

**DENSIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS
ASSOCIATIVAS ORIUNDAS DE
DIFERENTES SISTEMAS DE USO DA TERRA
NA REGIÃO AMAZÔNICA**

KRISLE DA SILVA

2006

KRISLE DA SILVA

**DENSIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS ASSOCIATIVAS ORIUNDAS DE
DIFERENTES SISTEMAS DE USO DA TERRA NA REGIÃO
AMAZÔNICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Solos e Nutrição de Plantas, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Profª. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Silva, Krisle da

Densidade e caracterização de bactérias diazotróficas associativas oriundas de diferentes sistemas de uso da terra na Região amazônica / Krisle da Silva. -- Lavras : UFLA, 2006.

73p. : il.

Orientador: Fátima Maria de Souza Moreira.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Azospirillum* sp. 2. *Bukholderia* sp. 3. *Enterobacteriaceae*. 4. Amazônia. 5. Sequenciamento parcial do rDNA 16S. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-333.335
-631.46

KRISLE DA SILVA

**DENSIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS ASSOCIATIVAS ORIUNDAS DE
DIFERENTES SISTEMAS DE USO DA TERRA NA REGIÃO
AMAZÔNICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Solos e Nutrição de Plantas, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 22 de fevereiro de 2006.

Pesq. Dra. Diva de Souza Andrade

IAPAR

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias

UFLA

Profª. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

DEDICO

A Ires Aurora da Silva, meu exemplo de força,
garra e determinação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha força, paz, liberdade, minha vida.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, pela oportunidade de realização do curso.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Fátima Maria de Souza Moreira pela orientação, apoio, amizade e confiança durante o Mestrado.

Aos professores do Departamento de Ciência do Solo.

Ao projeto TSBF-CIAT/GEF-UNEP, projeto “*Conservation and Sustainable Management of Below Ground Biodiversity*”, pelo financiamento para execução deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Pesq. Diva de Souza Andrade, Prof. Eustáquio Souza Dias e Profa. Fátima Maria de Souza Moreira.

Aos funcionários Marlene Aparecida de Souza e Manuel Aparecido da Silva pela amizade e ajuda na execução deste trabalho.

Ao Prof. Luciano Vilela Paiva pela contribuição parcial na realização das análises de sequenciamento.

Aos amigos adquiridos durante o curso, Patrícia, Robervone, Amanda, Rafaela, Meire, Taís, Michele Rocha, Michele Aparecida, Ligiane, Paulo, Plínio, José Geraldo, Tiago, Rogério, Silvana, Adriana e Alexandre.

Aos amigos André, Sandro, Éderson, Gláucia e Patrícia Leal pela amizade, paciência e companheirismo.

À Pesq. Diva de Souza Andrade pela iniciação em Microbiologia do Solo e pela grande amizade.

Às minhas grandes amigas, Daiane, Cintia, Josiane e Luciana, e a seus familiares, que mesmo distantes, sempre me apoiaram.

À minha família pelo amor e confiança.

À minha mãe, Ires Aurora da Silva, pelo amor incondicional, educação e apoio sempre presentes.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO	03
2.1 Floresta Amazônica.....	03
2.2 Diazotróficos associativos.....	04
2.3 Gênero <i>Azospirillum</i>	05
2.4 Gênero <i>Herbaspirillum</i>	08
2.5 Gênero <i>Burkholderia</i>	08
2.6 <i>Enterobacteriaceae</i>	10
2.7 Impacto do sistema de uso do solo sobre os microrganismos	12
2.8 Estudos de densidade e diversidade	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Aspectos gerais.....	17
3.2 Amostragem de solo.....	18
3.3 Densidade e isolamento dos diazotróficos associativos	20
3.4 Caracterização em meio de cultivo GNA e batata	21
3.5 Avaliação da morfologia celular em microscópio ótico e teste de Gram.....	22
3.6 Análise protéica através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	23
3.7 Atividade da nitrogenase através da redução do acetileno (ARA).....	23
3.8 Amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S do DNA ribossomal ..	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Densidade e isolamento dos diazotróficos associativos	26
4.2 Caracterização em meio de cultivo GNA e batata	35
4.3 Avaliação da morfologia celular em microscópio ótico e teste de Gram.....	39
4.4 Análise protéica através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	42
4.5 Atividade da nitrogenase através da redução do acetileno (ARA).....	45
4.6 Amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S do DNA ribossomal ..	47
5 CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
ANEXOS	60

RESUMO

SILVA, Krisle da. **Densidade e caracterização de bactérias diazotróficas associativas oriundas de diferentes sistemas de uso da terra na região amazônica**. 2006. 73p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG¹.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a densidade de bactérias diazotróficas provenientes de diferentes sistemas de uso da terra (SUT) na região amazônica e caracterizar alguns isolados. Trinta amostras de solos coletadas de diferentes SUT na região amazônica foram utilizadas (Floresta, Capoeira Velha, Capoeira Nova, Agrofloresta, Roça e Pastagem). A população de diazotróficos foi quantificada pela técnica do número mais provável (NMP) em meios semi-sólidos com diferentes composições livres de nitrogênio (JNFb, NFB, LGI e Fam). Para comparação foram incluídas estirpes tipo de espécies de *Azospirillum*, *Burkholderia* e *Herbaspirillum*. A caracterização fenotípica dos isolados foi avaliada através de caracterização cultural, caracterização celular, análise de proteínas totais SDS-PAGE e atividade da nitrogenase. A caracterização genotípica foi realizada através do sequenciamento parcial do 16S rDNA. Não foi observado crescimento bacteriano típico de diazotróficos em meio JNFb. A densidade foi variável entre os SUT, mas em meio LGI e Fam houve uma tendência de maiores valores no SUT Pastagem. Foram isoladas 22 bactérias com elevada diversidade fenotípica. Dos 22 isolados, 11 apresentaram atividade da nitrogenase. Dezesete isolados foram seqüenciados, destes 14 apresentaram similaridade abaixo de 100% com espécies fixadoras de nitrogênio. Houve predominância de espécies do gênero *Burkholderia* e espécies pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. A maioria das espécies de *Burkholderia* foi encontrada no SUT Pastagem. Existem, entre os isolados, seqüências desconhecidas que podem representar novas espécies.

¹ Orientadora: Fátima Maria de Souza Moreira – UFLA

ABSTRACT

SILVA, Krisle da. **Density and characterization of diazotrophic associative bacteria in soils under diverse land use systems in Amazonia.** 2006. 73p. Dissertation (Master Program in Soils and Plant Nutrition) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.¹

Associative diazotrophic bacteria are among the important functional groups of microorganisms that live in soils. These bacteria contribute to plant growth mainly through biological N₂ fixation. The aim of this work was to evaluate the density of non-symbiotic diazotrophic bacteria in soils under diverse land use systems (LUS) in Amazonia and to characterize some isolates. Thirty soil samples at different LUS in Amazon region were used (Forest, Young second forest, Old second forest, Agroforestry, Crop, and Pasture). The density was evaluated by most probable numbers (MPN) in nitrogen free media (JNFb, NFb, LGI and Fam) with different compositions. The phenotypic characterization of 22 isolates were evaluated through cultural characteristics on potato and GNA media, cell morphology in optic microscope, protein profiles by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), as well as nitrogenase activity by acetylene reduction assay (ARA), compared to type and reference strains of *Azospirillum*, *Herbaspirillum* and *Burkholderia* species. Partial nucleotide sequences of 16S rDNA of isolates were determined. No growth in JNFb was observed. The density was variable among the LUS, but in LGI and Fam media there were a trend of larger numbers in Pasture. Twenty-two isolates were obtained, with a great phenotypic diversity. From 22 isolates, 11 presented nitrogenase activity. Seventeen isolates were sequenced, from these 14 presented similarity below 100% to known nitrogen fixing species. Among them, there is a predominance of *Burkholderia* species and enteric bacterial. *Burkholderia* species were found mainly in LUS Pasture. There are among the isolates unknown sequences that can represent new species.

¹Adviser: Fátima Maria de Souza Moreira – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

A floresta Amazônica é considerada um grande reservatório de biodiversidade. Esta diversidade, principalmente de espécies vegetais, favorece maior diversidade de nichos, os quais, por sua vez, contribuem para maior diversidade de microrganismos, principalmente os que habitam o solo. Borneman & Triplett (1997) verificaram uma grande diversidade de microrganismos não cultiváveis oriundos de solos da floresta Amazônica. Outros estudos na Amazônia também têm evidenciado uma elevada diversidade de microrganismos do solo (Moreira et al., 1998; Lima et al., 2005; Jesus et al., 2005). No entanto, ainda são poucos os estudos; assim, mais pesquisas são necessárias para a avaliação da diversidade microbiana desta região.

Os organismos do solo não são apenas seus habitantes, mas também seus componentes. A biodiversidade e a atividade biológica estão estreitamente e diretamente relacionadas a funções e características essenciais para a manutenção da capacidade produtiva dos solos. Acredita-se que o sistema de uso da terra pode ter forte impacto sobre a população e diversidade de organismos do solo. Este impacto poderia diminuir a população de organismos e, conseqüentemente, reduzir a resiliência de diversos processos que ocorrem no solo.

Os microrganismos que realizam o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) atmosférico, também conhecidos como microrganismos diazotróficos, podem viver livremente no solo, em associações ou ainda em simbioses com plantas hospedeiras (Moreira & Siqueira, 2002).

Os diazotróficos associativos podem ser encontrados em uma ampla faixa de hospedeiros, principalmente gramíneas, como arroz, cana-de-açúcar, milho e trigo, entre outras. Estes podem promover o crescimento vegetal tanto pela FBN como pela produção de substâncias que auxiliam o crescimento

radicular, como o ácido indol acético, entre outros. As bactérias diazotróficas associativas são consideradas rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP); assim, assumem papel importante na interação com raízes de plantas e ciclagem de nutrientes, entre outros.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a densidade e caracterizar bactérias diazotróficas associativas provenientes de solos submetidos a diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Floresta Amazônica

A floresta Amazônica apresenta grande diversidade de flora e fauna e sua riqueza desperta grande interesse da pesquisa. Avaliando a diversidade de bactérias diazotróficas simbióticas, Moreira et al. (1998) pesquisaram a diversidade através do sequenciamento do gene 16S do DNA ribossomal de 44 isolados de leguminosas arbóreas de várias florestas do Brasil. Os autores encontraram 15 seqüências diferentes, sendo seis novas. Dentre as seqüências novas, três delas foram encontradas na região Amazônica, o que pode representar novas espécies.

Lima et al. (2005) verificaram elevada diversidade entre 46 estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia (monocultura, capoeira, pastagem, floresta e sistema agroflorestal). Através do perfil protéico total SDS-PAGE, foram formados 11 grupos com 80% de similaridade. Estes autores observaram que diversos isolados diferiram das espécies *B. elkanii*, *B. japonicum* e *B. liaoningense*, atualmente descritas e que podem representar espécies ainda não conhecidas.

Jesus et al. (2005) avaliaram o efeito dos sistemas de uso da terra (cultivo de mandioca, pupunheira e floresta de terra firme) da Amazônia ocidental sobre a diversidade fenotípica cultural de 257 bactérias que nodulam siratro (*Macrottilium atropurpureum*). Estes verificaram que o sistema de uso da terra influenciou na composição das bactérias que nodulam siratro e que áreas onde foi cultivada mandioca revelaram maior diversidade e riqueza de bactérias.

Borneman & Triplett (1997) avaliaram a diversidade de microrganismos na região da Amazônia através da amplificação de genes que codificam pequenas sub-unidades do rRNA (16S) diretamente do DNA extraído de solos em áreas de pastagem e floresta. Estes autores verificaram uma grande

diversidade, principalmente nos solos sob floresta, onde foram encontradas seqüências não conhecidas de microrganismos não cultiváveis e que não podem ser classificadas em nenhum filo de Bacteria. Isto evidencia a imensidão de microrganismos que ainda são desconhecidos, pois não são cultiváveis nos atuais meios de cultura desenvolvidos. Desta forma, justifica-se o interesse da pesquisa em microbiologia do solo em áreas da região Amazônica.

2.2 Diazotróficos associativos

Determinados grupos de microrganismos são de grande interesse nos estudos de diversidade devido aos benefícios decorrentes de suas atividades, como, por exemplo, as bactérias diazotróficas. As bactérias diazotróficas, através do processo conhecido como fixação biológica do nitrogênio (FBN), são responsáveis pelo fornecimento deste elemento em diversos ecossistemas. A maioria dos diazotróficos é de vida livre, ocorrendo em diversos ambientes, como em água doce ou salgada, no trato intestinal de animais e em todos os tipos de solos (Moreira & Siqueira, 2002). As bactérias que fixam nitrogênio atmosférico e vivem livremente no solo ou endofiticamente em tecidos vegetais, são denominadas de bactérias diazotróficas associativas.

Os diazotróficos associativos não contribuem para o crescimento vegetal como os simbióticos, que em casos como a soja, podem contribuir para o desenvolvimento desta cultura. Kennedy et al. (2004) relatam que o uso de diazotróficos não simbióticos poderia ter seu potencial melhor explorado em áreas agrícolas. Como biofertilizantes, poderiam reduzir os gastos com adubações e, conseqüentemente, diminuir problemas ambientais. Os diazotróficos associativos são considerados rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP), possuindo um papel chave na ciclagem de nutrientes e manutenção da fertilidade do solo, bem como no estabelecimento de

interações positivas com raízes de plantas em ambientes agrícolas (Tripathi et al., 2002).

No Brasil, a pesquisa sobre diazotróficos e a sua importância para a FBN em gramíneas foi iniciada há mais de 40 anos pela pesquisadora Johanna Döbereiner. Muitos avanços foram conquistados; assim, diversos diazotróficos foram descobertos, tanto de vida livre (*Azotobacter chroococcum*, *Beijerinckia fluminensis*, *Azotobacter paspali*, *Derxia* spp., *Paenebacillus azotofixans*) como associativos (*Azospirillum* spp.) e endofíticos (*Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp.), e sua contribuição para a FBN em gramíneas, principalmente os cereais, pôde ser quantificada (Baldani & Baldani, 2005).

Existem várias espécies de diazotróficos associativos, sendo o mais estudado *Azospirillum* spp. e *Herbaspirillum* spp. Assim, para avaliação da densidade e isolamento de diazotróficos de amostras de solo ou de vegetais, os meios livres de nitrogênio JNFb, NFb, LGI e Fam, que favorecem o desenvolvimento de espécies de *Herbaspirillum*, *Azospirillum* e *Azospirillum amazonense*, respectivamente, têm sido empregados (Fernandes et al., 2001; Tripathi et al., 2002; Brasil et al., 2005; Melloni et al., 2004; Nóbrega et al., 2004; Lange & Moreira, 2002). No entanto, outras espécies de diazotróficos têm sido isoladas a partir destes meios.

2.3 Gênero *Azospirillum*

Azospirillum são procariotos Gram-negativos, preferencialmente microaerófilos, situados no domínio Bacteria (α -Proteobacteria). São bactérias diazotróficas associativas endofíticas, mas que podem sobreviver no solo na forma de cistos. O gênero atualmente possui oito espécies identificadas: *A. lipoferum* e *A. brasilense* (Tarrand et al., 1978); *A. amazonense* (Magalhães et al., 1983); *A. halopraeferens* (Reinhold et al., 1987); *A. irakense* (Khammas et al., 1989); *A. largomobile* (Ben Dekhil et al., 1997); *A. doebereinae* (Eckert, et

al., 2001) e *A. oryzae* (Xie & Yokota, 2005). A nomenclatura de *A. largomobile* foi corrigida por Sly & Stackebrandt (1999) para *A. largimobile*. As oito espécies de *Azospirillum* através de análise filogenética estão divididas em dois sub-grupos: I – *A. largimobile*, *A. oryzae*, *A. lipoferum*, *A. doebereineriae*, *A. brasilense* e *A. halopraeferens*; II – *A. irakense* e *A. amazonense*. Estes microrganismos são preferencialmente microaerófilos e são móveis em meio de cultivo, possuindo flagelo polar bem desenvolvido quando são crescidos em meio líquido. Quando são crescidos em meio semi-sólido, *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. irakense* e *A. largimobile*, além do flagelo, polar desenvolvem flagelos laterais adicionais (Tarrand et al., 1978; Khammas et al., 1989; Ben Dekhil et al., 1997). *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, *A. doebereineriae* e *A. oryzae* apresentam flagelo monopolar (Magalhães et al., 1983; Reinhold et al., 1987; Eckert, et al., 2001; Xie & Yokota, 2005).

