéria seca da raiz da *B. brizantha* inoculada com as estirpes isoladas das três áreas de estudo apresentaram a seguinte variação: Nova Odessa-SP de 1,04 a 1,87g, São Carlos-SP de 1,03 a 1,56g e Campo Verde-MT de 0,97 a 1,62g (Tabela 9).

Tabela 9 - Matéria seca da raiz (MSR) das plantas de *B. brizantha*. NO (Nova Odessa-SP), SC (São Carlos-SP) e CV (Campo verde-MT)

Isolados NO	MSR*	Isolados SC	MSR*	Isolados CV	MSR*
NO1	1.87b	E1	1.06b	C1	1.08bc
NO2	1.63b	E2	1.31b	C2	1.16b
NO3	1.49b	E3	1.32b	C3	1.33b
NO4	1.43b	E4	1.22b	C4	1.19b
NO5	1.55b	E5	1.27b	C5	1.34b
NO6	1.24b	E6	1.56b	C6	1.02bc
NO7	1.26b	E7	1.41b	C7	1.05bc
NO8	1.04bc	E8	1.37b	C8	1.19b
NO9	1.66b	E9	1.09b	C9	0.97bc
NO10	1.32b	E10	1.25b	C10	1.07bc
NO11	1.45b	E11	1.03bc	C11	1.04bc
NO12	1.45b	E12	1.16b	C12	1.62b
NOE1	1.41b	Ee1	1.27b	CE1	1.38b
NOE2	1.20b	Ee2	1.35b	CE2	1.17b
NOE3	1.27b	Ee3	1.10b	CE3	1.42b
NOE4	1.30b	Ee4	1.14b	CE4	1.41b
NOE5	1.16bc	Ee5	1.11b	CE5	1.45b
NOE6	1.52b	Ee6	1.24b	CE6	1.01bc
NOE7	1.13bc	Ee7	1.07b	CE7	1.45b
NOE8	1.32b	Ee8	1.17b	CE8	1.15b
NOE9	1.36b	Ee9	1.10b	CE9	1.22b
NOE10	1.21b	Ee10	1.10b	CE10	1.14b
NOE11	1.45b	Ee11	1.07b	CE11	1.27b
NOE12	1.09bc	Ee12	1.23b	CE12	1.43b
Solução completa	4.72a	Solução completa	4.72a	Solução completa	4.72a
Solução 1/3 de N	1.26b	Solução 1/3 de N	1.26b	Solução 1/3 de N	1.26b
Solução sem N	0.50c	Solução sem N	0.50c	Solução sem N	0.50c

*Média de quatro repetições. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os dados de crescimento obtidos pela determinação do teor de nitrogênio da parte aérea da *B. brizantha* inoculada com as estirpes isoladas das áreas de Nova Odessa-SP, São Carlos-SP e Campo Verde-MT, apresentaram respectivamente a seguinte variação: 40,2 a 59,4, 38,2 a 53,8 e 33,8 a 50,2 $\mu\text{g N 1g}$ matéria seca (Tabela 10).

Tabela 10 - Teor de nitrogênio ($\mu\text{g N 1g}$ matéria seca) da parte aérea das plantas de *B. brizantha*, determinado através do método micro-Kjeldhal. NO (Nova Odessa-SP), SC (São Carlos-SP) e CV (Campo verde-MT)

Isolados NO	Teor de N *	Isolados SC	Teor de N*	Isolados CV	Teor de N*
NO1	48,4b	E1	50,4bc	C1	45,1bc
NO2	49,7b	E2	47,4bc	C2	45,8bc
NO3	48,4b	E3	49,3bc	C3	41,7bc
NO4	51,5b	E4	50,6bc	C4	40,5bc
NO5	44,4b	E5	38,2c	C5	44,8bc
NO6	46,7b	E6	43,3bc	C6	46,0bc
NO7	50,9b	E7	48,1bc	C7	43,4bc
NO8	48,8b	E8	45,0bc	C8	44,2bc
NO9	40,2b	E9	49,0bc	C9	40,2bc
NO10	44,9b	E10	45,6bc	C10	42,9bc
NO11	44,7b	E11	45,3bc	C11	45,7bc
NO12	48,1b	E12	47,8bc	C12	45,4bc
NOE1	41,0b	Ee1	45,1bc	CE1	46,6bc
NOE2	51,2b	Ee2	40,7bc	CE2	40,3bc
NOE3	42,9b	Ee3	41,6bc	CE3	44,2bc
NOE4	43,4b	Ee4	43,4bc	CE4	48,4bc
NOE5	42,0b	Ee5	46,1bc	CE5	44,7bc
NOE6	46,9b	Ee6	42,7bc	CE6	47,7bc
NOE7	44,4b	Ee7	47,2bc	CE7	46,4bc
NOE8	59,4b	Ee8	43,9bc	CE8	50,2bc
NOE9	47,5b	Ee9	46,0bc	CE9	48,9bc
NOE10	47,4b	Ee10	53,8b	CE10	33,8bcd
NOE11	44,0b	Ee11	49,1bc	CE11	49,4bc
NOE12	53,4b	Ee12	44,7bc	CE12	49,8bc
Solução completa	101,4a	Solução completa	101,4a	Solução completa	101,4a
Solução 1/3 de N	52,0b	Solução 1/3 de N	52,0b	Solução 1/3 de N	52,0b
Solução sem N	19,1b	Solução sem N	19,1d	Solução sem N	19,1d

*Média de quatro repetições. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

4.5 Identificação dos isolados bacterianos

Todas as 72 estirpes bacterianas sorteadas foram submetidas ao seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA. As sequencias obtidas no presente trabalho foram comparadas com as sequencias do banco de dados *GenBank* através do programa BLASTn (Figura 11).

Tabela 11 - Caracterização por similaridade obtida a partir da comparação das sequencias parciais do gene 16S rRNA de bactérias diazotróficas isoladas de *Brachiaria brizantha* com as sequencias contidas no banco de dados *GenBank*

(Continua)

Isolado	Origem	NCBI	n° acesso	Evalue	Similaridade (%)
NO1	Rizosfera	<i>Pseudomonas</i> sp.	GU086449. 1	0.0	99% (678/681)
NO2	Rizosfera	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	EU864329. 1	0.0	99% (619/625)
NO3	Rizosfera	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	EU864329. 1	0.0	99% (615/620)
NO4	Rizosfera	<i>Pseudomonas</i> sp.	GU086449. 1	0.0	99% (655/659)
NO5	Rizosfera	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	AM913881. 1	0.0	99% (674/676)
NO6	Rizosfera	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	FJ897489. 1	0.0	99% (552/556)
NO7	Rizosfera	<i>Xanthomonas</i> sp.	DQ011535. 1	0.0	98% (626/633)
NO8	Rizosfera	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	EU373412. 1	0.0	97% (629/642)
NO9	Rizosfera	<i>Bacillus</i> sp.	HM161901. 1	0.0	99% (506/511)
NO10	Rizosfera	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	AM913881. 1	0.0	98% (583/590)
NO11	Rizosfera	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	GQ901874. 1	0.0	98% (650/660)
NO12	Rizosfera	<i>Pseudomonas</i> sp.	GU362880. 1	0.0	99% (713/716)
NOE1	Raiz (Endf.)	<i>Rhizobium</i> sp.	EU399929. 1	0.0	99% (766/773)
NOE2	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	AM402950. 1	0.0	99% (713/720)
NOE3	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	EF491968. 1	0.0	100% (667/672)
NOE4	Raiz (Endf.)	<i>Pseudomonas</i> sp.	FN600408. 1	0.0	99% (652/657)
NOE5	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	FJ897490. 1	3e-97	99% (199/200)*
NOE6	Raiz (Endf.)	<i>Rhizobium</i> sp.	AB456615. 1	0.0	99% (668/673)
NOE7	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	FJ897489. 1	0.0	99% (620/621)
NOE8	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	EU373412. 1	0.0	99% (705/709)
NOE9	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	FJ897489. 1	0.0	99% (604/607)
NOE10	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	AM913881. 1	0.0	99% (734/740)
NOE11	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	GQ184202. 1	0.0	98% (553/562)
NOE12	Raiz (Endf.)	<i>Rhizobium</i> sp.	HM151912. 1	0.0	98% (494/503)
E1	Rizosfera	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	GQ381282. 1	0.0	99% (759/762)
E2	Rizosfera	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	AM913881. 1	0.0	99% (652/655)
E3	Rizosfera	<i>Rhizobium</i> sp.	EU399929. 1	0.0	99% (605/608)
E4	Rizosfera	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	FN666617. 1	0.0	98% (628/636)
E5	Rizosfera	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	FN666617. 1	0.0	99% (726/730)
E6	Rizosfera	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	EU073955. 2	0.0	96% (535/555)
E7	Rizosfera	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	EU373412. 1	0.0	99% (759/760)
E8	Rizosfera	<i>Pseudomonas</i> sp.	GQ199719. 1	0.0	98% (611/619)
E9	Rizosfera	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	AM913881. 1	0.0	99% (768/772)
E10	Rizosfera	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	FJ897489. 1	0.0	99% (618/624)
E11	Rizosfera	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	EU626404. 1	0.0	99% (629/630)
E12	Rizosfera	<i>Sphingomonas</i> sp.	FJ455060. 1	0.0	98% (735/745)
Ee1	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	AM913881. 1	0.0	98% (655/662)
Ee2	Raiz (Endf.)	<i>Sphingomonas</i> sp.	AF503277. 1	0.0	99% (765/771)

