

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES BACTERIANAS  
ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR COM CARACTERÍSTICAS  
PARA A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL**

**JULIANA FERREIRA DA SILVA**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO - UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ  
FEVEREIRO DE 2010**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES BACTERIANAS  
ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR COM CARACTERÍSTICAS  
PARA A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL**

**JULIANA FERREIRA DA SILVA**

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas”

Orientador: Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO – 2010

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES BACTERIANAS  
ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR COM CARACTERÍSTICAS  
PARA A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL

**JULIANA FERREIRA DA SILVA**

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Aprovada em 10 de fevereiro de 2010.

Comissão Examinadora:

---

Prof. Jean Luiz Simões de Araújo (D. Sc. em Ciências Biológicas- Genética) -  
EMBRAPA

---

Prof Fábio Lopes Olivares (D. Sc. em Agronomia Ciências do Solo) - UENF/LBCT

---

Dra Adriane Nunes de Souza (D. Sc. em Ciências) - UENF/LBT

---

Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho (D. Sc. em Biociências e Biotecnologia) -  
UENF/LBT  
(Orientador)

Dedico esta dissertação a Deus sobre todas as coisas,  
aos meus pais José Luiz e Maria, aos meus irmãos Jussara e Luiz Gustavo,  
ao meu sobrinho Rafael e ao meu noivo Diogo por toda força que me  
deram para que eu chegasse até aqui.

*Não é o desafio com que nos deparamos que  
determina quem somos e o que estamos nos tornando,  
mas a maneira com que respondemos ao desafio.  
Somos combatentes, idealistas, mas plenamente conscientes.  
Problemas para vencer, liberdade para provar.  
E, enquanto acreditamos em nosso sonho,  
nada é por acaso.”*

*(Hefinfil)*

## AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais por tudo que eles fizeram por mim, buscando orientar-me em todos os momentos, pelo carinho, pela amizade, por serem PAI e MÃE.
- Aos meus irmãos: Luiz Gustavo e Jussara, que sempre se fizeram pertos mesmo estando longe, nunca deixando com que me sentisse sozinha.
- Ao meu noivo Diogo por estar sempre ao meu lado, por todos os momentos que passamos juntos, pelo companheirismo, carinho, pela amizade. Pelo amor incondicional. Amo você!
- Às minhas amigas Cristiane Stabenow, Lílian Chaves, Luciana Almeida, Marina Blume que se fizeram presentes em todos os momentos. Que nunca cansaram de ouvir os meus desabafos, de vivenciar as minhas alegrias, que se mostraram intensamente AMIGAS.
- À grande amiga Renata Vasconcelos que sempre esteve ao meu lado, pelo carinho, amizade. Por ser minha *miquita!* Amo você!
- À grande amiga Roberta Barbosa pelo carinho, companheirismo, por ter estado ao meu lado nos momentos tristes e alegres durante a minha trajetória no mestrado. Pelas dicas, sugestões. Por ter se tornado uma grande amiga.
- Ao professor Gonçalo Apolinário, pela orientação, pela amizade. Obrigada!
- A Adriane pela co-orientação, amizade, pelos ensinamentos.
- Aos professore (a)s Jean Luiz Simões de Araújo e Fábio Lopes Olivares, por aceitarem fazer parte da banca examinadora da dissertação.

- Aos colegas do LBT Aline, Ana Lídia, Bia, Cristina, Fernanda, Fred, Janice, Leandro, Marcos Vinícius, Mariana, Natália, Paulo, Patrícia, Tamires e Verônica.
- Aos amigos Valéria e Wellington Ferreira que proporcionaram bons momentos de amizade. Pelo carinho, pelas dicas, pelo companheirismo.
- Aos professores, técnicos e alunos do LBT e LMGV que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.
- Ao professor Olney Vieira e à Dra Gina Nunes do LSA/UENF pela contribuição com dados bioquímicos.
- Ao CNPq, FINEP, FAPERJ e FENORTE pelo apoio financeiro.
- A FAPERJ, pela concessão da bolsa de mestrado.
- A UENF e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela oportunidade de realização do Mestrado.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xiii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. A Cana-de-açúcar .....	3
2.1.1. Origem e classificação botânica.....	3
2.1.2. Importância econômica .....	4
2.2. Bactérias associadas à cana-de-açúcar.....	6
2.2.1. Mecanismos associados à promoção de crescimento vegetal.....	7
2.2.2. Solubilização de fósforo .....	8
2.2.3. Solubilização de zinco.....	11
2.2.4. Síntese de reguladores de crescimento vegetal .....	12
3. OBJETIVOS .....	14
3.1.OBJETIVO GERAL .....	14
3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	15
4.1. Material vegetal e condições de cultivo.....	15
4.2. Isolamento bacteriano.....	15
4.3. Meios de multiplicação e purificação das bactérias .....	17
4.4. Solubilização de fosfato de cálcio e óxido de zinco .....	18
4.5. Produção de auxina (AIA) .....	19
4.6. Caracterização bioquímica dos isolados.....	20

4.6.1. Coloração de Gram.....	20
4.6.2. Teste de oxidase.....	21
4.6.3. Teste da catalase.....	21
4.6.4. Perfil de resistência a antibióticos.....	21
4.6.5. Análise das propriedades metabólicas dos isolados: utilização de açúcar e aminoácido como fonte de carbono .....	22
4.7. Caracterização molecular .....	22
4.7.1. Extração de DNA genômico.....	22
4.7.2. Amplificação do 16S rDNA.....	22
4.7.3. Sequenciamento de amplicons do 16S rDNA .....	23
4.7.4. Análise filogenética das sequências .....	25
4.8. Análise estatística .....	25
5. RESULTADOS.....	26
5.1. Isolamento de estirpes bacterianas associadas à cana-de-açúcar .....	26
5.2. Solubilização de fosfato de cálcio e óxido de zinco .....	27
5.3. Síntese de ácido indol acético (AIA) .....	29
5.4. Caracterização bioquímica e molecular dos isolados .....	31
5.4.1. Perfil bioquímico dos isolados.....	31
5.4.2. Perfil de resistência a antibióticos.....	33
5.4.3. Identificação dos isolados através de sequenciamento do 16S rDNA .....	34
6. DISCUSSÃO .....	39
7. CONCLUSÕES .....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Mapa da produção de cana-de-açúcar - setor sucroalcooleiro..	5
<b>Figura 2.</b> Mecanismos de interação entre planta e microrganismos promotores do crescimento vegetal.	8
<b>Figura 3.</b> Aspectos morfológicos de bactérias associadas à cana-de-açúcar.....	27
<b>Figura 4.</b> Halos de solubilização produzidos por estirpes isoladas de folha e raiz de cana-de-açúcar..	28
<b>Figura 5.</b> Diâmetro do halo de solubilização produzido por estirpes isoladas de folha e raiz de cana-de-açúcar.....	29
<b>Figura 6.</b> Concentração de AIA $\mu\text{mol L}^{-1}$ sintetizados pelos isolados bacterianos crescidos em meio DYGS na ausência e presença do aminoácido triptofano.....	30
<b>Figura 7.</b> Perfil colorimétrico de AIA sintetizado pelos isolados bacterianos crescidos em meio DYGS na ausência (A) e presença (B) do aminoácido triptofano. ....	31
<b>Figura 8.</b> Perfil de resistência a antibióticos das estirpes bacterianas isoladas de cana-de-açúcar. ....	33
<b>Figura 9.</b> Perfil de resistência ao antibiótico espectinomicina..	34
<b>Figura 10.</b> Extração de DNA genômico e amplificação do 16S rDNA dos isolados..	35
<b>Figura 11.</b> Árvore filogenética mostrando a relação genética de <i>Enterobacter sp.</i> com outras estirpes e espécies do gênero, taxonomicamente similares, baseado no 16S rDNA.....	37

**Figura 12.** Árvore filogenética mostrando a relação genética de *Pantoea ananatis* com outras estirpes e espécies do gênero, taxonomicamente similares, baseado no 16S rDNA ..... 38

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Solução salina para maceração e diluição.....	16
<b>Tabela 2.</b> Solução de micronutrientes. ....	16
<b>Tabela 3:</b> composição do meio LGI-P.....	17
<b>Tabela 4:</b> composição do meio DYGS.....	18
<b>Tabela 5.</b> Composição do meio LGI. ....	19
<b>Tabela 6.</b> Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação da região 16S rDNA das estirpes bacterianas isoladas de folha e raiz de cana-de-açúcar cultivar CB 4789. ....	24
<b>Tabela 7.</b> Identificação e origem das estirpes bacterianas isoladas de cana-de-açúcar ( <i>Saccharum spp.</i> ).....	26
<b>Tabela 8.</b> Características bioquímicas dos isolados. ....	32
<b>Tabela 9.</b> Identificação dos isolados bacterianos através do sequenciamento da região 16S rDNA. ....	36

## RESUMO

da SILVA, Juliana Ferreira; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro de 2010; ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES BACTERIANAS ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR COM CARACTERÍSTICAS PARA A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL; Orientador: Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho; Conselheiros: Profa. Rosana Rodrigues e Dra. Adriane Nunes de Souza.

A cana-de-açúcar é uma das culturas mais importantes do Brasil. Nos últimos anos, essa cultura tem recebido atenção especial devido ao crescente aumento da área cultivada e produção de etanol para uso como biocombustível. Para otimizar o rendimento agrícola da cultura, uma vasta quantidade de fertilizantes é aplicada anualmente. Associadas à cultura de cana-de-açúcar encontram-se bactérias que possuem características para a promoção de crescimento vegetal, tais como a fixação biológica de nitrogênio (FBN), a produção de fitohormônios como auxinas, citocininas e giberelinas, a solubilização de nutrientes (zinco e fósforo) e a produção de bacteriocinas. O uso de bactérias promotoras do crescimento como bioinoculantes é conhecido como uma alternativa benéfica por reduzir o consumo de fertilizantes e minimizar o impacto na biosfera. Neste contexto, o isolamento e caracterização de microrganismos, assim como a seleção de isolados com características desejáveis, são passos importantes nos estudos que têm por objetivo intensificar a produção e promover a sustentabilidade dos sistemas agrícolas. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar bactérias associadas à cana-de-açúcar cultivar CB 4789 com características para a promoção de crescimento vegetal. Foram isoladas 3 estirpes bacterianas provenientes de folhas e raízes de cana-de-açúcar. Em

seguida, esses isolados foram avaliados quanto à capacidade de solubilizar nutrientes insolúveis em meio LGI contendo fosfato de cálcio terciário e óxido de zinco e quanto à capacidade de sintetizar auxina em meio DYGS na ausência ou presença do aminoácido triptofano. O isolado SCB4789F-1 foi o mais eficiente para a solubilização de fósforo, com um halo de solubilização cujo diâmetro foi de, em média, 0,75 cm. Quanto à solubilização de zinco, os isolados SCB4789F-1 e SCB4789F-2 foram os mais eficientes, com um halo cujo diâmetro foi de, em média, 1,34 e 1,29 cm, respectivamente. A produção de auxina foi mais significativa para o isolado SCB4789F-2 com uma produção de 1.738  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em meio DYGS suplementado com triptofano. As estirpes selecionadas foram avaliadas quanto à morfologia celular, coloração de Gram, resistência a antibióticos e utilização de fonte de carbono. Os isolados foram identificados baseados na seqüência do 16S rDNA como *Enterobacter sp.* e *Pantoea ananatis*. Foi possível concluir, que as estirpes bacterianas possuem características promissoras de promoção de crescimento vegetal, justificando futuras análises de inoculação em plantas.

## **ABSTRACT**

da Silva, Juliana Ferreira, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, February 2010; ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIAL STRAIN ASSOCIATED WITH SUGARCANE WITH FEATURES FOR PROMOTING PLANT GROWTH; Advisor: Prof.. Gonçalo Apolinário de Souza Filho; Committee Members: Profa.. Rosana Rodrigues and Dra. Adriane Nunes de Souza.

The sugarcane is one of the most important crops in Brazil. In recent years, this culture has received special attention because of the increasing area under cultivation and production of ethanol for use as biofuel. To optimize the yield of agricultural crop, a large amount of fertilizers are applied annually. In association with sugarcane, there are bacteria that have characteristics to promote growth, such as biological nitrogen fixation (BNF), the production of phytohormones such as auxins, cytokinins and gibberellins, the solubility of nutrients (zinc and phosphorus) and the production of bacteriocins. The use of growth promoting bacteria as bioinoculants is known as a beneficial alternative to reduce the consumption of fertilizers and minimize the impact on the biosphere. In this context, the isolation and characterization of microorganisms and the selection of strains with desirable characteristics are important steps in the study which aims to increase production and promote sustainable agricultural systems. The aim of this study was to isolate and characterize bacteria associated with sugarcane CB 4789 with features to promote plant growth. We have isolated 3 bacterial strains from leaves and roots of sugarcane. Subsequently, these isolates were evaluated for their ability to solubilize insoluble nutrients in LGI medium containing calcium tertiary phosphate and zinc oxide and the ability to synthesize auxin in DYGS

medium in the absence or presence of the amino acid tryptophan. Isolate SCB4789F-1 was the most efficient for the solubilization of phosphorus, with a halo of solubilization diameter on average 0.75 cm. The solubility of zinc isolates SCB4789F-1 and SCB4789F-2 were the most efficient, with a halo whose diameter was on average 1.34 and 1.29 cm, respectively. The production of auxin was more significant for strain SCB4789F-2 with a production of  $1.738 \mu\text{mol L}^{-1}$  in medium DYGS supplemented with tryptophan. The selected strains were evaluated for cell morphology, Gram stain, resistance to antibiotics and use of carbon source. Isolates were identified based on the sequence of 16S ribosomal DNA (rDNA) in *Enterobacter* sp. and *Pantoea ananatis*. We concluded that the bacterial strains are promising features for promoting plant growth, and justify future analysis of inoculation in sugarcane plants.

## 1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma das culturas mais importantes do Brasil. Essa cultura ocupa um papel de destaque desde o período colonial, sendo a atividade agroindustrial mais antiga do país. Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de álcool e açúcar com uma área plantada superior a 7 milhões de hectares (Conab, 2009). Apesar desta posição de destaque, o rendimento médio da cultura no país é considerado baixo, em torno de 80 t/ha, com os melhores níveis nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste (Conab, 2009).

No estado do Rio de Janeiro, a cultura da cana-de-açúcar ocupa 15% da área agricultável sendo que nas regiões Norte e Noroeste Fluminense encontram-se a maior parte das lavouras do estado (Unica, 2009). No entanto diversos fatores contribuem com a redução dos rendimentos agroindustriais da cultura, tais como ocorrência de doenças e pragas, estresse salino, carência de nutrientes, entre outros.

Para otimizar o rendimento agrícola da cultura, métodos atuais de produção baseado no uso de pesticidas químicos e fertilizantes são aplicados anualmente. Apesar da eficiência desses métodos na agricultura, os mesmos geram custos cada vez mais significativos para o meio ambiente e saúde humana (Gunnell et al., 2007; Leach et al., 2008), além de uma forte elevação nos custos de produção, reduzindo as margens de lucro do setor e revelando grande dependência de insumos importados.

Atualmente, uma das estratégias utilizadas para melhorar o rendimento médio de culturas vegetais, economicamente importantes para o país, baseia-se no uso de bactérias promotoras do crescimento vegetal como bioinoculante. O uso dessas bactérias é conhecido como uma alternativa benéfica por reduzir o consumo de fertilizantes e minimizar o impacto na biosfera.

Dentre os mecanismos associados à promoção de crescimento vegetal destacam-se a fixação biológica do nitrogênio (FBN), produção de fitohormônios como auxina (Fuentes-Ramirez et al., 1993), giberelina (Bastián et al., 1998) e citocinina (Bazzicalupo & Okon, 2000), indução de resistência sistêmica (Hallmann, 1997), produção de sideróforos (Wenbo et al., 2001), produção de antibióticos (Strobel & Daisy, 2003), controle biológico de pragas e doenças nas plantas e solubilização de fosfato e zinco inorgânico (Verma et al., 2001).

Baseados nos mecanismos de promoção de crescimento, diversos inoculantes microbianos já estão no mercado e, nos últimos anos, a popularidade de inoculantes microbianos aumentou substancialmente, devido às pesquisas extensivas, a qual tem reforçado a sua coerência e eficácia (Thakore, 2006).

