

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**POTENCIAL DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO E
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS ISOLADAS
DE SOLOS SOB CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Rosa Betânia Rodrigues de Castro

Bióloga

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**POTENCIAL DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO E
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS ISOLADAS
DE SOLOS SOB CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Rosa Betânia Rodrigues de Castro

Orientador: Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

2015

C355p Castro, Rosa Betânia Rodrigues de
Potencial de Solubilização de Fosfato e Identificação Molecular de
Bactérias Isoladas de Solos Sob Cultivo de Cana-de-açúcar / Rosa
Betânia Rodrigues de Castro. – Jaboticabal, 2015
xvi, 46 p.: il.; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientadora: Jackson Antônio Marcondes de Souza
Banca examinadora: Eduardo da Silva Martins, Janete Aparecida
Desidério
Bibliografia

1. Biotecnologia. 2. Gene *16 S rRNA*. 3. Isolados bacterianos. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 577.21

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

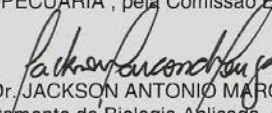
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

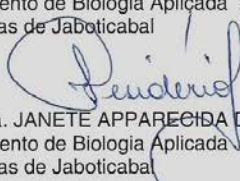
TÍTULO: "POTENCIAL DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE SOLOS SOB CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR"

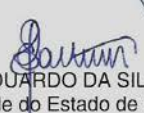
AUTORA: ROSA BETÂNIA RODRIGUES DE CASTRO

ORIENTADOR: Prof. Dr. JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA
Departamento de Biologia Aplicada À Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. JANETE APARECIDA DESIDERIO
Departamento de Biologia Aplicada À Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. EDUARDO DA SILVA MARTINS
Universidade do Estado de Minas Gerais / Frutal/MG

Data da realização: 02 de dezembro de 2015.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Rosa Betânia Rodrigues de Castro – nascida em Ituiutaba (MG), em 28 de setembro de 1966, graduada em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas pelo Instituto Superior de Ensino e Pesquisa de Ituiutaba (ISEPI) no ano de 1989. Em 2003 concluiu o curso de Especialização Lato Sensu em Gestão e Auditoria Ambiental na Fundação Educacional de Ituiutaba (FEIT). Em 2015 concluiu o curso de mestrado em Microbiologia Agropecuária na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) no Câmpus de Jaboticabal (SP).

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.

Fernando Pessoa

Dedicatória

Aos meus pais, Joana Alves Rodrigues (*in memoriam*) e Leonias Alves Rodrigues, pelos ensinamentos, exemplos de vida, criação e amor dedicados. Vocês são a minha base! Amo muito!

Ao meu esposo André, pelo companheirismo, conselhos e força nessa empreitada tão difícil! A sua ajuda foi imprescindível para que eu conseguisse concluir esse mestrado! Te amo!

Aos meus filhos, André Júnior, Eduardo e Bruna (meu anjo que não está aqui comigo, mas sei que cuida de mim, no outro plano que se encontra. Saudades eternas!), por vocês eu aprendi o que é o amor verdadeiro e a me manter de pé, frente às dores e aos percalços da vida. Obrigada por vocês existirem! Amor incondicional!

Aos meus irmãos, Célio, Júnior, Zé Luiz e Agilza muito me contenta contar com o carinho de vocês!

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida e por me guiar sempre no melhor caminho, me fazendo acreditar que as coisas acontecem no seu exato momento;

Ao Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza, por aceitar em me orientar, pelos ensinamentos transmitidos e pela oportunidade de crescimento na minha carreira profissional. Sou muita grata por ter tido a oportunidade em conhecer e trabalhar com uma pessoa tão qualificada e ao mesmo tempo tão humana!

Ao Wellington Pine Omori, pelas explicações, paciência e assistência tanto no laboratório, como na escrita. Sua ajuda foi relevante na condução desse trabalho!

Aos membros da banca do exame de qualificação: Prof. Dr. Hélio Montassier e Profa. Dra. Janete Desidério pelas observações agregadas ao trabalho;

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Eduardo da Silva Martins e Profa. Dra. Janete Desidério pelas correções e considerações, essenciais para o enriquecimento do trabalho;

À equipe do laboratório do Dr. Jackson: André, Cláudio, Valter e Wallynson, pela atenção e ajuda na condução dos experimentos;

À Osânia Ferreira, pela luta na realização desse Minter e aos preciosos conselhos durante todo o mestrado;

Ao meu diretor da escola Municipal Machado de Assis, Mário Calil e aos meus coordenadores da UEMG de Ituiutaba, Rosa Maria Guerra Diniz e Max Whendel, pela compreensão das vezes em que tive que me ausentar por conta do mestrado;

Às queridas amigas, Dilma, Lêda, Márcia Gervásio, Rosa Lacerda e Rosa Guerra, que tanto me incentivaram e me deram força. Em especial à Rosa Guerra pelo apoio e por me fazer acreditar no meu potencial!