As células de *A. brasilense* e *A. lipoferum* em meio NFb semi-sólido possuem forma de bastonetes curvos e móveis; no entanto, após um período de crescimento o meio se torna alcalino, as células de *A. lipoferum* tornam-se grandes, pleomórficas e imóveis (Döbereiner et al., 1995). Estas espécies são as mais frequentes, sendo encontradas colonizando raízes de plantas tropicais e temperadas. Em meio semi-sólido LGI, as células de *A. amazonense* apresentam formato de vibrio, são móveis e têm 0,9 -1,0 µm de largura. Esta espécie foi isolada primeiramente de diversas gramíneas, de *Bactris gasipaes* (pupunha) e de outras espécies vegetais na Amazônia e Rio de Janeiro (Magalhães et al., 1983). *A. halopraeferens* possui células pleomórficas, com largura variando entre 0,7 – 1,4 µm e foi isolada da gramínea Kallar Grass (*Leptochloa fusca* L.) cultivada em solos salinos do Paquistão (Reinhold et al., 1987). *A. irakense* foi isolada de plantas de arroz no Iraque, possui largura celular entre 0,6 –0,9 µm, células pleomórficas e móveis (Khammas et al., 1989). As células de *A. largimobile* são pleomórficas, com largura entre 0,7 – 1,5 µm e estas bactérias

foram isoladas de amostras de água coletadas de um lago da Austrália (Ben Dekhil et al., 1997). *A. doebereineriae* foi isolada na Alemanha, em raízes de gramíneas do gênero *Miscanthus*, possui células em forma de bastões curvos ou de espirilo, móveis, com 1,0 – 1,5 µm de largura (Eckert, et al., 2001). *A. oryzae* isolada de arroz (*Oryza sativa*) no Japão, possui células em forma de espirilo ou vibrio, móveis, com 1,0 x 1,5 – 5,0 µm de tamanho (Xie & Yokota, 2005).

Espécies de *Azospirillum* caracterizam-se pela síntese de compostos de armazenamento de carbono que são geralmente descritos como poli-β-hidroxibutirato (PHB). Kadouri et al. (2003) conduziram experimento com *A. amazonense* estirpe Sp7 e um mutante *phbC* (PHB sintase) em condições sub-ótimas e verificaram que a síntese e utilização de PHB como fonte de carbono e energia por *A. amazonense* auxiliou o estabelecimento desta bactéria e sua sobrevivência, mas não houve vantagens na colonização sob as condições testadas.

Espécies de *Azospirillum* auxiliam o desenvolvimento vegetal. São considerados rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP), ou seja, podem afetar o crescimento e produção de diversas espécies vegetais, muitas de interesse agrônômico e ecológico (Bashan et al., 2004). *A. brasilense* interage com raízes de vários cereais, tais como trigo e milho, promovendo, freqüentemente, o crescimento das raízes da planta hospedeira (Burdman et al., 2000). Espécies de *Azospirillum* sintetizam fitormônios, como, por exemplo, o ácido indol acético (AIA) e as giberelinas, promovendo um maior desenvolvimento do sistema radicular. O estímulo ao crescimento vegetal por espécies de *A. brasilense* parece estar mais ligado ao estímulo de proliferação das raízes do que à fixação de nitrogênio atmosférico (Ramey et al., 2004).

2.4 Gênero *Herbaspirillum*

O gênero *Herbaspirillum* é composto de oito espécies: *H. seropedicae* (Baldani et al., 1986); *H. rubrisulbicans* (Baldani et al., 1996); *H. frisingense* (Kirchhof et al., 2001); *H. lusitanum* (Valverde et al., 2003); *H. chlorophenolicum* (Im et al., 2004); *H. putei*, *H. huttiense* e *H. autotrophicum* (Ding & Yokota, 2004). As espécies estão incluídas como um grupo na subdivisão β -Proteobacteria e são Gram-negativas. As espécies *H. seropedicae* e *H. rubrisulbicans* são endofíticos obrigatórios, com baixa sobrevivência no solo (Baldani et al., 1996). Na espécie *H. seropedicae* foi detectada a produção de AIA e giberelinas A₁ e A₃ (Bastián et al., 1998). Radwan et al. (2002) também constataram a produção de indóis por estirpes de *Herbaspirillum*, incluindo *H. rubrisulbicans*. Algumas espécies de *Herbaspirillum* são endofíticos capazes de colonizar cana-de-açúcar, milho, trigo, arroz, sorgo e outros cereais (Kennedy et al., 2004). Dependendo da estirpe e da variedade de arroz, algumas espécies de *Herbaspirillum* podem fixar de 19 a 54% do nitrogênio requerido por esta cultura (Kennedy et al., 2004). A espécie *H. chlorophenolicum* não fixa nitrogênio e não está associada a plantas (Im et al., 2004).

2.5 Gênero *Burkholderia*

O gênero *Burkholderia* situa-se na subdivisão β -Proteobacteria, são microrganismos Gram-negativos em forma de bastonetes móveis com três a vários flagelos e acumulam PHB como material de reserva. O gênero *Burkholderia* foi proposto por Yabuuchi et al., (1992), onde sete espécies pertencentes ao gênero *Pseudomonas* foram transferidas para este novo gênero. Atualmente o gênero *Burkholderia* possui 45 espécies conhecidas (*Burkholderia*, 2006), destas, três possuem a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, *B. vietnamiensis* (Gillis et al., 1995), *B. kururienses* (Estrada-de los Santos et al.,

2001) e *B. tropica* (Reis et al., 2004). Estirpes de *Burkholderia* podem ser consideradas rizobactérias capazes de promover o crescimento vegetal, sendo que os mecanismos envolvidos vão desde a produção de fitormônios à fixação biológica de nitrogênio atmosférico, como demonstrado por *B. vietnamiensis* (Tran Van et al., 2000). A estirpe de *B. brasilensis* M130, em estudos realizados por Estrada-de los Santos et al. (2001), foi capaz de fixar nitrogênio atmosférico em condições microaerofílicas, de forma similar a *B. kururienses* estirpe KP23^T. Ambas as estirpes apresentaram o mesmo padrão de perfil por ARDRA e foram similares em 99,9% na sequência do rDNA 16S. Assim, estudos de hibridação DNA-DNA estão sendo conduzidos para definir se isolados de *B. brasilensis* representam uma nova espécie ou pertencem a *B. kururienses* (Baldani & Baldani, 2005). A espécie *B. tropicalis* foi aceita como *B. tropica*, isolada de plantas crescendo no México, Brasil e África do Sul (Reis et al., 2004). Esta espécie possui forma celular bastão curvo, com largura entre 0,7–0,8 µm e é móvel com um a quatro flagelos.

O gênero *Burkholderia* possui um grupo muito diverso de espécies. Alguns estudos encontraram isolados de *Burkholderia* capazes de nodular leguminosas (Moulin et al., 2001; Moreira et al., 2002; Vandamme et al., 2002). Minerdi et al. (2001) demonstraram a existência de espécies de *Burkholderia* ocorrendo em endossimbiose com o fungo micorrízico *Gigaspora margarita*, possuindo genes *nif* que se expressavam durante a germinação do esporo; assim, em sistemas naturais, fungos micorrízicos capazes de fixar nitrogênio através da associação com bactérias diazotróficas poderiam se tornar ótimos biofertilizantes. A presença do gene *nifH*, relacionada à enzima chave na fixação de nitrogênio atmosférico, foi confirmada na espécie *B. tuberum* nodulando raízes de leguminosas tropicais (Vandamme et al., 2002).

O gênero *Burkholderia* compreende, além de diazotróficos, espécies patogênicas oportunistas como *B. cepacia*, principalmente para pessoas com

fibrose cística (Berg et al., 2005). Estudos taxonômicos revelaram que estes microrganismos compreendem um heterogêneo grupo de estirpes, coletivamente referido como o complexo *B. cepacia*. Este complexo consiste de nove espécies com elevada similaridade na seqüência do rDNA 16S (98-100%) e moderado nível de hibridação DNA-DNA : *B. cepacia*; *B. multivorans*; *B. cenocepacia*; *B. stabilis*; *B. vietnamiensis*; *B. dolosa*; *B. ambifaria*; *B. anthina* e *B. pyrrocinia* (Berg et al., 2005). *B. cepacia* também promove o crescimento vegetal. Riggs et al. (2001) verificaram que a inoculação com *B. cepacia* estirpe AMMDR1 em sementes de milho em casa de vegetação com solo não esterilizado elevou a produção de grãos de 36-48%. Em campo, este acréscimo foi de 5,9-6,3%. Peix et al. (2001) verificaram que *B. cepacia* estirpe SAOCV2 também promoveu o crescimento vegetal em feijão. O experimento foi realizado em vasos com solo (cultivado com feijão e com presença de *Fusarium*) em câmara de crescimento vegetal. O efeito da inoculação da estirpe SAOCV2 parece estar relacionado a mobilização de fósforo, atividade antifúngica contra *Fusarium* e indireta promoção da nodulação por rizóbio em plantas feijão. Não existe relato da fixação biológica de nitrogênio por estirpes de *B. cepacia*, mas Tabacchione et al. (1995) verificaram, através de hibridação com sondas para genes da fixação de nitrogênio em isolados de *B. cepacia*, a presença dos genes *nifA* e *nifHDK*. Neste trabalho foram utilizados quatro isolados, dois oriundos de pessoas com fibrose cística e dois da rizosfera de milho e arroz. O DNA dos quatro isolados apresentaram hibridização com o gene *nifA* e um isolado da rizosfera de arroz apresentou hibridização com os genes *nifHDK*.

2.6 Enterobacteriaceae

Diversos gêneros pertencentes a *Enterobacteriaceae* isolados do solo são diazotróficos. Uma idéia especulativa considera que o longo uso de resíduos de animais na agricultura tenha desenvolvido uma flora bem adaptada para

animal-solo-ciclo nutricional na rizosfera de plantas (Kennedy et al., 2004). Alguns exemplos de diazotróficos entéricos com atividade de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) são *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Pantoea* e *Serratia*.

O gênero *Klebsiella* possui dois habitats comuns: um localiza-se no ambiente, como na superfície de águas, solo e plantas, e outro é a superfície mucosa de mamíferos como humanos, cavalos ou suínos (Podschn & Ullmann, 1998). Bactérias pertencentes a este gênero são freqüentemente associadas com infecções no trato urinário e pneumonia, mas em plantas não causam doenças. Por hibridação DNA-DNA, seis grupos são descritos como espécies de *Klebsiella*: *K. pneumoniae* (com três subespécies, *pneumoniae*, *ozaenae* e *rhinoscleromatis*); *K. oxytoca*; *K. planticola*; *K. terrigena*, *K. mobilis* e *K. variicola* (Martínez et al., 2004). Nem todas as espécies são capazes de fixar nitrogênio, sendo diazotróficos *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola* e *K. variicola*. Além da fixação biológica do nitrogênio, também foi verificado que espécies de *Klebsiella* também sintetizam fitormônios como o ácido indol acético (AIA), promovendo um maior desenvolvimento radicular na cultura do arroz (El-Khawas & Adachi, 1999).

Os gêneros *Enterobacter* e *Pantoea* têm sido isolados de uma ampla variedade de culturas, tanto epífitos como endofíticos (Asis & Adachi, 2003). Fernandes et al. (2001), utilizando os meios semi-sólidos JNFb e NFb para quantificar, isolar e identificar bactérias diazotróficas existentes nas raízes e folhas de coqueiro, verificaram que dos 20 isolados obtidos, 13 foram pertencentes ao gênero *Enterobacter*, sendo que nove foram *E. cloacae*. Todos os isolados obtidos neste experimento foram capazes de fixar nitrogênio atmosférico. Kämpfer et al. (2005) propuseram uma nova espécie do gênero *Enterobacter*, *E. radicincitans*, capaz de produzir fitormônios e fixar nitrogênio atmosférico. Esta espécie foi isolada em 1986 da filosfera de trigo na Alemanha

e anteriormente, com base em testes bioquímicos, era considerada como pertencente à espécie *Pantoea agglomerans*. Asis & Adachi (2003) isolaram do caule de batata doce, no Japão, o endofítico não diazotrófico *Enterobacter asburiae* e o diazotrófico *Pantoea agglomerans*. O isolamento de *Pantoea agglomerans* apresentou atividade da nitrogenase e pode estar contribuindo para a fixação biológica de nitrogênio na cultura de batata doce japonesa, mas a função de *E. asburiae* necessita de estudos futuros.

Outra espécie pertencente à família *Enterobacteriaceae* é a *Serratia marcescens*. Experimentos de inoculação com *Serratia marcescens* em solo não estéril, em casa de vegetação, mostrou que esta bactéria pode ser facilmente introduzida junto a plantas de arroz através da sua inoculação em sementes ou raízes antes do plantio, demonstrando redução do acetileno após a colonização (Gyaneshwar et al., 2001). Também é um patógeno oportunista para humanos, causando muitas infecções nosocomiais (Grimont & Grimont, 1978, citado por Matsuyama et al., 1995). Tripathi et al. (2002), através da caracterização molecular da comunidade bacteriana tolerante à salinidade na rizosfera de arroz, utilizando ARDRA, RAPD e sequenciamento do rDNA 16S, encontraram quatro grupos representativos, sendo que um deles, no sequenciamento, apresentou 97% de similaridade com *Serratia marcescens*. Esta espécie também tem sido encontrada em algodão e milho doce (McInroy & Kloepper, 1995).

2.7 Impacto do sistema de uso do solo sobre os microrganismos

A transição de área natural, com muitas espécies de plantas e animais convivendo em equilíbrio ecológico dinâmico, para área agrícola, com reduzido número de espécies convivendo em desequilíbrio, pode resultar em uma diminuição da diversidade de bactérias do solo. O sistema de uso do solo pode alterar a densidade e composição de microrganismos. Melloni et al. (2004) avaliaram a densidade e diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas em

áreas em reabilitação após algumas décadas de mineração de bauxita. As áreas foram submetidas a diversos processos de reabilitação e nelas foram encontradas diversos tipos de vegetação: gramíneas, leguminosas herbáceas, bracatinga, espécies arbóreas nativas e *Eucalyptus saligna*. A densidade da população de diazotróficos associativos foi estimada através do número mais provável, o isolamento foi realizado nos meios JNFb (*Herbaspirillum* spp.), NFb (*Azospirillum* spp.), Fam (*Azospirillum amazonense*) e a caracterização cultural dos isolados, realizada em meio batata. Os autores verificaram que o tipo de vegetação afetou a densidade dos diazotróficos, a qual foi baixa em todas as áreas em reabilitação se comparada aos sistemas agrícolas; porém, houve grande diversidade fenotípica cultural entre os isolados obtidos. Nóbrega et al. (2004) avaliaram a diversidade fenotípica cultural em meio GNA, a morfologia celular, a tolerância ao cloreto de sódio e a análise de proteínas totais pela técnica de SDS-PAGE de 72 isolados obtidos em áreas em reabilitação de mineração de bauxita, isolados nos meios NFb, JNFb e Fam. Os autores encontraram uma grande diversidade fenotípica entre os microrganismos obtidos, com alta dissimilaridade em relação às espécies descritas, sugerindo novas espécies. Houve uma correlação entre os grupos formados pelo perfil protéico total e a caracterização morfológica celular. Os meios de cultivo Fam e JNFb, que favorecem o desenvolvimento de *A. amazonense* e *Herbaspirillum* spp., respectivamente, também permitiram o isolamento de outras espécies. Em ambos os trabalhos, a alta diversidade fenotípica, segundo os autores, pode estar relacionada à resiliência das espécies no solo retirado para a mineração, e que foi utilizado para a reabilitação das áreas, ou à entrada destas espécies através das sementes da vegetação utilizada no processo de recuperação.

A perda de diversidade de microrganismos do solo pode alterar a estrutura populacional de outros organismos situados ao longo da cadeia trófica. Processos vitais do solo, como a decomposição de matéria orgânica e a ciclagem

de nutrientes, podem sofrer impactos elevados, levando o sistema agrícola à maior dependência por fertilizantes.

2.8 Estudos de densidade e diversidade

Para quantificar a população de diazotróficos associativos, tanto de amostras de solo quanto na rizosfera, e de tecidos vegetais, a técnica do número mais provável (NMP) tem sido amplamente utilizada (Magalhães & Döbereiner, 1984; Fernandes et al., 2001; Lange & Moreira, 2002; Melloni et al., 2004; Brasil et al., 2005). Os meios de cultura mais utilizados para detectar a presença de diazotróficos não simbióticos não contêm nitrogênio e são semi-sólidos, como Fam (Magalhães 1983) e LGI, JNFb, NFb (Döbereiner et al., 1995). Apesar de os meios Fam e LGI, NFb e JNFb favorecerem o desenvolvimento de espécies de *A. amazonense*, *Azospirillum* spp. e *Herbaspirillum* spp., respectivamente, diversos trabalhos têm isolado outras espécies através destes meios (Magalhães & Döbereiner, 1984; Fernandes et al., 2001; Tripathi et al., 2002; Nóbrega et al., 2004).