Existe uma tendência de que nos próximos anos, países em desenvolvimento tais como, o Brasil, Rússia, China e Índia liderem uma transformação no modelo de produção agrícola mundial. Esse modelo se apóia na substituição gradual de fertilizantes químicos industrializados, que apesar de eficazes, conduzem a danos expressivos para o meio ambiente, por bactérias benéficas ao crescimento vegetal e não prejudiciais ao meio ambiente.

Neste sentido, bactérias que possuem mais de uma característica para a promoção de crescimento vegetal são almejadas e rastreadas para uma possível aplicação no campo com o intuito de aumentar a produção agrícola (Verma et al., 2001).

Diante do supracitado, o objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar novas bactérias associadas à cana-de-açúcar com características para a solubilização de nutrientes (Zinco e Fósforo) e produção de auxinas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. A Cana-de-açúcar

#### 2.1.1. Origem e classificação botânica

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é originária da Nova Guiné, conhecida como uma planta silvestre e ornamental. A partir da Nova Guiné, foi se disseminando em várias linhas do sul do Oceano Pacífico, na Indochina, no Arquipélago da Malásia e em Bengala, sendo certo o seu aparecimento como planta produtora de açúcar na Índia tropical (Junqueira, 2006).

No ano de 1753 a cana-de-açúcar foi descrita por Linneu no livro *Specie Plantarum*, como *Saccharum officinarum* e *Saccharum spicatum* a qual, posteriormente, sofreu inúmeras alterações (Cesnik & Miocque, 2004). A cana é uma planta herbácea, alógama, pertencente à divisão Embryophyta siphonogama, filo Magnoliophyta, classe Liliopsida, ordem Poales, família Poaceae, tribo Andropogoneae, gênero *Saccharum*. Dentro do gênero *Saccharum* encontram-se as espécies *S. arundinaceum*, *S. baldwinii*, *S. brevibarbe*, *S. fulvum*, *S. giganteum*, *S. officinarum*, *S. barberi*, *S. edule*, *S. sinense*, *S. ravennae*, *S. robustum* e *S. spontaneum* (NCBI, 2008).

As cultivares plantadas são híbridos de *Saccharum spp.* provenientes de cruzamentos entre *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. barberi* e *S. sinense* (Barbosa, 2000). A complexidade apresentada pelo genoma da cana analisando a sua natureza híbrida, com perfil citogenético de difícil análise, origem

multiespecífica, alto nível de ploidia e aneuploidia (Heinz, 1987) dificulta o seu melhoramento genético (Teixeira, 2006).

Recentemente, esta cultura encontra-se disseminada em uma extensa área, mostrando melhor comportamento nas regiões tropicais devido à alternância de duas estações distintas: a seca e a úmida. A estação seca favorece uma melhor germinação e perfilhamento e a úmida favorece a maturação e acúmulo de sacarose nos colmos.

A cana-de-açúcar desenvolve-se caracteristicamente em forma de touceiras. É composta por uma parte subterrânea a qual é representada por raízes e rizomas (Cesnik & Miocque, 2004), e uma parte aérea composta por caules constituídos de nós e entrenós. Possuem folhas alternadas ao longo do caule com bainha e colar, e sua inflorescência é do tipo panícula, onde se encontram as flores que são hermafroditas (Lima, 1984).

A cana-de-açúcar se reproduz comercialmente por propagação assexuada ocorrendo por meio das gemas laterais, ou por micropropagação através da cultura de meristemas apicais. É possível que a produção de mudas via cultura de tecidos elimina microrganismos patogênicos e favoreça a longevidade do canavial (Hendre et al., 1983).

### **2.1.2. Importância econômica**

A cana-de-açúcar é uma das culturas mais importantes não só do Brasil, mas também do mundo. Essa cultura ocupa, no Brasil, um papel de destaque desde o período colonial, sendo a atividade agroindustrial mais antiga do país (Figueiredo, 2000). Tal cultura, economicamente importante, é responsável por aproximadamente 60% da produção mundial de açúcar e álcool (Rocha et al., 2007). Além da produção de açúcar, álcool e aguardente, os subprodutos da cana, dentre eles bagaço, vinhaça, são de grande importância socioeconômica na geração de energia, ração animal, fertilizantes.

Devido à grande importância econômica da cana-de-açúcar, na década de 70 foi criado um programa nacional do álcool, o PROÁLCOOL, com o objetivo de incentivar a produção e utilização do álcool metílico como combustível alternativo ao petróleo (Bocado, 1998). Neste sentido, o programa incentivou a

ampliação da cultura da cana-de-açúcar, uma excelente matéria-prima para a produção deste combustível (Figueiredo, 2000).

Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. De acordo com a Conab (2009), na safra 2009/2010 o Brasil apresentou uma área plantada superior a 7 milhões de hectares. Ressalta-se que o setor sucroalcooleiro movimenta, cerca de R\$ 40 bilhões por ano, o que corresponde a aproximadamente 2,35% do PIB nacional.

As regiões que se destacam com o cultivo da cana-de-açúcar são Nordeste e Sudeste (Figura 1), sendo o Sudeste líder da produção. O Estado de São Paulo é o maior produtor nacional, sendo responsável por 59% da produção brasileira (337,1 milhões de toneladas). A região Centro-Oeste é a que mais cresce, tendo o estado de Mato Grosso do Sul aumentado sua produção em 39,5% em 2008 (IBGE, 2009).

No Rio de Janeiro se destacam as regiões produtoras Norte/Noroeste Fluminense. Em 2005, o município de Campos dos Goytacazes alcançou cerca de 95 mil ha de área colhida, 4 milhões de toneladas de produção total, obtendo 89 milhões de reais de faturamento, com uma participação de 1 % da produção nacional (IBGE, 2006).



**Figura 1:** Mapa da produção de cana-de-açúcar - setor sucroalcooleiro. As áreas em marrom indicam as plantações e usinas produtoras de açúcar e etanol (Adaptado de Conab, 2010).

Diante do supracitado, existe grande interesse pelos produtos derivados desta cultura, especialmente o etanol e o açúcar, sendo que o etanol é o mais atrativo no momento, devido ao aumento do consumo nos mercados interno e externo, motivado pela questão ambiental no uso de energias renováveis.

Mediante a importância socioeconômica, a cana-de-açúcar tem sido muito estudada quanto aos aspectos produtivos, fisiológicos, metabólicos e genéticos. Ressalta-se que as doenças, carência de nutrientes, estresse salino constituem os principais fatores que limitam o rendimento da cultura (Ramallo et al., 2000). Neste sentido, vários estudos buscam através de bioinoculação, com bactérias promotoras de crescimento vegetal, aumentar a produtividade da cultura.

## **2.2. Bactérias associadas à cana-de-açúcar**

Em associação à cana-de-açúcar pode-se encontrar um grande número de microrganismos, os quais podem viver tanto em sua superfície como em seu interior.

Dentre os microrganismos associados à cana-de-açúcar estão aqueles que são classificados como epifíticos, os quais habitam a superfície dos tecidos vegetais (filoplano ou rizoplano) e os endofíticos que são, geralmente, definidos como aqueles que vivem no interior das plantas sem causar sintomas aparentes de doenças (Hallmann et al., 1997).

Os microrganismos endofíticos se distinguem dos patógenos, pois microrganismos patogênicos encontram-se em associação com o vegetal, no entanto, causam doenças em plantas (Azevedo, 2007).

Dentro do grupo das bactérias endofíticas encontram-se as denominadas diazotróficas endofíticas. Esse conceito foi introduzido por Döbereiner em 1992 referindo-se à capacidade de alguns diazotróficos, os quais apresentam uma baixa sobrevivência no solo, colonizarem especialmente o interior de raízes de gramíneas e, em associação com estas plantas, fixarem nitrogênio.

Posteriormente, foi proposto que este grupo de bactérias fosse dividido em endofíticos facultativos, com capacidade de colonizarem tanto a rizosfera quanto o interior das raízes, no entanto com baixa sobrevivência no solo, enquanto os endófitos obrigatórios, embora colonizem o interior das raízes e a parte aérea, não sobrevivem bem no solo (Baldani et al., 1997).

Dentre as bactérias associadas à cana-de-açúcar destacam-se *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *Herbaspirillum seropedicae* (Baldani et al., 1997; James, 2000; Boddey et al., 2003). Recentemente, outros microrganismos tais como *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca* e *Pantoea*, têm sido encontrados em associação endofítica com cana-de-açúcar (Sajjad et al. 2001; Loiret et al., 2004). Esses microrganismos podem apresentar efeito benéfico, pois atuam na promoção do crescimento vegetal e rendimento da cultura (Ryan et al., 2008).

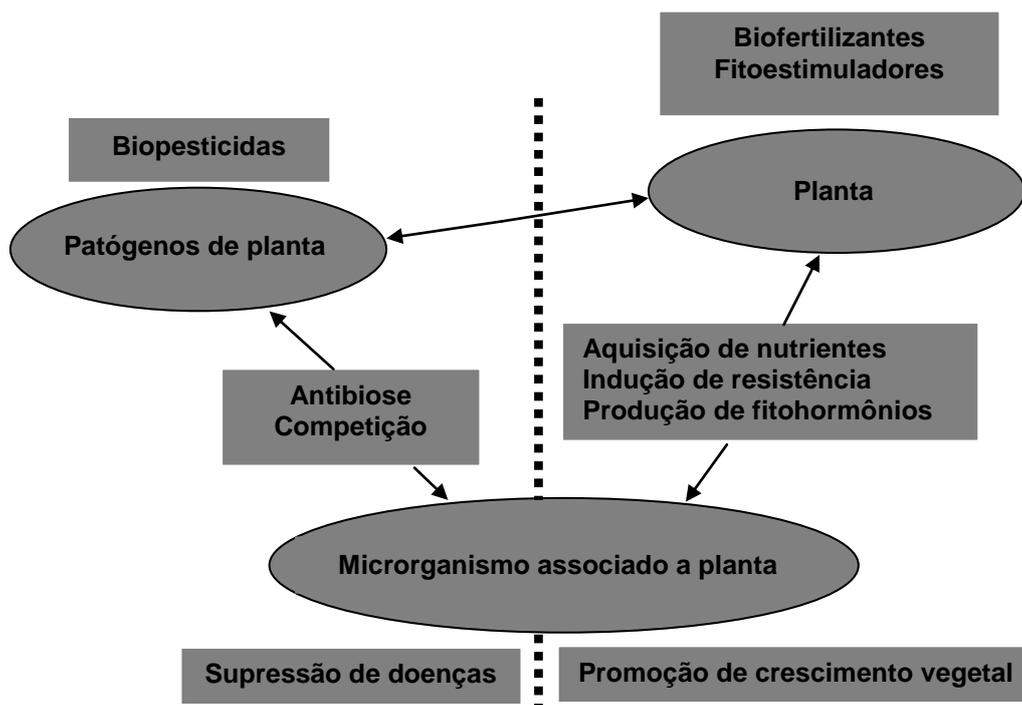
### **2.2.1. Mecanismos associados à promoção de crescimento vegetal**

Atualmente, bactérias associadas às plantas, com potencial para estimular o crescimento vegetal, têm recebido atenção especial. Sabe-se que a interação entre planta e microrganismos promotores do crescimento vegetal, dentre eles os endófitos e epifíticos, podem contribuir para o crescimento, saúde e desenvolvimento da planta (Berg, 2009; Figura 2).

Os mecanismos pelos quais as bactérias promotoras do crescimento vegetal podem exercer um efeito positivo no crescimento das plantas podem ser de dois tipos: diretos e indiretos (Glick, 1995).

Dentre os mecanismos de promoção de crescimento indiretos destacam-se o controle biológico por competição de nutrientes, produção de sideróforos, antibiose e indução de resistência sistêmica no hospedeiro pelas bactérias (Sturz et al., 1996; Leong, 1986; Sivan et al., 1992; Ramamoorthy et al., 2001). Já os mecanismos diretos podem ocorrer através da síntese de fitohormônios (auxina, citocinina, giberilina), fixação de nitrogênio atmosférico, síntese de enzimas (tais como ACC desaminase) que modulam o nível de hormônios vegetais e disponibilização de nutrientes para a planta, dentre eles fósforo e zinco (Xie et al., 1996; Christiansen-Weneger, 1992; Glick et al., 1998; Glick, 1995).

Alguns estudos têm demonstrado que compostos voláteis, tais como 2-3 butanodiol e acetoína produzidos por bactérias atuam como possíveis mecanismos responsáveis pela promoção do crescimento de plantas (Ryu et al., 2003).



**Figura 2.** Mecanismos de interação entre planta e microrganismos promotores do crescimento vegetal. Modo de ação e uso potencial em aplicações biotecnológicas. Adaptado de Berg, 2009.

Grupos bacterianos que possuem mais de um dos mecanismos supracitados para a promoção de crescimento vegetal são almejados e rastreados para uma possível aplicação no campo, objetivando o aumento da produção agrícola (Verma et al., 2001). A utilização desses grupos bacterianos como biofertilizantes ou agentes de controle para a melhoria da agricultura tem sido foco de inúmeras pesquisas. Este grupo de bactérias tem sido denominado bactérias promotoras do crescimento vegetal (do inglês PGPB), e entre eles estão membros dos gêneros *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter* e *Flavobacterium* (Rodríguez et al., 1999).

### 2.2.2. Solubilização de fósforo

O fósforo (P) é um dos principais macronutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas devido à sua atuação em processos biológicos, tais como metabolismo energético, biossíntese de fosfolipídios e ácido

nucléico, transdução de sinal e regulação de atividade enzimática (Rocha et al., 2007).

A baixa disponibilidade de P nos solos ácidos das regiões tropicais e subtropicais é o principal fator limitante para a produção de culturas vegetais. A baixa fertilidade de solos ácidos é principalmente devido à transformação de formas solúveis de P em formas de baixa solubilidade. Ânions fosfato podem ser imobilizados através de precipitação com cátions como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Al}^{3+}$  tornando-se indisponíveis para as plantas (Rengel et al., 2005). A presença desses complexos reduz a disponibilidade de nutrientes desses solos para manutenção da planta e do crescimento microbiano (Tiessen et al., 1996; Richardson, 2001).

A estratégia utilizada para suprir a carência de fosfato em solos ácidos é o uso de aplicações corretivas. No entanto, tal estratégia não é econômica e ambientalmente viável devido à alta quantidade de fosfato necessário, pois tais fosfatos são rapidamente imobilizados e indisponíveis para a planta (Hinsinger, 2001).

As maiores reservas de P inorgânico são rochas e outros depósitos minerais, porém, uma considerável porção de P é acumulada em grande parte nos solos agrícolas em consequência de aplicações regulares de fertilizantes químicos. Contudo, quase a totalidade do fosfato inorgânico solúvel aplicado no solo é rapidamente imobilizada logo após sua aplicação, devido à sua alta reatividade com cálcio, ferro e alumínio, tornando-se indisponível para o vegetal (Altomare et al., 1999).

Associados a espécies vegetais, existem microrganismos que são capazes de solubilizar formas insolúveis de fósforo, tornando-o disponível para o crescimento das culturas (Goldstein, 1995; Illmer et al., 1992). Esse processo é conhecido como solubilização natural de fosfato mineral, sendo uma característica exibida por muitos microrganismos do solo ou em associação epifítica ou endofítica com plantas.

Os microrganismos que possuem tal característica são conhecidos como microrganismos solubilizadores de fosfato, o qual contribui com a nutrição da planta como microrganismos promotores de crescimento vegetal.

Em ambientes naturais, por exemplo, na rizosfera de diferentes espécies de plantas, os microrganismos promotores de crescimento vegetal desempenham

papéis ecofisiológicos importantes. Esses microrganismos mobilizam fosfatos inorgânicos insolúveis, a partir de uma matriz mineral do solo, de forma que possa ser absorvido pelas raízes da planta. Por sua vez, a planta disponibiliza nutriente, principalmente os açúcares, que podem ser metabolizados para o crescimento bacteriano (Goldstein, 1995; Deubel et al., 2000).

A descoberta dessa relação mútua entre plantas e microrganismos solubilizadores de fosfato impulsionou o desenvolvimento de novas tecnologias, tais como o uso desses microrganismos como biofertilizantes, visando aumentar o rendimento das culturas (Richardson, 2001; Niranjana Raj et al., 2006; Saghir Khan et al., 2007). Além disso, o desenvolvimento de bioinoculantes comerciais e bioprocessos de minérios de fosfato em larga escala, através da ação desses microrganismos resultou em tecnologias altamente eficientes e de baixo custo utilizadas hoje, pela agroindústria mundial (Goldstein et al., 1993; Goldstein, 2000; Matsushita et al., 2002).