Aos meus bolsistas do PIBID, pela torcida e incentivos sempre para comigo;

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente contribuíram com essa conquista, tão importante para mim!

SUMÁRIO

Conteúdo

RESUMO	xii
ABSTRACT	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 A expansão da cultura da cana-de-açúcar no Brasil e sua importância na geração de energia	2
2.2 A vinhaça e as questões ambientais	3
2.3 Micro-organismos e o Ciclo do Fósforo na natureza	5
2.4 Identificação molecular dos micro-organismos do solo	7
2.5 O gene <i>16 S rRNA</i> utilizado para análise em sistemática bacteriana e diversidade	8
3. OBJETIVO GERAL	9
3.1 Objetivos específicos	9
4. MATERIAL E MÉTODOS	9
4.1 Origem e análise do material coletado.....	10
4.2 Cultivo bacteriano e padronização de D.O. das culturas puras	10
4.3 Extração do DNA genômico	11
4.4 Quantificação do DNA genômico	12
4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	13
4.6 Sequenciamento dos produtos da PCR.....	14
4.7 Análises de Bioinformática	15
4.8 Teste para atividade de solubilização de fosfato	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5.1 Perfil da eletroforese após a amplificação do gene <i>16S rRNA</i> a partir do DNA genômico	17
5.2 Filogenia dos quatro isolados bacterianos baseados no gene <i>16S rRNA</i>	19
5.3 Características e Potencial dos isolados verificados em solos com manejo de vinhaça	22
5.4 Avaliação da solubilização de fosfato em meio NBRIP líquido	26

5.5 Medida do pH do meio de cultivo NBRIP líquido.....	31
6. CONCLUSÃO	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

POTENCIAL DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE SOLOS SOB CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO - A vinhaça é um subproduto resultante da fabricação do etanol e do açúcar. Existe uma enorme preocupação para os profissionais da área ambiental com relação ao seu destino final, pelo elevado grau impactante quando descartada no meio ambiente. As usinas do setor sucroenergético ultimamente vêm utilizando a adubação com vinhaça nas lavouras, graças às grandes concentrações de nutrientes presentes neste efluente.

Estudo sobre a composição e a fisiologia da microbiota de solos submetidos à irrigação de vinhaça pode ter grande importância na descoberta de produtos de interesse biotecnológico, uma vez que este resíduo aumenta a atividade microbiana nos ambientes onde é aplicado. O objetivo do referido trabalho foi realizar a caracterização molecular, através do sequenciamento do gene *16S rRNA*, a fim de identificar a filogenia de quatro isolados bacterianos obtidos de solos agrícolas de cana-de-açúcar com manejo de vinhaça, assim como avaliar a capacidade de solubilização de fosfato desses isolados em meio NBRIP e relacionar os dados obtidos com boas práticas na agricultura. O isolado LGA01-EV05 mostrou alta similaridade de sequência com *Curtobacterium albidum*, o isolado LGA02-EV08 denota similaridade com *Brevibacillus nitrificans*, os isolados LGA03-V20B e LGA04-V20G evidenciam elevado grau de similaridade entre si e com *Sinomonas soli*. Os táxons dos isolados são pertencentes aos filos Actinobactéria e Firmicutes. Com relação à avaliação do potencial bacteriano para solubilização de fosfato, os quatro isolados demonstraram eficiência em solubilizar fosfato em meio NBRIP. Entretanto, observou-se que não houve diferença estatística entre os grupos LGA02-EV08 e LGA04-V20G, sendo as melhores bactérias solubilizadoras de fosfato. Elas apresentaram um rendimento cerca de quatro vezes superior ao grupo LGA03-V20B, o pior entre os analisados.

Palavras-chave: biotecnologia, gene *16S rRNA*, isolados bacterianos

PHOSPHATE SOLUBILIZATION POTENTIAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF BACTERIA ISOLATED FROM SOIL UNDER GROWING CANE SUGAR

ABSTRACT- The stillage is a by-product of the production of ethanol and sugar. There is a huge concern for professionals in the environmental area in relation to its final destination, the high degree impactful when discarded into the environment. The plants the sugarcane industry lately have been using the fertilization with vinasse in crops thanks to large concentrations of nutrients present in this effluent.