Tabela 11 - Caracterização por similaridade obtida a partir da comparação das sequências parciais do gene 16S rRNA de bactérias diazotróficas isoladas de *Brachiaria brizantha* com as sequências contidas no banco de dados *GenBank*

(conclusão)

Isolado	Origem	NCBI	n° acesso	Evalue	Similaridade (%)
Ee3	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	EU073955. 2	0.0	99% (617/621)
Ee4	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	EF491967. 1	0.0	99% (678/682)
Ee5	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	GU350456. 1	0.0	98% (485/492)
Ee6	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	GQ381282. 1	0.0	99% (651/656)
Ee7	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	GQ381282. 1	0.0	98% (625/632)
Ee8	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	AM913881. 1	0.0	99% (593/598)
Ee9	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	AM913881. 1	0.0	99% (630/633)
Ee10	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	EU073955. 2	0.0	99% (604/607)
Ee11	Raiz (Endf.)	<i>Sphingomonas</i> sp.	FJ455063. 1	0.0	99% (607/609)
Ee12	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	HM044374. 1	0.0	99% (602/606)
C1	Rizosfera	<i>Azospirillum</i> sp.	AB114200. 1	0.0	98% (527/533)
C2	Rizosfera	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	GQ381282. 1	0.0	99% (604/606)
C3	Rizosfera	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	AB461649. 1	0.0	96% (592/612)
C4	Rizosfera	<i>Pseudomonas</i> sp.	HM484310. 1	3e-72	92% (184/200)*
C5	Rizosfera	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	EU438980. 1	0.0	99% (618/619)
C6	Rizosfera	<i>Xanthomonas</i> sp.	EF522125. 1	0.0	96% (599/621)
C7	Rizosfera	<i>Azospirillum</i> sp.	GU396259. 1	3e-98	94% (228/242)
C8	Rizosfera	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	GQ381282. 1	1e-177	97% (360/369)
C9	Rizosfera	<i>Sphingomonas</i> sp.	DQ659593. 1	0.0	97% (608/623)
C10	Rizosfera	<i>Azospirillum</i> sp.	GU396258. 1	0.0	100% (458/458)
C11	Rizosfera	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	FN645732. 1	0.0	99% (625/629)
C12	Rizosfera	<i>Pseudomonas</i> sp.	HM489948. 1	4e-100	100% (201/201)*
Ce1	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	HM584797. 1	2e-98	99% (200/201)*
Ce2	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	FJ897489. 1	0.0	99% (612/616)
Ce3	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	HM044374. 1	0.0	98% (596/606)
Ce4	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	HM028652. 1	0.0	99% (599/605)
Ce5	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	HM028652. 1	0.0	99% (696/700)
Ce6	Raiz (Endf.)	<i>Pseudomonas</i> sp.	HM447035. 1	0.0	96% (464/482)
Ce7	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	GU350456. 1	0.0	99% (574/576)
Ce8	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	HM584797. 1	6e-69	92% (176/191)
Ce9	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	EF491967. 1	0.0	99% (653/657)
Ce10	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	AB461765. 1	0.0	96% (568/589)
Ce11	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	EU373412. 1	0.0	98% (629/639)
Ce12	Raiz (Endf.)	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	DQ242478. 1	0.0	99% (608/610)

*Fragmentos de 200pb

Os percentuais de similaridade variaram de 92% a 100% com 200 a 704pb. A maioria dos isolados obtidos da raiz e solo rizosférico de *B. brizantha* tiveram maior similaridade com o gênero *Stenotrophomonas* sp. As frequências relativas dos grupos genotípicos formados nas três áreas de estudo estão apresentadas na figura 11.

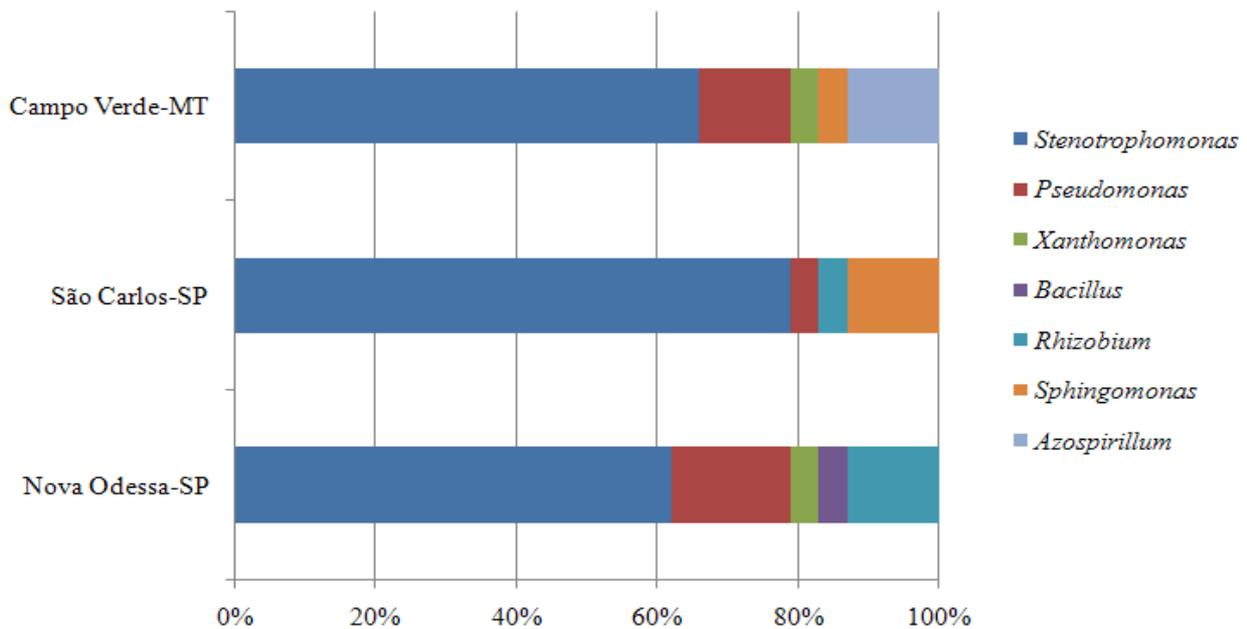


Figura 11 - Frequência relativa dos grupos genotípicos formados a partir do sequenciamento de estirpes bacterianas isoladas de plantas de *B. brizantha* de três áreas de coleta: Nova Odessa-SP, São Carlos-SP e Campo Verde-MT

Na área de Nova Odessa-SP foi possível caracterizar isolados com similaridade aos gêneros *Stenotrophomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhizobium* sp., *Bacillus* sp. e *Xanthomonas* sp. Na área de São Carlos-SP os isolados apresentaram similaridade aos gêneros *Stenotrophomonas* sp., *Sphingomonas* sp., *Pseudomonas* sp. e *Rhizobium* sp. Já na área de Campo Verde-MT os isoladas demonstraram similaridade aos gêneros *Stenotrophomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Azospirillum* sp., *Sphingomonas* sp. e *Xanthomonas* sp.