O fenótipo exibido pelos microrganismos solubilizadores de fosfato tem sido associado com a produção de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, principalmente ácido glucônico e cetoglucônico (Rodríguez et al., 1999; Goldstein, 2000; Deubel et al., 2000). Esses ácidos são produzidos no citoplasma de muitas bactérias Gram negativas através de uma via de oxidação direta da glicose, cujo papel fisiológico permanece indeterminado (Anthony, 2001, 2004; Matsushita et al., 2002).

Com base nas questões supracitadas, vários estudos têm sido realizados com a finalidade de avaliar microrganismos com capacidade de solubilizar fosfato inorgânico. Dentre os gêneros bacterianos conhecidos com esta capacidade estão *Gluconacetobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Azotobacter* e *Pantoea* (Goldstein et al., 1999; Rodríguez et al., 1999; Rodríguez et al., 2000; Verma et al., 2001; Garg et al., 2001).

O uso de bactérias solubilizadoras de fosfato como inoculantes é uma alternativa almejada para o aumento do desenvolvimento e produção vegetal (Rodríguez et al., 1999; Gyaneshwar et al., 2001).

### 2.2.3. Solubilização de zinco

O zinco é um micronutriente essencial para a promoção de crescimento vegetal. É um componente vital de várias enzimas metabólicas, no entanto, sua baixa mobilidade em plantas sugere a necessidade de fornecimento frequente de zinco na sua forma disponível para um melhor desenvolvimento vegetal (Saravanan et al., 2006).

O zinco é um nutriente de grande importância para as culturas vegetais, no entanto, tal elemento é limitante na maioria dos solos, principalmente em solos com pH elevado (White et al., 1997).

Para suprir a carência de zinco, o fornecimento a partir de fertilizantes é feito principalmente na forma solúvel, por exemplo, sulfato de zinco, os quais são aplicados no solo e em poucos dias se transformam em diferentes formas indisponíveis devido à reação do solo (Rattan et al., 1991). Essas transformações são baseadas no tipo de solo.

O zinco é transformado, principalmente, em carbonato de zinco em solos muito calcários, reage com ferro e óxido de manganês, e pode ser convertido em fosfato de zinco em solos adubados com P (Baruah et al., 1999). Assim, se um isolado tem a capacidade de solubilizar formas insolúveis de zinco em uma forma solúvel, poderá contribuir significativamente para a produtividade da cultura.

Neste sentido, a solubilização de zinco por microrganismos é benéfica e economicamente importante. A solubilização de zinco tem sido amplamente estudada em fungos (White et al., 1997) e poucos estudos têm documentado a solubilização de compostos insolúveis de zinco por bactérias (Di Simone et al. 1998; Fasim et al., 2002).

Do mesmo modo como ocorre com o fósforo, as formas de zinco insolúveis são solubilizadas por ácidos orgânicos, ligantes quelados e sistemas de oxirredução na superfície celular e membranas. Em algumas condições, entretanto, a acumulação de ácido glucônico resulta na acidificação do meio, o qual contribui para a solubilização de nutrientes (Goldstein et al., 1993; Babu-Khan et al. 1995). Em *G. diazotrophicus*, já foi verificado que o ácido 5-cetoglucônico está presente durante o processo de solubilização de ZnO, apesar de existir a produção de outros ácidos em quantidade muito reduzida (Saravanan et al., 2007a, 2007b). Estudos acerca das vias de mobilização de zinco, utilizando um banco de mutantes de *G. diazotrophicus* PAL5, revelaram que genes envolvidos

na síntese do ácido 5-cetoglucônico são essenciais para o processo de solubilização destes elementos (Intorne et al., 2009).

#### **2.2.4. Síntese de reguladores de crescimento vegetal**

Nos processos de promoção de crescimento vegetal, os reguladores de crescimento ou fitohormônios, dentre eles, auxina, etileno, citocininas, ácido abscísico e giberelinas, desempenham um papel importante. Esses fitohormônios podem ser sintetizados pela planta e também por microrganismos em associação com o vegetal. Ademais, a associação bactéria/planta pode influenciar o equilíbrio hormonal da planta (Berg, 2009).

Dentre as classes de fitohormônios supracitados, diversas espécies bacterianas possuem a capacidade de produzir o hormônio vegetal auxina. O ácido indol acético (AIA) é uma das auxinas mais conhecidas e mais bem estudadas e apresenta importância central no crescimento das plantas (Arshad et al., 1991; Boddy et al., 1995; Bashan et al., 2004).

Diferentes rotas para a biossíntese de AIA já foram identificadas. Interações entre bactérias produtoras de AIA e plantas resultam em diferentes resultados podendo variar de efeitos benéficos à patogenia, dependendo da sua concentração (Spaepen et al., 2007). Quando em baixas concentrações, pode estimular, e quando em altas concentrações, pode inibir o desenvolvimento da raiz vegetal.

É provável que bactérias usem este fitohormônio para interagir com as plantas como parte de sua estratégia de colonização, incluindo fitoestimulação e evasão dos mecanismos de defesa vegetal. Além disso, vários estudos recentes indicam que o fitohormônio AIA também pode ser uma molécula sinalizadora em bactérias e, portanto, pode ter um efeito direto sobre a fisiologia bacteriana. Os níveis de AIA produzidos pelas bactérias dependem do crescimento bacteriano, da atividade metabólica e da expressão de genes que codificam enzimas para a biossíntese do hormônio (Lambrecht et al., 2000).

Quando secretado por bactérias, o AIA pode afetar de forma direta a morfologia das raízes, aumentando o comprimento e o número de pêlos radiculares (Barbieri et al., 1986) ou, indiretamente, pela influência sobre a atividade da ACC desaminase (1-aminociclopropano-1-carboxilato, um precursor

do etileno) (Patten et al., 2002). Neste sentido, microrganismos que sintetizam o AIA são considerados importantes promotores de crescimento vegetal, podendo melhorar o rendimento das culturas (Arkhipova et al., 2005).

Evidências sobre a ação do AIA, no desenvolvimento radicular, foram obtidas pela inoculação de um mutante de *Azospirillum* deficiente na produção desse fitohormônio (Dobbelaere et al., 1999). Atualmente, já foram descritas, em *Azospirillum*, pelo menos três vias metabólicas responsáveis pela produção de AIA. Duas dessas vias são dependentes de triptofano, denominadas indole-3-acetamida (IAM) e indole-3-piruvato (IpyA). Já a terceira via é independente de triptofano (Dobbelaere et al., 1999; Lambrecht et al., 2000).

O triptofano tem sido identificado como um precursor principal nas vias de biossíntese de IAA em bactérias. A transformação de triptofano em AIA pode ser realizada por microrganismos que produzem uma conversão oxidativa quando o triptofano se encontra em presença de peroxidases e de radicais livres. As vias de sínteses do AIA se baseiam na evidência obtida a partir da presença de intermediários, atividade biológica e enzimas capazes de converter *in vivo* estes intermediários em AIA.

A produção destes reguladores já foi relatada em bactérias dos gêneros *Gluconacetobacter*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Methylobacterium*, *Erwinia*, *Pantoea* e *Pseudomonas* (Fuentes-Ramirez et al., 1993; Patten et al., 1996; Lucangeli et al., 1997; Bastián et al., 1998; Cassán et al., 2001, Verma et al., 2001; Koenig et al., 2002).

A biossíntese de AIA é crucial no crescimento e desenvolvimento de plantas, no entanto, o potencial de cepas bacterianas em aumentar a produção de AIA pode ser usado como um dos critérios para a seleção de microrganismos eficazes para a promoção do crescimento vegetal (Ali et al., 2008).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar estirpes bacterianas associadas à cana-de-açúcar, variedade CB 4789, com potencial para a solubilização dos nutrientes fósforo e zinco e para a produção de auxina *in vitro*.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as estirpes isoladas através do sequenciamento da região 16S rDNA;
- Avaliar o potencial das estirpes bacterianas em solubilizar fosfato de cálcio e óxido de zinco e sintetizar auxina (AIA) *in vitro*;
- Avaliar o potencial de resistência e susceptibilidade a antibióticos;
- Determinar o perfil bioquímico dos isolados.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Material vegetal e condições de cultivo

Plantas de cana-de-açúcar (cultivar CB 4789), cedidas pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Campus Leonel Miranda – Campos dos Goytacazes/RJ), foram cultivadas a partir de mini-toletes. Os mini-toletes foram plantados em vasos plásticos de 700 mL contendo substrato inerte, composto por uma mistura de areia e plantmax® em uma proporção de 2:1 e mantidos em casa de vegetação.

### 4.2. Isolamento bacteriano

Para o isolamento bacteriano foram utilizadas plantas de cana-de-açúcar com três meses de idade. Com o objetivo de remover bactérias da superfície vegetal, amostras de raízes e folhas foram lavadas em água corrente. Em seguida, as amostras foram secas em papel toalha para a retirada do excesso de água. Logo após, pesou-se 1 g das amostras, as quais foram desinfestadas superficialmente com álcool 70% por 2 minutos, duas lavagens em água destilada estéril por 3 minutos. Para a desinfestação de raízes, as mesmas foram imersas em solução de cloramina T a 1% ( $C_7H_7ClNNaO_2S_3H_2O$ ) por 10 min e para as folhas, as mesmas foram, novamente, expostas em álcool 70% durante 3 minutos. Os passos seguintes tanto para desinfestação de folhas e raízes procedeu-se com 3 lavagens em água destilada estéril. Após a desinfestação superficial, as amostras de raízes e folhas foram maceradas em solução salina (Tabela 1) com a utilização de pistilo e almofariz. Após a homogeneização inicial,

as amostras de folhas e raízes foram submetidas a diluições seriadas até  $10^{-6}$ . Em seguida 100  $\mu\text{L}$  de cada diluição foram espalhadas com uma alça de Drigalski na superfície da placa contendo LGI-P acrescido de 20  $\text{mg L}^{-1}$  de extrato de levedura (Döbereiner et al.,1995) e incubadas em estufa bacteriológica por uma semana à temperatura de 30°C.

**Tabela 1.** Solução salina para maceração e diluição

Composição	Concentração ( $\text{g L}^{-1}$ )
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3,4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{NaCl}$	0,1
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02
$\text{KOH}$	4,5

Para 1 L de solução salina adicionar 2 ml de solução de micronutrientes (Tabela 2) e 4 ml de FeEDTA (solução a 1,64%). Ajustar o pH para 7 com KOH. A solução salina foi esterilizada em autoclave a 121 °C por 20 min.

**Tabela 2.** Solução de micronutrientes

Composição	Concentração ( $\text{g L}^{-1}$ )
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,04
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,2
$\text{H}_3\text{BO}_3$	1,4
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,175

### 4.3. Meios de multiplicação e purificação das bactérias

Após 7 dias de cultivo as colônias bacterianas, provenientes de raiz e folha de cana-de-açúcar, que surgiram nas placas de Petri foram selecionadas e então crescidas em meio líquido LGI-P (Döbereiner et al. 1995) (Tabela 3) e DYGS modificado (Rodrigues Neto et al., 1986) (Tabela 4) e incubadas por 18 horas à temperatura de 30°C sob agitação constante de 140  $\text{m}^{-1}$ .

As culturas bacterianas crescidas foram semeadas em meio sólido LGI-P e DYGS, utilizando a técnica de esgotamento com alça de platina. As placas foram incubadas em estufa a 30°C por 24-48 h. As colônias formadas foram novamente transferidas para o meio DYGS líquido e este procedimento foi repetido até a obtenção de apenas colônias puras nas placas. Após este processo, colônias isoladas foram selecionadas para estudo e estocadas em glicerol 50% a -70° C.

**Tabela 3:** composição do meio LGI-P

Composição	Concentração (g L <sup>-1</sup> )
Açúcar cristal	100
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6
MgSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02
FeCl <sub>3</sub>	0,01
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,002

**Tabela 4:** composição do meio DYGS

Composição	Concentração (g L <sup>-1</sup> )
Extrato de levedura	2,0
Peptona bacteriológica	1,5
Glicose	2,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
Ácido glutâmico	1,5

Os componentes dos meios foram dissolvidos em água destilada e esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 min. O pH do meio DYGS e LGI-P foi ajustado para 5,5 com KOH antes da esterilização.

No preparo do meio DYGS e LGI-P sólido foi adicionado 17 g L<sup>-1</sup> de agar-agar. Como indicador de pH foi utilizado azul de bromotimol 0,5 % em KOH 0,2 M (5 mL L<sup>-1</sup>). Acrescentou-se 20mg L<sup>-1</sup> de extrato de levedura ao meio LGI-P.

#### 4.4. Solubilização de fosfato de cálcio e óxido de zinco

Para avaliar a capacidade de solubilização dos microrganismos, utilizou-se uma metodologia baseada na observação de zonas claras ou halo de solubilização. A zona de solubilização é formada ao redor das colônias, em meio de cultivo sólido contendo o composto insolúvel da substância que se quer avaliar, devido à liberação de ácidos orgânicos pela bactéria.

Para avaliar o potencial de solubilização de fósforo e zinco das estirpes selecionadas, os ensaios foram realizados em LGI (Cavalcante e Dobereiner, 1988). Inicialmente, as estirpes bacterianas foram crescidas em meio líquido DYGS por 18 h, a 30 °C e 140 m<sup>-1</sup>. Após o crescimento bacteriano, alíquotas de 10 µL das soluções bacterianas (10<sup>8</sup> células mL<sup>-1</sup>) foram colocadas em placas de Petri contendo meio LGI + 0,54% Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>OH ou 0,12% ZnO e meio LGI controle e incubadas a 30 °C por 7 dias. A avaliação da solubilização de fosfato e zinco foi realizada por meio da medição do diâmetro do halo translúcido que se forma em torno das colônias. Foram realizadas três repetições para cada estirpe

bacteriana. Como controle positivo usou-se a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5.

**Tabela 5.** Composição do meio LGI

Composição	Concentração (g L <sup>-1</sup> )
Glicose	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6
MgSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub>	0,2
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02
FeCl <sub>3</sub>	0,01
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,002

No preparo do meio LGI sólido foi adicionado 15 g L<sup>-1</sup> de agar-agar. O pH foi ajustado para 6 com ácido acético.

#### 4.5. Produção de auxina (AIA)

As bactérias foram crescidas previamente em meio líquido DYGS (Döbereiner et al.,1995) por 18 h, a 30 °C e 140 m<sup>-1</sup>. Alíquotas de 10 µL das soluções bacterianas contendo 10<sup>8</sup> células mL<sup>-1</sup> foram transferidas para erlenmayer de 50 mL, contendo 10 mL do meio DYGS com e sem adição de triptofano (100 µg mL<sup>-1</sup>) e incubadas no escuro por 72 horas, a 30 °C e 140 m<sup>-1</sup>. Para avaliação da síntese de auxina (AIA) (Sarwar et al., 1995), 1 mL da cultura foi centrifugada a 14.000 m<sup>-1</sup> por 5 minutos. Cem µL do sobrenadante foram transferidos para microplacas de poliestireno e, posteriormente, foram adicionados 100 µL do reagente de Salkowsky (1 mL de tricloreto de ferro hexahidratado (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O), 0,5 mol L<sup>-1</sup>, em 50 mL de ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>), 35% em água), as placas foram mantidas no escuro por 60 min. Após esse período, foram realizadas leituras no comprimento de onda de 540 nm em espectrofotômetro. A concentração de auxina (AIA) foi estimada ajustando equações de regressão para as curvas de calibração entre absorvância e

concentração de ácido indol acético (AIA). Foram realizadas três repetições para cada estirpe bacteriana. Como controle positivo usou-se a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5.

#### **4.6. Caracterização bioquímica dos isolados**

As análises das características bioquímicas dos isolados, dentre elas o teste de oxidase, catalase, resistência a antibióticos pelo método de difusão em disco e análise das propriedades metabólicas foram realizadas no laboratório de sanidade animal (CCTA/LSA/UENF). O teste de coloração de Gram e o ensaio de resistência ao antibiótico espectinomicina foram realizados no laboratório de biotecnologia (CBB/LBT/UENF).

##### **4.6.1. Coloração de Gram**

A técnica de coloração de Gram consiste em preparações histológicas para observação ao microscópio óptico. Tal técnica é utilizada para corar microrganismos com base na composição química e integridade da sua parede celular (Gram, 1884). De acordo com a cor que adquirem, são classificados em Gram positivos (roxo) ou Gram negativos (vermelho).