Lange & Moreira (2002) avaliaram a eficiência de dois meios que favorecem *Azospirillum* spp, Fam e LGI. Os autores realizaram dois experimentos: no primeiro foi avaliada a densidade através do NMP da rizosfera de 13 espécies vegetais e de mistura de espécies de mata nativa; no segundo experimento avaliou-se a ocorrência de *A. amazonense* no substrato de crescimento ou solo rizosférico, na ectorizosfera e na endorizosfera de 12 diferentes espécies vegetais, de 10 espécies de orquídeas e de mistura de diversas espécies coletadas em mata nativa. Os autores verificaram que no primeiro experimento os valores de densidade obtidos em meio Fam foram superiores em solo rizosférico de sete das nove espécies vegetais em que foram detectadas as presenças de *A. amazonense*. No segundo experimento, foi

verificado que o meio Fam detectou a presença de *A. amazonense* em frequências maiores que o meio LGI.

O conhecimento da diversidade fenotípica e estrutura genética das populações presentes na rizosfera fornece a amplitude da diversidade de determinados ambientes. Isto pode auxiliar na compreensão de como as variações no ambiente podem estar influenciando na diversidade de espécies. A técnica de determinação de proteínas totais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) tem sido empregada para estimar a diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas associativas. Nóbrega et al. (2004), através da técnica de SDS-PAGE, puderam distinguir os isolados em área de reabilitação após mineração de bauxita, que foram similares às estirpes padrões conhecidas. Lima et al. (2005) verificaram, através desta técnica, a diversidade entre estirpes de *Bradyrhizobium* oriundos da Amazônia. Esta técnica permite a distinção de grupos, mas não permite identificar os microrganismos que não são similares a estirpes conhecidas e identificadas. Assim, outras técnicas podem ser empregadas como caracterização cultural, morfologia celular e testes bioquímicos, entre outros.

A caracterização genotípica de bactérias diazotróficas é ferramenta útil para conhecimento da diversidade destes organismos e compreensão sobre como os sistemas de uso do solo podem afetar a população destes microrganismos. O sequenciamento de genes que codificam para subunidades do RNA ribossomal (16S, 23S e 5S) tem sido amplamente empregado para estudos de diversidade. Os RNAs ribossomais são considerados cronômetros moleculares, pois são moléculas universais com funções altamente específicas estabilizadas ao longo da evolução e não sofrem influência por mudanças no meio ambiente, sendo o gene 16S um dos mais utilizados para detectar as relações entre bactérias (Woese, 1991). O gene 16S pode ser amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e o produto da reação pode ser clonado para o

sequenciamento ou seqüenciado diretamente (Weisburg et al., 1991). Por isso, esta técnica pode ser empregada com facilidade em estudos de diversidade e para a identificação de espécies. As seqüências de bases de genes obtidas em todo o mundo são submetidas a banco de dados como o GenBank, podendo, então, ser comparadas com seqüências já conhecidas. Atualmente, existem 37294 gêneros e 148663 espécies com seqüências de DNA conhecidas e depositadas no banco de dados do GenBank (Taxonomy, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos gerais

Este trabalho faz parte do projeto “*Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity*”, implementado pelo “*United Nations Programme (UNEP)*”, executado no Brasil, Costa do Marfim, Índia, Indonésia, Kênia, México e Uganda. No Brasil, este trabalho está sendo coordenado pela Profa. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira, da Universidade Federal de Lavras. As áreas avaliadas localizam-se na região amazônica, incluindo comunidades indígenas do município de Benjamin Constant, no estado do Amazonas. As áreas avaliadas estão localizadas nas comunidades Guanabara II, Nova Aliança e cidade de Benjamin Constant, situadas a aproximadamente 1.100 km a oeste de Manaus, na base do Rio Solimões (Figura 1). As comunidades indígenas existem há 22 anos e são formadas por representantes dos índios Ticuna e Cocamo. Estão organizadas em associações, praticando agricultura de pequena escala, agrofloresta e extrativismo vegetal. O projeto é multidisciplinar e aborda diversos aspectos da biota do solo, incluindo estudos sobre diazotróficos associativos. Assim, os procedimentos gerais de escolha dos sistemas de uso da terra (SUT), do sistema de amostragem e da localização das janelas de estudo e os métodos utilizados foram padronizados pela equipe global do projeto.

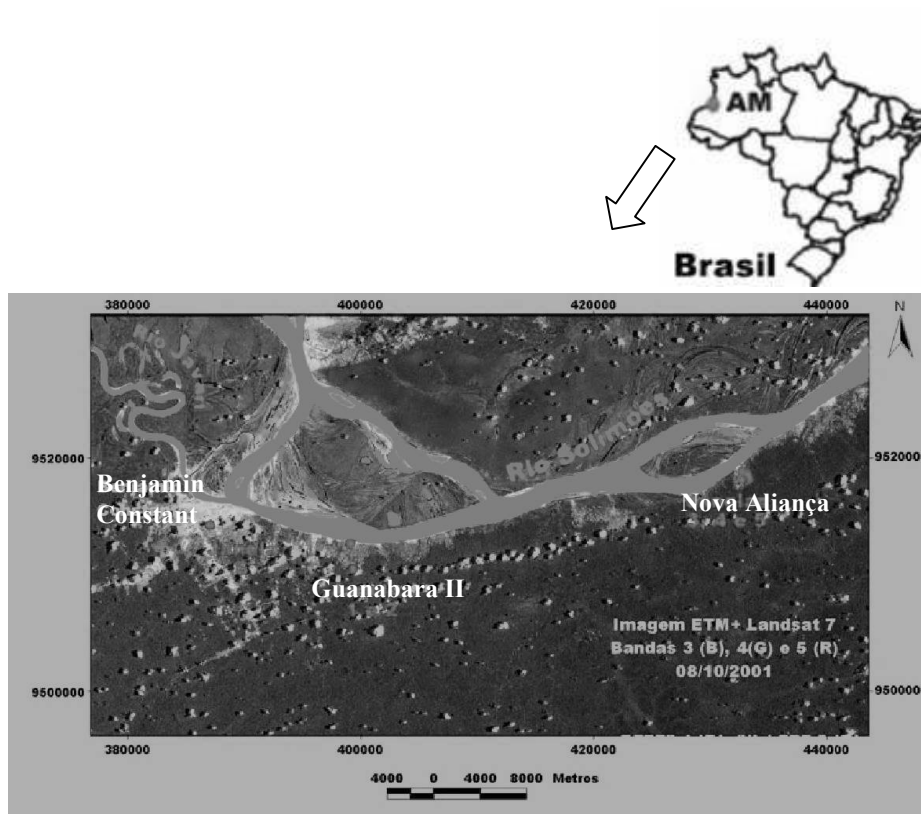


FIGURA 1 Local da realização das áreas de coleta (cidade de Benjamin Constant e comunidades indígenas Nova Aliança e Guanabara II, no município de Benjamin Constant).

3.2 Amostragem de solo

As áreas avaliadas estão distribuídas em seis janelas, onde as amostras de solos foram coletadas de acordo com os sistemas de uso da terra, totalizando 98 pontos de amostragem, alocados a 100 metros um do outro e, em alguns casos, a 50 m (Fidalgo et al., 2005). As amostras foram coletadas em março de 2004 e em cada ponto de amostragem georreferenciado, uma amostra composta constitui-se de 12 amostras simples, coletadas à profundidade de 0-20 cm. As

amostras simples foram coletadas nos raios de 3 a 6 m do ponto principal, conforme a Figura 2. Antes de realizar a coleta das amostras, retirou-se a serrapilheira do local e todo material a ser utilizado foi flambado para evitar contaminação entre os pontos.

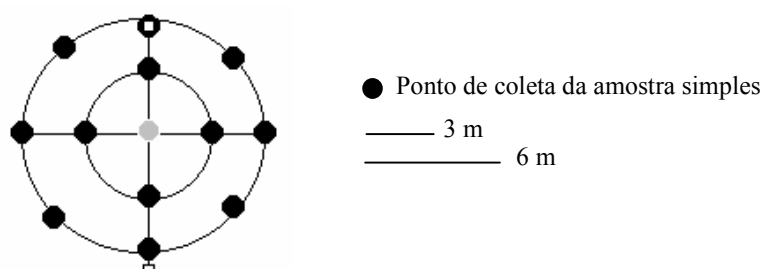


FIGURA 2 Esquema de coleta das amostras de solo. O ponto do centro do círculo foi georreferenciado. Os 12 pontos em negrito representam as amostras simples.

Cada amostra composta foi separada em sub-amostras destinadas a análises de vários organismos (nematóides, fungos endomicorrízicos, fungos fitopatogênicos e entopatogênicos, bactérias capazes de nodular leguminosas e diazotróficos associativos). Cerca de 300 g de cada amostra composta foram destinados à análise microbiológica e 200 g, à análise das características físicas e químicas do solo (Nóbrega & Moreira, 2006¹). As amostras destinadas à análise microbiológica foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis Millipore; armazenadas em recipientes de isopor, para sua conservação; e levadas para o laboratório, no qual foram conservadas a 4°C até o uso.

¹ Comunicação pessoal.

Para a avaliação da densidade e diversidade de microrganismos diazotróficos associativos, foram selecionados 30 pontos distribuídos nas seis janelas (Anexo 1A) sob diferentes sistemas de uso (Tabela 1).

TABELA 1 Identificação das amostras de solo por sistema de uso utilizado para avaliação da densidade e diversidade de diazotróficos associativos.

Janelas	Sistema de uso da terra (SUT)					
	Floresta	Capoeira Velha	Capoeira Nova	Agrofloresta	Roça	Pastagem
	Pontos utilizados					
J-1	05, 07, 16		01			
J-2				17, 17A, 25	21, 27	
J-3	40, 41	37			33	
J-4	62	60	53		58	
J-5			68, 75	66, 67	72, 78	
J-6		90				82,84, 86, 91, 92, 94

A- pontos alocados a 50 m; J-1 e J-2 – Guanabara II; J-3, J-4 e J-5 – Nova Aliança; J 6 Benjamin Constant.

3.3 Densidade e isolamento dos diazotróficos associativos

Para a determinação da densidade e isolamentos dos microrganismos associativos, as amostras de solos (10 g) foram diluídas (10^{-2} a 10^{-8}) em solução salina (0,85%) e 0,1 mL da suspensão de cada diluição foi inoculado em meios de cultura semi-sólidos que favorecem o crescimento de algumas espécies de diazotróficos, mas também permitem o desenvolvimento de outras, com três repetições, como JNFb (*Herbaspirillum* spp.), NFb (*Azospirillum* spp.), LGI (*Azospirillum amazonense*) (Döbereiner et al., 1995) e Fam (*Azospirillum*

amazonense) (Magalhães et al., 1983) (Anexo 2A). Os meios inoculados foram mantidos por 14 dias em câmara de crescimento a 27°C. A densidade de diazotróficos associativos foi avaliada através da técnica do número mais provável (NMP), utilizando o programa “Most Probable Number Estimate” (MPNES) (Woomer et al., 1988). Todas as culturas que apresentaram o crescimento típico, isto é, com a formação de película, foram isoladas. Os meios inoculados que não apresentaram a formação de películas foram descartados. Para o NMP e o isolamento, foram consideradas as películas que atingiram a superfície e as que permaneceram cerca de 4 mm abaixo superfície. Para o isolamento, foi transferida uma quantidade da cultura com o crescimento típico para novo meio semi-sólido, a qual foi incubada à mesma temperatura até que a nova película fosse formada. Nessa fase, as culturas foram riscadas em placas contendo os meios de origem sólidos (JNFb, NFb, LGI e Fam). Cinco colônias isoladas de cada placa foram transferidas para os meios semi-sólidos para confirmar o crescimento típico. Os isolados que formaram novamente película foram, então, riscados em meio GNA e batata para confirmação da pureza. Os isolados obtidos foram armazenados em glicerol e mantidos a – 20°C.

3.4 Caracterização em meio de cultivo GNA e batata

A caracterização cultural foi realizada em meios GNA e batata (Anexo 2A), após um período de crescimento de cinco dias a 27°C. As características coloniais avaliadas foram dias de aparecimento; diâmetro médio (mm); forma (puntiforme circular e irregular); elevação (plana, lenticular, convexa, drop-like, umbonada e umbilicada); borda (inteira, ondulada, lobada, denteada e filamentosa); superfície (lisa, rugosa e papilada); produção de goma (escassa, pouca, moderada, abundante); consistência da massa de crescimento (seca, aquosa, gomosa, viscosa e butírica); detalhes ópticos (transparente, translúcido, opaco e brilhante) e coloração (branca, rosa, rosa claro, creme, creme escuro).

Para comparações foram incluídas estirpes-tipo e referência: BR11001^T (*Azospirillum brasilense*); BR11140^T (*Azospirillum amazonense*); BR11340^T (*Burkholderia brasilensis*); BR11080^T (*Azospirillum lipoferum*); BR11175^T (*Herbaspirillum seropedicae*), *Azospirillum irakense* e BR9004 (*Burkholderia* sp. isolada de leguminosa arbórea, Fátima M. S. Moreira, Universidade Federal de Lavras-MG).

3.5 Avaliação da morfologia celular em microscópio ótico e teste de Gram

Os isolados e as estirpes foram avaliados quanto à morfologia das células em microscópio ótico de contraste de fase (Olympus BX40). Após o crescimento nos meios semi-sólidos seletivos durante cinco dias, à temperatura de 27°C, uma alíquota de cada tubo foi retirada para a montagem das lâminas e procedeu-se a observação em microscópio de contraste de fase. As características observadas foram movimento celular; forma da célula; presença ou ausência de cadeias bacterianas e presença de grânulos de poli-β-hidroxibutirato (PHB).

Os isolados foram avaliados quanto ao teste de Gram seguindo a metodologia de Bartholowew (Yano et al., 1993). Para esta avaliação os isolados e estirpes-tipo e referência foram crescidos em meio GNA sólido por três dias, a 27°C. Uma colônia foi retirada de cada isolado e das estirpes-tipo e referência; então se realizou o esfregaço sobre lâmina limpa. A cultura foi coberta com solução de cristal violeta por 1 minuto, lavada com água corrente, coberta com lugol por 1 minuto, lavada com água corrente, lavada com etanol 95% durante 30 segundos, lavada com água novamente e coberta com corante safranina durante 10 segundos. As células foram observadas em microscópio ótico com objetiva de imersão (Nikon AFX-IIA). As células Gram positivas ficaram azuis violetas e as Gram negativas, vermelhas.

3.6 Análise protéica através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os isolados e as estirpes foram repicados duas vezes em meio TY (“tryptone yeast”) sólido antes de serem inoculados em meio TY líquido, no qual permaneceram sob crescimento por 4 dias, a temperatura de 28°C, sob agitação de 120 rpm (Anexo 3A). O meio foi centrifugado a 80 g X 100 por 10 minutos, a 4°C, para obtenção dos “pellets” ou células, que foram então lavados duas vezes com tampão NaPBS. De cada isolado e estirpe foram pesados 70 mg de células em tubos “eppendorfs” e adicionados 0,9 mL do tampão da amostra (TTA) e 0,1 mL de SDS a 20%. As amostras foram aquecidas em banho-maria por 10 minutos a 95°C e depois centrifugadas a 80 g X 100 por 10 minutos, a 4°C. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) pelo método Laemmli (1970) modificado por Jackman (1985). Foram inoculadas 30 µL de cada amostra, em gel de sistema descontínuo com concentração 12% para o gel separador e 5 % para o gel de concentração. Para ausência ou presença de bandas foram atribuídos valores 0 e 1, respectivamente. As bandas foram comparadas e suas semelhanças foram estimadas pelo coeficiente de Jacard (S_j), em que $S_j = a/a + b + c$. Os isolados e as estirpes foram agrupados pelo método UPGMA (average linkage clustering) e representados graficamente por um dendrograma (NTSYS-pc, versão 2.1t).

3.7 Atividade da nitrogenase através da redução do acetileno (ARA)

A atividade da nitrogenase através da redução do acetileno foi realizada seguindo a metodologia descrita por Dilworth (1966). As estirpes tipo, referência e os isolados foram crescidos em seus meios semi-sólidos de origem em vidros de penicilina com 10 mL de volume (5 mL de meio por vidro) com três repetições, a 28°C, até a formação da película característica. Para a verificação da atividade da nitrogenase, após a formação da película

característica os tubos de penicilina foram vedados com tampa plástica. No ensaio de redução do acetileno (“acetylene reduction assay”- ARA), o acetileno foi produzido em um erlenmeyer de Kitasato através da reação de carbureto de cálcio (CaC_2) com água; então, 1 mL deste gás foi injetado em cada tubo de penicilina contendo o meio semi-sólido com os isolados crescidos. Após 1 hora, foi retirado 1 mL do gás presente em cada tubo para verificar a produção de etileno através da leitura por cromatografia gasosa (Varian Star 3400 cx).