5 DISCUSSÃO

5.1 Isolamento

Na década de 60 a 80 alguns pesquisadores formularam diferentes composições de meios de cultivo, isentos de N combinado, considerando-os seletivos para determinados gêneros e até espécies de micro-organismos diazotróficos.

O meio NFb seria seletivo para *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasilense*, LGI seria seletivo para *Azospirillum amazonense* e JNFb seria seletivo pra *Herbaspirillum* spp. A classificação taxonômica era realizada de acordo com o meio de cultivo em que as bactérias cresciam e também por algumas características fenotípicas e bioquímicas dos isolados.

Recentemente, esta rotina foi seguida por Neroni (2007) para se obter bactérias diazotróficas de raízes de *Araucaria angustifolia*, levando a 37 agrupamentos fenotípicos de 73 isolados. Quando estes isolados foram submetidos a métodos moleculares, verificou-se que a classificação baseada em caracteres fenotípicos era totalmente artificial, não apresentando nenhuma relação com os genotípicos.

Em razão disto, para a realização do isolamento das bactérias diazotróficas da raiz e solo rizosférico de *B. brizantha* do presente trabalho, optou-se pela utilização de apenas um meio de cultivo semi-sólido, JNFb, utilizado por diversos autores para o isolamento de bactérias diazotróficas associativas em gramíneas (SALA et al., 2005; BERGAMASCHI, et al., 2007).

A utilização deste meio de cultivo também demonstrou que este não se restringia a isolar exclusivamente bactérias do gênero para o qual foi descrito, pois consta na literatura como sendo exclusivo para o isolamento de *Herbaspirillum* spp. Porém, após a realização das análises moleculares pode-se observar que foram isoladas bactérias pertencentes aos gêneros *Azospirillum* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Sphingomonas* sp., *Rhizobium* sp., *Stenotrophomonas* sp. e *Xanthomonas* sp., mas nenhum isolado de *Herbaspirillum* sp. Estes resultados podem ser atribuídos à grande versatilidade nutricional microbiana, relacionada aos diferentes gêneros, espécies e linhagens.

5.2 Produção de ácido-indol-acético (AIA)

Neste trabalho 68 das 72 estirpes bacterianas sorteadas que foram isoladas de raiz e solo rizosférico de *B. brizantha* mostraram-se capazes de produzir o hormônio vegetal ácido-indol-acético. Estes resultados estão de acordo com a literatura, segundo a qual 80% das bactérias isoladas da rizosfera são capazes de produzir este hormônio vegetal (BARAZANI; FRIEDMAN, 1999; KHALID et al., 2004).

Foi encontrada uma grande variação nas quantidades de ácido-indol-acético produzidas pelas estirpes isoladas das diferentes áreas de estudo. Segundo Pedraza et al. (2004), a quantidade de ácido-indol-acético produzida por estirpes bacterianas depende da espécie que está em estudo. Afirma que as condições em que os micro-organismos são cultivados (como: presença ou ausência do precursor L-triptofano para a síntese de AIA, oxigenação, pH, e a fase de crescimento em que se encontra a bactéria), podem influenciar na produção do hormônio vegetal.

As estirpes que apresentaram as maiores produções de AIA foram isoladas da área de Campo Verde- MT. Narayanaswami e Veerraju (1996) puderam observar uma quantidade três vezes maior de AIA em um solo rizosférico quando comparado a um solo não rizosférico. Este resultado muito provavelmente está relacionado ao fato das rizobactérias habitarem um local sob influência direta da exsudação radicular.

A maioria das estirpes produziu concentrações superiores de AIA quando comparadas com as encontradas na literatura. Os isolados obtidos no presente trabalho produziram de 0,39µg/mL a 195 µg/mL de ácido-indol-acético. Segundo Reis et al. (2004), isolados de *Azospirillum amazonense* oriundos de raízes de *Brachiaria* spp. produziram 0,61 µg/mL a 19,27µg/mL de AIA. Estirpes isoladas de raízes de arroz produziram 2,79 µg/mL a 13,47 µg/mL de ácido-indol-acético (KUSS et al., 2007).

Segundo Mascarua-Esparza et al. (1988), estirpes de *Azospirillum lipoferum* isoladas de plantas cactáceas no México produziram 4,90 µg/mL a 16,99 µg/m de AIA. El-Khamas e Adachi, (1999) demonstraram que, *in vitro*, estirpes de *Azospirillum brasilense* (ATCC 2970), após 72 horas de cultivo e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) com 48 horas de cultivo, produziram, respectivamente, 46 µg/mL, e 35 µg/mL de AIA.

Estes resultados são de grande importância, pois a produção de hormônios vegetais por bactérias pode ter uma influência positiva para o crescimento de plantas e tem sido demonstrada

em diversos trabalhos. O ácido-indol-acético apresenta um papel fundamental no enraizamento e crescimento apical dos vegetais através da divisão e diferenciação das células recém-formadas nos meristemas.

Porém, o efeito que este hormônio pode exercer na planta depende de sua concentração disponível às células vegetais. Em concentrações muito altas o ácido-indol-acético pode promover um efeito deletério e inibir o crescimento vegetal. A interação planta-bactéria envolve diversos mecanismos associados tanto à planta quanto aos micro-organismos. É necessário ter o conhecimento de todos os processos envolvidos para se permitir a utilização desta interação, visando o aumento da produtividade agrícola.

5.3 Atividade da nitrogenase

A determinação do caráter diazotrófico das estirpes bacterianas isoladas de *B. brizantha* foi realizada através do método de aumento na concentração de nitrogênio no meio de cultura e através da técnica de redução de acetileno (ARA).

O método de redução de acetileno, embora de uso corriqueiro e generalizado em estudos de fixação biológica do nitrogênio, reflete a atividade da enzima responsável pela fixação no momento em que está sendo avaliada. Em alguns casos, a bactéria diazotrófica poderá estar em um período de alta fixação, o qual foi antecedido ou seguido por período de não-fixação. Já em outro isolado poderiam ser encontrados valores baixos de atividade, os quais teriam sido antecidos por uma atividade elevada e prolongada. Sendo assim, este método reflete uma situação momentânea da atividade da enzima nitrogenase.

O método de aumento na concentração de nitrogênio no meio de cultura refletiria o resultado do somatório dos valores da atividade de redução de acetileno em todo o período de crescimento de um determinado isolado bacteriano. Em razão disto, para a determinação do caráter diazotrófico das estirpes, utilizaram-se ambos os métodos.

Estrada-De Los Santos et al. (2001), utilizando a técnica de redução de acetileno, observou que isolados provenientes de amostras de solo rizosférico de milho e café não apresentavam atividade da nitrogenase em meio de cultivo com ácido azelaico como única fonte de carbono. Porém, os mesmos isolados foram capazes de reduzir acetileno em meio de cultivo com três fontes de carbono (ácido málico, glicose e manitol).

Sendo assim, para a realização dos métodos de determinação do caráter diazotrófico das estirpes utilizou-se o meio de cultivo semi-sólido CC. Este possui estas três fontes de carbono e 100 mg L⁻¹ de extrato de levedura utilizado como fonte de fatores orgânicos de crescimento e “iniciador” de nitrogênio sem inibir a redução de acetileno (RENNIE, 1981).

10 isolados demonstraram incrementar nitrogênio no meio de cultivo quando submetidos ao teste de acúmulo de N-total em meio de cultura. O fato de nem todas estas estirpes terem apresentado resultados positivos para este teste, pode ter decorrido do fato de a fixação biológica do nitrogênio realizada por bactérias diazotróficas sofrer uma variação de acordo com a fonte de carbono utilizado no meio de cultivo. Segundo Estrada-De Los Santos et al. (2001) todos os isolados obtidos em seu trabalho foram capazes de fixar nitrogênio em meio contendo frutose, manitol e succinato como única fonte de carbono. Porém, esta capacidade foi variável quando se utilizou glicose, sacarose, glicerol, azelato, benzoato e propionato.

A maioria dos isolados que foram submetidos à técnica de redução de acetileno para determinar seu caráter diazotrófico apresentaram resultados positivos da atividade da nitrogenase. Apenas 19 isolados não apresentaram atividade da enzima. Provavelmente estes isolados realmente não sejam diazotróficos, não possuindo a enzima nitrogenase, mas, isto pode também estar relacionado a outros fatores, além da fonte de carbono utilizada no meio de cultivo.