De acordo com o protocolo sugerido por Yano e colaboradores (1991), um pingo da amostra bacteriana foi depositado sobre uma lâmina de vidro e espalhada com alça de platina. Posteriormente, as amostras foram passadas em chama 3 vezes até secar. Em seguida, cobriu-se a lâmina com cristal violeta por 1 minuto e lavou-se, imediatamente, em água corrente. Os próximos passos foram: cobrir a lâmina com lugol por 2 minutos; lavar com água corrente e descorar rapidamente com álcool-acetona (1:1); lavar a lâmina; cobrir com safranina por 30 segundos e, finalmente, lavar a lâmina com água, secar e avaliar ao microscópio óptico.

#### **4.6.2. Teste de oxidase**

A oxidase é uma enzima encontrada em algumas bactérias que transferem elétrons ao oxigênio, o qual atua comoceptor final do elétron. A presença da oxidase pode ser detectada com o uso de uma solução de TEMED (Kovacs, 1956). Uma alíquota de 50 µl de suspensão bacteriana foi depositada em tiras de papel de filtro. Posteriormente, uma gota de solução aquosa de TEMED (1%) (N-N-dimetil-p-fenilenediamino) foi depositada sob a cultura no papel de filtro. Se as bactérias oxidarem o reagente, aparecerá uma coloração roxa, indicando um teste positivo. Nenhuma mudança da cor indicará um teste negativo.

#### **4.6.3. Teste da catalase**

O teste da catalase é usado para a distinção de bactérias. Uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) foi depositada sobre a amostra (uma gota de cultura líquida do microrganismo) que então foi esfregada nesta gota (Yano et al., 1991). Quando ocorre a presença de bolhas, o organismo é catalase positivo, se não é catalase negativo. As bolhas são formadas pelo oxigênio molecular liberado na reação da catalase.

#### **4.6.4. Perfil de resistência a antibióticos**

O perfil de resistência e/ou susceptibilidade a antibióticos foi determinado através do método de difusão em disco de Kirby-Bauer (NCCLS, 1983) em meio de cultura Mueller-Hinton. A resistência e/ou susceptibilidade em Mueller-Hinton foi testada para os antibióticos amoxicilina + ácido clavulânico (20 µg/10 µg mL<sup>-1</sup>), ciprofloxacino (5 µg mL<sup>-1</sup>), gentamicina (10 µg mL<sup>-1</sup>), sulfazotrin (300 µg mL<sup>-1</sup>), tetraciclina (30 µg mL<sup>-1</sup>), cefalotina (30 µg mL<sup>-1</sup>), cefoxitina (30 µg mL<sup>-1</sup>), ampicilina (10 µg mL<sup>-1</sup>), tobramicina (10 µg mL<sup>-1</sup>), cefalexina (30 µg mL<sup>-1</sup>). As placas foram mantidas em estufa bacteriológica a 30<sup>0</sup>C por 24 horas e avaliadas, posteriormente. Para o antibiótico espectinomicina, o teste foi realizado em meio

LGI-P acrescido de  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  do antibiótico e mantidas em estufa a  $30^{\circ}\text{C}$  por 5 dias.

#### **4.6.5. Análise das propriedades metabólicas dos isolados: utilização de açúcar e aminoácido como fonte de carbono**

A determinação das propriedades metabólicas dos isolados foi realizada a partir de um sistema de identificação automática para bacilos Gram negativos, com 32 testes de utilização de açúcar e aminoácidos como fonte de carbono. O meio Mueller Hinton foi usado por ser um meio de pré-seleção para a determinação de perfil bioquímico. Todos os isolados cresceram bem neste meio e foram testados com o Kit API-ID 32 GN (*Bio Mérieux S.A., France*), exceto o isolado 3 que foi testado com o Kit API-ID 32 E, o qual contém uma tira com 30 cúpulas. O kit API-ID 32 GN (*Bio Mérieux S.A., France*) consiste de uma tira com trinta e duas cúpulas que contêm cada uma um substrato carbonado sob forma desidratada, permitindo a avaliação de trinta e duas características bioquímicas. A inoculação dos isolados nesse kit foi feita conforme as recomendações do fabricante e após 24-48 horas de incubação as tiras foram lidas e os resultados computados e analisados com o auxílio do aparelho ATB<sup>®</sup> ou mini API.

### **4.7. Caracterização molecular**

#### **4.7.1. Extração de DNA genômico**

O DNA genômico dos isolados, crescidos durante a noite em meio de cultura líquido DYGS, foi extraído utilizando o kit de extração *Plant DNAzol* (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) de acordo com o manual do fabricante. O DNA extraído foi quantificado através de gel de agarose 1,2% utilizando um padrão de peso molecular (KS –  $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ).

#### **4.7.2. Amplificação do 16S rDNA**

A região 16S rDNA foi amplificada por PCR com os seguintes oligonucleotídeos iniciadores para o domínio *Eubacteria* fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3')

(Weisburg et al., 1991). Amplificações do 16S rDNA por PCR foram feitas em volume de 50  $\mu$ L contendo 20 pmols de oligonucleotídeos iniciadores, 200  $\mu$ M de cada dNTP, 1 X tampão *Taq*, 1,5 mM  $MgCl_2$ , 2 U e 20 ng de DNA. A PCR foi iniciada com 3 minutos de desnaturação a 94°C, seguido de 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 10 minutos. Uma aliquota de 2  $\mu$ L do produto da PCR foi analisada em gel de agarose 1,2%, utilizando como padrão molecular o marcador 1KB *plus* DNA Ladder (Invitrogen). Os produtos amplificados foram purificados utilizando etanol 70% e isopropanol 100%.

#### **4.7.3. Sequenciamento de amplicons do 16S rDNA**

A reação de sequenciamento dos fragmentos foi feita em um volume final de 10  $\mu$ L, onde foram utilizados 20 ng dos fragmentos de interesse; 3,2 pmoles de oligonucleotídeos iniciadores; 2,0  $\mu$ L de tampão 2,5 X; 0,5  $\mu$ L de Big Dye Terminator Cycle Sequencing v.3 (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram o rD1 e fD1, além dos conjuntos de oligonucleotídeos internos descritos na tabela 1, visando o fechamento da seqüência do 16S rDNA. As condições de amplificação foram: 4 minutos de desnaturação a 94°C; seguidos de 25 ciclos com desnaturação a 94°C, por 1 minuto, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos.

**Tabela 6.** Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação da região 16S rDNA das estirpes bacterianas isoladas de folha e raiz de cana-de-açúcar cultivar CB 4789

<b>Sequência (3'-5')</b>	<b>Posição de alinhamento na sequência de <i>E. coli</i></b>
CCT ACG GGA GGC AGC AG	341-357F
CTG CTG CCT CCC GTA GG	357R
GTA G(GC)G GTG AAA T(GC)C GTA GA	685-704F
TCT ACG SAT TTC ACC (GC) CT AC	704R
GGG TTG CGC TCG TTG C	1114R

Após a amplificação dos fragmentos de interesse, procedeu-se a precipitação com a eliminação dos ddNTPs que não foram incorporados. Os produtos de PCR foram transferidos para microtubos de 500  $\mu\text{L}$  e, posteriormente foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de água ultrapura esterilizada e 30  $\mu\text{L}$  de isopropanol 100%. Após a homogeneização por agitação, os microtubos foram incubados à temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugados a 14.000  $\text{m}^{-1}$  por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e 250  $\mu\text{L}$  de etanol 70% foram adicionados. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 14.000  $\text{m}^{-1}$ , o sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi incubado por 5 minutos a 40 °C para secagem. Em seguida o precipitado foi ressuspendido em 10  $\mu\text{L}$  de formamida (HiDi formamida – Applied Biosystems) e transferido para microplacas com capacidade para 96 amostras. Esta microplaca foi colocada em um termociclador para a desnaturação do DNA a 96°C durante 5 minutos sendo, imediatamente, colocada no gelo por 2 minutos.

A leitura das bases marcadas foi realizada no Sequenciador Automático ABI Prism 3130 Genetic Analyser do Núcleo de Análise Genômica / UENF.

#### 4.7.4. Análise filogenética das sequências

As sequências geradas foram editadas removendo as bases de baixa qualidade (<20) através do programa Geneious 4.8. As sequências foram analisadas pelo BLASTn contra a base de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information, website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal W 1.8 (<http://www.ebi.ac.uk/index.html>) (Thompson et al., 1994). Posteriormente, o ajuste das extremidades das sequências de DNA, de forma que todas elas tivessem o mesmo número de bases e estivessem completamente alinhadas, foi realizado com o auxílio do programa BioEdit (Hall, 2001). Para o cálculo da significância estatística da similaridade entre as sequências foi utilizada uma reamostragem para 1000 replicações (Swofford et al. 1996). O método de distância (Jukes e Cantor) (Saitou & Nei, 1987) foi utilizado para a construção da árvore filogenética com auxílio do programa Geneious 4.8. A sequência do 16S rDNA de *E. coli* foi utilizada como grupo externo das árvores filogenéticas construídas.

#### 4.8. Análise estatística

Os dados foram organizados e os gráficos gerados no programa Microsoft Excel. Posteriormente, os dados foram testados através da análise de variância (ANOVA). Sempre que a hipótese nula foi rejeitada, o teste *a posteriori* de Tukey foi aplicado para identificar que as médias diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ). Quando necessário, o teste t foi utilizado para comparação entre os tratamentos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Isolamento de estirpes bacterianas associadas à cana-de-açúcar

Plantas de cana-de-açúcar variedade CB 4789, crescendo em condições de casa de vegetação, foram utilizadas para a seleção de estirpes bacterianas com características para a promoção de crescimento vegetal, dentre elas, solubilização de fosfato e zinco insolúvel e produção de auxina (AIA) *in vitro*.

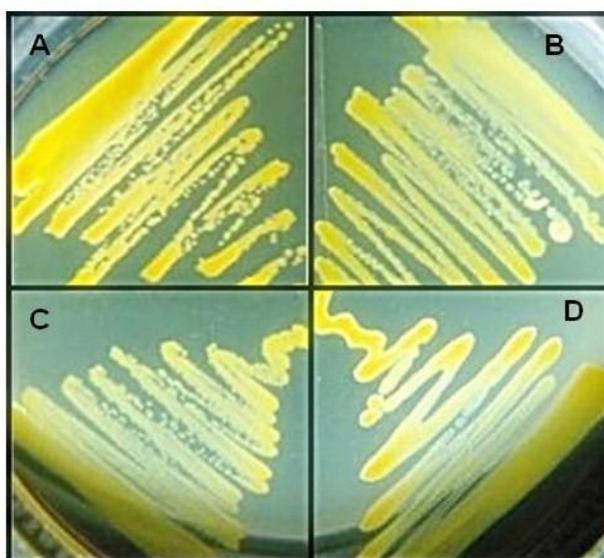
As estirpes bacterianas foram isoladas em meio LGI-P acrescido de extrato de levedura. Após uma semana de crescimento a 30<sup>0</sup>C, as colônias que apareceram nas placas foram analisadas (coloração, tamanho da colônia) e, posteriormente, contadas. Baseado em morfotipos distintos de colônias em LGI-P, foram selecionados dois isolados bacterianos de folha, os quais foram nomeados SCB4789F-1 e SCB4789F-2 (folha) e um de raiz, nomeado SCB4789R-1 (Tabela 7).

**Tabela 7.** Identificação e origem das estirpes bacterianas isoladas de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) variedade CB 4789

Isolados	Tecido
SCB4789F-1	Folha
SCB4789F-2	Folha
SCB4789R-1	Raiz

A população dos isolados SCB4789F-1 e SCB4789F-2, isolados de folha, foi de, aproximadamente,  $2 \times 10^3$  CFU/g de tecido vegetal. Já a população de SCB4789R-1, isoladas de raiz, foi de  $4 \times 10^4$  CFU/g de tecido vegetal.

As estirpes selecionadas tiveram o seu crescimento avaliado em meio líquido LGI-P, LGI e DYGS modificado, pH 5,5. Todas as estirpes apresentaram um bom crescimento nos três meios testados (em ~ 18h de cultivo a  $30^\circ\text{C}$ ,  $140 \text{ m}^{-1}$ ). Uma alíquota dessas bactérias foi inoculada em meio LGI-P sólido, acrescido de extrato de levedura, e após uma semana de crescimento a  $30^\circ\text{C}$ , as estirpes bacterianas apresentaram uma coloração amarelada, com aspecto cremoso, similar à coloração apresentada por *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Figura 3).



**Figura 3.** Aspectos morfológicos de bactérias associadas à cana-de-açúcar. As bactérias foram inoculadas em meio LGI-P acrescido de extrato de levedura e incubadas a  $30^\circ\text{C}$  durante 7 dias. (A) *G. diazotrophicus* PAL5; (B) isolado SCB4789F-1; (C) isolado SCB4789F-2 e (D) isolado SCB4789R-1.

## 5.2. Solubilização de fosfato de cálcio e óxido de zinco

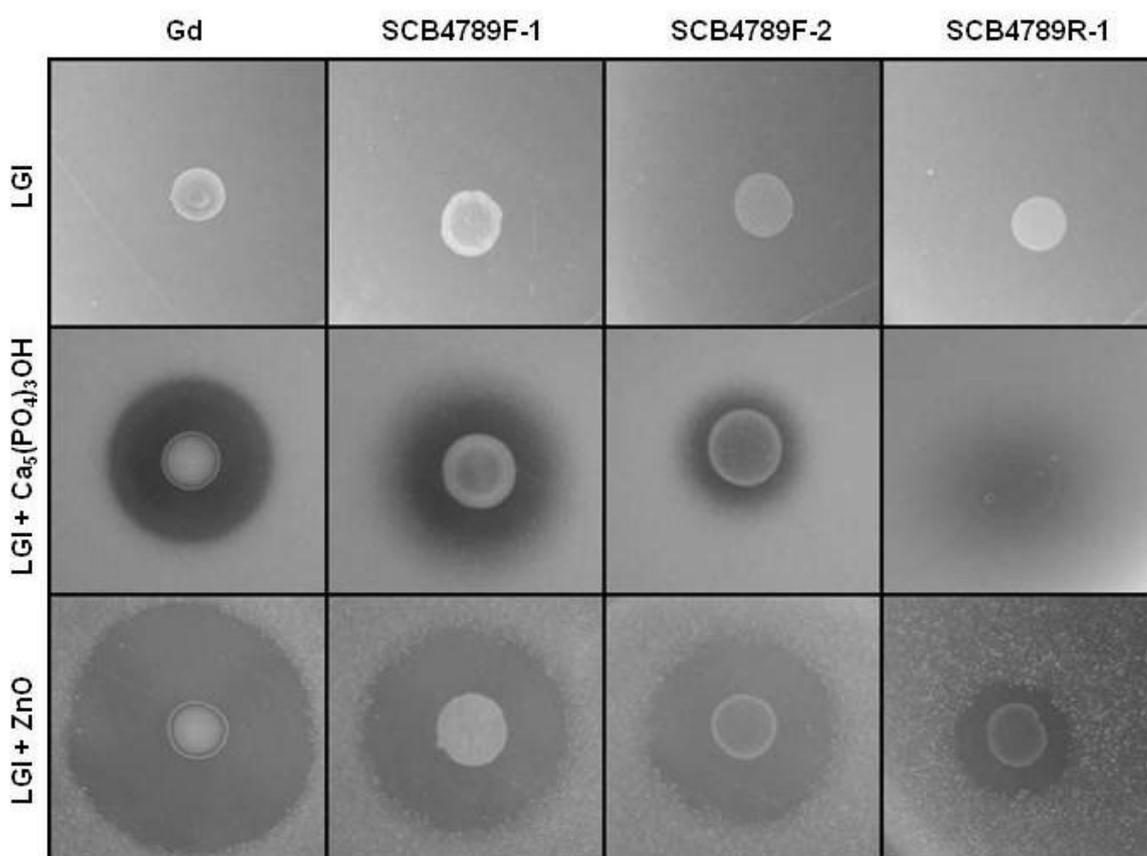
O perfil de solubilização de macro e micronutrientes foi baseado na presença de uma zona clara ou halo de solubilização ao redor das colônias em meio sólido LGI suplementado com fosfato de cálcio ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ) e óxido de zinco ( $\text{ZnO}$ ) (Figura 4). A bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* foi utilizada como controle positivo de solubilização tanto para o fósforo quanto para o zinco, pois tal microrganismo possui a capacidade de solubilizar *in vitro* esses nutrientes.