3.8 Amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S do DNA ribossomal

Os isolados foram crescidos em meio GNA sólido. Colônias isoladas foram retiradas e colocadas em tubos “eppendorfs” contendo 1000 μL de água ultra pura estéril e aquecidas por 10 minutos a 95°C . Estas amostras foram diluídas 10 vezes e uma alíquota de 20 μL foi utilizada para a reação em cadeia da polimerase (PCR), para um volume final de 100 μL por reação. A concentração final dos reagentes por reação foram 0,2 μM de cada oligonucleotídeos iniciadores 27F (5AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT), 2,5 mM de cloreto de magnésio, tampão 1X para PCR, 0,2 μM de cada dNTP e 0,02 U Taq DNA polimerase (Platinum™ Taq DNA polimerase, Invitrogen). A reação de amplificação foi realizada no Eppendorf Mastercycler®, Alemanha. As temperaturas do ciclo de amplificação foram uma desnaturação inicial de 94°C por 5 min., 30 ciclos de desnaturação (94°C por 40 s), anelamento (55°C por 40 s), extensão (72°C por 1,5 min) e uma extensão final de 72°C por 7 min. Para a reação de sequenciamento, a reação de PCR do rDNA 16S (100 μL) foi corrida em gel de agarose 1,5% (p/v), com tampão TAE, e depois corada em brometo de etídeo ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$). A banda de interesse foi cortada do gel e purificada utilizando-se o QiAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento direto foi realizado utilizando os oligonucleotídeos iniciadores

27F e 1492R e o Big Dye® Terminator v3.0 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram então submetidas ao sequenciamento no MegaBACE™ 500, Amersham. As seqüências obtidas foram comparadas às existentes no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para a possível identificação das espécies.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Densidade e isolamento dos diazotróficos associativos

No meio JNFb, em nenhuma das amostras foi verificado o crescimento característico de diazotróficos, ou seja, a formação da película. O meio JNFb favorece o crescimento de *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisulbalbicans* (Döbereiner et al., 1995), e a ausência de crescimento destes microrganismos pode estar associada ao fato de que estas espécies são endofíticas obrigatórias e possuem baixa sobrevivência no solo (Baldani et al., 1996). Na Figura 3 são apresentadas as densidades e seus respectivos intervalos de confiança de todas as amostras de solos utilizadas neste experimento em meio NFb. Em todas as amostras foi detectado o crescimento bacteriano característico. Os valores de densidade em meio NFb variaram de $0,035 \times 10^3$ a $9,18 \times 10^3$ células por grama de solo. No meio LGI (Figura 4), os valores de densidade variaram de 0 a $2,30 \times 10^3$ células por grama de solo. O meio Fam (Figura 5) apresentou valores variando entre 0 a $4,24 \times 10^3$ células por grama de solo. A média de densidade em cada meio foi de $1,05 \times 10^3$ células por grama de solo em NFb, $2,84 \times 10^2$ células por grama de solo em LGI e $3,95 \times 10^2$ células por grama de solo em Fam. No meio Fam houve uma tendência de maiores valores de densidade do que o meio LGI em 22 das 30 amostras avaliadas; três amostras foram iguais em ambos os meios e oito amostras foram menores que o meio LGI. No meio LGI não foi verificado crescimento bacteriano característico de diazotrófico nas amostras J2-25, J2-27 e J6-84 e no meio Fam, na amostra J5-67. Para as amostras J1-05 e J2-17A em ambos os meios, não foi verificado o crescimento de diazotróficos. O meio de cultura Fam mostrou-se mais eficiente em detectar o crescimento de diazotróficos do que o meio LGI. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Lange & Moreira (2002), que testaram a eficiência dos meios Fam e LGI para a detecção de *A. amazonense* em raízes e rizosfera de

Orchidaceae e de outras famílias vegetais. No primeiro experimento destes autores, *A. amazonense* foi detectada no solo rizosférico de oito das 13 espécies pesquisadas. Em duas amostras no meio LGI não foi observado o crescimento de *A. amazonense* e de outras espécies de diazotróficos. No segundo experimento, a frequência de *A. amazonense* em solo rizosférico, ecto+endorrizosfera e endorrizosfera de várias espécies vegetais e de Orchidaceae foi maior no meio Fam, comparado ao meio LGI. Os autores atribuíram este resultado à presença de micronutrientes no meio Fam que estimulariam o desenvolvimento destes microrganismos.

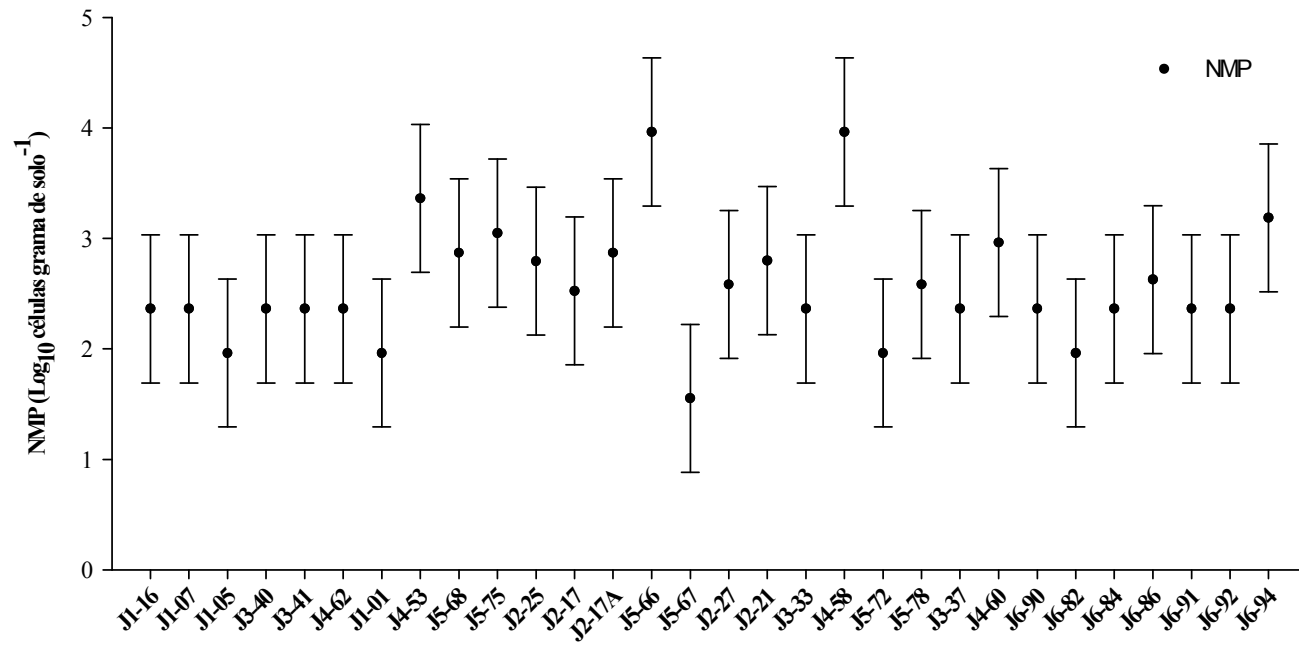


FIGURA 3 Número mais provável (NMP) de células por grama de solo em meio semi-sólido NFb das 30 amostras de solos oriundas de diferentes sistemas de uso da terra (SUT) na região Amazônica. Barras representam intervalo de confiança a 95%.

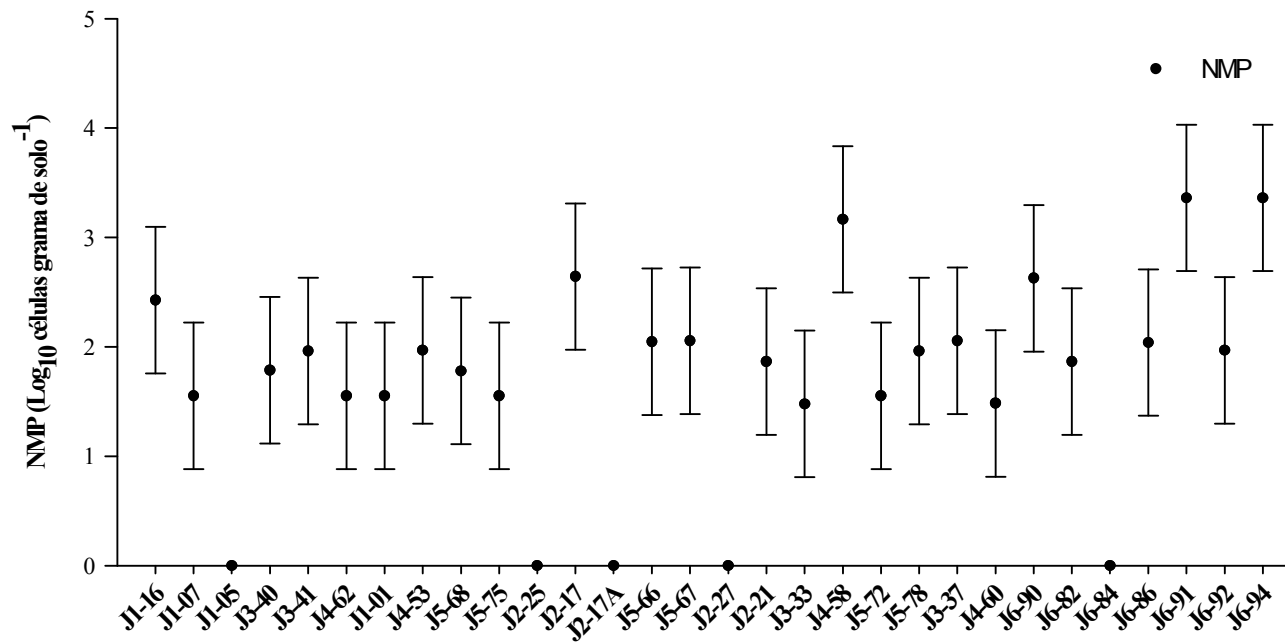


FIGURA 4 Número mais provável (NMP) de células por grama de solo em meio semi-sólido LGI das 30 amostras de solos oriundas de diferentes sistemas de uso da terra (SUT) na região Amazônica. Barras representam intervalo de confiança a 95%.

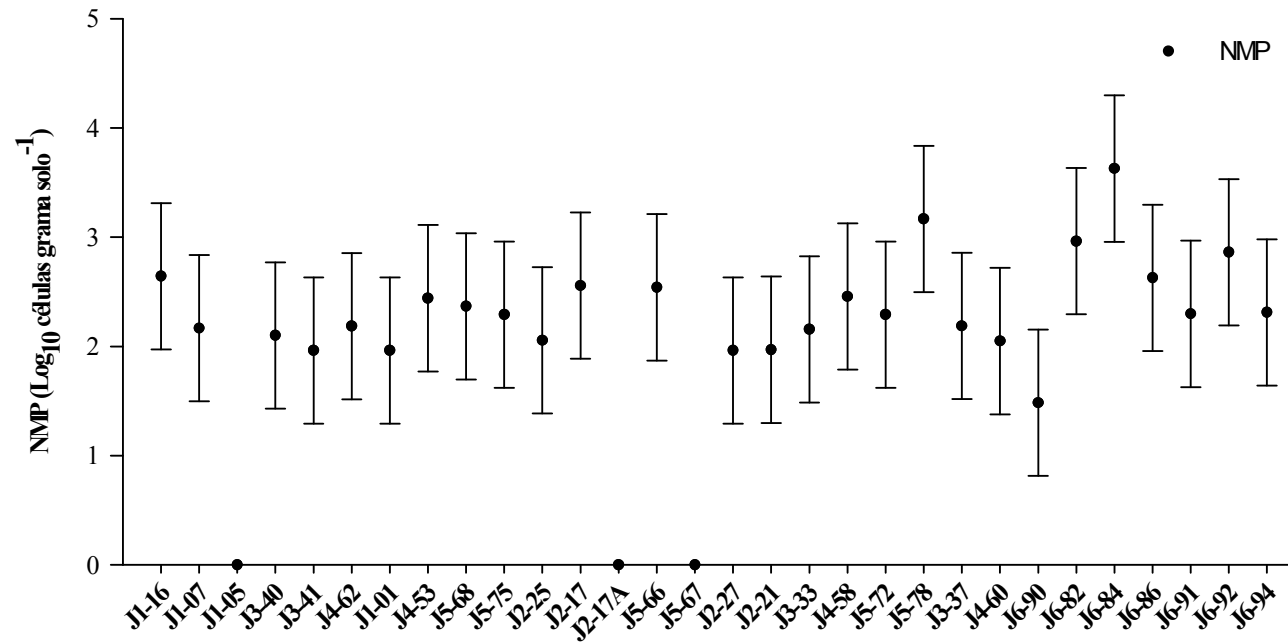


FIGURA 5 Número mais provável (NMP) de células por grama de solo em meio semi-sólido Fam das 30 amostras de solos oriundas de diferentes sistemas de uso da terra (SUT) na região Amazônica. Barras representam intervalo de confiança a 95%.

Os valores médios de densidade de bactérias diazotróficas em meio NFb por sistema de uso (SUT) e seus respectivos intervalos de confiança são apresentados na Figura 6. Em meio NFb houve tendência de maiores valores de densidade nos SUT Agrofloresta, Roça e Capoeira Nova, porém sem diferenças estatísticas. Na Figura 7 são apresentados os valores de densidade em meio LGI. Os valores obtidos decrescem na seguinte ordem: Pastagem; Roça, Capoeira Velha, Agrofloresta, Floresta e Capoeira Nova. Em meio Fam houve uma tendência de maior densidade em Pastagem e menor no SUT Capoeira Velha (Figura 8). Em meio LGI e Fam não houve diferenças estatísticas entre os SUT.

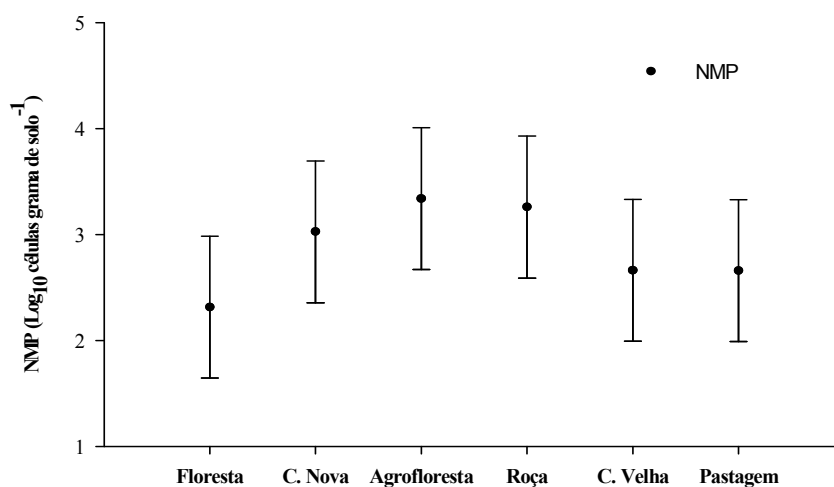


FIGURA 6 Média por sistema de uso da terra (SUT) na região Amazônica do número mais provável (NMP) de células de diazotróficos por grama de solo em meio semi-sólido NFb. Barras representam intervalo de confiança a 95%.

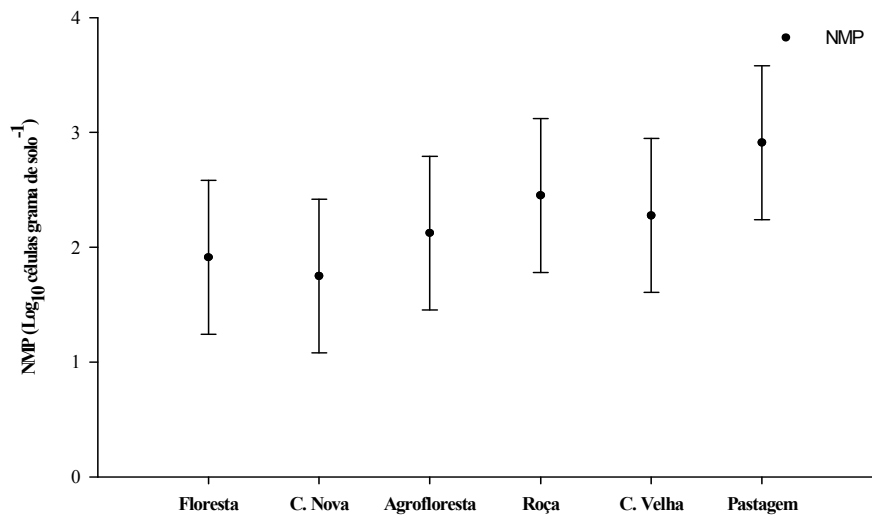


FIGURA 7 Média por sistema de uso da terra (SUT) na região Amazônica do número mais provável (NMP) de células de diazotróficos por grama de solo em meio semi-sólido LGI. Barras representam intervalo de confiança a 95%.