Para o uso da técnica de redução de acetileno alguns pontos devem ser considerados, como: saturação da nitrogenase com o gás acetileno (100 ml L⁻¹), tempo de incubação com o gás, faixas de temperatura e período de cultivo dos isolados, possíveis problemas como a possibilidade de conversão do gás acetileno a etileno por algum reagente presente no meio de cultura ou pela composição das rolhas utilizadas para vedar os frascos, pureza do gás acetileno, volume do inóculo e vedação dos frascos utilizados para a realização da análise.

Em termos quantitativos, duas estirpes bacterianas isoladas da rizosfera de *B. brizantha* da área de Campo Verde-MT se destacaram das demais por apresentar diferença significativa quando comparados às estirpes-tipo da Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas da Embrapa Agrobiologia.

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. O uso desta técnica para avaliações quantitativas ou comparativas da fixação biológica do nitrogênio

requer adequações do método, de acordo com as condições já discutidas (GILLER, 1987; VESSEY, 1994).

Considerando a diversidade dos isolados obtidos no presente trabalho e a versatilidade nutricional que cada estirpe pode apresentar, é possível que existam mais diazotróficos dentre os isolados obtidos capazes de fixar nitrogênio em condições não avaliadas. Para determinar esta possibilidade, seria necessária a adequação dos métodos utilizados e a realização de novos estudos da atividade da enzima nitrogenase.

Para obter a classificação taxonômica dos isolados, empregou-se o método do seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA. A classificação taxonômica também poderia ter sido obtida por meio da amplificação por PCR do gene *nifH*, que expressa a subunidade da enzima nitrogenase. Este método dispensa testes relacionados à atividade da nitrogenase. Independentemente das condições ambientais este gene sempre está presente nos organismos diazotróficos. Poderia ser feita a combinação de técnicas moleculares que avaliam a presença do gene *nifH* e a detecção da atividade da enzima.

Como o objetivo do presente trabalho foi o isolamento não apenas de bactérias fixadoras de nitrogênio, mas também de bactérias promotoras do crescimento vegetal através de outros mecanismos, optou-se por realizar o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. A maioria das técnicas moleculares relacionados a estudos taxonômicos de bactérias é baseada na composição dos genes ribossomais. O gene 16S rRNA é o mais utilizado como sendo uma importante molécula de estudo de filogenia e ecologia microbiana (LOUWS; RADEMAKER; DE BRUIJN, 1999).

A escolha da sequência de nucleotídeos do 16S decorre do fato da mesma agrupar um conjunto de características necessárias a um bom marcador molecular, a qual inclui sua distribuição universal, estrutura e função conservada entre os táxons, ausência de transferência lateral de genes, e tamanho suficiente (aproximadamente 1600 nucleotídeos) para estudos de filogenias (AMANN; LUDWIG, 2000). A sua amplificação e sequenciamento permite a caracterização de micro-organismos em nível de gênero e possivelmente em nível de espécie (CHENEY et al., 2000).

A utilização do sequenciamento do gene *nifH* seria empregado para caracterização da diversidade genética das bactérias diazotróficas, que geralmente não se correlacionam com a

taxonomia baseada nos genes ribossomais que são utilizados para caracterização de bactérias independente de serem fixadores ou não (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

5.4 Promoção do crescimento de *Brachiaria brizantha*

A pesquisa sobre bactérias diazotróficas no Brasil iniciou-se na década de 50 com Döbereiner e colaboradores. Estas pesquisas foram intensificadas a partir da descoberta de novas espécies de *Azospirillum* (DÖBEREINER, 1978), despertando o interesse por alternativas biológicas aos fertilizantes nitrogenados utilizados na agricultura (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os resultados obtidos no presente trabalho relacionados à promoção do crescimento de *B. brizantha* não demonstraram diferença significativa em relação ao controle contendo a mesma dose de nitrogênio que foi fornecida às plantas. As respostas da produção de biomassa da planta quando inoculada com bactérias diazotróficas associativas nem sempre produzem resultados positivos, e se questiona se o número de resultados negativos ou sem efeitos não estaria subestimado na literatura, uma vez que a tendência é não publicá-los (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os dados obtidos podem estar relacionados ao inóculo e à metodologia utilizada para a inoculação das suspensões bacterianas nas plantas. Sabe-se que a qualidade do inoculante está diretamente relacionada ao tipo de veículo utilizado e pelas condições ambientais a que este é submetido até o momento de sua utilização. Os inoculantes turfosos, líquidos ou outras formulações devem conter uma população mínima de 1×10^8 células por grama ou ml de inoculante.

Devido ao grande número de vasos do experimento com plântulas de *B. brizantha* realizado em casa de vegetação houve a inviabilidade de se padronizar o número de células presente em cada inóculo utilizado. As bactérias foram cultivadas em meio líquido pelo período de 1 a 2 dias até que o meio de cultivo ficasse turvo. Porém, como sabemos, o crescimento bacteriano varia de acordo com cada estipe e pode ter ocorrido que os inóculos produzidos não tivessem um número suficientemente elevado de células no momento da inoculação na planta.

Foram realizadas duas inoculações em períodos diferentes durante a condução do experimento. A primeira foi realizada após uma semana de adaptação das plantas nas unidades

experimentais e a outra após 1 mês e meio de experimento. As inoculações foram realizadas após a fase de germinação das sementes, ou seja, em mudas de aproximadamente 5 cm de comprimento. Alguns autores afirmam que, para a inoculação ter um bom resultado, é necessário seja realizada diretamente nas sementes. Resultados positivos foram observados quanto ao aumento da produção de biomassa em trigo, quando a inoculação das suspensões de bactérias foi feita diretamente nas sementes (DIDONET et al., 1996)

Outro fator importante é que a eficiência das bactérias diazotróficas associativas quando comparadas com as simbióticas, está em desvantagem em relação ao fornecimento do nitrogênio à planta. A associação simbiótica é resultante de um processo muito mais evoluído, que minimiza as perdas do nitrogênio fixado, por fatores químicos, físicos e biológicos. No interior dos nódulos desenvolvidos, os bacteróides estabelecem uma relação extremamente íntima com a planta, garantindo uma maior eficiência na simbiose.

Já as bactérias diazotróficas associativas, mesmo as endofíticas (localizadas no interior da planta), não possuem uma relação tão complexa e íntima com a planta, o que contribui para diminuir a fixação biológica do nitrogênio. Resultados controversos observados na literatura apontam que a interação entre bactérias diazotróficas associativas e gramíneas ainda precisa ser mais bem avaliada, principalmente quanto à baixa sobrevivência dos micro-organismos no solo. Existe uma grande necessidade de se realizar estudos mais detalhados em laboratório e a campo sobre a utilização de inoculantes contendo bactérias fixadoras de nitrogênio como promotoras do crescimento vegetal em forrageiras.

Apesar de que a maioria dos isolados inoculados nas plantas de *B. brizantha* terem a capacidade de produzir o hormônio vegetal ácido-indol-acético, sabe-se que o AIA em concentrações muito altas inibe a alongação celular e, portanto, o crescimento da planta. A sensibilidade das células à auxina varia nas diferentes partes da planta. O caule, por exemplo, é menos sensível ao hormônio vegetal que a raiz. Sarwar e Kremer (1995) compararam a produção de ácido-indol-acético entre bactérias promotoras de crescimento e rizobactérias de efeito inibidor e verificaram que as últimas produziram altos níveis de AIA, que por sua vez, inibiram o crescimento da raiz de *Convolvulus arvensis*.

Experimentos de inoculação de bactérias diazotróficas em combinação com doses crescentes de adubo nitrogenado pode ser uma alternativa que permite a detecção de fixadores nos diferentes níveis de fertilidade do solo, resultando na diminuição destes insumos em níveis

idênticos de produtividade. Machado et al. (1998) testaram o efeito da adubação nitrogenada associada à inoculação com uma mistura de estirpes de bactérias diazotróficas (*A. amazonense*, *A. lipoferum* e *Herbaspirillum seropedicae*) em milho e constataram aumento de produção de 4.830 kg.ha⁻¹ para 5.790 kg.ha⁻¹ devido à inoculação, quando aplicaram a dose de 100 kg.ha⁻¹ de N. O aumento da produção também foi acompanhado pelo aumento do teor de N nos grãos.