Study on the composition of the microbiota and physiology of soils subjected to irrigation vinasse can be of great importance in finding products of biotechnological interest since this residue enhances the microbial activity in environments where it is applied. The purpose of that study was the molecular characterization, by sequencing the 16S rRNA gene in order to identify the phylogeny of four bacterial isolates obtained from sugarcane cropland with vinasse management, and assess the capacity of phosphate solubilization of these isolated amid NBRIP and relate the data with best practices in agriculture. Isolated LGA01-EV05 showed high sequence similarity to *Curtobacterium albidum*, isolated LGA02-EV08 denotes similarity to *Brevibacillus nitrificans*, the LGA03-V20B isolated and LGA04-V20G show high degree of similarity between themselves and with *Sinomonas soli*. Taxa of isolates are belonging to the phyla Firmicutes and Actinobacteria. As to the evaluation of the bacterial potential for phosphate solubilization, the four isolates were efficient in solubilizing phosphate amid NBRIP. However, it was observed that there was no statistical difference between the LGA02-EV08 and LGA04-V20G groups, with the best phosphate solubilizing bacteria. They had an income about four times the LGA03-V20B group, the worst among the analyzed.

Keywords: biotechnology, 16S rRNA gene, bacterial isolates

LISTA DE ABREVIATURAS

PCR= Reação em Cadeia da Polimerase
Pb=pares de base
Kb=kilobase
L=litros
h=horas
min=minutos
s=segundos
g= gramas
mg=miligramas
mg/L=miligramas por litro
g/L=gramas por litros
 μl = microlitros
mg/L= miligramas por litros
mg/ml= miligramas por mililitros
 $^{\circ}\text{C}$ = graus Celsius
C= carbono
N= nitrogênio
P= fósforo
KCl=cloreto de potássio
 K_2O = óxido de potássio
 H_2O =água
NBRIP=National Botanical Research Institute's Phosphate
 CaHPO_4 = fosfato de cálcio
 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ = fosfato tricálcio
 AlPO_4 = fosfato de alumínio
 FePO_4 = fosfato de ferro
 K_2HPO_4 =fosfato monoácido de potássio
 MgSO_4 =sulfato de magnésio
NaCl= cloreto de sódio
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ = sulfato de amônio
 $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$ = fosfato hidróxido de cálcio
DNA= ácido desoxirribonucléico
RNA= ácido ribonucléico
ADP= adenosina difosfato
ATP= adenosina trifosfato
pH= potencial de hidrogênio
B.O.D. = Demanda Bioquímica de Oxigênio
D.O.= densidade óptica
v/v = volume por volume
p/v = peso por volume
M = molar
mM = milimolar
 μM = micromolar
V=volts
pmol/ μL = picomol/microlitro

dNTPs=didesoxiribonucleotídeos trifosfatos

ddNTPs= dideoxinucleotídeos Trifosfatos

BR= Biomassa Ressuspendida

BS= Biomassa Seca

PS= fosfato solúvel

Pi=fosfato insolúvel

rpm=rotações por minuto

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Composição da matriz energética brasileira	3
Figura 2. Exemplo da organização estrutural básica do gene <i>16S rRNA</i> , de acordo com o modelo da <i>E. coli</i> . As regiões hiper-variáveis (V1-V9) estão representadas em cinza.....	9
Figura 3. Perfil da eletroforese em gel de agarose 0,8%(p/v) da amostra de DNA genômico obtido dos quatro isolados bacterianos. Na canaleta P foi aplicado 3,0 µl de padrão GeneRuler™ 1 kb DNA ladder (Fermentas). O DNA genômio dos quatro isolados, 1 (LGA01-EV05), 2 (LGA02-EV08), 3 (LGA03-V20B) e 4 (LGA04-V20G) está com altura maior que 10 kb.	18
Figura 4. Padrão dos amplicons <i>16S rRNA</i> obtidos através da PCR dos quatro isolados bacterianos: 1 (LGA04-V20G), 2 (LGA03-V20B), 3 (LGA02-EV08) e 4 (LGA01-EV05).....	18
Figura 5. Árvore ilustrando a classificação das Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) relacionadas aos filos Actinobacteria e Firmicutes recuperadas de EV e V. A escala mostra que a cada posição ocorrem 0,05 substituições de nucleotídeos. Os números mostrados nas conexões indicam os valores de bootstrap (percentual de 1000 repetições). Os números à frente da classificação taxonômica indicam a Sequência de acesso do banco de dados NCBI.	21
Figura 6. Avaliação do número de células dos isolados bacterianos durante o intervalo de tempo de 96 h. As D.Os. dos quatro isolados foram aferidas numa variação de 24 h. No total foram feitas quatro leituras em triplicata para cada isolado.	27
Figura 7. Reta padrão das curvas de solubilização de fosfato, evidenciando a qualidade e confiabilidade das mesmas.....	27
Figura 8. Avaliação da solubilização de fosfato dos quatro isolados bacterianos: LGA01-EV05, LGA02-EV08, LGA03-V20B e LGA04-V20G aferida no intervalo de tempo de 24 h. No total de quatro leituras.	28
Figura 9. Dosagem de fosfato precipitado por meio colorimétrico através da técnica de azul de fosfomolibdênio.	29
Figura 10. Avaliação do pH dos quatro isolados bacterianos aferida no intervalo de 24h. No total de quatro leituras.	32