As estirpes estudadas foram capazes de solubilizar fósforo em meio LGI,

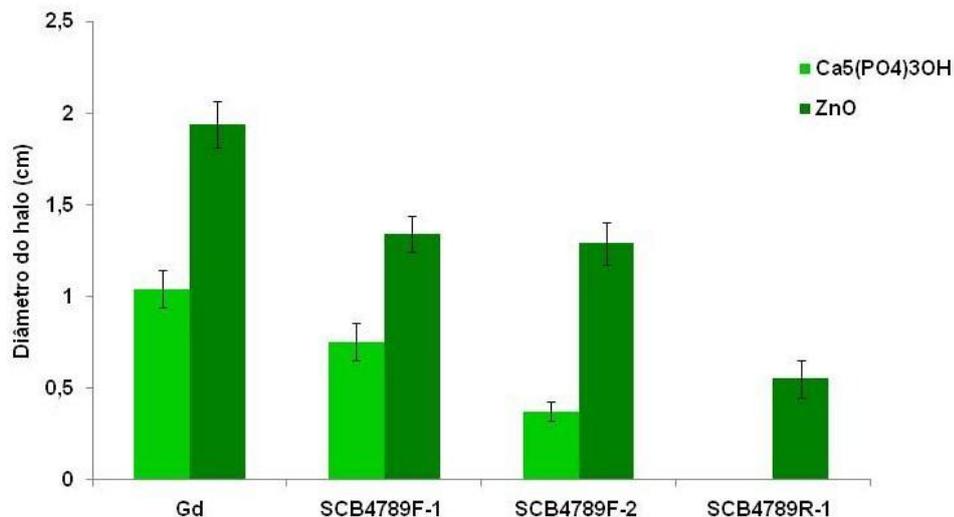
exceto o isolado SCB4789R-1, o qual não mostrou halo de solubilização que pudesse ser avaliado após 1 semana de cultivo. O isolado SCB4789F-1 foi o mais eficiente para a solubilização de fósforo, com um halo de solubilização cujo diâmetro foi de, em média, 0,75 cm (Figuras 4 e 5).

Quanto à solubilização de zinco, após uma semana de cultivo, as três estirpes bacterianas mostraram-se eficientes para essa característica. Os isolados SCB4789F-1 e SCB4789F-2 foram os mais eficientes na solubilização de zinco, com um halo cujo diâmetro foi de, em média, 1,34 e 1,29 cm, respectivamente (Figuras 4 e 5).

Segundo a ANOVA, houve diferença significativa entre todas as bactérias testadas para a solubilização de fósforo ( $p < 0,001$ ). Quanto à solubilização de zinco, só não houve diferença significativa entre os isolados SCB4789F-1 e SCB4789F-2 ( $p > 0,05$ ).



**Figura 4.** Halos de solubilização produzidos por estirpes isoladas de folha e raiz de cana-de-açúcar. As bactérias foram inoculadas em meio LGI contendo  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  de ZnO e  $5,4 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ . *Gluconacetobacter diazotrophicus* foi usada como controle positivo.



**Figura 5.** Diâmetro do halo de solubilização produzido por estirpes isoladas de folha e raiz de cana-de-açúcar. As bactérias foram inoculadas em meio LGI contendo  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  de ZnO e  $5,4 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ . *Gluconacetobacter diazotrophicus* foi usada como controle positivo. O experimento foi realizado em triplicata. As barras verticais indicam o desvio padrão.

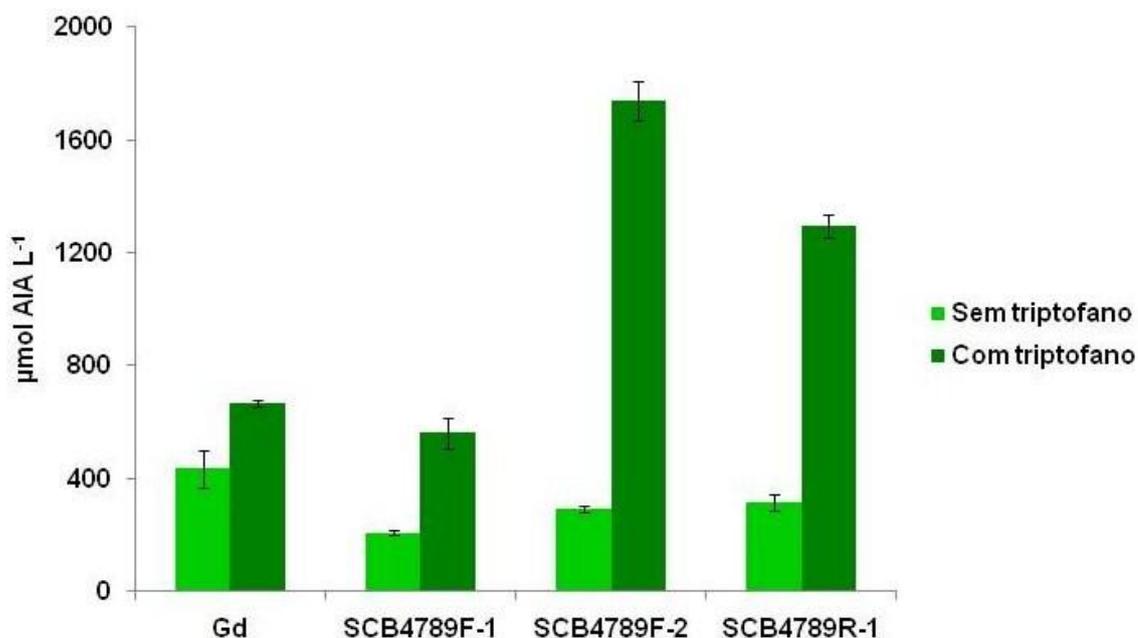
### 5.3. Síntese de ácido indol acético (AIA)

A síntese de AIA foi determinada colorimetricamente, através do reagente de Salkowsky, e foi expressa em  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de AIA. Os três isolados foram capazes de produzir AIA na ausência e presença de triptofano, no entanto os isolados diferiram na capacidade de sintetizar AIA. Os maiores valores para a síntese de AIA foram obtidos com o acréscimo de triptofano no meio de cultivo DYGS.

O isolado que apresentou uma maior síntese de AIA foi SCB4789F-2, com uma produção de  $1.738 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AIA em meio DYGS acrescido de triptofano após 72 horas de incubação a  $30^\circ\text{C}$   $140 \text{ m}^{-1}$  (Figura 6). Os isolados SCB4789F-2 e SCB4789R-1 sintetizaram, em média, 2,6 e 1,94 vezes mais AIA na presença de triptofano, respectivamente, quando comparado com *Gluconacetobacter diazotrophicus*, que foi usada como controle positivo para a produção de AIA (Figura 6).

Segundo a ANOVA, não houve diferença significativa para a síntese de AIA na ausência de triptofano entre os isolados SCB4789F-2 e SCB4789R-1 ( $p > 0,05$ ). Em relação à síntese de AIA na presença de triptofano houve diferença significativa entre os isolados ( $p > 0,01$ ), exceto entre Gd e SCB4789F-1. Com o

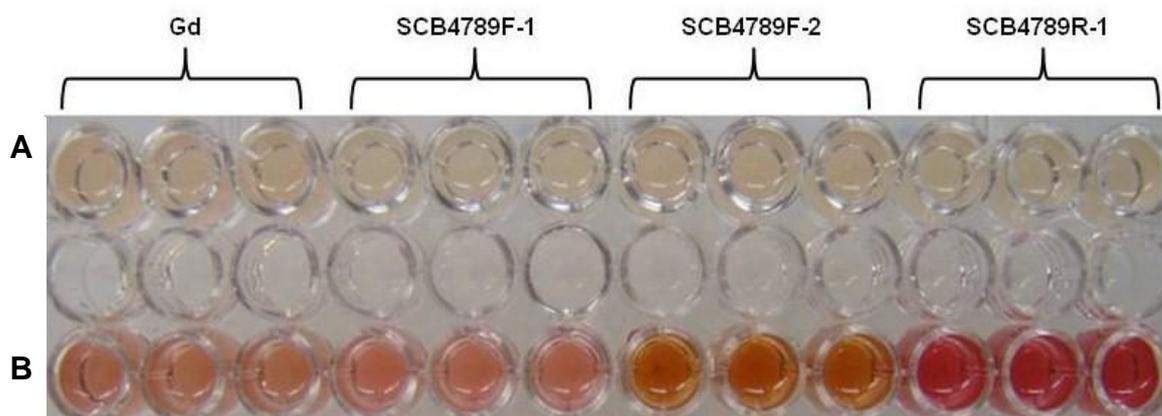
intuito de comparar os tratamentos (ausência e presença de triptofano) foi utilizado o teste t, onde foi possível observar diferenças significativas entre todos os isolados ( $p < 0,001$ ).



**Figura 6.** Concentração de AIA  $\mu\text{mol L}^{-1}$  sintetizados pelos isolados bacterianos crescidos em meio DYGS na ausência e presença do aminoácido triptofano. A quantificação foi feita após 60 minutos na presença do reagente de Salkowsky O experimento foi realizado em triplicata. As barras verticais indicam o desvio padrão.

A reação de uma solução de AIA com o reagente de Salkowsky resulta em uma coloração amarelada para o teste negativo e rosa avermelhado para o teste positivo. Os isolados, interessante, apresentaram perfis de coloração diferentes após 60 minutos de incubação na presença do reagente de Salkowsky.

O perfil de coloração apresentado pelo isolado SCB4789F-1 ficou próximo ao perfil colorimétrico fornecido por *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Figura 7). Correlacionando o perfil colorimétrico com a produção de AIA foi visto que o isolado SCB4789F-1 sintetizou quantidades similares de AIA quando comparado com *G. diazotrophicus* (Figura 6 e 7).



**Figura 7.** Perfil colorimétrico de AIA sintetizado pelos isolados bacterianos crescidos em meio DYGS na ausência (A) e presença (B) do aminoácido triptofano. O perfil colorimétrico foi observado após 60 minutos de reação. O experimento foi realizado em triplicata.

#### 5.4. Caracterização bioquímica e molecular dos isolados

Como já fora supracitado, todos os isolados bacterianos possuíram características relevantes para a promoção de crescimento vegetal, tais como solubilização de fósforo e zinco e síntese de auxina (AIA) *in vitro*. Baseado nessas características, a identificação e caracterização desses isolados foi conduzida.

##### 5.4.1. Perfil bioquímico dos isolados

O padrão de coloração de Gram foi determinado para os isolados SCB4789F-1, SCB4789F-2 e SCB4789R-1. Os isolados foram todos classificados como Gram negativo. Em relação à presença das enzimas catalase e oxidase, os isolados foram classificados como catalase positiva e oxidase negativa (Tabela 8).

Todos os isolados foram testados quanto à capacidade de utilização de açúcares e aminoácidos como fonte de carbono. Os isolados mostraram perfis similares de utilização de fonte de carbono. No entanto, pequenas variações entre os três isolados em utilizar açúcar ou aminoácido como fonte de carbono foram observadas (Tabela 8). Os testes bioquímicos realizados com a utilização das galerias API-ID 32 GN e API-ID 32 E, permitiram identificar as estirpes bacterianas SCB4789F-1 e SCB4789R-1 como pertencentes ao gênero

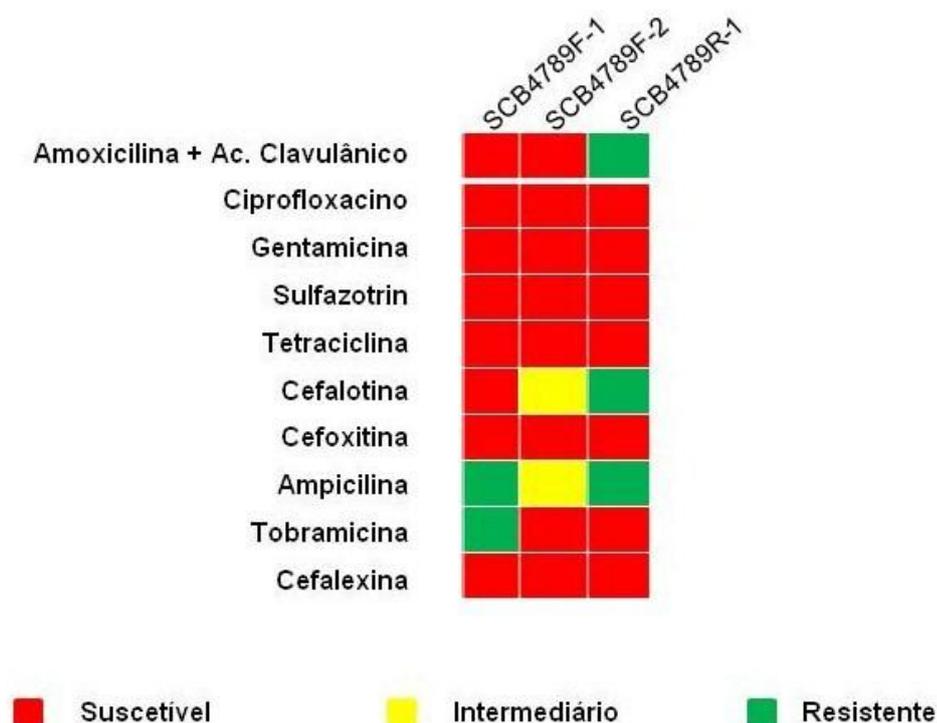
*Enterobacter* (Tabela 8). Em relação à estirpe SCB4789F-2 não foi possível identificá-la a partir da interpretação automática gerada pela galeria utilizada. No entanto, baseado no manual de Bergey, os dados bioquímicos obtidos para o isolado SCB4789F-2 serviram de suporte para classificá-lo como *Pantoea ananatis*.

**Tabela 8.** Características bioquímicas dos isolados. Os campos com o sinal (+) indicam reação positiva; os campos com sinal (-) indicam reação negativa, e os campos nt e nd indicam condição não-testada e não determinada, respectivamente.

Testes	SCB4789F-1	SCB4789F-2	SCB4789R-1
Gram	-	-	-
Catalase	+	+	+
Oxidase	-	-	-
Piruvato de sódio	+	+	-
Citrato	+	+	+
Vermelho de metila	-	-	-
L-ramnose	+	+	+
D-sacarose	+	+	+
D-ribose	+	+	nt
D-manitol	+	+	+
D-glicose	+	+	+
D-melbiose	+	+	nt
L-fucose	+	nd	nt
D-sorbitol	+	+	+
L-arabinose	+	+	+
L-trealose	nt	nt	+
Inositol	+	+	+
$\alpha$ -galactose	nt	nt	+
$\beta$ -galactose	nt	nt	+
N-acetilglicosamina	+	+	-
Malonato de sódio	-	+	+
Acetato de sódio	+	+	nt
Ácido láctico	+	+	nt
5-cetogluconato de potássio	-	+	-
L-serina	+	+	nt
L-alanina	+	+	nt
L-histidina	+	+	nt
L-prolina	+	+	nt
L-ornitina	nt	nt	+
L-arginina	nt	nt	+
L-lisina	nt	nt	-

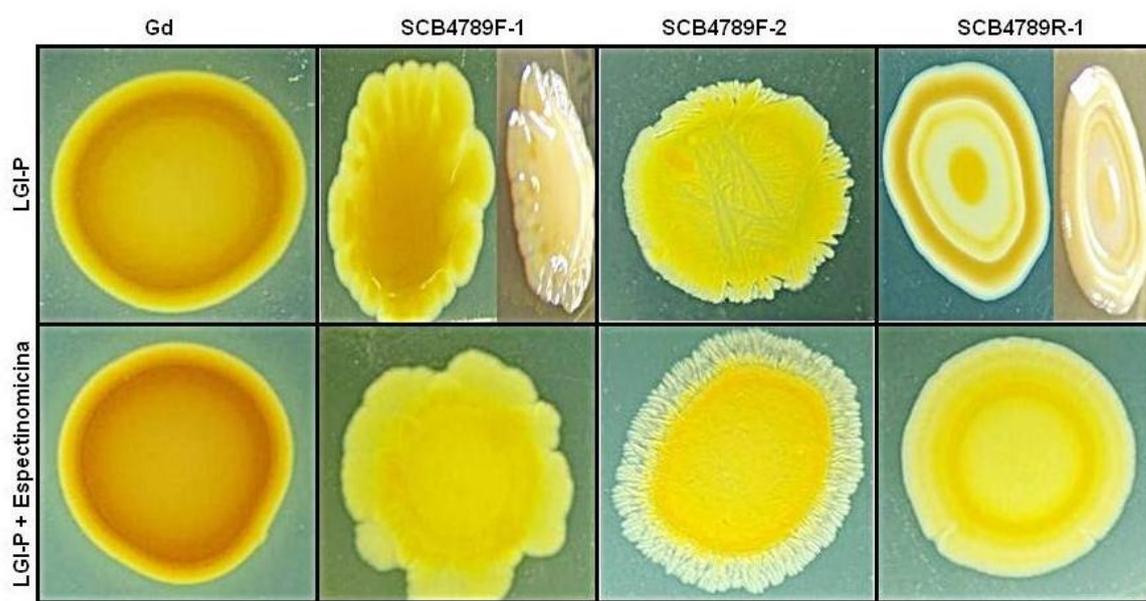
### 5.4.2. Perfil de resistência a antibióticos

Os isolados foram então avaliados quanto à resistência a antibióticos, através do método de difusão em disco (Figura 8) e em meio LGI-P acrescido de espectinomicina (Figura 9). A resistência a antibióticos é usada como um indicador de competitividade e sobrevivência, sendo que muitos dos microrganismos presentes no solo são capazes de produzir antibióticos. No teste de resistência conduzido pelo método de difusão em disco, o isolado SCB4789R-1 mostrou-se resistente aos antibióticos amoxicilina+ácido clavulânico ( $20 \mu\text{g}/10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), cefalotina ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), e ampicilina ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e sensível aos demais antibióticos testados. Já o isolado SCB4789F-1 foi resistente a ampicilina ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e tobramicina ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), sendo sensível aos demais antibióticos. O isolado SCB4789F-2 foi o mais susceptível a todos os antibióticos testados, mostrando-se moderadamente resistente aos antibióticos cefalotina ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e ampicilina ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).