Exceto para o SUT Capoeira Velha, em todos os SUT houve tendência de maior média de densidade no meio Fam do que no meio LGI. Os meios LGI e Fam favorecem o desenvolvimento de *A. amazonense* e de outros diazotróficos (Magalhães & Döbereiner, 1984); assim, justifica-se o fato de os maiores valores de densidade nestes meios terem sido encontrados no SUT Pastagem, em que predominam gramíneas, já que estes microrganismos foram encontrados em números elevados em associação com estas espécies vegetais (Magalhães et al., 1983). Maior densidade de diazotróficos associativos também foi encontrada por Melloni et al. (2004) quando espécies de gramíneas foram utilizadas para reabilitação de áreas degradadas após mineração de bauxita. Não houve o

mesmo comportamento por SUT dos meios LGI e Fam, comparados ao NFb. Em todos os meios, no SUT Floresta foi detectada o crescimento bacteriano característico de diazotróficos, o que difere dos resultados obtidos por Melloni et al. (2004). Estes autores, utilizando meios JNFb, NFb, LGI e Fam, não encontraram diazotróficos endofíticos em área de mata nativa. Magalhães & Döbereiner (1984) também não detectaram a presença de *A. amazonense* ou de outros diazotróficos em áreas de floresta na região Amazônica. Os valores encontrados neste trabalho em Floresta deve-se ao fato que películas abaixo da superfície também foram consideradas. Em todos os SUT, independentemente do meio de cultivo utilizado, a densidade não foi elevada. Os valores de densidade encontrados, poderiam ser ainda menores se as películas que permaneceram 4 mm abaixo da superfície não tivessem sido consideradas.

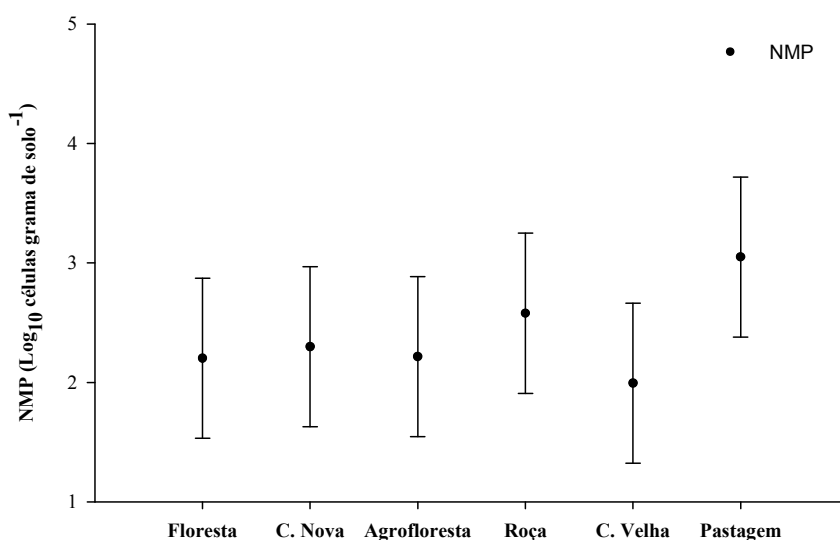


FIGURA 8 Média por sistema de uso da terra (SUT) na região Amazônica do número mais provável (NMP) de células de diazotróficos por grama de solo em meio semi-sólido Fam. Barras representam intervalo de confiança a 95%.

Do experimento da densidade, após sucessivas repicagens foram obtidos 22 isolados. A origem, o meio de isolamento e a identificação dos isolados são apresentados na Tabela 2. Não foram obtidos isolados de todas as amostras avaliadas. Foram isoladas bactérias provenientes de todos os SUTs, exceto Capoeira Velha. Do SUT Pastagem foram obtidos oito isolados; de Agrofloresta, cinco; de Roça, quatro; de Capoeira nova e de Floresta, dois isolados. Maior número de isolados foram obtidos a partir do meio Fam, seguido por LGI e depois NFb.

TABELA 2 Origem e identificação dos 22 isolados obtidos nos diferentes SUT da Amazônia.

Amostras	Diluição	SUT	Meio de isolamento	Identificação
J2-27	10 ⁻²	Roça	NFb	UFLA73
J4-62	10 ⁻²	Floresta	NFb	UFLA74
J6-94	10 ⁻²	Pastagem	NFb	UFLA75
J1-07	10 ⁻²	Floresta	Fam	UFLA76
J2-25	10 ⁻²	Agrofloresta	Fam	UFLA77
J4-53	10 ⁻²	Capoeira Nova	Fam	UFLA78
J4-58	10 ⁻²	Roça	Fam	UFLA79
J5-66	10 ⁻³	Agrofloresta	Fam	UFLA80
J5-66	10 ⁻⁴	Agrofloresta	Fam	UFLA81
J5-68	10 ⁻⁴	Capoeira Nova	Fam	UFLA82
J6-82	10 ⁻³	Pastagem	Fam	UFLA83
J6-84	10 ⁻²	Pastagem	Fam	UFLA84
J6-84	10 ⁻²	Pastagem	Fam	UFLA85
J6-86	10 ⁻²	Pastagem	Fam	UFLA86
J6-92	10 ⁻²	Pastagem	Fam	UFLA87
J6-94	10 ⁻²	Pastagem	Fam	UFLA88
J6-94	10 ⁻²	Pastagem	Fam	UFLA89
J2-17	10 ⁻²	Agrofloresta	LGI	UFLA90
J2-17	10 ⁻²	Agrofloresta	LGI	UFLA91
J4-58	10 ⁻²	Roça	LGI	UFLA92
J4-58	10 ⁻²	Roça	LGI	UFLA93
J6-92	10 ⁻²	Pastagem	LGI	UFLA94

4.2 Caracterização em meio de cultivo GNA e batata

A caracterização morfológica das colônias dos 22 isolados em meio de cultura GNA é apresentada na Tabela 3. O tempo para aparecimento das primeiras colônias variou de 1 a 3 dias, o diâmetro médio das colônias foi de <1 a 5 mm e a forma, circular e irregular. A elevação das colônias variou de “convexa, lenticular, drop-like e umbonada”; bordos inteiros, superfície “lisa, papilada e ondulada”; produção de goma, “pouca, moderada a abundante”; consistência “seca, butírica e gomosa”; detalhes ópticos entre “brilhante, opaco e translúcido” e cor “creme, rosa e branco”. Em meio batata (Tabela 4), o tempo de aparecimento das colônias foi de 1 a 2 dias; diâmetro <1 a 5 mm; forma “circular e irregular”; elevação, “convexa, lenticular, drop-like e umbonada”. Os bordos das colônias variaram de “inteiro, filamentosos e ondulados”; superfície “lisa, rugosa, papilada e ondulada”; produção de goma, “pouca, moderada a abundante”; consistência “seca, butírica e gomosa”; detalhes ópticos “brilhante e opaco” e cor “creme, branca, amarela e rosa”.

Em meio GNA, UFLA76 e UFLA80, UFLA77 e UFLA94, UFLA91 e UFLA92 e UFLA89 e BR9004 foram iguais em todas as características avaliadas. Já em meio batata, não houve o mesmo comportamento, apenas os isolados UFLA77 e UFLA80 e os isolados UFLA78, UFLA89 e estirpe-tipo BR11340^T foram iguais. Em meio batata, houve maior variação entre as características avaliadas que em meio GNA. Em meio GNA, a produção de goma é maior que em meio batata, o que dificulta a caracterização das colônias. Todavia, a caracterização cultural em ambos os meios revelou uma grande diversidade fenotípica entre os isolados.

TABELA 3 Caracterização morfológica em meio de cultura GNA após cinco dias de crescimento dos 22 isolados oriundos dos diferentes SUT da Amazônia e das estirpes-tipo e referência.

Isolados	Tempo ⁽¹⁾	Diâmetro (mm) ⁽²⁾	Forma	Elevação	Borda	Superfície	Goma	Consistência	Detalhes ópticos	Cor
UFLA73	1	3	circular	convexa	inteira	lisa	moderada	seca	brilhante	creme
UFLA74	1	3	circular	lenticular	inteira	papilada	pouca	butírica	brilhante	rosa
UFLA75	1	3	circular	lenticular	inteira	lisa	moderada	seca	brilhante	rosa
UFLA76	2	3	circular	convexa	inteira	lisa	moderada	butírica	brilhante	creme
UFLA77	1	1	circular	convexa	inteira	lisa	moderada	butírica	brilhante	creme
UFLA78	2	3	circular	convexa	inteira	lisa	moderada	butírica	opaco	branca
UFLA79	1	5	circular	drop like	inteira	lisa	moderada	gomosa	brilhante	creme
UFLA80	2	3	circular	convexa	inteira	lisa	moderada	butírica	brilhante	creme
UFLA81	1	4	circular	convexa	inteira	lisa	abundante	butírica	brilhante	creme
UFLA82	1	5	circular	convexa	inteira	papilada	abundante	gomosa	brilhante	creme
UFLA83	2	3	circular	convexa	inteira	lisa	abundante	butírica	brilhante	creme
UFLA84	2	1	circular	convexa	inteira	lisa	pouca	butírica	opaco	branca
UFLA85	2	1,5	circular	lenticular	inteira	lisa	pouca	butírica	brilhante	branca
UFLA86	2	2	circular	lenticular	inteira	lisa	moderada	butírica	brilhante	branca
UFLA87	3	1,5	circular	convexa	inteira	lisa	moderada	butírica	brilhante	creme
UFLA88	2	3	irregular	umbonada	inteira	papilada	moderada	butírica	brilhante	creme
UFLA89	2	1	circular	convexa	inteira	lisa	pouca	butírica	brilhante	creme
UFLA90	1	3	circular	convexa	inteira	lisa	abundante	gomosa	brilhante	creme
UFLA91	1	3	circular	convexa	inteira	lisa	moderada	gomosa	brilhante	creme
UFLA92	1	3	circular	convexa	inteira	lisa	moderada	gomosa	brilhante	creme
UFLA93	1	3	circular	drop like	inteira	ondulada	abundante	gomosa	brilhante	creme
UFLA94	1	1	circular	convexa	inteira	lisa	moderada	butírica	brilhante	creme

Continua...

Continua...										
BR11140 ^T	1	3	circular	convexa	inteira	lisa	pouca	butírica	brilhante	creme
BR11001 ^T	1	<1	circular	lenticular	inteira	lisa	pouca	seca	translúcido	creme
BR11340 ^T	1	1	circular	convexa	inteira	lisa	pouca	butírica	brilhante	creme
BR11080 ^T	1	3	circular	lenticular	inteira	lisa	pouca	butírica	brilhante	amarela
BR11175 ^T	1	4	circular	convexa	inteira	lisa	pouca	butírica	brilhante	creme
<i>A. irakense</i>	1	2	circular	lenticular	inteira	lisa	pouca	butírica	brilhante	marrom
BR9004	2	<1	circular	convexa	inteira	lisa	pouca	butírica	brilhante	creme

⁽¹⁾ Tempo em dias de aparecimento; ⁽²⁾ Diâmetro médio das colônias.

TABELA 4 Caracterização morfológica em meio de cultivo batata após cinco dias de crescimento dos 22 isolados oriundos dos diferentes SUT da Amazônia e das estirpes-tipo e referência.

Isolados	Tempo ⁽¹⁾	Diâmetro (mm) ⁽²⁾	Forma	Elevação	Borda	Superfície	Goma	Consistência	Detalhes ópticos	Cor
UFLA73	1	3	circular	lenticular	inteira	lisa	moderada	butírica	brilhante	creme
UFLA74	1	<1	circular	lenticular	inteira	rugosa	pouca	butírica	opaca	branco
UFLA75	1	3	circular	lenticular	inteira	lisa	pouca	butírica	brilhante	creme
UFLA76	1	1	circular	lenticular	inteira	rugosa	pouca	butírica	brilhante	creme
UFLA77	1	2	circular	lenticular	inteira	lisa	pouca	butírica	brilhante	creme
UFLA78	1	1	circular	lenticular	inteira	lisa	pouca	butírica	brilhante	creme
UFLA79	1	5	circular	lenticular	filamentosa	lisa	abundante	butírica	brilhante	amarelo
UFLA80	1	2	circular	lenticular	inteira	lisa	pouca	butírica	brilhante	creme
UFLA81	1	4	irregular	lenticular	ondulada	lisa	moderada	butírica	brilhante	branco

Continua...

Continua...										
UFLA82	1	4	circular	umbilicada	inteira	papilada	moderada	gomosa	brilhante	creme
UFLA83	1	1	circular	umbonada	inteira	rugosa	pouca	butírica	brilhante	creme
UFLA84	1	1	circular	plana	inteira	lisa	pouca	butírica	opaca	branco
UFLA85	2	1	circular	plana	inteira	lisa	pouca	butírica	opaca	branco
UFLA86	2	1	circular	lenticular	inteira	lisa	pouca	butírica	brilhante	branco
UFLA87	1	1	circular	lenticular	inteira	lisa	moderada	butírica	brilhante	creme
UFLA88	1	3	irregular	umbonada	inteira	papilada	moderada	butírica	brilhante	branco
UFLA89	1	1	circular	lenticular	inteira	lisa	pouca	butírica	brilhante	creme
UFLA90	1	3	circular	lenticular	inteira	ondulada	moderada	gomosa	brilhante	branco
UFLA91	1	2	circular	convexa	inteira	lisa	moderada	gomosa	brilhante	creme
UFLA92	1	4	circular	drop like	inteira	lisa	moderada	butírica	brilhante	creme
UFLA93	1	4	circular	drop like	inteira	lisa	abundante	gomosa	brilhante	creme
UFLA94	1	2	circular	lenticular	inteira	lisa	moderada	butírica	brilhante	branco
BR11140 ^T	1	3	circular	convexa	inteira	lisa	pouca	butírica	brilhante	branco
BR11001 ^T	1	<1	circular	convexa	inteira	rugosa	pouca	seca	brilhante	rosa
BR11340 ^T	1	1	circular	lenticular	inteira	lisa	pouca	butírica	brilhante	creme
BR11080 ^T	1	3	circular	convexa	inteira	lisa	moderada	seca	brilhante	laranjado
BR11175 ^T	1	1	circular	convexa	inteira	lisa	pouca	butírica	translúcido	creme
<i>A. irakense</i>	1	1	circular	convexa	inteira	lisa	pouca	butírica	brilhante	creme
BR9004	1	1	circular	convexa	inteira	lisa	escassa	butírica	brilhante	creme

⁽¹⁾ Tempo em dias de aparecimento; ⁽²⁾ Diâmetro médio das colônias.

4.3 Avaliação da morfologia celular em microscópio ótico e teste de Gram

A caracterização celular dos isolados é apresentada na Tabela 5. A fotografia celular dos isolados é apresentada na Figura 9. A largura das células variou de 0,55 a 1,10 μm . A forma celular verificada entre os isolados foi vibrio, cocos e bastão. Três movimentos celulares foram observados rápido e trajetória; lento e trêmulo e giratório rápido e ondulatório. Na maioria dos isolados foi verificada a presença de PHB e dois isolados apresentaram teste Gram positivo (UFLA84 e UFLA85). Não foi observada a presença de cadeias bacterianas. Houve uma grande diversidade entre os isolados; apenas os isolados UFLA90 e UFLA93 foram iguais para todas as características avaliadas. Poucos isolados apresentaram o mesmo movimento celular das estirpes-tipo BR11001^T e BR11140^T (giratório rápido e ondulatório); o movimento predominante entre os isolados foi lento e trêmulo.

Através da caracterização celular foi possível verificar que existem, entre os isolados, bactérias que diferem de *Azospirillum* ssp., indicando que os meios favoreceram o crescimento de outras espécies de diazotróficos, o que já foi verificado por outros autores (Magalhães & Döbereiner, 1984; Fernandes et al., 2001; Tripathi et al., 2002; Nóbrega et al., 2004).

TABELA 5 Caracterização celular dos 22 isolados oriundos dos diferentes SUT da Amazônia e estirpes-tipo e referência, em microscópio de contraste de fase após cinco dias de crescimento em meios semi-sólidos¹.