Segundo Sala et al. (2007), a inoculação de bactérias diazotróficas combinada com diferentes doses de nitrogênio em dois genótipos de trigo, promoveu maior massa de matéria seca, nitrogênio acumulado na parte aérea e aumento da produtividade de grãos. Este efeito foi observado principalmente na presença de adubo nitrogenado, possibilitando um maior lucro para o agricultor. Em concordância com esses resultados, Cavallet et al. (2000) encontraram aumento de 17% na produção de grãos de milho, de 5.211 para 6.067 kg.ha⁻¹, e de 6% na média do comprimento das espigas, quando inocularam as sementes de milho com *Azospirillum* spp. Na cultura do trigo, Didonet et al. (1996) observaram que a redução da dose de N de 60 kg.ha⁻¹ para 15 kg.ha⁻¹ pode ser realizada quando associada à inoculação com *A. brasilense* na semeadura. No trigo não se observou aumento da produção de grãos, restringindo-se somente a aumento da biomassa. Esse seria um efeito interessante em pastagens, já que neste caso o acúmulo de forragem é o objetivo principal da produção.

5.5 Identificação dos isolados bacterianos

Através do uso da filogenia baseada no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA observou-se que 69% dos isolados obtidos no presente trabalho, entre endofíticos e rizosféricos, possuem similaridade com bactérias do gênero *Stenotrophomonas* sp. Este gênero compreende pelo menos oito espécies: *Stenotrophomonas maltophilia* (PALLERONI; BRADBURY, 1993), *Stenotrophomonas nitritireducens* (FINKMANN et al., 2000), *Stenotrophomonas rhizophila* (WOLF et al., 2002), *Stenotrophomonas acidaminiphila* (ASSIH et al., 2002), *Stenotrophomonas koreensis* (YANG et al., 2006), *Stenotrophomonas chelatiphaga* (KAPARULLINA et al., 2009), *Stenotrophomonas terrae* (HEYLEN et al., 2007) e *Stenotrophomonas humi* (HEYLEN et al., 2007). A *Stenotrophomonas dokdonensis* foi descrita em 2006, mas em 2008 foi transferida para o gênero *Pseudoxanthomonas* (LEE et al., 2008).

Algumas destas espécies podem apresentar uma extraordinária gama de atividades que promovem efeitos benéficos para o crescimento vegetal. Este gênero possui um papel ecológico muito importante no ciclo do nitrogênio e enxofre (IKEMOTO et al, 1980; BANERJEE; YESMIN, 2002; PARK et al., 2005).

As espécies *Stenotrophomonas maltophilia* e *Stenotrophomonas rhizophila*, são freqüentemente encontrados em associação com algumas espécies vegetais. Podem ser isoladas a partir da rizosfera (BERG et al., 1996) ou a partir de tecidos internos da planta, especialmente dos tecidos vasculares da raiz e caule. Algumas bactérias endofíticas da espécie *S. maltophilia* foram isoladas de raízes de alfafa (SCHWIEGER; TEBBE, 2000), milho (CHELIUS; TRIPLETT, 2000), arroz (MEHNAZ et al., 2001) e trigo (GERMIDA; SICILIANO, 2001).

Bactérias pertencentes ao gênero *Stenotrophomonas* são candidatos promissores para aplicações biotecnológicas na agricultura. Apresentam aplicações promissoras em biorremediação e fitorremediação, devido sua capacidade em metabolizar uma grande variedade de compostos orgânicos que estão presentes na rizosfera. Podem promover um efeito positivo na produtividade das plantas por vários mecanismos, incluindo a produção do hormônio vegetal ácido-indol-acético (SUCKSTORFF; BERG, 2003), fixação biológica do nitrogênio (PARK et al., 2005; LIBA, et al., 2006) e oxidação de enxofre elementar (BANERJEE; YESMIN, 2002).

Foi possível o isolamento de bactérias com similaridade ao gênero *Pseudomonas* sp., citado na literatura como promotor de crescimento em gramíneas (PERRINE et al., 2001; GRAY E SMITH, 2005). O gênero *Pseudomonas* possui uma ampla distribuição mundial e já foi encontrado na rizosfera de canola, arroz e trigo (VERMA et al., 2001) e endofiticamente em diversas espécies vegetais (ZINNIEL et al., 2002; MOCALI et al., 2003).

O gênero *Pseudomonas* recebe uma atenção especial no meio científico não apenas pela sua versatilidade metabólica, tornando-o um forte competidor na rizosfera pela variedade de substâncias que pode utilizar, mas também pela sua facilidade de cultivo *in vitro* e manipulação genética (HAAS; KEEL, 2003). Sua atuação é relevante devido à capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico (HAAHTELA et al., 1983), de produzir o hormônio vegetal ácido-indol-acético (GORIS et al., 1998) e de solubilizar fosfato (RODRIGUEZ e FAGA, 1999), inerente a muitas de suas espécies. Além de promover o crescimento de plantas este gênero é descrito como agente no controle de pragas e doenças.

Alguns isolados obtidos no presente trabalho apresentaram similaridade com o gênero *Sphingomonas* sp., descrito em 1990 por YABUUCHI et al. Dentre as 49 espécies descritas, a literatura cita três relacionadas à fixação biológica do nitrogênio. A espécie *S. paucimobilis* tem sido relatada como dotada de potencial diazotrófico (FERNADES et al., 2001), sendo isolada da rizosfera e de sementes de arroz (ENGELHARD et al., 2000).

Alguns isolados apresentaram similaridade com o gênero *Azospirillum* sp. A distribuição ecológica deste gênero é extremamente ampla. Estirpes têm sido encontradas em associação com plantas monocotiledôneas, incluindo milho, arroz, cana-de-açúcar, sorgo (DÖBEREINER et al., 1976; REINHOLD et al., 1986; WONG E STEMBERG, 1979). Apresentam ainda alta incidência em associação com *Brachiaria* ssp. (REIS et al., 2001). Além da habilidade de fixar o nitrogênio atmosférico, as espécies que se associam com gramíneas forrageiras são capazes de produzir hormônios vegetais como o ácido-indol-acético, estimulando o desenvolvimento radicular, aumento a densidade e crescimento das raízes laterais e a área superficial das plantas (VANDE BROEK E VANDERLEYDEN, 1995)

O gênero *Azospirillum* compreende pelo menos sete espécies, identificadas em base fenotípica e por sequenciamento do gene 16S rRNA. São elas: *Azospirillum brasilense* (TARRAND et al., 1978) , *Azospirillum lipoferum* (TARRAND et al., 1978), *Azospirillum amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983), *Azospirillum halopraeferans* (REINHOLD et al., 1987), *Azospirillum irakense* (KHAMMAS et al., 1989), *Azospirillum largimobile* (DEKHIL et al., 1997) e *Azospirillum dobereinae* (ECKERT et al., 2001). Esta última é considerada uma nova espécie e foi isolada da gramínea *Miscanthus sinesensis*. Até o presente momento apenas três das sete espécies foram isoladas em associação com forrageiras, são elas: *A. lipoferum*, *A. amazonense* e *A. brasilense* (BALDANI et al., 1997).

Três isolados apresentaram similaridade com o gênero *Rhizobium* sp. Bactérias deste gênero normalmente são saprófitas e consideradas como simbiontes específicos para leguminosas. Entretanto, alguns estudos apontam que este gênero bacteriano tem habilidade de colonizar as raízes de não leguminosas, sugerindo outro mecanismo de estimulação para o crescimento e desenvolvimento da planta (CHABOT et al., 1996; ANTOUN et al., 1998). Trabalho realizado por BISWAS et al. (2000) indicou que espécies bacterianas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* promoveram considerável aumento no comprimento das raízes de plantas de arroz.

PRAYITMO et al (1999) detectaram, por técnica de microscopia eletrônica de fluorescência, que algumas estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, em condições laboratoriais, colonizam e multiplicam-se internamente em cultivares de arroz e migram para diversos tecidos da planta, inclusive para as raízes laterais. A habilidade natural que as estirpes de *Rhizobium* possuem para infectar gramíneas começou a ser explorada, mas ainda faltam muitas informações que precisam ser avaliadas (YANNI et al., 1997).