**Figura 8.** Perfil de resistência a antibióticos das estirpes bacterianas isoladas de cana-de-açúcar. O teste foi realizado para os seguintes antibióticos: Amoxicilina + ácido clavulânico ( $20 \mu\text{g}/10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), ciprofloxacino ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), gentamicina ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), sulfazotrin ( $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), tetraciclina ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), cefalotina ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), cefoxitina ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), ampicilina ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), tobramicina ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), cefalexina ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

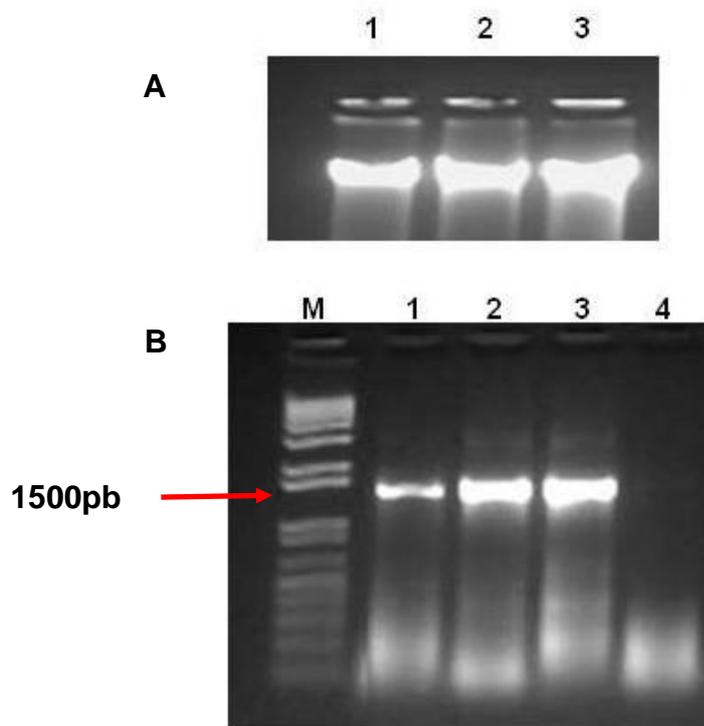
No teste de resistência para o antibiótico espectinomina ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em meio LGI-P foi visto que na presença do antibiótico, houve uma mudança de morfologia quando comparado ao controle (Figura 9). O isolado SCB4789F-2 foi o mais evidente em relação à mudança morfológica ocasionada pela presença de antibiótico no meio de cultura.



**Figura 9.** Perfil de resistência ao antibiótico espectinomina. As bactérias foram inoculadas em meio LGI-P contendo  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  do antibiótico e mantidas em estufa bacteriológica a  $30^{\circ}\text{C}$  por 5 dias. *Gluconacetobacter diazotrophicus* foi usada como controle positivo. O experimento foi realizado em triplicata.

#### 5.4.3. Identificação dos isolados através de sequenciamento do 16S rDNA

O DNA genômico dos isolados foi extraído e avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose. O aparecimento de uma única banda íntegra indica que o processo de extração do DNA foi bem sucedido e o mesmo não se encontra degradado (Figura 10A). Posteriormente, uma alíquota do DNA genômico foi utilizado para amplificar a região 16S rDNA ( $\sim 1.5 \text{ kb}$ ) com os oligonucleotídeos iniciadores rD1 e fD1 (Figura 10B). A partir dessa etapa, os amplicons 16S rDNA foram utilizados para as etapas de sequenciamento.



**Figura 10:** Extração de DNA genômico e amplificação do 16S rDNA dos isolados. **A)** Gel de agarose 1,2% para confirmação da extração do DNA genômico das 3 estirpes bacterianas com o reagente *Plant DNAzol*. **B)** Depois de isolados, os DNAs foram amplificados com os primers rD1 e fD1 e, em seguida analisados em gel de agarose 1,2%. M: marcador de peso molecular de 1kb *plus* DNA ladder (invitrogen); 1: SCB4789F-1; 2: SCB4789F-2 ; 3: SCB4789R-1 e 4: controle negativo (sem DNA).

Para a identificação dos isolados, com base na sequência do 16S rDNA obtida após o sequenciamento, realizou-se uma pesquisa no GenBank utilizando o Blastn, cuja comparação ocorreu entre os dados obtidos neste trabalho com os já existentes no banco de dados. Com base nas buscas por similaridade de sequências através do banco de dados, os isolados foram identificados como *Enterobacter sp.* e *Pantoea ananatis* (Tabela 9).

**Tabela 9.** Identificação dos isolados bacterianos através do sequenciamento da região 16S rDNA

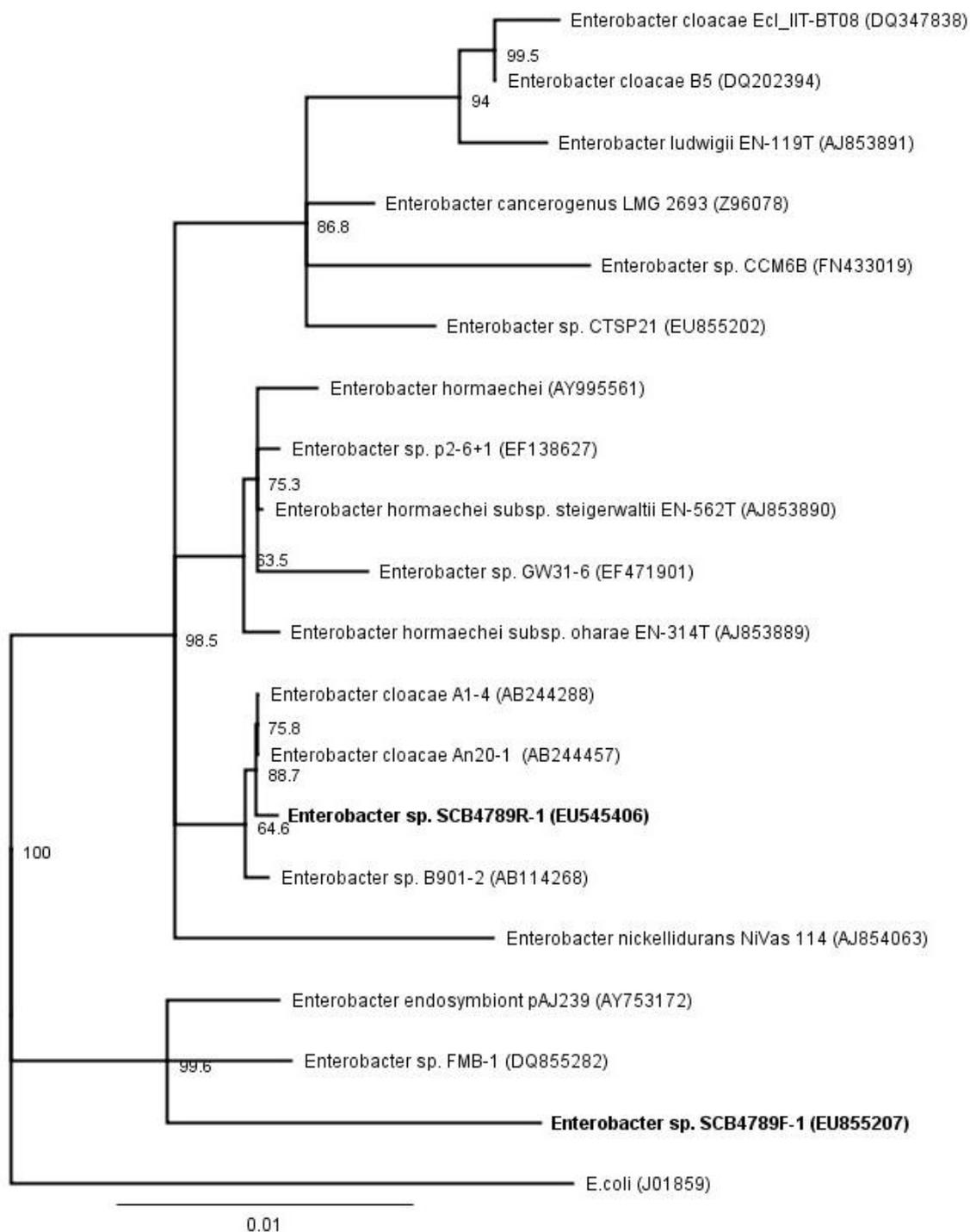
Isolado	Organismo mais relacionado	
	Espécie (estirpe)	Identidade (%)
SCB4789F-1	<i>Enterobacter sp.</i>	99
SCB4789F-2	<i>Pantoea ananatis</i>	100
SCB4789R-1	<i>Enterobacter sp.</i>	99

Posteriormente às pesquisas realizadas através do programa BLAST do GenBank por busca de similaridade para os isolados (Tabela 9), estudos das relações filogenéticas para os isolados bacterianos foram realizadas a fim de determinar seu relacionamento com espécies afins. Essas análises foram feitas a partir das sequências da região 16S rDNA dos isolados.

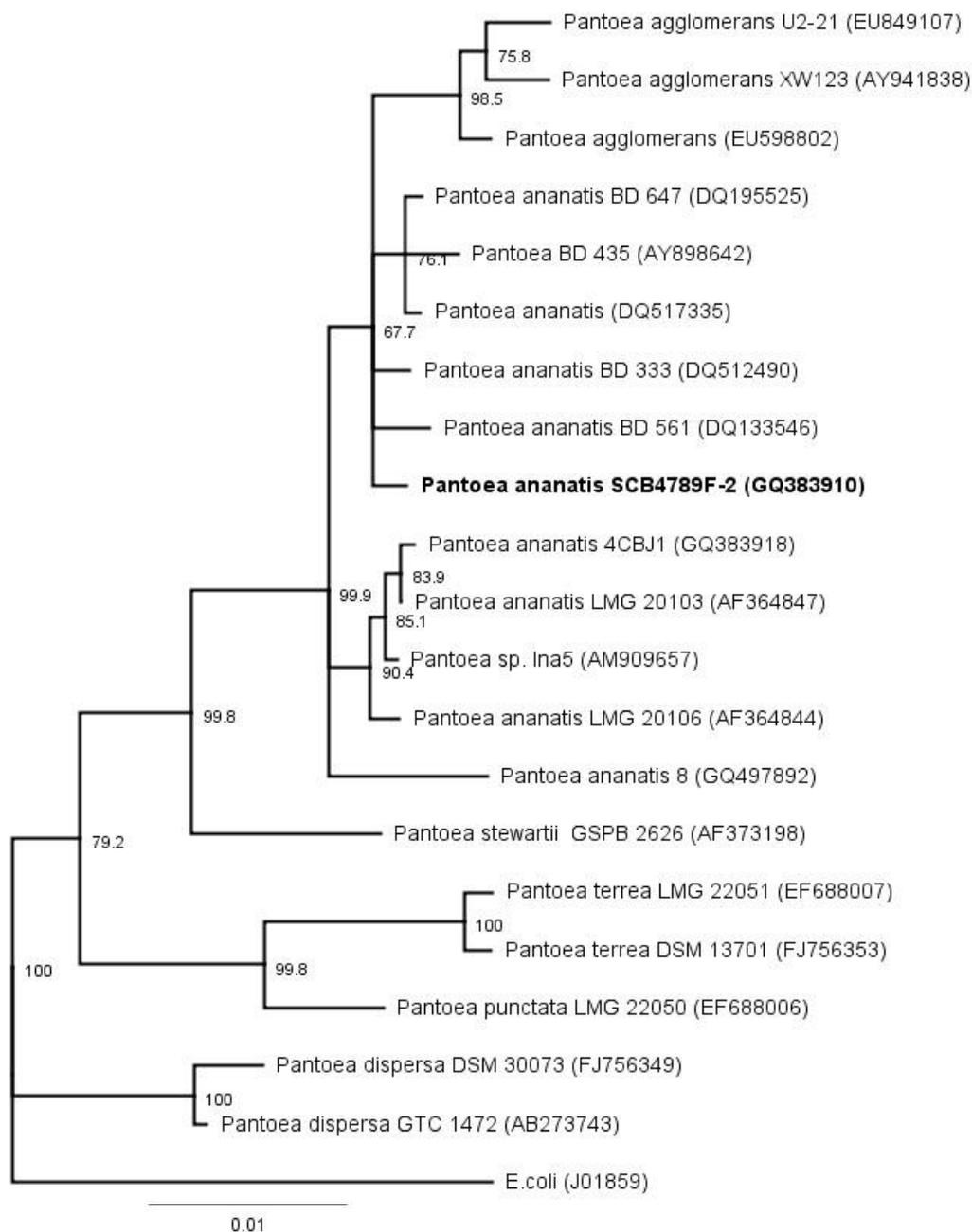
Para a construção da árvore filogenética dos isolados foram selecionadas sequências do 16S rDNA (~1500 pb) de diferentes estirpes de *Enterobacter sp.* e *Pantoea ananatis* e também de espécies do mesmo gênero. Estas sequências foram editadas e alinhadas e as árvores filogenéticas foram construídas através do programa Geneious 4.8 (Figuras 11 e 12).

Com a árvore filogenética obtida para o gênero *Enterobacter* e espécies afins pode-se observar que o isolado *Enterobacter sp.* SCB4789R-1 (EU545406) apresentou alta similaridade com *Enterobacter cloacae* e foram agrupados no mesmo grupo (Figura 11). O isolado *Enterobacter sp.* SCB4789F-1 (EU855207) mostrou similaridade com *Enterobacter endosymbiont* e *Enterobacter sp.*

O isolado *Pantoea ananatis* SCB4789F-2 (GQ383910) apresentou similaridade com outras estirpes de *Pantoea ananatis* e com *Pantoea agglomerans* (Figura 12).



**Figura 11.** Árvore filogenética mostrando a relação genética de *Enterobacter* sp. com outras estirpes e espécies do gênero, taxonomicamente similares, baseado no 16S rDNA. Número de acesso no GenBank encontra-se entre parênteses. O método usado foi o *neighbor-joining* e as distâncias calculadas pelo método de JUKES e CANTOR. Os valores em cada ramo representam porcentagens de 1.000 réplicas *bootstrap*. *E. coli* foi incluída como *outgroup*. A escala é a distância de similaridade do agrupamento em questão.



**Figura 12.** Árvore filogenética mostrando a relação genética de *Pantoea ananatis* com outras estirpes e espécies do gênero, taxonomicamente similares, baseado no 16S rDNA. Número de acesso no GenBank encontra-se entre parênteses. O método usado foi o *neighbor-joining* e as distâncias calculadas pelo método de JUKES e CANTOR. Os valores em cada ramo representam porcentagens de 1.000 réplicas *bootstrap*. *E. coli* foi incluída como *outgroup*. A escala é a distância de similaridade do agrupamento em questão.