1. INTRODUÇÃO

Entre os sistemas agrícolas estabelecidos, o plantio da cana-de-açúcar tem se sobressaído pela enorme expansão nos últimos tempos. Beneficiada pela crise do petróleo, a cana-de-açúcar vem sendo usada na produção do etanol combustível, denominado de combustível renovável. Do processo de produção do etanol, origina a vinhaça, um dos resíduos mais consideráveis das destilarias. O descarte incorreto ou a falta de reaproveitamento deste resíduo causa inúmeras consequências que podem ser observadas através das alterações ambientais. O que exige novas providências na gestão desse recurso no meio ambiente (SILVA et al., 2007).

No solo, a microbiota realiza os ciclos biogeoquímicos (Carbono, Nitrogênio, Fósforo, dentre outros) que influenciam diretamente na nutrição das plantas e fertilidade do solo. Dessa forma, a análise da diversidade dos micro-organismos do solo tem sido alvo de várias pesquisas, tanto para correlacioná-los com a transformação de diferentes substâncias, como para identificar a influência destes no desenvolvimento de práticas agrícolas mais adequadas e sustentáveis (KIRK et al., 2004; PEDRINHO, 2009).

Frente à biodiversidade da microbiota do solo, e devido à complexidade metabólica dos micro-organismos, em particular as bactérias, foi utilizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que garante o sequenciamento do gene *16S rRNA* ribossomal (*16S rRNA*), permitindo a identificação dos micro-organismos estudados (ACINAS et al., 2004). Tal gene possui regiões conservadas e variáveis que são utilizadas como cronômetros moleculares, permitindo estimar as distâncias filogenéticas entre as diversas populações microbianas e suas possíveis aplicações biotecnológicas (WEISBURG et al., 1991; WANG ; QIAN, 2009).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização molecular com o intuito de identificar a filogenia de quatro isolados bacterianos obtidos de solos agrícolas de cana-de-açúcar com manejo de vinhaça, através do sequenciamento do gene *16S rRNA* assim como, avaliar a capacidade de solubilização de fosfato desses isolados em meio NBRIP e relacionar os dados obtidos com boas práticas na agricultura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A expansão da cultura da cana-de-açúcar no Brasil e sua importância na geração de energia

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é considerada uma planta semi-perene, apresenta um ciclo médio de quatro anos, desde o plantio até a renovação das áreas plantadas. Sua classificação taxonômica a coloca como pertencente ao reino Metaphyta, divisão das Angiospermas, classe das Monocotiledôneas, único representante da ordem Graminales, família Poaceae e gênero *Saccharum*. Atualmente são reconhecidas seis espécies de *Saccharum*: *S. saccharumbarberi*, *S. saccharumeduli*, *S. saccharumofficinarium*, *S. saccharumrobustum*, *S. saccharumsinense* e *S. saccharumspontaneum* (MACEDO, 2012).

Própria para climas tropicais e subtropicais, a sua origem está localizada nas regiões leste da Indonésia e da Nova Guiné (DANIELS; ROACH, 1987; MACEDO, 2012). Aqui no Brasil, a cana-de-açúcar foi trazida por Martim Afonso de Souza em 1532. Inicialmente seu polo de produção foi a Zona da Mata nordestina, que se expandiu para a região sudeste, com ênfase no estado de São Paulo, que logo se transformou em uma das principais culturas do agronegócio brasileiro. A importância da cana-de-açúcar pode ser observada através das suas várias utilizações, como por exemplo, forragem para a alimentação de animais, insumo para a produção de etanol, melaço, açúcar, aguardente e rapadura. Porém, a sua maior utilização se concentra na produção do etanol combustível e açúcar (BRASIL, 2007).

O Brasil possui destaque internacional na produção qualitativa e quantitativa do açúcar e etanol e essa ascensão é observada principalmente pela busca da utilização de fontes alternativas de energia, em detrimento aos combustíveis fósseis (CONAB, 2014). Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de etanol combustível, com cerca de dez milhões de hectares cultivados de cana-de-açúcar sendo, após o petróleo, uma das principais matrizes energéticas brasileiras (Figura 1).

A estimativa de produção de etanol na safra 2015/2016 é de 27,28 bilhões de litros, alta de 4,33% em comparação com a safra 2014/2015, que foi de 26,15

bilhões. Deste montante, 10,95 bilhões de litros serão de etanol anidro (aumento de 1,78% sobre o volume do último ano) e 16,33% de etanol hidratado (crescimento de 6,10%). Este avanço da produção de etanol foi resultado da introdução dos veículos *flex-fuel* em 2003 e do rápido crescimento de sua frota, presente em 21 milhões de automóveis, mais de 60% da frota de veículos leves que circula no Brasil (ÚNICA 2015).