Isolados	Largura (µm)	Mobilidade celular ²	Forma celular ³	Presença de PHB	Presença de cadeias	Gram
UFLA73	1,10	R/T	víbrio	+	-	-
UFLA74	0,55	L/Tre	cocos	-	-	-
UFLA75	0,94	R/T	víbrio	+	-	-
UFLA76	0,72	GR/O	víbrio	+	-	-
UFLA77	0,72	L/Tre	cocos	-	-	-
UFLA78	0,61	L/Tre	víbrio	-	-	na
UFLA79	0,83	L/Tre	bastão	-	-	-
UFLA80	0,55	GR/O	bastão	+	-	-
UFLA81	na	R/T	víbrio	+	-	-
UFLA82	0,66	R/T	víbrio	-	-	-
UFLA83	0,77	L/Tre	víbrio	+	-	-
UFLA84	na	na	na	na	na	+
UFLA85	na	na	na	na	na	+
UFLA86	na	na	na	na	na	-
UFLA87	0,55	L/Tre	víbrio	+	-	-
UFLA88	0,55	R/T	bastão	+	-	-
UFLA89	0,83	R/T	bastão	+	-	-
UFLA90	0,77	L/Tre	bastão	-	-	-
UFLA91	0,72	L/Tre	bastão	-	-	-
UFLA92	0,61	L/Tre	bastão	-	-	-
UFLA93	0,77	L/Tre	bastão	-	-	-
UFLA94	0,77	L/Tre	víbrio	+	-	-
BR11140 ^T	na	GR/O	víbrio	+	-	-
BR11001 ^T	0,88	GR/O	víbrio	+	-	-
BR9004	na	na	na	na	na	-
BR11175 ^T	na	na	na	na	na	-
BR11080 ^T	na	na	na	na	na	-
BR11340 ^T	na	na	na	na	na	-
<i>A. irakense</i>	na	na	na	na	na	-

¹ Os isolados foram crescidos nos meios semi-sólidos específicos utilizados no isolamento. ² Mobilidade: lento e trêmulo (L/Tre); rápido e trajetória (R/T); giratório rápido e ondulatório (GR/O). ³ Forma: bastão, coco e vibrio. *na- não avaliado.

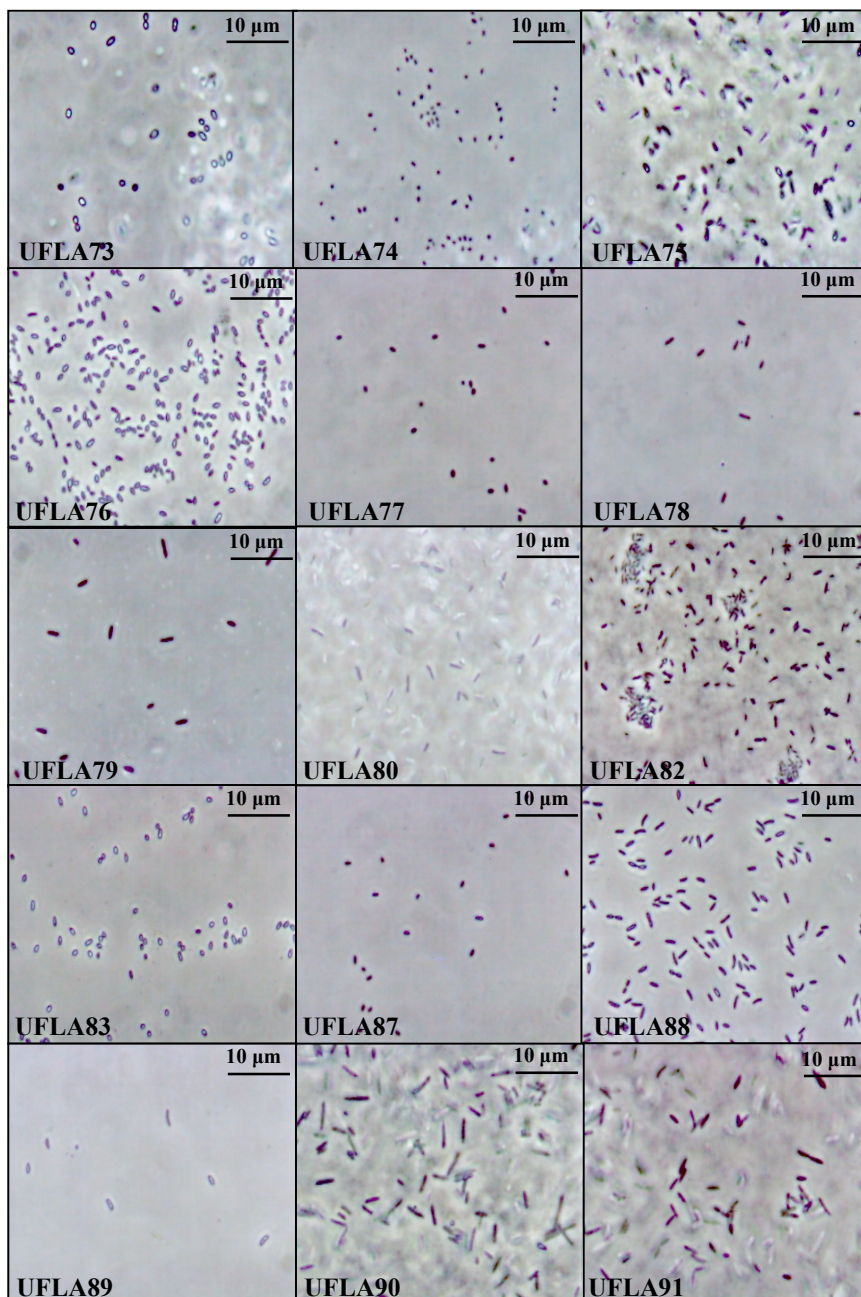


FIGURA 9 Morfologia celular dos isolados obtidos. (Continua...)

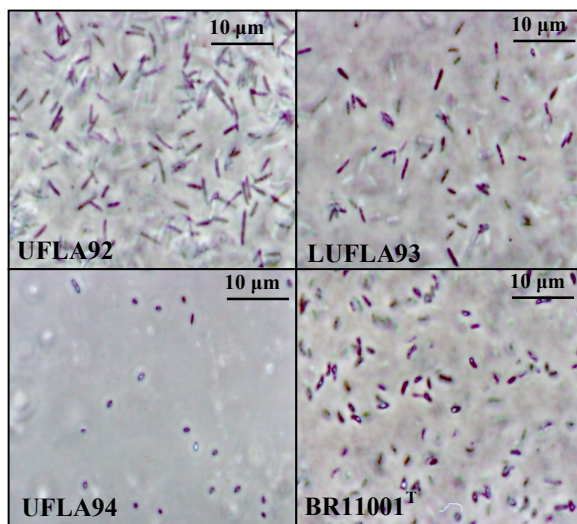


FIGURA 9 Morfologia celular dos isolados obtidos e da estirpe BR11001.

4.4 Análise protéica através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O dendrograma de similaridade e os perfis de proteína total são apresentados na Figura 10. Não foi possível avaliar o perfil protéico dos isolados UFLA78, UFLA84 e UFLA90. Três grupos de isolados apresentaram 100% de similaridade. Nenhum dos isolados apresentou 100% de similaridade com as estirpes-tipo. A 85% de similaridade, 21 grupos são formados: grupo I - BR11340^T; grupo II - BR9004; grupo III - UFLA89 (Pastagem) e UFLA83 (Pastagem); grupo IV - UFLA80 (Agrofloresta) e UFLA86 (Pastagem); grupo V - UFLA87; grupo VI - UFLA81 (Agrofloresta), UFLA76 (Floresta) e UFLA75 (Pastagem); grupo VII - UFLA88; grupo VIII - UFLA82; grupo IX - UFLA94; grupo X - BR11175^T; grupo XI - UFLA93; grupo XII - UFLA79; grupo XIII - UFLA92; grupo XIV - UFLA77; grupo XV - UFLA74; grupo XVI -

BR11001^T; grupo XVII – BR11080^T; grupo XVIII – *A. irakense*; grupo XIX – UFLA91; grupo XX – UFLA85; grupo XXI – UFLA73.

Através da avaliação do perfil protéico dos isolados, foi possível verificar uma elevada diversidade entre os isolados obtidos. Esta técnica permite avaliar a diversidade de bactérias com rapidez e baixo custo. Nóbrega et al. (2004), mediante análise de proteína total por SDS-PAGE, verificaram elevada diversidade de bactérias diazotróficas associativas em áreas em reabilitação após mineração de bauxita, incluindo isolados que poderiam representar novas espécies. Lima et al. (2005) também puderam verificar elevada diversidade de estirpes de *Bradyrhizobium* isolados de diferentes SUT da Amazônia, obtendo vários fenótipos que diferem das espécies atualmente descritas, que podem representar novas espécies pertencentes a este gênero.

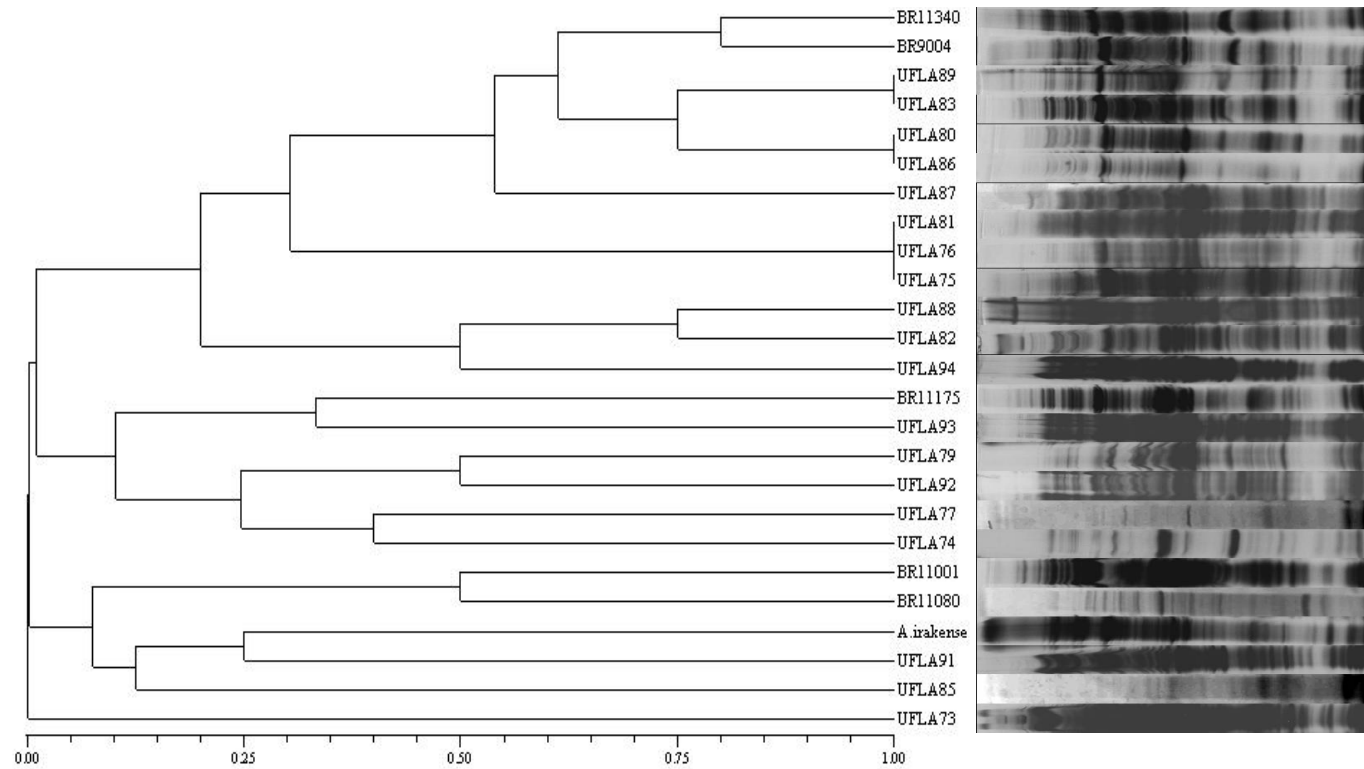


FIGURA 10 Dendrograma de similaridade construído de acordo com o perfil protéico total dos isolados oriundos dos diferentes SUT e estirpes-tipo e referência.

4.5 Atividade da nitrogenase através da redução do acetileno (ARA)

Os dados referentes à atividade da nitrogenase através da redução do acetileno (ARA) dos isolados e estirpes-tipo e referência são apresentados na Tabela 6. Dos 22 isolados, 11 apresentaram atividade da nitrogenase, sendo que em cinco destes a atividade foi baixa. Não foi possível determinar a atividade da nitrogenase do isolado UFLA78, pois este não formou o crescimento característico. Nove isolados não apresentaram atividade da nitrogenase. Esta técnica, por apresentar baixo custo e rapidez, permite verificar a presença de diazotróficos.

TABELA 6 Atividade da nitrogenase através da redução do acetileno (ARA) dos isolados oriundos de diferentes SUT na Amazônia e das estirpes-tipo. Média de três repetições.

Isolados	Meio de cultivo	Período (dias)	C ₂ H ₄ (nmol h ⁻¹ cultura ⁻¹)
UFLA73	NFb	6	161,51
UFLA74	NFb	5	0
UFLA75	NFb	3	360,10
UFLA76	Fam	5	0
UFLA77	Fam	3	0
UFLA78	Fam	na	na
UFLA79	Fam	5	0
UFLA80	Fam	5	89,45
UFLA81	Fam	10	6,01
UFLA82	Fam	5	22,76
UFLA83	Fam	5	0
UFLA84	Fam	10	0
UFLA85	Fam	10	36,63
UFLA86	Fam	10	0
UFLA87	Fam	5	0
UFLA88	Fam	10	0
UFLA89	Fam	na	na
UFLA90	LGI	10	0,90
UFLA91	LGI	10	1,54
UFLA92	LGI	10	0,30
UFLA93	LGI	10	1,62
UFLA94	LGI	6	2,23
BR11001	Fam	3	773,50
<i>A.i rakense</i>	NFb	5	144,70

*na- não avaliado.

4.6 Amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S do DNA ribossomal

Dos 22 isolados, 17 foram seqüenciados (Tabela 7). A maioria dos isolados obteve maior número de bases seqüenciadas com o oligonucleotídeo iniciador no sentido “reverse”, que amplifica a região final do gene 16S. O rDNA 16S dos isolados UFLA78, UFLA84 e UFLA86 não foi amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores utilizados. Os isolados UFLA75 e UFLA76 não obtiveram um número suficiente de bases seqüenciadas, ou seja, acima de 400 bases. Apesar de os meios utilizados favorecerem o crescimento de *Azospirillum* spp., através do sequenciamento parcial do gene do rDNA 16S não foi detectada a presença de espécies pertencentes a este gênero. Fernandes et al. (2001) utilizaram os meios JNfb e NFb para o isolamento de bactérias diazotróficas associativas de coqueiros e obtiveram a predominância de bactérias pertencentes ao gênero *Enterobacter* e *Pseudomonas* entre os isolados. Nóbrega et al. (2004) também verificaram que o meio Fam, que favorece o crescimento de *A. amazonense*, foi capaz de detectar outras espécies. Tripathi et al. (2002), utilizando o meio NFb semi-sólido contendo 3% de NaCl para avaliar a tolerância à salinidade da comunidade bacteriana na rizosfera de arroz, não detectaram a presença de *Azospirillum* spp.

Gêneros pertencentes a *Enterobacteriaceae*, com elevada similaridade, foram encontrados entre os isolados, como *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Escherichia*. Os isolados UFLA73 (*Klebsiella* sp.), UFLA79 (*Enterobacter* sp.) e UFLA92 (*K. pneumoniae*) são oriundos do SUT Roça; UFLA77 (*Enterobacter radicincitans*), do SUT Agrofloresta; e UFLA74 (*Serratia marcescens*), do SUT Floresta. Espécies de *Klebsiella* são encontradas associadas a plantas, sem causar doença (Martinez et al. 2004). Não foi possível determinar a espécie no isolado UFLA73, mas somente *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola* e *K. variicola* são capazes de fixar nitrogênio atmosférico (Martínez et al., 2004). Com respeito a *Enterobacter radicincitans*, que foi inicialmente isolada da

filosfera de trigo na Alemanha, sendo capaz de produzir fitormônios e fixar nitrogênio atmosférico (Kämpfer et al., 2005), este é o primeiro relato da ocorrência desta espécie no Brasil. O isolado UFLA74, oriundo do SUT Floresta, apresentou 97% de similaridade com *Serratia marcescens*. Esta espécie, além de patógeno humano, é um diazotrófico e tem sido encontrada em algodão, milho doce (McInroy & Kloepper, 1995), arroz (Gyaneshwar et al., 2001) e rizosfera de arroz (Tripathi et al., 2002). Tripathi et al. (2002) sugeriram que *Serratia marcescens* pode ser considerado um endofítico facultativo, pois foi encontrado na rizosfera de arroz, e também endofítico, como em trabalho realizado por Gyaneshwar et al. (2001). O isolado UFLA90 oriundo do SUT Agrofloresta apresentou 98% de similaridade com *Escherichia albertii*, uma bactéria entérica isolada inicialmente de fezes de crianças doentes em Bangladesh (Huys et al., 2003). Não existem relatos da associação destas bactérias com plantas. O isolado UFLA91 apresentou 94% de similaridade com *Pantoea agglomerans*. Esta bactéria também é entérica e apresentou baixa capacidade de reduzir acetileno neste trabalho. No entanto, mostrou atividade da nitrogenase no caule de batata doce (Asis & Adachi, 2003).