## 6. DISCUSSÃO

O isolamento e seleção de microrganismos que possuem características eficazes para o desenvolvimento vegetal são passos importantes para otimizar o rendimento das culturas e melhorar a sustentabilidade dos sistemas de cultivo (Roesch et al., 2007). A exploração desses microrganismos em diferentes culturas abre caminho para reduzir o uso de fertilizantes químicos, bem como minimizar o risco de poluição gerado pela aplicação contínua de tais fertilizantes.

Devido à existência de técnicas de isolamento e caracterização bacteriana eficientes, diversas bactérias importantes já foram identificadas em associação com cana-de-açúcar. Dentre as bactérias mais comuns isoladas de tecidos de cana-de-açúcar destacam-se *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *Herbaspirillum seropedicae* (Baldani et al., 1997; James, 2000; Baldani et al., 2002; Boddey et al., 2003).

Neste estudo foram isoladas três estirpes bacterianas, com características para a promoção de crescimento, provenientes de folha e raiz de cana-de-açúcar, cultivar CB 4789. Os isolados nomeados SCB4789F-1, SCB4789F-2 e SCB4789R-1 foram identificados, com base nos testes bioquímicos (Tabela 8) e sequenciamento da região 16S rDNA, como *Enterobacter* sp., *Pantoea ananatis* e *Enterobacter* sp., respectivamente (Tabela 9). Esses isolados foram avaliados quanto à capacidade de solubilização de nutrientes, zinco e fósforo, e quanto à síntese de auxina.

Estudos anteriores já relataram a associação tanto endofítica quanto epifítica de bactérias do gênero *Pantoea* e *Enterobacter* com cana-de-açúcar

(Mirza et al., 2001; Loiret et al., 2004; Loiret et al., 2009). Nos últimos anos, *P. ananatis* tem sido isolada como um endófito de várias espécies vegetais importantes, incluindo o café (Nunes et al., 2006), o ginseng (Cho et al., 2007) e a cana-de-açúcar (Magnani, 2004). No entanto, a capacidade de solubilização de zinco e fósforo; e síntese de auxina ainda é pouco descrita na literatura para *Pantoea ananatis* e *Enterobacter* sp.

No presente trabalho, o ensaio de solubilização de nutrientes foi avaliado baseado na presença ou ausência de uma zona clara ou halo de solubilização ao redor das colônias. De acordo com Saravanan e colaboradores (2007a), a presença desta zona clara ou zona de solubilização ao redor da colônia está relacionada com a excreção de ácidos orgânicos no meio de cultura, o qual acidifica o meio e contribui para a solubilização de nutrientes.

Quanto à solubilização de fósforo, os resultados obtidos neste trabalho indicaram que os isolados SCB4789F-1 (*Enterobacter* sp.), SCB4789F-2 (*Pantoea ananatis*) foram eficientes na solubilização desse nutriente. O isolado SCB4789R-1 não foi capaz de solubilizar esse nutriente após uma semana de cultivo (Figura 4 e 5). É possível que este isolado não produza exudados ácidos suficientes para alterar o pH do meio e com isso contribuir com a solubilização.

Em rabanete (*Raphanus sativus*, L.), estudos realizados por Elvia e colaboradores (2008), demonstraram que *Pantoea* sp. é capaz de solubilizar fósforo *in vitro* e que quando inoculados ao vegetal podem aumentar a concentração de fósforo nos tecidos foliares desta cultura. Naquele trabalho, o halo de solubilização para *Pantoea* sp. alcançou um tamanho médio de 0,6 cm em meio de cultura contendo 5 g L<sup>-1</sup> de Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> após uma semana de crescimento (Elvia et al., 2008). Portanto, nossos dados para *Pantoea ananatis*, que revelaram um halo de solubilização de, em média, 1,29 cm após uma semana de cultivo (Figura 4) foram superiores aos dados encontrados por Elvia (2008) para *Pantoea* sp.

Quanto à solubilização de zinco os três isolados SCB4789F-1 (*Enterobacter* sp.), SCB4789F-2 (*Pantoea ananatis*) e SCB4789R-1 (*Enterobacter* sp.) mostraram perfis similares ao de *G. diazotrophicus* (Figura 4 e 5). Poucos são os dados disponíveis na literatura para a solubilização de zinco por bactérias associadas a plantas (Di Simone et al., 1998; Fasim et al., 2002; Saravanan et al., 2003; Intorne et al., 2009). Para *Pantoea ananatis* ainda não foi relatado na

literatura à solubilização de zinco e fósforo. Inclusive para *G.diazotrophicus*, os estudos de solubilização de zinco, são recentes (Saravanan et al., 2007a; Saravanan et al., 2007b; Intorne et al., 2009). Surpreendentemente, no presente trabalho, todas as 3 estirpes foram capazes de solubilizar zinco *in vitro*.

Apesar de não existir relatos na literatura para a solubilização de fósforo e zinco para *Pantoea ananatis* isolada de cana-de-açúcar, alguns trabalhos relatam essa bactéria como promotora de crescimento em culturas vegetais importantes.

Em pimenta já foi visto que, *P. ananatis* promove um crescimento significativo e induz resistência sistêmica contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *Vesicatoria* (Kang et al., 2007). Da mesma forma, quando ápices de plantas de mamão foram inoculados com estirpes de *P. ananatis*, endofíticas de tecido de mamão, observou-se um melhor crescimento radicular e da parte aérea (Thomas et al., 2007). Estirpes endofíticas isoladas de grãos de milho têm atividade *in vitro* contra *Lecanicillium aphanocladii* (Rijavec et al. 2007). *Pantoea ananatis* também tem sido relatada como um endófito em plantas de arroz (Mano e Morisaki, 2008). Por outro lado, existem trabalhos que relatam *Pantoea ananatis* como patógeno de milho (Bomfeti et al., 2008; Paccola-Meirelles et al., 2001), cebola (Goszczyńska et al., 2006; Walcott et al., 2002).

Um estudo realizado por Loiret e colaboradores (2009) mostra que a inoculação de cana-de-açúcar com *Pantoea* sp. aumenta os teores de aminoácidos na planta. Tal fato pode estar associado com a fixação biológica de N, resposta metabólica da planta ou moléculas bioativas secretadas pela bactéria (Loiret et al., 2009).

Em 2009 foi isolada e caracterizada uma bactéria identificada como *Pantoea* sp.NII-186 sobrevivendo em solos da floresta Gath, na Índia. Esse isolado foi caracterizado como promotor do crescimento vegetal, pois mostrou vários atributos para a promoção de crescimento, tais como atividade de solubilização de fosfato, síntese de ácido indol acético (AIA) e produção de sideróforos (Dastager et al., 2009).

Todos os isolados testados foram capazes de produzir AIA na ausência e presença de triptofano (Figura 6). Análises colorimétricas mostraram que as bactérias diferem em sua capacidade de produzir auxina na presença de L-triptofano. Quanto à coloração, foram observados perfis colorimétricos diferenciados entre os isolados (Figura 7). De acordo com Glickmann e

colaboradores (1995), esse fato está relacionado com a presença de diferentes intermediários das vias de biossíntese de AIA no meio que também podem reagir com o reagente de Salkowsky e contribuir com a absorção de cor durante a quantificação.

Estudos realizados por Inui (2009), mostraram que *Enterobacter* sp., obtidos de cana-de-açúcar com cerca de um ano de idade, são capazes de sintetizar AIA *in vitro*, indicando que o hormônio pode atuar em diversos estádios do desenvolvimento da planta, como perfilhamento e crescimento dos colmos.

Tem-se verificado que o AIA excretado pelas bactérias que vivem em associação com o vegetal é responsável pela estimulação do crescimento e proliferação das raízes secundárias ou pela patogênese em diversas plantas. Muitos grupos microbianos, incluindo aqueles de vida livre ou que vivem em associação com o tecido das plantas podem produzir AIA (Patten et al., 1996).

Os resultados obtidos neste estudo revelaram que isolados provenientes tanto de folha quanto de raiz foram capazes de produzir AIA e que a produção deste fitohormônio não foi dependente da parte da planta de onde as bactérias foram isoladas (Figura 6). De acordo com Ona e colaboradores (2005), a produção de AIA ocorre sob condições de estresse incluindo deficiência de carbono e estresse por oxigênio na fase final de crescimento das bactérias.

Segundo Cohen e colaboradores (2008), bactérias associadas às plantas, as quais produzem fitohormônios, podem afetar significativamente o crescimento das plantas, contribuindo com uma fonte exógena de fitorreguladores. Embora o efeito e a função do AIA produzido por bactérias associadas à cana-de-açúcar ainda necessite ser investigado, esta característica foi considerada um dos principais mecanismos envolvidos na promoção do crescimento de plantas de milho pelas bactérias rizosféricas *Gluconacetobacter azotocaptans* DS1, *Pseudomonas putida* CQ179 e *Azospirillum lipoferum* N7 em condições de casa-de-vegetação (Mehnaz et al., 2006).

Outro fator importante estudado neste trabalho foi a capacidade dos isolados em resistir a antibióticos. No que tange à resistência intrínseca dos isolados aos antibióticos testados foi visto que o isolado SCB4789R-1 mostrou-se o mais resistente. O isolado SCB4789F-2 foi o mais susceptível a todos os antibióticos testados (Figura 8). Para o ensaio de resistência ao antibiótico espectinomicina em placa de Petri, os 3 isolados foram resistentes, no entanto na

presença do antibiótico houve uma mudança na morfologia da colônia, sendo esta característica mais evidente para o isolado SCB4789F-2 (Figura 9).

A resistência a antibióticos é usada como um indicador de competitividade e sobrevivência, sendo que muitos dos microrganismos presentes no solo e em associação endofítica ou epifítica com o vegetal são capazes de produzir antibióticos (Levy, 2006). De acordo com Pereira (1995), a resistência intrínseca aos antibióticos é determinada por uma série de fatores relacionados às condições ambientais.

Em suma, os isolados bacterianos identificados no presente estudo como *Enterobacter sp.* e *Pantoea ananatis* possuem características desejáveis para a promoção de crescimento vegetal e, possivelmente, poderão ser bons candidatos para a produção de inoculantes. No entanto, futuras análises de inoculação em plantas precisam ser monitoradas.

O conjunto de informações obtidas sustenta a discussão do benefício econômico que pode ser exercido por microrganismos com características para a promoção do crescimento vegetal na agricultura.

As estirpes bacterianas isoladas nesse trabalho serão melhores estudadas biotecnologicamente, tanto no âmbito da promoção do crescimento vegetal, quanto nos aspectos ambientais.

## 7. CONCLUSÕES

- Através do sequenciamento da região 16S rDNA e com base nos testes bioquímicos foi possível classificar os isolados SCB4789F-1 (*Enterobacter* sp.) e SCB4789R-1 (*Enterobacter* sp.) em nível de gênero e o isolado SCB4789F-2 (*Pantoea ananatis*) em nível de espécie;
- Todas as estirpes isoladas foram capazes de solubilizar zinco *in vitro*. Os isolados SCB4789F-1 e SCB4789F-2 foram os que mais se destacaram. Em relação ao fósforo, somente o isolado SCB4789R-1 não foi capaz de solubilizar este nutriente. O isolado SCB4789F-1 foi o que apresentou uma maior capacidade de solubilização;
- Todas as estirpes isoladas foram positivas para a síntese de auxina *in vitro*. O isolado SCB4789F-2 foi o mais eficiente na produção do hormônio;
- No teste de resistência a antibiótico, o isolado SCB4789R-1 mostrou-se resistente aos antibióticos amoxicilina+ácido clavulânico, cefalotina, e ampicilina. O isolado SCB4789F-1 foi resistente a ampicilina e tombramicina. O isolado SCB4789F-2 foi o mais susceptível a todos os antibióticos testados, mostrando-se moderadamente resistente aos antibióticos cefalotina e ampicilina. Todos os isolados foram resistentes a espectinomicina;

- Os isolados bacterianos possuem características significativas para a promoção do crescimento vegetal podendo, neste sentido, ser considerados como candidatos para futuros testes de inoculação em plantas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, B., SABRI, A.N., LJUNG, K., HASNAIN, S. Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. *Letters in Applied Microbiology*, v. 48, p. 542-547, 2008.

ALTOMARE C, NORVELL WA, BJORKMAN T, HARMAN GE. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Fifai 1295-22. *Appl Environ Microbiol.*, v. 65, p. 2926-2933, 1999.

ANTHONY, C. Pyrroloquinoline quinone (PQQ) and quinoprotein enzymes. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 3, p. 757-774, 2001.

ARKHIPOVA, T. N., VESELOV, S. U., MELENTIEV A. I., MARTYNENKO E. V., KUDOYAROVA, G. R. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil*, v. 272, p. 201-209, 2005.

ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W. T. Microbial - Production of plant hormones. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 133, p. 1-8, 1991.

BABU-KHAN S, YEO TC, MARTIN WL, DURON MR, ROGERS RD, GOLDSTEIN AH. Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. *Appl Environ Microbiol.*, v. 61, p. 972-978, 1995.

BALDANI J. I.; CARUSO L.; BALDANI, V. L.; GOE S. R.; DÖBEREINER J. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 29, p. 911-922, 1997.

BALDANI, J.I., REIS, V.M., BALDANI, V.L.D., DOBEREINER, J. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane reasons for success in Brazil. *Funct. Plant Biol.*, v. 29, p. 417-423, 2002.

BARBIERI, P.; ZANELLI, T.; GALLI, E.; ZANELLI, G. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. *FEMS Microbiology Letters*, v. 36, p. 87-90, 1986.

BARBOSA, M.H.P. Perspectivas para o melhoramento da cana-de-açúcar. *Simpósio de Atualização em Genética e Melhoramento de Plantas*. Universidade Federal de Lavras. Lavras, p. 1-17, 2000.

BARUAH, T.C., BARTHAKUR, H.P. In: A Textbook of Soil Analysis. *Vikas publishers*, New Delhi, India, p. 193-196, 1999.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 50, p. 521-577, 2004.

BASTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V. BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 e A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation*, v. 24, p. 7-11, 1998.

BAZZICALUPO, M. E OKON, Y. Associative and endophytic symbiosis. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*. Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. *Kluwer academic publishers*, 2000.

BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol.*, v. 84, p. 11-18, 2009.

BOCADO, M. R. Efeitos de fontes e doses de nitrogênio, aplicadas nas formas fluida e sólida, em soqueiras de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Tese (Mestrado em Agronomia-Fitotecnia). Lavras-MGT, UFLA, p. 50, 1998.

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

BODDY, R. M.; DOBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. *Fertility Research*, Dordrecht, v. 42, p. 241-250, 1995.

BOMFETI, C.A., SOUZA-PACCOLA, A., MASSOLA JÚNIOR, N.S., MARRIEL, I.E., MEIRELLES, W.F., CASELA, C.R. AND PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Localization of *Pantoea ananatis* inside lesions of maize white spot disease using transmission electron microscopy and molecular techniques. *Trop. Plant Pathol*, v. 33, p. 1-6, 2008.

CASSÁN, F.D.; LUCANGELI, C.D.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P.N. *Azospirillum* spp. Metabolize [17,17-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] gibberellin A20 to [17,17-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] gibberellin A1 in vivo in *dy* ice mutant seedlings. *Plant Cell Physiology*, v. 42, p. 763-767, 2001.

CESNIK, R., MIOCQUE, J. Melhoramento da cana-de-açúcar. *Embrapa Informação Tecnológica*, Brasília, p. 24-49, 2004.

CHO, K.M., HONG, S.Y., LEE, S.M., KIM, Y.H., KAHNG, G.G., LIM, Y.P., KIM, H.; YUN, H.D. Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens. *Microb. Ecol.*, v. 54, p. 341-351, 2007.

CHRISTIANSEN-WENEGER C. N<sub>2</sub>-fixation by ammonium-excreting *Azospirillum brasilense* in auxin-induced tumours of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biol Fertil Soils*, v. 12, p. 85-100, 1992.

COHEN, A.C., BOTTINI, R. AND PICCOLI, P.N. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in *Arabidopsis* plants. *Plant Growth Regul.*, v. 54, p. 97-103, 2008.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira Cana-de-açúcar Safra 2009/2010, terceiro levantamento, dezembro/2009/ *Companhia Nacional de Abastecimento*. Brasília, 2010.