De acordo com as perspectivas, em 2017, o etanol hidratado continuará sendo o combustível preferencial da categoria *flex-fuel* no Brasil, representando 75,5% de consumo no mercado. Esse cenário aliado a uma conjuntura de outros fatores, como a escalada dos preços do petróleo, o fato de contribuir para a redução das emissões de gases de efeito estufa, favorecem um projeto nacional desenvolvimentista de expansão da produção de etanol combustível (EPE, 2008).

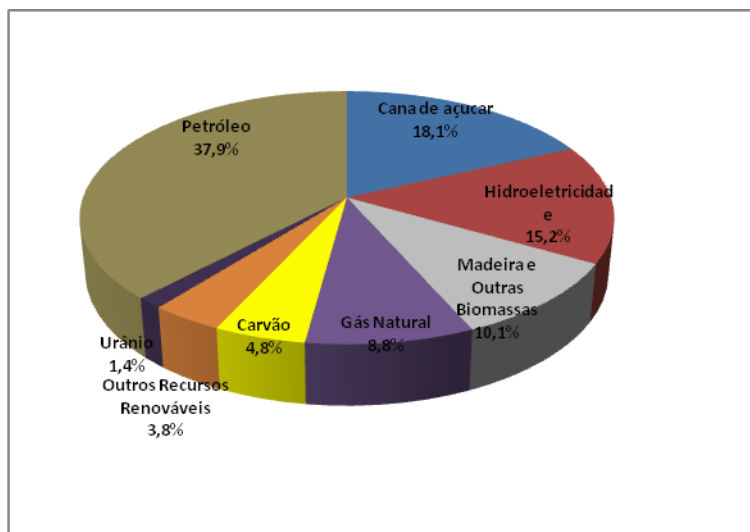


Figura 1. Composição da matriz energética brasileira (UNICA, 2015).

2.2 A vinhaça e as questões ambientais

Entre os sistemas agrícolas estabelecidos, o plantio da cana-de-açúcar tem se sobressaído pela enorme expansão nos últimos tempos. Beneficiada pela crise do petróleo, a cana-de-açúcar vem sendo usada na produção do etanol combustível, denominado de combustível renovável, suprimindo em parte os derivados do petróleo.

Do processo de produção do etanol, origina a vinhaça, um dos resíduos mais consideráveis das destilarias (SILVA et al., 2007).

A vinhaça é também conhecida como vinhoto, restilo ou calda da destilaria. Trata-se de uma substância com aproximadamente 93% de água, 7% de sólidos orgânicos (glicerol, fósforo e nitrogênio) e minerais (potássio, cálcio e magnésio). Essa composição pode apresentar variações em função de alguns fatores, tais como moagem de variedades diferentes da cana-de-açúcar, período da safra, tipos de solo, dentre outros (MARIANO et al., 2009). É o efluente com maior carga poluidora, porque apresenta elevada D.B.O. (Demanda Bioquímica de Oxigênio) variando de 20.000 a 35.000 mg/L. A quantidade de vinhaça produzida pela destilaria é resultado do teor alcoólico obtido na fermentação, de maneira, que a concentração pode oscilar entre 10 a 18 litros de vinhaça por litro de álcool produzido (LAIME et al., 2011).

Apesar de possuir características poluentes quando empregada de forma inadequada, o uso racional da vinhaça na adubação nas lavouras, propicia a melhoria da fertilidade do solo, graças às grandes concentrações de nutrientes presentes neste efluente. Adicionalmente, o destino a um uso correto impede que a vinhaça seja descartada no meio ambiente de modo desregrado, diminuindo os riscos de poluição dos mananciais (SILVA et al., 2007).

As usinas do setor sucroenergético ultimamente vêm utilizando a adubação com vinhaça nas lavouras, principalmente nas soqueiras (rebrotas da cana cortada), fornecendo todo o K_2O (óxido de potássio) e parte do nitrogênio necessário à cana (PRADO et al., 2013). Em muitos solos, é necessário complementar a vinhaça com adubos nitrogenados para garantir o suprimento de nutrientes necessário ao desenvolvimento da cana-de-açúcar.

Estudos apontam que o uso da vinhaça nos solos proporciona uma série de benefícios, como disponibilidade e fornecimento de alguns nutrientes, acréscimo do poder de retenção de água, melhoria das condições físicas, químicas e biológicas possibilitando o aumento da atividade microbiana. O crescimento da atividade microbiana se dá graças à matéria orgânica, presente na vinhaça, oferecendo energia aos micro-organismos e possibilitando o aumento e a atividade da massa microbiana sob as modificações do solo (BARROS et al., 2010). Entretanto, o

excesso de vinhaça provoca retardamento do processo de maturação da planta, levando à queda no teor de sacarose e comprometendo a qualidade final da matéria-prima. Além disso, o uso contínuo de vinhaça pode levar à contaminação do lençol freático através da lixiviação de ânions em função do excesso de potássio (ROSSETTO; DIAS, 2005; OMORI, 2014).