Seis isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Burkholderia* (UFLA80, UFLA82, UFLA83, UFLA87, UFLA88 e UFLA89). Destes seis isolados, quatro foram obtidos do SUT Pastagem (UFLA83, UFLA87, UFLA88 e UFLA89), um de Agrofloresta (UFLA80) e um de Capoeira Nova (UFLA82). Para o isolado UFLA80 não foi possível determinar a espécie de *Burkholderia*, mas este isolado foi capaz de reduzir o acetileno. O isolado UFLA82 apresentou 95% de similaridade com *B. cepacia*. O isolado UFLA88 apresentou elevada similaridade com *B. cepacia*, 99%. A inoculação com *B. cepacia* foi capaz de promover aumentos na produção de milho (Riggs et al., 2001) e feijão (Peix et al., 2001). A espécie é um patógeno humano oportunista, especialmente para pessoas com fibrose cística (Berg et al., 2005).

Foi detectada a presença dos genes *nifA* em dois isolados da rizosfera de milho e arroz e em dois isolados de pacientes com fibrose cística (Tabacchioni et al., 1995). Estes autores verificaram que destes quatro isolados, apenas um apresentou os genes *nifHDK*. Os isolados UFLA83, UFLA87 e UFLA89 foram similares a *B. tropica*, que foi isolada inicialmente no México, África do Sul e Brasil, e é um diazotrófico isolado de tecidos e rizosfera de gramíneas (Reis et al., 2004).

O isolado UFLA81 (Agrofloresta) foi similar a uma bactéria referida como “Uncultured bacterium clone O39”, que foi encontrada associada à cana-de-açúcar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O isolado UFLA93 do SUT Roça não apresentou similaridade com nenhuma bactéria depositada no banco de dados do GenBank. Oriundos do SUT Pastagem, os isolados UFLA85 e UFLA94 apresentaram 97% e 96% de similaridade com *Bacillus subtilis*, respectivamente.

Através do sequenciamento parcial do gene 16S rDNA, foi possível verificar uma elevada diversidade entre os isolados, com seqüências desconhecidas e que, portanto, podem representar novas espécies. O isolamento destas espécies de diazotróficos foi possível porque películas a 4 mm abaixo da superfície também foram consideradas.

TABELA 7 Sequenciamento parcial do gene 16S rDNA do isolados oriundos de diferentes SUTs na Amazônia.

Isolados	GenBank*	Nº bases sequenciadas ¹	Identidade (B.D/S.I) ²	Similaridade (%)	Nº de acesso NCBI*
UFLA73	<i>Klebsiella</i> sp. PN2	623 F	520/529	99	AB114637
UFLA74	<i>Serratia marcescens</i>	710 R	549/561	97	AY395011
UFLA77	<i>Enterobacter radicincitans</i>	673 R	598/606	98	AY563134
UFLA79	<i>Enterobacter</i> sp. CBMB30	608 F	584/610	95	AY683044
UFLA80	<i>Burkholderia</i> sp. BR3464	502 R	495/498	99	AY773194
UFLA81	Uncultured bacterium clone O39	793 R	638/653	97	AY376707
UFLA82	<i>Burkholderia cepacia</i> estirpe ATCC 29352	426 R	360/377	95	AY741361
UFLA83	<i>Burkholderia tropica</i> estirpe MTo-293	664 F	512/531	96	AY128103
UFLA85	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. spizizenii estirpe PDA	546 R	473/484	97	DQ219358
UFLA87	<i>Burkholderia tropicalis</i> estirpe Aa1	640 R	602/623	96	AY561845
UFLA88	<i>Burkholderia cepacia</i> estirpe ATCC 55792	732 F, R	533/534	99	AY741359
UFLA89	<i>Burkholderia tropica</i> estirpe MTo-672	521 R	516/517	99	AY128104
UFLA90	<i>Escherichia albertii</i>	618 R	411/419	98	AY696669
UFLA91	<i>Pantoea agglomerans</i>	648 R	526/555	94	AJ506794
UFLA92	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	623 F	520/529	98	AF511429
UFLA93	n.s.**	462. F	-	-	-
UFLA94	<i>Bacillus subtilis</i>	745 F	704/723	97	AY462217

*NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) consultado em 31/01/2006; ¹ F e R – oligonucleotídeo iniciador “forward” e “reverse”; ² B.D/S.I – Banco de dados/Seqüência dos isolados. **n.s. – não significativo com nenhuma seqüência depositada no GenBank.

5 CONCLUSÕES

A densidade entre todas as amostras e em todos os meios utilizados foi variável e relativamente baixa.

O meio Fam foi mais eficiente na detecção de diazotróficos que o meio LGI.

Nos meios LGI e Fam houve tendência de maior média de densidade no SUT Pastagem.

Os meios NFb, LGI e Fam que favorecem o desenvolvimento de *Azospirillum* spp. são versáteis para o isolamento de outros diazotróficos.

Entre os isolados obtidos, foi detectada a presença de patógenos humanos oportunistas.

Os isolados obtidos possuem seqüências ainda desconhecidas, que podem representar espécies e gêneros novos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASIS, C. A.; ADACHI, K. Isolation of diazotrophic *Pantoea agglomerans* and nondiazotrophic *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan. **Letters in Applied Microbiology**, v.38, p.19-23, 2003.

BALDANI, J. I. et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* nov. sp. a root associated nitrogen fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.36, n.1, p.86-93, Jan. 1986.

BALDANI, J. I. et al. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of *Pseudomonas rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.46, n.3, p.802-810, July 1996.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.77, n.3, p.549-579, 2005.

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

BASTIÁN, F. et al. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A₁ and A₃ by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v.24, p.7-11, 1998.

BEN DEKHILL, S. et al. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *Largomobilis* to the genus *Azospirillum largomobile* com. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 20, n.6, p.72-77, 1997.

BERG, G.; EBERL, L.; HARTMANN, A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. **Environmental Microbiology**, v.7, n.11, p.1673-1685, 2005.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.7, p. 2647-2653, July 1997.

BRASIL, M. S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do pantanal sul matogrossense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 29, p.179-190, 2005.

BURDMAN, S.; OKON, Y. JURKEVITCH, E. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. **Critical Reviews in Microbiology**, v.26, n.2, p.91-110, 2000.

BURKHOLDERIA. Disponível em: <<http://www.ncbi.nih.gov/>>. Acesso em: 31 jan. 2006

DING, L.; YOKOTA, A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Great Britain, v.54, n.6, p.2223-2230, Nov. 2004.

DILWORTH, M. J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. **Biochem. Biophys. Acta**, v.127, p.285-294, 1966.

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

ECKERT, B. et al. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Great Britain, v.51, n.1, p.17-26, Jan. 2001.

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

ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; BUSTILIOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. Burkholderia, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied And Environmental Microbiology**, Whashington, v.67, p. 2790–2798, 2001.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. M.; RODRIGUES, L. S. Bactérias diazotróficas associadas a coqueiros na região de baixada litorânea em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.12, p.1509-1517, dez. 2001.

FIDALGO, E. C. C. et al. **Levantamento do uso e cobertura da terra de seis áreas amostrais relacionadas ao projeto “Conservation and sustainable management of below-ground biodiversity: Phase 1”, Município de Benjamin Constant (AM)**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2005. Apostila.

GILLIS, M. et al. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.45, p.274-289, 1995.

GYANESHWAR, P. et al. Endophytic colonization of rice by diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.2634-2645, 2001.

HUYS, G. et al. *Escherichia albertii* sp. nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.807-810, 2003.

IM, WT. et al. *Herbaspirillum chlorophenolicum* sp. nov., a 4-chlorophenol-degrading bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Great Britain, v.54, n.3, p.851-855, May 2004.

JACKMAN, P. J. H. Bacterial taxonomy based on eletrophoretic whole-cell protein patterns. In: GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D. (Ed.). **Chemical Methods in Bacterial Systematics**. London: Academic, 1985. p.119-129.

JESUS, E. C. et al. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.8, p.769-776, Ago. 2005.

KADOURI, D.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Involvement of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. **Applied And Environmental Microbiology**, Whashington, v.69, n.6, p. 3244-3250, June 2003.

KÄMPFER, P.; RUPPEL, S.; REMUS, R. *Enterobacter radicincitans* sp. nov., a plant growth promoting species of the family *Enterobacteriaceae*. **Systematic and Applied Microbiology**, v.28, p.213-221, 2005.

KENNEDY, I. V.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKÉS, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.36, n.8, p.1229-1244, Aug. 2004.

KHAMMAS, K.M. et al. *Azospirillum irakense* sp. nov. a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research in Microbiology**, Paris, v.140, n.9, p.679-693, Nov. 1989.

KIRCHHOF, G. et al. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4 – fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Great Britain, v.51, p.157-168, 2001.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.27, p.680-685, 1970.

LANGE, A.; MOREIRA, F. M. S. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de Orchidaceae e de outras famílias vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.26, p.529-533, 2002.

LIMA, A. S.; PEREIRA, J. P. A. R.; MOREIRA, F. M. S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.11, p.1095-1104, Nov. 2005.

MAGALHÃES, F. M. et al. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v.55, n.4, p.417-430, 1983.

MAGALHÃES, F. M. M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.15, n.4, p.246-252, 1984.

MARTÍNEZ, L. et al. Diazotrophic bacteria associated with banana (*Musa* spp.). **Plant and Soil**, v.257, p.35-47, 2003.

MARTÍNEZ, J. et al. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. **International Microbiology**, v.7, p.261-268, 2004.

MATSUYAMA, T.; BHASIN, A.; HARSHEY, R. M. Mutational analysis of flagellum-independent surface spreading of *Serratia marcescens* 274 on a low-agar medium. **Journal of Bacteriology**, v.177, n.4, p.987-991, 1995.

McINROY, J. A.; KLOPPER, J. W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, v.173, p.337-343, 1995.

MELLONI, R. et al. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita, em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.28, n.1, p.85-93, 2004.

MINERDI, D. et al. Nitrogen fixation genes in a endosymbiotic *Burkholderia* strain. **Applied And Environmental Microbiology**, Whashington, v.67, n.2, p. 725-732, Feb. 2001.

MOREIRA, F. M. S.; HAUKKA, K.; YOUNG, J. P. W. Biodiversity of rhizobia isolated form a wide range of forest legumes in Brazil. **Molecular Ecology**, v.7, n.7, p.889-895, 1998.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. 626p.

MOREIRA, F. M. S.; TIEDJE, J.; MARSH, T. L. *Burkholderia* spp. Are among fast growing symbiotic diazotrophs isolated from diverse land use systems in Amazônia and from Brazilian leguminosae forest species. In: REUNIÓN LATINOAMERICANA DE RHIZOBIOLOGÍA, 21., CONGRESO NACIONAL DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO, 6., 2002, Cocoyoc. **Memorias**, Cocoyoc, México: FAO, 2002. v.1, p.45-46.

MOULIN, L. et al. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. **Nature**, v.411, p.948-950, June 2001.

- NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA LIMA, A. S. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.28, n.2, p.269-279, 2004.
- PEIX, A. et al. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.33, p.1927-1935, 2001.
- PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Review**, v.11, p.589-603, 1998.
- RADWAN, T. S. D.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. **Symbiosis**, Rehovot, v.32, p.39-54, 2002.
- RAMEY, B. E. et al. Biofilm formation in plant-microbs associations. **Current Opinion in Microbiology**, v.7, n.6, p.602-609, Dec. 2004.
- REINHOLD, B. et al. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L) Kunth). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.37, n.1, p.43-51, Jan. 1987.
- REIS, V. M. et al. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.2155-2162, 2004.
- RIGGS, P. J. et al. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p.829-836, 2001.
- SLY, L. I.; STACKEBRANDT, E. Description of *Skermanella parooensis* gen. nov., sp. nov. to accommodate *Conglomeromonas largomobilis* subsp. Parooensis following the transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.49, p.541-544, 1999.
- TABACCHIONE, S. et al. Molecular characterization of rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacia*. **Res. Microbiology**, Paris, v.146, p.531-542, 1995.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.24, p.976-980, 1978.

TAXONOMY Statistics. Disponível em: <<http://www.ncbi.nih.gov/>>. Acesso em: 07 mar. 2006

TRAN VAN, V. et al. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. **Plant and Soil**, v.218, p.273-284, 2000.

TRIPATHI, A. K.; VERMA, S. C.; RON, E. Z. Molecular characterization of salt-tolerant bacterial community in the rice rhizosphere. **Research in Microbiology**, Paris, v.153, n.9, p.579-584, Nov. 2002.

VALVERDE, A. et al. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Great Britain, v.53, n.6, p.1979-1983, Nov. 2003.

VANDAMME, P. et al. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic Applied Microbiology**, v.25, p.507-512, 2002.

WEISBURG, W. G. et al. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of bacteriology**, v.173, p.697-703, Jan. 1991.

WOESE, C. Prokaryote Systematics: Chapter 1. The Evolution of a Science. In: The prokaryotes. In: BALOWS, A. et al. (Ed.). **The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria, ecophysiology, isolation, identification, applications**. 2.ed. New York: Springer-Verlag, 1991. v.1, p.3-18.

WOOMER, A. N.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. B. Ecological indicators of native rhizobia in tropical soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 7, p. 1112-1116, July 1988.

XIE, C.; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of rice plant *Oryzae sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.1435-1438, 2005.

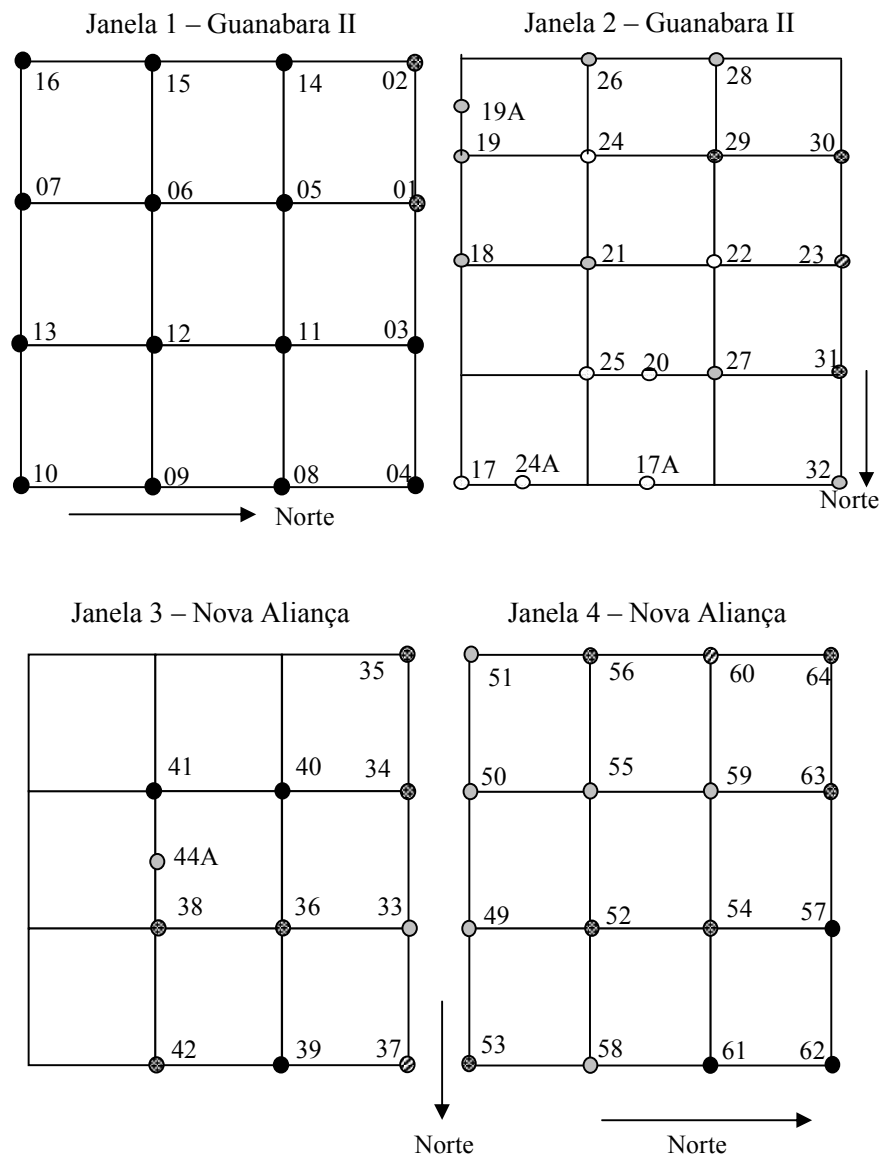
YABUUCHI, E. et al. Proposal of Burkholderia gen. nov. and transfer of seven species of the genus Pseudomonas homology group II to the new genus, with the type species Burkholderia cepacia (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, v.36, n.12, p.1251-1275, 1992.

YANO, D. M. Y. et al. **Técnicas para cultivo, identificação e preservação de bactérias**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1993. Apostila.