Dois isolados apresentaram similaridade com o gênero *Xanthomonas* sp. Este gênero é um grupo diversificado e economicamente importante de fitopatógenos bacterianos, pertencente ao filo *Proteobacteria*. Este gênero pode promover o crescimento vegetal aumentando o comprimento das raízes e o número de pêlos radiculares das plantas. Khalid et al., (2004) relataram que esse efeito é atribuído à produção microbiana do hormônio vegetal ácido-indol-acético.

Apenas um isolado apresentou similaridade com o gênero *Bacillus* sp. A grande maioria das bactérias pertencentes a este gênero são saprófitas, estando amplamente distribuída no ar, solo e água. Existem mais de 191 espécies e 4 subespécies descritas no gênero *Bacillus*. No âmbito da agricultura existem diversos produtos tendo como ingrediente ativo bactérias deste gênero consideradas como rizobactérias promotoras do crescimento vegetal. Muitas espécies possuem um grande potencial de solubilização do fósforo no solo, de controle biológico de fitopatógenos e de produção de enzimas como a nitrogenase, responsável pela redução do nitrogênio atmosférico à amônia (CATTELAN et al., 1999).

Ding e colaboradores, em 2005, encontraram fragmentos do gene *nifH* relacionados à fixação biológica do nitrogênio em *Bacillus*. Xie et al. (2003) relataram o isolamento de 14 linhagens de *Bacillus* de lavouras de arroz, capazes de reduzir o acetileno a etileno, técnica utilizada para detecção do caráter diazotrófico de bactérias. Li e colaboradores, em 1992, também já haviam identificado, através da utilização da mesma técnica, uma espécie de *Bacillus* que fixava nitrogênio em associação com ectomicorrizas.

É importante lembrar que a identificação dos isolados do presente trabalho foi feita ao nível de gênero, através da utilização de sequências com 200 a 704 pb. Para uma adequada identificação e filogenia dos isolados seria necessário o sequenciamento completo do gene 16S rRNA, o que provavelmente levaria ao descobrimento de novas espécies.

Este estudo permitiu relacionar as bactérias isoladas da raiz e rizosfera de *B. brizantha* a grupos taxonômicos descritos como RPCP, diazotróficas ou não, fato que pode ter grande

implicação ecológica e prática na preservação, recuperação e restauração de áreas de pastagens degradadas.

6 CONCLUSÕES

- ✓ Foram isoladas 110 estirpes de bactérias potencialmente diazotróficas a partir de amostras de solo e raízes de *B. brizantha*.
- ✓ 10 de 72 estirpes testadas demonstraram a atividade da enzima nitrogenase *in vitro* pelo aumento da concentração do N em meio de cultivo.
- ✓ 2 isolados dos 57 capazes de reduzir acetileno a etileno se destacaram por apresentar valores de atividade da nitrogenase muito maiores do que algumas estirpes-tipo provenientes da Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas da Embrapa Agrobiologia.
- ✓ 68 estirpes foram capazes de produzir ácido-indol-acético. Destas, a maioria produziu quantidades bastante elevadas de AIA quando comparadas com a literatura.
- ✓ O seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA dos 72 isolados permitiu a caracterização de sete grupos genotípicos: *Stenotrophomonas* sp, *Pseudomonas* sp., *Xanthomonas* sp., *Bacillus* sp., *Rhizobium* sp, *Sphingomonas* sp. e *Azospirillum* sp.
- ✓ O experimento realizado em casa de vegetação não permitiu diferenciar o crescimento de plântulas inoculadas com as estirpes bacterianas de plântulas controle sem inoculação.
- ✓ A maioria das bactérias selecionadas neste estudo demonstrou possuir mecanismos de grande potencial biotecnológico para promover o crescimento vegetal.
- ✓ Novos experimentos relacionados à promoção do crescimento de *B. brizantha* e de outras forrageiras devem ser realizados em casa de vegetação e no campo a fim de verificar se alguma das estirpes potencialmente promissoras poderá ser indicada para inoculação rotineira de gramíneas na formação de pastos e quais as condições ambientais e edáficas que favorecem tal prática.

REFERÊNCIAS

- AMANN, R.; LUDWIG, W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 24, 555-565, 2000.
- AMANN, R.; LUDWIG, W.; SCHNEIDER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, New York, v. 59, p. 143-169, 1995.
- ANDRADE, R.P. Tecnologia de produção de sementes do gênero *Brachiaria*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 11, 1994. Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1994. p. 49-71.
- ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C.J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on no-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 204, n.1, p. 57-67, 1998.
- ARAÚJO, F.F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis* formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, p.456-462, 2008.
- ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; SOBRAL, J.K.; LACAVAL, P.T. **Manual: Isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALQ, 2002. 86p.
- ASSIH, E.A.; OUATTARA, A.S.; THIERRY, S.; CAYOL, J.L.; LABAT, M.; MACARIE, H. *Stenotrophomonas acidaminiphila* sp. nov., a strictly aerobic bacterium isolated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v.52, p.559-568, 2002.
- 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**, Paris, v.29, n. 5/6, p. 911-922, May/June 1997.
- BANERJEE, M; YESMIN, L. Sulfur-oxidizing plant growth promoting rhizobacteria for enhanced canola performance. US Patent 07491535. 2002.
- BARAZANI O.; FRIEDMAN J. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.25, p.2397-2406, 1999.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; LIFSHITZ, R. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria. In: GLICK, B.R.; THOMPSON, J.E.(Ed.). **Methods in plant molecular biology and biotechnology**. Boca Raton: CRC Press, 1993. p. 331-345.
- 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**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 409-410.

BERGAMASCHI, C.; ROESCH, L.F.W.; QUADROS, P.D.; CAMARGO, F.A.O. Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de sorgo forrageiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n. 3, p. 727-733, 2007.

BERG, G.; MARTEN, P.; BALLIN, G. *Stenotrophomonas maltophilia* in the rhizosphere of oilseed rape — occurrence, characterization and interaction with phytopathogenic fungi. **Microbiological Research**, Amsterdam, v.1, p.19–27,1996.

BISHOP, P.E.; PREMAKUMAR, R. Alternative nitrogen fixation systems. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J.(Ed.). **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.736-762.

BISWAS, J.C.; LADHA, J.K.; DAZZ, F.B. RHIZOBIA inoculation improves nutrient uptake and growth of Lowland rice. **Soil Scientific Society American**, Madison, v. 64, p. 1644-1650, 2000.

BODDEY, R.M. ; VICTORIA, R.L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria e Paspalum notatum* cv. batatais using ¹⁵N labelled organic matter and fertilizer. **Plant Soil**, Dordrecht, v.90, p. 265-292, 1986.

BODDEY, R.M.; CLARK, P.M.; VICTORIA, R.L.; MATSUI, E. DÖBEREINER, J. The use of the ¹⁵N isotope dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of *Paspalum notatum* cv batatais. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.29, p. 1036-1045, 1983.

BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S.E. Rapid In Situ Assay for Indoleacetic Acid Production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n.2, p. 535–538, 1991.

BURRIS, R.H. Nitrogen fixation assay - methods and techniques. **Methods in Enzymology**, Amsterdam, v.24B, p.415–431, 1972.

BURNS, R.C.; HARDY, R.W.F. **Nitrogen fixation in bacteria and higher plants**. New York: Springer-Verlag, 1975. 189p.

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

CAVALLET, L.E.; PESSOA, A.C. dos S.; HELMICH, J.J.; HELMICH, P.R.; OST, C.F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, PB, DEAg/UFPB, v. 4, , 2000. p. 129-132.

CHABOT, R.; ANTOUN, H.; KLOEPPER, J.W.; BEAUCHAMP, C.J. Root colonization of Maize and Lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.2767-2772, 1996.

CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, p. 783–787, 2000.

CHENEBY, D.; PHILIPPOT, L.; HARTMANN, A.; HENAULT, C.; GERMON, J.C. 16S rDNA analysis for characterization of dinitryfying bacteria isolated from three agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 34, p. 121-128, 2000.

COSTA, K.A.P.; FRANÇA, A.F.S.; OLIVEIRA, I.P.; MONTEIRO, F. A.; BARRIGOSI, J.A.F. Produção de massa seca, eficiência e recuperação do nitrogênio e enxofre pelo capim Tanzânia adubado com nitrogênio, potássio e enxofre. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 598-603, 2005.

CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J.M.; MONTEIRO, A.M. Analysis of indole-3-acetic and related indoles in culture media from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, p. 2833-2837, 1988.

DAVID, K.A.V.; FAY, P. Effects of long-term treatment with acetylene on nitrogen-fixing microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 34, n. 6, p. 640-646, 1977.

DAVIS, R., LEHMAN, L.; PETROVICH, R.; SHAH, V.K.; ROBERTS, G.P.; LUDDEN, P.W. Purification and characterization of the alternative nitrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.178, n.5, p.1445-1450, 1996.

DEKHIL, S.B.; CAHILL, M.; STACKEBRANDT, E.; SLY, L.I. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the Genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v.20, n.1, p.72-77, 1997.

DIAS, D.C.F.S.; TOLEDO F.F. Germinação e incidência de fungos em testes com sementes de *Brachiaria Brizantha* Stapf. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.50, n.1, p.68-76, fev./maio 1993.

DIDONET, A.D.; RODRIGUES, O.; KENNER, M.H. Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, p. 645-651, 1996.

DING, Y.; WANG, J., LIU, Y., CHEN, S. Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 99, n. 5, p.1271-1281, 2005.

DÖBEREINER, J.; ALVAHYDO, R. Sobre a influência da cana-de-açúcar na **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.19, n.4, p.401-412, 1959.

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil biology and Biochemistry**, Elmsford, v.29, p.771-774, 1997.

DÖBEREINER, J.; MARRIEL, I.E.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.22, n.10, p.1464-1473, 1976.

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

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in the Plant Science**, Kidlington, v. 22, p. 107-149, 2003.

ECKERT, B.; WEBER, O.B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 51, p. 17–26, 2001.

ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; ABALLEROMELLADO, 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.

EL-KHAWAS, H.; ADACHI, K. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiela* and their effect on rice roots. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.28, p. 377-381, 1999.

ENGELHARD, M.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. **Environmental Microbiology**, Washington, v.2, p. 131-141, 2000.

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

FERREIRA, C.R.R.P.T.; VEGRO, C.L.R.; BORTOLETO, E.E; FRANCISCO, V.L.F.S. Caracterização da pecuária bovina no estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 29, p. 7-30, 1999.

FERREIRA, J.S. **Qualidade de inoculante, inoculação e reinoculação de *Herbaspirillum seropedicae* em duas variedades de arroz irrigado**. Tese de (Doutorado na área de Agronomia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, p. 69. 2008.

FINKMANN, W.; ALTENDORF, K.; STACKEBRANDT, E; LIPSKI, A. Characterization of N₂O-producing *Xanthomonas*-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas*

broegbernensis gen. nov., sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v.50, p.273–282, 2000.

GERMIDA, J.J.; SICILIANO, S.D. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of modern, recent and ancient wheat cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.33, p.410–415, 2001.

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

GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, Baltimore, v. 26, n. 1, p. 192-195, 1951.

GORIS, J.; KERSTER, K.; DE VOS P. Polyamine distribution among authentic pseudomonads and Azotobacteraceae. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v.21, p. 285-290, 1998.

GRAY, E.J.; SMITH, D.L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 395-412, 2005.

HAAHTELA K.; HELANDER I.; NURMIAHO-LASSILA E.L.; SUNDMAN V. Morphological and physiological characteristics and lipopolysaccharid composition of N₂-fixing (C₂H₂-reducing) root-associated *Pseudomonas* sp. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, p. 874-880, 1983.

HAAS, D.; KEEL, C. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.41, p.117-153, 2003.

HEYLEN, K.; VANPARYS, B.; PEIRSEGAELE, F.; LEBBE, L.; DE VOS, P. *Stenotrophomonas terrae* sp. nov. and *Stenotrophomonas humi* sp. nov., two nitrate-reducing bacteria isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v.7, p.2056–2061, 2007.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method of growing plants without soil. **University of California**, Berkeley, 32p. v. 25. 1950

HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S. (Ed.) **Manual de métodos empregados em estudo de Microbiologia do Solo**. Brasília: EMBRAPA, 1994. 542 p.

- IKEMOTO, S.; SUZUKI, K.; KANEKO, T.; KOMAGATA, K. Characterization of strains of *Pseudomonas maltophilia* which do not require methionine. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.30, p.437–447, 1980.
- ITZIGSOHN, R.; BURDMAN, S.; OKON, Y.; ZAADY, E.; YONATAM, A.; PEREVOLOTSKY, A. Plant-growth promotion in natural pastures by inoculation with *Azospirillum brasilense* under suboptimal growth conditions. **Arid Soil Research and Rehabilitation**, Utah. v. 13, p. 151-158, 2000.
- KAPARULLINA, E.; DORONINA, N.; CHISTYAKOVA, T.; TROTSSENKO, Y. *Stenotrophomonas chelatiphaga* sp. nov., a new aerobic EDTA-degrading bacterium. **Systematic and Applied Microbiology**, Oxford, v.32, p.157–162, 2009.
- KHALID A., ARSHAD M., ZAHIR Z.A. Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.96, p.473–480, 2004.
- KHAMMAS, K.M.; AGERON, E.; GRIMONT, P.A.D.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere **Soil Research Microbiology**, Paris, v.140, p.679-693, 1989.
- KIM, J.; REES, D.C. Crystallographic structure and functional implications of the Nitrogenase molybdenum-iron protein from *Azotobacter vinelandii*. **Nature**, London, v.360, p.553-560, 1992.
- KICHEL, A.N., MIRANDA, C.H.B., ZIMMER, A.H. Degradação de pastagens e produção de bovinos de corte com a integração agricultura x pecuária. In: FERREIRA, C.C.B. et al. (eds.). SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE - SIMCORTE. 1. Viçosa. **Anais...** Viçosa: UFV. 1999. p. 201-234.
- KOKALIS-BURELLE, N.; KLOEPPER, J.W.; REDDY, M.S. Plant growth promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous microorganisms. **Applied Soil Ecology**, Washington, v. 31, p. 91-100, 2006.
- KUSS, A.V.; KUSS, V.V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M.L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.10, p.1459-1465, 2007.
- LAMMEL, D.R. **Diversidade de rizóbios em Florestas de Araucária no Estado de São Paulo**. 2007. 116p. (Dissertação de Mestrado na área de Agronomia).- Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- LANE D.J.; PACE B.; OLSEN G.J.; STAHL D.A.; SOGIN M.L.; PACE N.R. Rapid-determination of 16s rRNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.82, p.6955–6959. doi:10.1073/pnas.82.20.6955. 1985.
- LEE, D.S.; RYU, S.H.; HWANG, H.W.; KIM, Y.; PARK, M.; LEE, J.R.; LEE, R.; JEON, C.O. *Pseudoxanthomonas sacceonensis* sp. nov., isolated from BTEX-contaminated soil in

Korea, transfer of *Stenotrophomonas dokdonensis* Yoon *et al.* 2006 to the genus *Pseudoxanthomonas* as *Pseudoxanthomonas dakdonensis* comb. nov. and emended description of the genus *Pseudoxanthomonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v.58, p.2235–2240, 2008.

LI, C.Y.; MASSICOTE, H.B.; MORE, L.V.H. Nitrogenfixing *Bacillus* sp. associated with Douglas-fir tuberculate ectomycorrhizae. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.140, p.35–40, 1992.

LIBA C.M.; FERRARA F.I.; MANFIO G.P.; FANTINATTI-GARBOGGINI F.; ALBUQUERQUE R.C.; PAVAN C.; RAMOS P.L.; MOREIRA-FILHO C.A.; BARBOSA H.R. Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, .v.101, p.1076–1086, 2006.

LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: Diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, 1999.

MACHADO, A.T.; SODEK, L.; DÖBEREINER, J.; REIS, V.M. Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho nitroflint. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, p. 961-970, 1998.

MAGALHÃES, F.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.55, n.4, p.417-430, 1983.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo, 1989. 201p.

MANULIS, S.; HAVIV-CHESNER, A.; BRANDI, M.T.; LINDOW, S. E.; BARASH, I. Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophylae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 11, n. 7, p. 634-642, 1998.