Apesar de os reais benefícios e prejuízos da utilização da vinhaça em diferentes solos destinados à agricultura não estarem ainda bem definidos, verifica-se na maior parte das pesquisas uma melhora do sistema radicular das plantas de cana-de-açúcar e reposição de nutrientes, como o potássio. Nesse sentido, favorece a continuidade da aplicação em níveis seguros deste efluente nos solos agricultáveis, de acordo com os valores estabelecidos pela norma P4.231, (VINHAÇA – CRITÉRIOS E PROCEDIMENTOS PARA APLICAÇÃO NO SOLO AGRÍCOLA) da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB, 2006). Outro ponto positivo que contribui para a utilização da vinhaça nos solos destinados ao plantio de cana-de-açúcar é a capacidade deste resíduo em diminuir a utilização de adubos químicos, tido como onerosos (PRADO et al., 2013).

2.3 Micro-organismos e o Ciclo do Fósforo na natureza

Os micro-organismos são essenciais para importantes funções nos mais variados ecossistemas terrestres, dentre as quais destacam a regulação de diversos processos biogeoquímicos no solo, incluindo decomposição da matéria orgânica, mineralização de nutrientes e emissão e consumo de gases (RADMAN et al., 2003; OMORI, 2014). Assim, a microbiota do solo ao realizar os ciclos biogeoquímicos como o do Carbono (C), Nitrogênio (N) e Fósforo (P), influencia na nutrição das plantas e fertilidade do solo.

Dessa forma a análise da diversidade dos micro-organismos do solo tem sido alvo de várias pesquisas no decorrer dos anos, tanto para correlacioná-los com a transformação de diferentes substâncias, como para identificar a influência destas no desenvolvimento de práticas agrícolas mais adequadas e sustentáveis (KIRK et al., 2004; COSTA et al., 2006; PEDRINHO et al., 2009).

O elemento P é essencial em sistemas biológicos, pois entra na constituição de ácidos nucleicos (DNA e RNA) e constituição de fosfolipídios das membranas celulares. O fosfato é também um constituinte de ADP e ATP, que são moléculas relacionadas aos fenômenos de armazenamento e transferência de energia nas células da maior parte dos seres vivos. Vale ressaltar que o P é o segundo nutriente essencial ao desenvolvimento vegetal, ficando atrás apenas do N (SHENOY; KALAGUDI, 2005).

No solo, o P é o nutriente de menor abundância e mobilidade, não apresentando meios de ser prontamente absorvido pelas plantas (TAKAHASHI; ANWAR, 2007). Nesse ambiente, ocorre a presença de altos níveis de fosfato total, porém, a forma de fosfato solúvel que pode ser absorvida pelas plantas ocorre em baixa frequência, sendo necessária a utilização de fertilizantes fosfatados para diminuir esta deficiência natural (GYANESHWAR et al., 2002). Devido a várias reações do P com componentes naturalmente presentes no solo, as plantas conseguem utilizar pequenas quantidades do P presente nos fertilizantes fosfatados, os quais são frequentemente aplicados em excesso. Do P total presente no adubo, uma grande porção é rapidamente convertida em complexos insolúveis, tais como fosfato de cálcio (CaHPO_4), fosfato tricálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), fosfato de alumínio (AlPO_4) e fosfato de ferro (FePO_4) (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999; TAO et al., 2008).

As pesquisas apontam que os fertilizantes químicos têm impactos negativos no meio ambiente, além de custos crescentes, que oneram a produção agrícola. A utilização de bactérias solubilizadoras de fosfato apresenta-se como uma estratégia vantajosa e sustentável para o agronegócio (GYANESHWAR et al., 2002; RODRIGUEZ et al., 2006). Esses micro-organismos melhoram a absorção do fósforo pelas plantas, graças à produção de enzimas extracelulares e aos exsudados de ácidos orgânicos, que aumentam o crescimento da planta em solos com baixos percentuais de fósforo solúvel (TRIPURA et al., 2007; BEDDINGTON, 2010).

As bactérias solubilizadoras de fosfato pertencem a um grupo amplo, que possuem a habilidade de solubilizar compostos de fosfato indisponível em formas disponíveis às plantas (KHAN et al., 2006). Entre os gêneros com essa característica, destacam-se: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* e *Erwinia*. Estes

grupos bacterianos são vitais para o ciclo biogeoquímico do P, uma vez que aumentam a disponibilidade do fósforo no solo, contribuindo assim para a manutenção da vida no planeta Terra (KAMPFER, 2002; RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999; KHAN et al., 2006).