DASTAGER, S.G. ; DEEPA, C.K. ; PUNEET, S.C.; NAUTIYAL; C.S; PANDEY, A. Isolation and characterization of plant growth-promoting strain *Pantoea* NII-186. From Western Ghat Forest soil, India. *Letters in Applied Microbiology*, v. 49, p. 20-25, 2009.

DEUBEL, A., GRANSEE, A., MERBACH, W. Transformation of organic rhizodeposits by rhizoplane bacteria and its influence on the availability of tertiary calcium phosphate. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, v. 163, p. 387-392, 2000.

DI SIMINE, C. D.; SAYER, J. A.; GADD, G. M. Solubilization of zinc phosphate by a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from a forest soil. *Biol. Fertil. Soils*, v. 28, p. 87-94, 1998.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; TRYS, A.; VANDEBROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil*, v. 212, p. 155-164, 1999.

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

DRUMMOND, A.J.; ASHTON, B.; CHEUNG, M.; HELED, J.; KEARSE, M.; MOIR, R.; STONES-HAVAS, S.; THIERER, T.; WILSON, A. Geneious v. 4.8, 2009. Available from <http://www.geneious.com/>

ELVIA, J. C.; ORTEGA-RODÉS, P.; ORTEGA, E. Plant inoculation with *Pantoea* sp., phosphate solubilising-bacteria increases P concentration in leaf tissues. *Rev. Colomb.Biotecnol*, v. 10, p. 111-121, 2008.

FASIM, F; AHMED, N; PARSONS, R; GADD, G.M. Solubilization of zinc salts by a bacterium isolated from the air environment of a tannery. *FEMS Microbiology Letters*, v. 213, p. 1-6, 2002.

FIGUEIREDO, P.A.M. Efeitos da vinhaça e de sua complementação nitrogenada e biológica no palhiço, no solo e na cana-de-açúcar. *Tese (Doutorado em Agronomia- Fitotecnia)*. Lavras-MG, UFLA, p. 77, 2000.

FUENTES-RAMIREZ L. E.; JIMENEZ-SALGADO T.; ABARCA-OCAMPO I. R.; CABALLERO-MELLADO J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugar cane cultivars of Mexico. *Plant Soil*, v. 154, p. 145-150, 1993.

GARG, S.K.; BHATNAGAR, A.; KALLA, A.; NARULA, N. In vitro fixation, phosphate solubilization, survival and nutrient release by *Azotobacter* strains in an aquatic system. *Bioresource Technology*, v. 80, p. 101-109, 2001.

GEORGE, M.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Department of Microbiology and Molecular Genetics. Michigan State University. East Lansing, USA, v. 2, p. 1136, 1923.

GLICK BR, PENROSE DM, LI J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J Theor Biol*, v. 8, p. 63-190, 1998.

GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol*, v. 17, p. 41-109, 1995.

GLICKMANN, E.; DESSAUX, Y. A critical examination of the specificity of the Salkowsky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, v. 61, p. 793-796, 1995.

GOLDSTEIN, A.H., ROGERS, R.D., MEAD, G. Separating phosphate from ores via bioprocessing, *BIO/TECH*, v. 11, p. 1250-1254, 1993.

GOLDSTEIN, A. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria. *Biol Agric Hortic*, v. 12, p. 185-193, 1995.

GOLDSTEIN, A.H.; BRAVERMAN, K.; OSORIO, N. Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) rhizobacterium. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 30, p. 295-300, 1999.

GOLDSTEIN, A.H. Bioprocessing of rock phosphate ore: essential technical considerations for the development of a successful commercial technology. In: *Proceedings of the International Fertilizer Technical Association Conference*, New Orleans, United States, p 1-21, 2000.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a geographical tool for sequence finishing. *Genome Research*, Woodbury, v. 8, p. 195-202, 1998.

GOSZCZYNSKA, T., MOLOTO, V.M., VENTER, S.N.; COUTINHO, T.A. (2006) Isolation and identification of *Pantoea ananatis* from onion seed in South growth under greenhouse conditions. *Microbial Ecology*, New York, v. 51, p. 326-335, 2006.

GRAM, C. Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten in SchnittÄund Trockenpreparaten. *Fortschritte der Medicin*, vol. 2, p. 185-189, 1884.

GUNNELL, D., EDDLESTON, M., PHILLIPS, M.R., KONRADSEN, F. The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. *BMC Public Health* v. 21, n. 7, p. 357, 2007.

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

HALLMANN J.; QUADT-HALLMAN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPFER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 43, p. 895-914, 1997.

HEINZ, D.J. and TEW, T.L. Hybridization procedures. In: Heinz, D.J. ed. Sugarcane Improvement through breeding. *Elsevier*, Amsterdam, p. 313-342, 1987.

HENDRE, R.R., IYOR, R.S., KOTWALM, M., KLUSPE, S.S., MASCARENHAS, A.F. Rapid multiplication of sugar cane by tissue culture. *Sugarcane*, v.1, p. 5-8, 1983.

HINSINGER, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil*, v. 237, p. 173-195, 2001.

IBGE. Produção Agrícola Municipal 2005. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2006. Disponível em <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 15/05/07.

IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática. Levantamento sistemático da produção agrícola, 2009. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 15/01/2010.

ILLMER, P.; SCHINNER, F. Solubilization of inorganic phosphate by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biol Biochem*, v. 24, p. 389-395, 1992.

INTORNE, A.C.; OLIVEIRA, M.V.; LIMA, M.L.; DA SILVA, J.F.; OLIVARES, F.L.; SOUZA FILHO, G.A; DE SOUZA FILHO, G.A. Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. *Archives of Microbiology*, v. 191, p. 477-483, 2009.

INUI, R.N. Isolamento e identificação de bactérias solubilizadoras de fósforo e produtoras de auxinas em solo com cana-de-açúcar. *Dissertação (mestrado)* - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, p. 90, 2009.

JAMES, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research*, v. 65, p. 197-209, 2000.

JOHNSON, S.E., LOEPPERT, R.H. Role of organic acids in phosphate mobilization from iron oxide. *Soil Science Society of America Journal*, v. 70, p. 222-234, 2006.

JUNQUEIRA, E. D. A cana-de-açúcar, origem e influência. *Jornal procana*, 17 de julho, P1, 2006.

KANG, S.H., CHO, H.S., CHEONG, H., RYU, C.M., KIM, J.F. AND PARK, S.H. Two bacterial endophytes eliciting both growth promotion and plant defense on pepper (*Capsicum annum* L.). *J. Microbiol. Biotechnol*, v. 17, p. 96-103, 2007.

KOENIG, R.L.; MORRIS, R.O.; POLACCO, J.C. tRNA is the source of low-level trans-zeatin production in *Methylobacterium* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, v.184, p.1832-1842, 2002.

KOVACS, N. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, London, v. 178, p. 703, 1956.

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

LEACH, A.W, MUMFORD J.D. Pesticide environmental accounting: a method for assessing the external costs of individual pesticide applications. *Environ Pollut.* v. 151, p. 139-147, 2008.

LEONG J. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, v. 24, p. 187-208, 1986.

LIMA, G. A. Cultura da cana-de-açúcar. 1ª edição. Fortaleza, p. 15-35, 1984.

LOIRET, F. G. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. *J Appl Microbiol.*, v. 97, n. 3, p. 504-11, 2004.

LOIRET, F.G.; GRIMM, B.; HAJIREZAEI, M.R.; KLEINER, D.; ORTEGA, E. Inoculation of sugarcane with *Pantoea* sp. increases aminoacid contents in shoot tissues; serine, alanine, glutamine and asparagines permit concomitantly ammonium excretion and nitrogenase activity of the bacterium. *Journal of Plant Physiology*, v. 166, p. 1152-1161, 2009.

LUCANGELI, C; BOTTINI, R. Reversion of dwarfWsm in dwarf-1 maize (*Zea mays* L.) and dwarf-x rice (*Oryza sativa* L.) mutants by endophytic *Azospirillum* spp. *Biocell*, v. 20, p. 223, 1996.

MAGNANI, G. S. Diversidade de bactérias endofíticas em cana-de-açúcar. *Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica)* - Curitiba, PR, Universidade Federal do Paraná, 93p, 2005.

MANO, J. AND MORISAKI, H. Endophytic bacteria in the rice plant. *Microbes Environ*, v. 23, p. 109-117, 2008.

MATSUSHITA, K., TOYAMA, H., YAMADA, M., ADACHI, O. Quinoproteins: structure, function, and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 58, p. 13-22, 2002.

MEHNAZ, S; LAZAROVITS, G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microbial Ecology*, New York, v. 51, n. 3, p. 326-335, 2006.

MIRZA M.S.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; ALLY, R.; NORMAND, P. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth promoting bacteria (PGPB) on micropropagated sugarcane in vitro. *Plant Soil*, v. 237, p. 47-54, 2001.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests. Approved standard M2-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa, 1983.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Letters*, v. 170, n. 1, p. 265-270, 1999.

NCBI. Taxonomia da cana-de-açúcar. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=128810&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>. 2008. Acesso em : 13/01/08

NIRANJAN, R.A.J; SHETTY, S.; REDDY, H.S. Plant growth promoting rhizobacteria: potential green alternative for plant productivity. In: Siddiqui, Z.A. (Ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization. *Springer, Netherlands*, p. 197-216, 2006.

NUNES, F.V. AND DE MELO, I.S. Isolation and characterization of endophytic bacteria of coffee plants and their potential in caffeine degradation. *Environ. Toxicol.* 1, 293–297, 2006.

PACCOLA-MEIRELLES, L.D., MEIRELLES, W.F., PARENTONI, S.N., MARRIEL, I.E., FERREIRA, A.S. AND CASELA, C.R. Reaction of maize inbred lines to the bacterium *Pantoea ananas* isolated from Phaeosphaeria leaf spot lesions. *Crop Breed. Appl. Biotechnol*, v. 2, p. 587-589, 2002.

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

RAMALLO, J.; RAMALLO, N.E.V.; PLOPER, L.D. Diagnóstico de enfermedades de La caña de azúcar: metodologías aplicadas por la EEADAC. *Avance Agroindustrial*, Tucumán, v. 21, n. 1, p. 8-12, 2000.

RAMAMOORTHY, V.; VIWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection*, v. 20, p. 1-11, 2001.

RATTAN, R.K., SHUKLA, L.M. Influence of different zinc carriers on the utilization of micronutrients by rice. *J. Indian Soc. Soil Sci*, v. 39, p. 808-810, 1991.

RENGEL, Z., MARSCHNER, P. Nutrient availability and management in the rhizosphere: exploiting genotypic differences. *New Phytologist*, v. 168, p. 305-312, 2005.

RICHARDSON, A.E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, v. 28, p. 897-906, 2001.

ROCHA, F.R., PAPINI-TERZI, F.S., NISHIYAMA JR, M.Y., VÊNIO, R.Z.N., VICENTINI, R., DUARTE, R.D.C, ROSA JR, V.E., VINAGRE, F.,

BARSALOBRES, C., MEDEIROS, A.H., RODRIGUES, F.A., ULIAN, E.C., ZINGARETTI, S.M., GALBIATTI, J.A., ALMEIDA, R.S., FIGUEIRA, A.V.O., HEMERLY, A.S., SILVA-FILHO, M.S., MENOSSI, M., SOUZA, G.M. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. *BMC Genomics*, v. 8, p. 71-93, 2007.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA Jr, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa Phytopatho*, v.12, p.16, 1986.

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

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; SELMAN, G. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. *Journal of Biotechnology*, v.84, p.155-161, 2000.

ROESCH, L. F. W. Diversidade de bactérias diazotróficas associadas a plantas de milho cultivadas no Estados do Rio Grande do Sul. *Tese (Doutorado em Ciência do Solo)* - Porto Alegre, RS- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 143p, 2007.

RYAN, R.P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D.J.; DOWLING, D.N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol Lett*, v. 278, p. 1-9, 2008.

RYU, C.M., FARAG, M. A., HU, C. -H., REDDY, M. S., WEI, H. -X., PARE, P.W., AND KLOPPER, J. W. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v. 100, p. 4927-4932, 2003.

SAGHIR KHAN, M., ZAIDI, A., WANI, P.A. Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture- a review. *Agronomy for Sustainable Development*, v. 27, p. 29-43, 2007.

SAJJAD, M., AHMAD, W., LATIF, F., HAURAT, J., BALLY, R., NORMAND, P.; MALIK, K.A. Isolation, partial characterization, and effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. *Plant and Soil*, v. 237, p. 47-54, 2001.

SARAVANAN, V. S.; KALAIARASAN, P.; MADHAIYAN, M.; THANGARAJU, M. Solubilization of insoluble zinc compounds by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and the detrimental action of zinc ion (Zn<sup>2+</sup>) and zinc chelates on root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Appl. Microbiol.*, v.44, p. 235-241, 2006.

SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN, M.; THANGARAJU, M. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere*, v. 66. p. 1794-1798, 2007a.

SARAVANAN, V. S.; OSBORNE, J.; MADHAIYAN, M.; MATHEW, L.; CHUNG, J.; AHN, K.; SA, T. M. Zinc metal solubilization by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and induction of pleomorphic cells. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 17, p. 1477-82, 2007b.

SARAVANAN, V. S.; SUBRAMONIAM, S. R.; RAJ, S. A. Assessing *in vitro* solubilization potential of different zinc solubilizing bacterial (zsb) isolates. *Braz. J. Microbiol.*, v. 34. p. 121-125, 2003.

SARWAR, M. & KREMER, R.J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan derived compounds by deleterious rhizobacteria. *Plant Soil*, v. 172, p. 261-269, 1995.

SIVAN, A.; CHET, I. Microbial control of plant diseases. In: Mitchell R, editor. *Environmental Microbiology*. New York: Wiley-Liss, p. 335–54, 1992.

SOUCHIE, E.L.; ABOUD, A.C.S.; CAPRONI, A.L. Solubilização de fosfato *in vitro* por microrganismos rizosféricos de guandu. *Bioscience Journal*, v.23, p.53-60, 2007.

SPAEPEN, STIJN; VANDERLEYDEN, JOS; REMANS, ROSELINE. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant Signaling. *FEMS Microbiol Rev*, v. 31, p. 425-448, 2007.

STROBEL G, DAISY B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol Rev.*, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; MATHESON, B.G.; NOWAK, J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biological and Fertilizer Soils*, v.25, p.13-19, 1997.

THAKORE, Y . The biopesticide market for global agricultural use. *Ind Biotechnol*. V. 2, p. 194-208, 2006.

TEIXEIRA, L. H. M. Mapeamento Funcional em cana-de-açúcar Utilizando ESTs como Marcadores Moleculares. *Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular)* – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 96p, 2006.

THOMAS, P., KUMARI, S., SWARNA, G.K. AND GOWDA, T.K.S. Papaya shoot tip associated endophytic bacteria isolated from in vitro cultures and host endophyte interaction in vitro and in vivo. *Can. J. Microbiol.*, v. 53, p. 380-390, 2007.

TIESSEN, H., LO MONACO, S., RAMIREZ, A., SANTOS, M.D.C., SHANG, C. Phosphate minerals in a lateritic crust from Venezuela. *Biogeochemistry*, v. 34, p. 8-17, 1996.

UNICA (União da Indústria da cana-de-açúcar). Disponível em: <http://www.unica.com.br>. Acesso em 21/01/09.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophic from deep water rice. *Journal of Biotechnology*, v. 91, p. 127-141, 2001.

VIDEIRA, S. S.; ARAÚJO, J. L.S.; BALDANI, V. L. D. Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 74p, 2007. (Documentos /Embrapa Agrobiologia, ISSN 1517-8498, 234).

WALCOTT, R.R., GITAITIS, R.D., CASTRO, A.C., SANDERS, F.H. J.R.; DIAZ- PEREZ, J.C. Natural infestation of onion seed by *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot. *Plant Dis.*, v. 86, p. 106-111, 2002.

WENBO, M.; ZALEC, K.; GLICK, B. R. Biological activity and colonization pattern of the bioluminescence-labeled plant growth-promoting bacterium *Kluyvera ascorbata* SUD165/26. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 35, p. 137-144, 2001.

WHITE, C., SAYER, J.A., GADD, G.M. Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 20, p. 503-516, 1997.

XIE H, PASTERNAK JJ, GLICK BR. Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indoleacetic acid. *Curr Microbiol*, v. 32, p. 67-71, 1996.

YANO, D. M. Y.; ATTILI, D. S.; GATTI, M. S. V.; EGUCHI, S. Y.; OLIVEIRA, U. M. Técnicas de microbiologia em controle de qualidade. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", 1991.