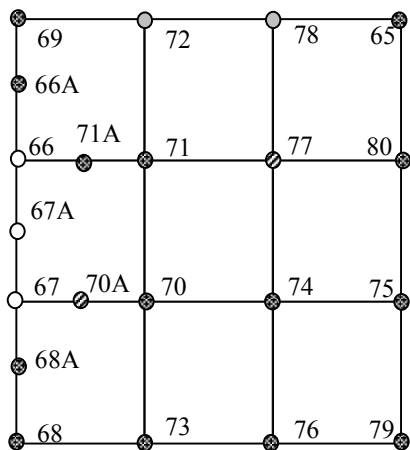
ANEXOS

ANEXO A		Página
1A	Croqui de campo das áreas amostradas.....	61
2A	Composição dos meios de cultura.....	63
3A	Protocolo para proteína total SDS-PAGE.....	67

1A Croqui de campo das áreas amostradas.

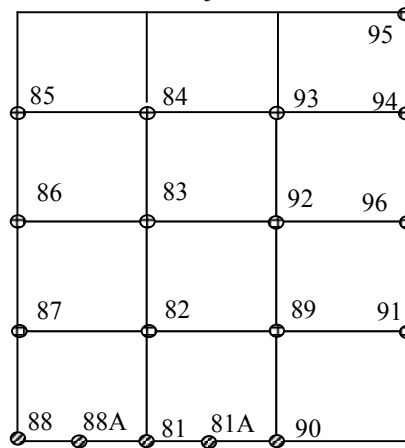


Janela 5 – Nova Aliança



Norte
←

Janela 6- Benjamin Constant



Norte
←

LEGENDA	
●	Floresta
⊘	Capoeira Velha
⊗	Capoeira Nova
○	Agrofloresta
○	Roça
⊕	Pastagem

2A Meios de cultura.

Meio de cultura NFb

- 5,0 g ácido málico
- 0,5 g K_2HPO_4
- 0,2 g $MgSO_4$
- 0,1 g NaCl
- 0,02 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
- 2 mL solução de micronutrientes^a
- 2 mL azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2N KOH)
- 4 mL FeEDTA (solução 1,64%)
- 1 mL solução de vitaminas^b
- 4,5 g de KOH

Ajustar o pH para 6,8 com KOH e completar o volume para 1000 mL com água destilada. Colocar as substâncias na ordem indicada. Para meio semi-sólido, adicionam-se 1,75 g de ágar por litro, e para meio sólido adicionam-se, 15 g de ágar por litro.

Solução de micronutrientes

- 0,04 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
 - 1,20 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
 - 1,40 g H_3BO_3
 - 1,00 g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$
 - 1,175 g $MnSO_4 \cdot H_2O$
- Completar o volume para 1000 mL com água destilada.

Solução de vitaminas

10 mg biotina

20 mg piridoxol-HCl

Dissolver em banho-maria e completar o volume para 100 mL com água destilada. Manter a solução em geladeira.

Meio de cultura LGI

5 g sacarose ou açúcar cristal

0,2 g K_2HPO_4

0,6 g KH_2PO_4

0,2 g $MgSO_4 \cdot 2H_2O$

0,02 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

0,002 g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$

5 mL azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2N KOH)

4 mL FeEDTA (solução 1,64%)

1 mL solução de vitaminas

Ajustar o pH para 6,0 a 6,2 com H_2SO_4 e completar o volume para 1000 mL com água destilada. Para meio semi-sólido, adicionar 1,75 g de ágar por litro, e para meio sólido, 15 g de ágar por litro.

Meio de cultura JNFb

5,0 g de ácido málico

0,6 g K_2HPO_4

1,8 g KH_2PO_4

0,2 g $MgSO_4 \cdot 2H_2O$

0,1 g NaCl

0,02 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

2 mL solução de micronutrientes

2 mL azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2N KOH)

4 mL FeEDTA (solução 1,64%)

1 mL solução de vitaminas

4,5 g KOH

Ajustar o pH para 5,8 com KOH e completar o volume para 1000 mL com água destilada. Adicionar 1,8 e 17 g de ágar por litro para meios semi-sólido e sólido, respectivamente.

Meio de cultura Fam

5 g sacarose

1,8 g KH_2PO_4

0,5 g K_2HPO_4

0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,02 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,1 g NaCl

4 mL FeEDTA (solução 1,64%)

1 mL solução de vitaminas

2 mL solução de micronutrientes

Ajustar o pH para 6,0 e completar o volume para 1000 mL com água destilada. Adicionar 1,8 e 17 g de ágar por litro para meios semi-sólido e sólido, respectivamente.

Meio de cultura batata

200 g batata

2,5 g ácido málico

2,5 g açúcar cristal

2 mL solução de micronutrientes

1 mL solução de vitaminas

Modo de preparar: pesar 200 g de batata inglesa, descascar, lavar e ferver durante 30 minutos. Em seguida, filtrar em funil com algodão. Misturar as quantidades de ácido málico e açúcar cristal dissolvendo-as em água destilada até 50 mL, ajustando o pH para 6,5 a 7,0 com KOH. Adicionar ao filtrado essa solução e as soluções de micronutrientes e vitaminas. Completar o volume para 1000 mL com água destilada.

Meiode cultura GNA

20 g caldo nutritivo

5 g glicose

15 g ágar

Ajustar pH para 6,8, completar para 1000 mL água destilada e adicionar 15 g de ágar.

3A Protocolo para Análise de Proteína Total por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) de bactérias Gram-negativas (protocolo utilizado do Laboratório de Microbiologia da Universidade de Gent).

EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

- 1) Multiplique a bactéria em meio adequado para o cultivo da espécie sólido, a 28°C, para verificação de pureza.
- 2) Repique colônias isoladas para meio TY sólido (pode ser ágar inclinado) duas vezes sucessivas. Inocule colônias isoladas em meio TY líquido (50 mL), a 28°C (bactérias de crescimento rápido por 48h e as de crescimento lento por 72 h.), sob agitação constante (120 rpm).
- 3) Centrifugue a 80 g X 100 por 10 min., a 4° C.
- 4) Descarte o sobrenadante
- 5) Lave as células por meio de ressuspensão do “pellet” em 30 mL de tampão NaPBS e faça uma nova centrifugação.
- 6) Descarte o sobrenadante e repita a lavagem por mais duas vezes.
- 7) Pese, para cada isolado, as células em tubos Eppendorf limpo. O peso úmido das células deve ser de 70 mg.
- 8) Adicione 0,9 mL do tampão de tratamento da amostra (STB sem SDS) e misture com misturador tipo Vórtex.
- 9) Adicione 0,1 mL de uma solução SDS 20% (dodecil sulfato de sódio) e misture com misturador do tipo Vórtex.
- 10) Aqueça a mistura a 95°C por 10-15 min, esfrie e centrifugue em uma centrífuga Eppendorf (80 g X 100 por 8 min)
- 11) Verta o sobrenadante (extrato de proteína) em dois tubos Eppendorf limpos. A parte menor, para uso diário, é armazenada a -20°C, e a parte maior, para armazenamento mais longo, a - 80°C por até três anos.

Obs.: Entre os passos 9 e 10, a suspensão bacteriana resfriada pode ser tratada por ultra-som (sonda com ponta tipo agulha - 127 mm, 4mm diâmetro), durante 5 segundos, posição “low”, máximo de 50 W.

PREPARAÇÃO GEL DE SDS-PAGE NAS PLACAS (modificado de Laemmli, 1970).

A) Preparação do gel de separação de 12%

1) Misture o seguinte em um frasco limpo.

H₂O (bidestilada) 13.4 mL

1.5M Tris-HCl, pH 8,8 (tampão do gel de separação) 10.mL

Bis-Acrilamida (solução de monômeros) 16 mL

(30% T; 2,67%C)

2) Esquente a mistura acima a aproximadamente 19°C, por aproximadamente 3 min.

3)Adicione o seguinte na mistura:

SDS 10% 0,4 mL

TEMED 20 µL

(NH₄)₂ S₂O₈ 10% (APS) 0,14 mL

(pH da solução de APS recém preparada (fresca 1 hora, no máximo) deve estar entre 5-6).

4) Misturar bem (agitando o frasco, erlenmeyer, que contém a solução do gel) e verta 28ml da solução imediatamente entre as placas de vidro. O nível de gel de separação deve ser, aproximadamente, 12,6 cm da base.

5) Colocar o conjunto submerso em banho-maria a 19° C

6) Cubra com 2ml de isobutanol saturado com água para manter uma condição de anaerobiose e obter uma superfície plana.

- 7) Deixe polimerizar no banho-maria por 1h a 20° C. Após 1 hora, descarte o isobutanol, lave a superfície do gel com bastante água bidestilada e cubra com 1,6 mL de tampão do gel de separação (diluído 1:4) contendo 0,1% de SDS.
- 8) Proceder a polimerização por 24 h (ou só durante a noite) em temperatura ambiente (a 20°C).

B - Preparação do gel de empilhamento (concentração) de 5% (pelo menos 1 hora antes de “carregar” o gel).

1) Descarte o líquido sobrenadante e lave com água bidestilada, remova o excesso do líquido virando as placas de cabeça para baixo para escoar.

2) Misture o seguinte em frasco:

H ₂ O (bidestilada)	5,7mL
0,5 M Tris HCl (pH 6.8) (tampão do gel empilhamento)	2,5mL
Bis-Acrilamida (30%T, 2.67%C) solução de monômeros	1,7 mL

3) Esquente a mistura até aproximadamente 19°C, por aproximadamente 3 min. em banho Maria.

4) Adicione o seguinte na mistura:

SDS10%	0.1mL
TEMED	10 µL
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ 10% (APS)	0,05ml

(pH da solução de APS preparada fresca deveria estar entre 5-6).

Misturar bem com um bastão de vidro.

5) Antes de colocar a solução do gel de empilhamento na superfície do gel de separação, lave a superfície com alguns mL da solução do gel de empilhamento.

6) Aplique a solução do gel de empilhamento (concentração) em cima do gel de separação polimerizado à temperatura ambiente.

7) Insira o pente entre as placas para formar de 15 ou 20 aberturas (poços).

8) Deixe polimerizar à temperatura ambiente por aproximadamente 30 min.

9) Remova o pente e preencha as aberturas (poços) com o tampão de empilhamento (1:4) contendo 0,1% de SDS. Espere 30 min.

10). Aplique as amostras de proteína extraída, após encher as aberturas (poços) com tampão de corrida preparado fresco.

ELETROFORESE DE PROTEÍNA SOLUBILIZADA COM SDS

Marque as aberturas com números desejados e aplique extrato de proteína em cada uma das aberturas (poços) usando uma micropipeta. O volume a ser aplicado é em microlitros e depende da concentração do extrato de proteína.

O volume final em cada poço é ajustado a 15 μ L (com tampão de tratamento de amostra contendo 0.001% azul de Bromofenol) (linha de corrida). No caso de um extrato de proteína muito diluído, não deve ser aplicado um maior volume. Preencha os poços com tampão de corrida.

Prenda o reservatório superior em cima das placas e remova a parte de baixo(prenda bem os parafusos).

Imergir as placas de gel na cuba cheia com tampão de corrida Tris Glicina (não mais velho que 7 dias). Ligue o banho térmico a 15°C, verifique se as mangueiras não estão dobradas.

Coloque vagarosamente tampão de corrida (tris – glicina SDS) fresco no reservatório superior e verifique se não há vazamento.

Ligue a corrente a 5,5 MA para cada placa (correspondendo a aproximadamente 18 volts) e deixe correr a corrente constante até que a linha de corrida alcance um nível de aproximadamente 9,5 cm do topo de gel de separação (comprimento total de gel de separação: aproximadamente 12,6 cm; comprimento total de gel de separação + empilhando gel / (fundo de aberturas): aproximadamente 14 cm).

Desligue a corrente e tire as placas da cuba.

Remova os grampos que seguram o gel, retire os espaçadores e insira uma espátula de plástico plana; empurre para soltar as placas de vidro. Nunca use um objeto de metal, que lascará as placas de vidro. Retire o gel de empilhando, deixe permanecer gel de separação, faça a marca de início da aplicação das amostras e coloque o gel na solução de coloração .

Após 12 horas, retire o gel da solução de coloração e coloque na solução de descoloração (revelação), troque a solução caso precise, quando as bandas eletroforéticas estiverem nítidas e o resto do gel transparente passe para a solução de fixação, e armazene sob refrigeração.

Quanto for secar o gel, se ele estiver com o tamanho adequado, coloque-o na solução secante por aproximadamente 1 hora. Em um bastidor, coloque uma folha de papel celofane umedecido em água destilada; coloque o gel e coloque outra folha de celofane, formando um sanduíche. Feche o bastidor, estique o papel e deixe secar. Caso o gel não esteja no tamanho adequado, deixe-o em água destilada por meia hora antes de colocar na solução secante.

Meios de cultura, tampões e soluções de revelação.

Meio de cultura TY		Observação
Tryptona	5g	Solução CaCl ₂ (autoclavar em frasco individual) 20g CaCl ₂ .2 H ₂ O em 100mL H ₂ O. No momento da inoculação, acrescentar 0,25mL para cada 50ml de meio de cultura (TY)
Extrato de levedura	0,75g	
KH ₂ PO ₄	0,454g	
Na ₂ HPO ₄ . 7 H ₂ O	1,79g	
H ₂ O destilada	completar para 1000mL	
pH 6,8-7,8		

Tampão de lavagem das células (NaPBS)	
Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O 0,2M	40,5ml
NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O 0,2M	9,5ml
NaCl	8,0 g
H ₂ O bidestilada	completar para 1000mL
pH 7,3	Estocar a 4°C

Tampão de tratamento da amostra (TTA)		Observação:
Mercaptoetanol	5mL	(0,75 g Tris + 50 mL de água destilada + 3,45 mL 1,72 N HCl ajuste o pH para 6,8). Depois de adicionar o mercaptoetanol + 10 mL de glicerol e ajuste para 100 mL
Glicerol	10mL	
Tris-HCL	0,75 g	
H ₂ O bidestilada	completar para 100mL	
pH 6,8	Estocar a -18° C	

A - Tampão do gel de separação		B - Tampão gel de Empilhamento	
Tris (1,5M)	18,15 g	Tris base (0,5M)	6,0 g
H ₂ O	completar para 100 mL	H ₂ O	completar para 100 mL
pH 8,8	Estocar a 4°C	pH	6,8 Estocar a 4°C

Observação:

A- Pesar o Tris e adicionar 50mL de água bidestilada + 24,2 mL de HCl 1,72 N. Elevar o pH para 8,8 e completar o volume restante com água bidestilada.

B- Pesar o Tris e adicionar 50mL de água bidestilada + 29 mL de HCl 1,72 N. Elevar o pH para 6,8 e completar o volume restante com água bidestilada.

Solução estoque de SDS (10%)		Solução estoque de APS (10%)	
10g SDS	100mL H ₂ O destilada	0,1g APS	1mL H ₂ O destilada

Gel de separação (para 1 gel)		Gel de concentração (para 1 gel)	
H ₂ O bidestilada	9,6 mL	H ₂ O bidestila	6 mL
Bis acrilamida	12,5 mL	Bis acrilamida	1,34 mL
Tris-HCl 1,5M pH:8,8	7,5 mL	Tris-HCl 1,5M pH:8,8	2,5 mL
SDS (10%)	300µL	SDS (10%)	100µL
APS (10%)	15µL	APS (10%)	50µL
TEMED	10µL	TEMED	5µL

Tampão de corrida (Tampão Tris-Glicina)

Tris	12,0 g
Glicina	57,5 g
SDS	4 g
H ₂ O bidestilada	completar para 4000 mL

pH 8,59 à 19°C. (Preparar minutos antes de começar a eletroforese)

Solução de monômeros**Observação**

Acrilamida	29,2g	Imediatamente após dissolver os compostos em água (processos endotérmico) o volume é ajustado e a solução deverá sempre permanecer gelada.
Bis-acrilamida	0,8g	
H ₂ O bidestilada	completar para 100 mL.	
Filtrar e armazenar a 4° C.		

Solução estoque de SDS (20%)

20 g de SDS e completar o volume para 100mL com água destilada.
Estocar à temperatura ambiente (Não colocar na geladeira)

Volumes de STB e SDS para a preparo do extrato de célula (1/20 diluição)

Peso de células úmidas em mg	STB (sem SDS) em mL	SDS 20% em mL
70	0,9	0,1

Revelação de proteínas totais

*Solução de coloração		*Solução fixadora	
Metanol	400mL	Metanol	450mL
Ác. acético	70mL	Ác. acético	100mL
Coomassie Blue R250	0,5 g	H ₂ O destilada	1000mL
H ₂ O destilada	1000mL		
*Solução descolorante		*Solução secante	
Metanol	400mL	Metanol	650mL
Ác. acético	70mL	Glicerol	5mL
H ₂ O destilada	1000mL	H ₂ O destilada	1000mL