2.4 Identificação molecular dos micro-organismos do solo

Animais e plantas são satisfatoriamente complexos nos aspectos morfológicos para que seja permitido estabelecer uma filogenia embasada nestas características. Em contrapartida, a morfologia e fisiologia dos micro-organismos e várias outras propriedades não são apropriadas o suficiente para serem usadas como marcadores filogenéticos e na maioria das vezes acabam agrupando organismos que são essencialmente distintos (PACE, 1997).

Os micro-organismos do solo têm sido alvo de várias pesquisas para a produção de produtos naturais. Graças à cultura *in vitro* desses micro-organismos, é permitido o estudo de compostos bioativos. Essas pesquisas com a microbiota do solo são divididas em dois campos: i) estudo da diversidade, englobando isolamento, identificação taxonômica e quantificação dos micro-organismos em diversos ecossistemas e ii) ação microbiológica, como eles auxiliam no equilíbrio e manutenção da atividade do solo (XU et al., 2004).

Como exemplo da atividade microbiológica que contribui para o bom funcionamento e equilíbrio dos ecossistemas, pode ser citada a ciclagem de nutrientes, mantida através da participação dos micro-organismos no processo de quebra e decomposição da matéria orgânica complementada pelos ciclos biogeoquímicos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002; NACKE et al., 2011).

De acordo com os fatores edáficos e climáticos do solo, haverá variação tanto na qualidade como na quantidade de micro-organismos, sendo que um dos grupos mais abundantes é o das bactérias (FIERER; JACKSON, 2006; CHAN et al., 2008; FAORO et al., 2010). Entretanto, esse enorme potencial de biodiversidade da microbiota do solo ainda é pouco explorado pelos microbiologistas mesmo nos

tempos atuais, em razão da utilização das técnicas convencionais de cultivo. Os ínfimos valores de micro-organismos do solo cultiváveis giram em torno de 0,1 a 1,0% (TORSVIK et al., 1990; DANIEL, 2005; SILVEIRA et al., 2006).

A partir da década de 90, a abordagem do cultivo limitou seriamente à avaliação taxonômica e filogenética como estimativa da diversidade dos micro-organismos, devido à falha de cultivo da maior parte destes pelos métodos tradicionais, o qual necessita de um refinamento (MALIK et al., 2008). Frente a isso, poderosas técnicas moleculares são colocadas em uso, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que garante a amplificação seletiva de genes como o *16S rRNA* que é crucial na exploração de comunidades bacterianas e identificação taxonômica de isolados obtidos em cultura pura nos laboratórios do mundo todo (RÖLING ; HEAD, 2005; AISLABIE et al., 2006).

2.5 O gene *16 S rRNA* utilizado para análise em sistemática bacteriana e diversidade

Ultimamente, vários estudos embasados no gene *16 S ribossomal RNA* (também denominado *16 S rDNA*) vêm sendo desenvolvidos e como resultado, os pesquisadores verificaram a elevada eficiência deste gene para a classificação filogenética de muitos grupos de bactérias(MORALES et. al., 2008).

Os RNAs ribossômicos apresentam sua classificação baseada em seu coeficiente de sedimentação quando sob centrifugação, que deriva tanto do tamanho, como da densidade da molécula, em unidades denominadas como *Svedberg* ("S"). Existem três tipos de rRNAs nos procariotos: 5S (120 nucleotídeos), 16S (1542 nucleotídeos) e 23S (2904 nucleotídeos) (GORAB, 2001).

Baseado no genoma referência de *Escherichia coli*, sabe-se que o *16S rRNA* possui aproximadamente 1.500 pares de bases (pb), variando de micro-organismo para micro-organismo. Além disso, como característica peculiar, este gene apresenta nove regiões conservadas, importantes para o desenho de oligonucleotídeos universais e nove regiões hiper-variáveis (Figura 2), que são

utilizadas como cronômetro molecular e estimativa de distâncias filogenéticas no estudo de diversas populações microbianas (NEEFS, 1990; WEISBURG et al., 1991; RÖLING ; HEAD, 2005; WANG; QIAN, 2009).



Figura 2. Exemplo da organização estrutural básica do gene *16S rRNA*, de acordo com o modelo da *E. coli*. As regiões hiper-variáveis (V1-V9) estão representadas em cinza.

3. OBJETIVO GERAL

Identificar filogeneticamente quatro isolados bacterianos obtidos de solo sob o cultivo da cana-de-açúcar e manejo de vinhaça, através do sequenciamento do gene *16S rRNA* e efetuar a caracterização para solubilização de fosfato em meio NBRIP.