MASCARUA-ESPARZA, M.A.; VILLA-GONZALEZ, R. ; CABALLERO-MELADO, J. Acetylene reduction and indolacetic acid production by *Azospirillum* isolates from Cactaceous plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.106, p.91-95, 1988.

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 rhizosphere of rice. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.47, p.110–117, 2001.

MILES, J.W; MAASS, B.L.; VALLE, C.B. **Brachiaria biology, agronomy and improvement**. Cali: CIA/ Brasília: EMBRAPA-CNPQC, 1996. 288p.

MOCALI, S., BERTELLI, E., DI CELLO, F., MENGONI, A., SFALANGA, A., VILIANI, F. Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. **Research in Microbiology**, Paris, v.154, p.105–114, 2003.

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

NARAYANASWAMI, R.; VEERRAJU, V. IAA syntesis in paddy soil as influenced by ammonium sulfate fertilization. **Current Science**, Bangalore, v. 38, p. 517-518, 1996.

NEYRA, C.A. ; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation in grasses. **Advances in Agronomy**, New York ,v. 29: p.1-38, 1977.

NERONI R.F. **Diversidade de bactérias diazotróficas associadas à *Araucaria angustifolia* no Estado de São Paulo**. 2007. 60p. (Dissertação de Mestrado na área de Agronomia).- Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

NUNES, S.G.; BOOCK, A.; PENTEADO, M.I.O.; GOMES, D.T. ***Brachiaria brizantha* cv. Marandu**. Campo Grande: EMBRAPA- CNPQC, 1985. 31 p. (Documentos, 21).

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**, Oxford, v.34, p. 801-811, 2002.

OLIVEIRA, P.P.A.; MARCHESIN, W.; LUZ, P.H.C.; HERLING, V.R. **Guia de identificação de deficiências nutricionais em *Brachiaria brizantha* cv. marandu**. São Carlos: EMBRAPA, 2007. 38 p. (Comunicado Técnico, 76).

ONA O.; VAN IMPE J.; PRINSEN E.; VANDERLEYDEN J. Growth and índole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. **Fems Microbiology Letters**, Oxford, v.246, p. 125-132, 2005.

PALLERONI, N.J.; BRADBURY, J.F. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings. et al. 1983. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.43,p.606–609, 1993.

PARK, M.; KIM, G.; YANG, J.; LEE, H.; SHIN, W.; KIM, W.; SA, T. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. **Research in Microbiology**, Amsterdan, v.160,p.127–133, 2005.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Bacteria biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, p. 207-220, 1996.

PEDRAZA, R.O.; RAMIREZ-MATA, A.; XIQUI M.L.; BAÇA, B.E. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen- fixing bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, V. 233, P. 15–21. 2004.

PEREIRA, P.A.A.; DÖBEREINER, J., ; NEYRA, C.A. Nitrogen assimilation and dissimilation in five genotypes of *Brachiaria spp.* **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 59, p. 1475-1479, 1981.

PERRINE, F.M.; Prayitno, J.; Weinman, J.J.; Dazzo, F.B.; Rolfe, B.G. Rhizobium plasmids are involved in the inhibition of simulation of rice growth and development. **Australian Journal of Plant Physiology**, Sidney, v. 28, p. 923-937, 2001.

RADEMAKER, J.L.W.; LOUWS F.J.; BRUIJN F.J. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. **Molecular Microbial Ecology**, Dordrecht, v.34, n.4, p.1-27, 1998.

REIS JR, F.B. **Ecologia e diversidade de bactérias do gênero *Azospirillum* em associação com pastagens de *Brachiaria spp.*** 2002. 98p. Tese de (Doutorado área de Agronomia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

REIS JUNIOR, F.B.; SILVA, M.F.; TEIXEIRA, K.R.S.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria spp.*, em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Visçosa, v.28, p.103-113, 2004.

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.; REIS JUNIOR, F.B. dos; QUESADA, D.M.; OLIVEIRA, O.C.A. de; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Biological nitrogen fixation associated with tropical pasture grasses. **Australian Journal of Plant Physiology**, Sidney, v.28, p.837- 844, 2001.

REIS, V.S.; Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas. Seropédica: **EMBRAPA Agrobiologia**, 2007. 22 p. (Documentos, EMBRAPA Agrobiologia, 232).

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.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; NIEMAN, E.G.; FENDRIK, I. Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zone of Kallar grass. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.52, n.3, p.520-526, 1986.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogenfixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.37, n.1, p.43-51, 1987.

RODRÍGUEZ, H. ; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 17, p. 319-339, 1999.

ROESCH, L.F.W.; PASSAGLIA, L.M.P.; BENTO, F.M.; TRIPLETT, E.W ; CAMARGO, A.O. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Visçosa, v. 31, p.1367-1380, 2007.

SALA, V.M.R.; CARDOSO, E.J.B.N.; FREITAS, J.G. ; SILVEIRA, A.P.D. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Rio de Janeiro, v.42, p.833-842, 2007.

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

SARWAR, M.; KREMER, R. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 172, n. 2, p. 261 – 269, 1995.

SCHWIEGER, F.; TEBBE, C. C.Effect of field inoculation with *Sinorhizobium meliloti*L33 on the composition of bacterial communities in rhizospheres of a target plant (*Medicago sativa*) and a non-target plant (*Chenopodium album*) — linking of 16S rRNA gene-based single-strand conformation polymorphism community profiles to the diversity of cultivated bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, p.3556–3565, 2000.

SOARES FILHO, C.V. Recomendações de espécies e variedades de *Brachiaria* para diferentes condições. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM. PIRACICABA, 11.,1994.Piracicaba : **Anais...FEALQ**., 1994. p.25-48.

SUCKSTORFF, I.; BERG, G. Evidence for dose-dependent effects on plant growth by *Stenotrophomonas* strains from different origins. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.95, p.656–663,2003.

TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description a new genus, *Azospirillum* gen. Nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.24, n.8, p.967- 980, 1978.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.24, p. 1596-1599, 2007.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p.4876-4882, 1997.

VANDE BROEK, A. ; VANDERLEYDEN, J. Rewiew: genetics of the *Azospirillum*-plant root association. **Critical Rewiew in Plant Science**, Kidlington, v.14: p.445-466, 1995.

- VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. In: VARGAS M.A.T.; HUNGRIA, M. (Ed.). *Biologia dos solos do cerrados*. Planaltina:EMBRAPA-CPAC, 1997. 524 p.
- VERMA, S.C.; LADHA, J.K.; TRIPATHI, A.K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v.91,p.127-141, 2001.
- VESSEY, J.K. Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: In defense of the acetylene reduction assay. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 158, n. 2, p. 151-162, Jan. 1994.
- WOLF, A.; FRITZE, A.; HAGEMANN, M.; BERG, G. *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v.52, 1937–1944. 2002.
- WONG, P.; STENBERG, N.E. Characterization of *Azospirillum* isolated from nitrogen-fixing roots of haversted sorghum plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.38, n.6, p.1189-1191, 1979.
- YABUUCHI, E.; YANO, I.; OYAIZU, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; YAMAMOTO, H. Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. **Microbiology & Immunology**, Tokyo, v. 34, p. 99-119, 1990.
- YANG, H.C.; IM, W.T.; KANG, M.S.; SHIN, D.Y.; LEE, S.T. *Stenotrophomonas koreensis* sp. nov., isolated from compost in South Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v.56, p.81–84.,2006.
- YANNI, G.Y.; RIZK, R.Y.; CORICH, V.; SQUARTINI, A.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; ORGAMBIDE, G.; BRUIJN, F.; STOLTZFUS, J.; BUCKLEY, D. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 194, p. 99-114, 1997.
- XIE, G.H.; CAI, M.Y.; TAO, G.C.; STEINBERGER, Y. Cultivable heterotrophic N₂-fixing bacterial diversity in rice fields in the Yangtze River Plain. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.37, p. 29–38, 2003.
- ZAKHAROVA E.A.; SHCHERBAKOV A.A.; BRUDNIK VV.; SKRIPKO N.G.; BULKHIN NSH.; IGNATOV VV. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasiliense*. **European Journal Biochemistry**, Berlin, v. 259, p. 572-576, 1999.
- ZINNIEL D.K.; LAMBRECHT P.; HARRIS B.N. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68: p.. 2198–2208, 2002.