3.1 Objetivos específicos

- (1) Utilizar o gene *16S rRNA* dos quatro isolados bacterianos para identificação filogenética nos bancos de dados públicos específicos;
- (2) Avaliar a ocorrência de atividade metabólica de quatro isolados bacterianos para a solubilização do fósforo em meio líquido NBRIP;
- (4) Identificar bactérias relacionadas ao ciclo do fósforo no solo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização desse trabalho foram utilizados quatro isolados bacterianos (LGA01-EV05, LGA02-EV08, LGA03-V20B e LGA04-V20G) provenientes do banco

de cepas do Laboratório de Genética Aplicada (LGA), pertencente ao Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária localizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP/FCAV, Campus de Jaboticabal. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos e Plantas (LBMP) pertencente ao Departamento de Tecnologia da UNESP/FCAV. Os protocolos, quando não especificados pelo fornecedor do kit ou reagentes, foram baseados em Sambrook e Russel (2006). Tais técnicas não oferecem risco para o meio ambiente e saúde humana, adequando-se aos padrões de biossegurança (NB-1).

4.1 Origem e análise do material coletado

As estirpes utilizadas foram isoladas a partir de amostras coletadas de dois solos distintos, identificados como Canal Mestre da Vinhaça e Solo de Plantio de Cana-de-açúcar e Adubação por Vinhaça. A coleta dos solos foi realizada conforme descrito por Omori (2011). Os solos são oriundos da área de plantio de cana-de-açúcar pertencentes à Fazenda Itaquerê de propriedade da Usina Santa Fé S.A.. Esta área está localizada no município de Nova Europa, estado de São Paulo. A coleta foi realizada em fevereiro de 2011. A análise das características físicas e químicas do solo foi realizada pelo Laboratório de Análise de Solo e Planta do Departamento de Solos e Adubos, localizado na UNESP/FCAV. O isolamento em cultura pura e manutenção em meio de cultivo dos isolados utilizado neste trabalho foram descritos por Omori (2011). Os isolados com nomenclatura EV são referentes ao solo do Canal Mestre da Vinhaça (serve para transportar a vinhaça da indústria ao campo, sob ação da gravidade) e os isolados com nomenclatura V são do solo com Plantio e Irrigação de Vinhaça.

4.2 Cultivo bacteriano e padronização de D.O. das culturas puras

Os quatro isolados bacterianos tiveram suas D.O.s de cultivo padronizadas em aproximadamente 0,800 no comprimento de onda de 600 nanômetros, após

crescimento em meio PEG (conteúdo para 1 L : 0,6 g de K_2HPO_4 , 0,2 g de $MgSO_4$, 0,1 g de NaCl, 1,0 g de Extrato de Levedura e 10,0 g de Glicose; pH 6,9) e TY (conteúdo para 1 L: 5,0 g de Triptona, 3,0 g de Extrato de Levedura e 0,87 g de NaCl; pH 7,2), entre 17- 48 h. O estoque das células crescidas nesta D.O. foi padronizado conforme identificação do período da fase logarítmica de crescimento no TY líquido. Quando cada uma das culturas bacterianas atingiu a D.O. aproximada de 0,8, 800 μ L da suspensão foi transferida para 8 tubos de estoque criogênicos contendo 200 μ L de glicerol estéril. Em seguida, foram estocados em *freezer* -80 °C, após serem congelados em nitrogênio líquido.

4.3 Extração do DNA genômico

O protocolo utilizado foi baseado nos métodos descritos por Marmur (1961), com adaptações. Foram utilizados cerca de 0,05 g de *pellets* das células microbianas. Essas células foram sedimentadas em tubos novos de 1,5 mL estéreis, sendo ressuspensas em 400 μ L de solução salina 0,85 % v/v. Posteriormente, foram acrescentados 40,0 μ L de lisozima na concentração de 20 mg/mL, agitando os tubos em vórtex. Após a agitação, foram adicionados 13,0 μ L de RNase aos tubos que foram deixados em banho-maria na temperatura de 37 °C por 2 h, com inversões a cada 30 min.

Passado o tempo, adicionou-se 35,0 μ L de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 25% (p/v), submetendo os tubos à inversão manual por 5 min. Ao preparo adicionou-se 158 μ L de Acetato de Sódio 3 M pH 5,2, invertendo os tubos manualmente durante 5 min. Logo após, colocou-se 650 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) (v/v), misturando os reagentes por inversão manual. Os tubos foram centrifugados em centrífuga Eppendorf a 20.817 x g, na temperatura de 4 °C por 15 min.

O sobrenadante foi coletado e transferido para novos tubos de 2,0 mL estéreis, acrescentado a esta fase dois volumes de etanol absoluto gelado e invertendo delicadamente os tubos manualmente para mistura. Os tubos foram deixados 20 min em -80 °C, sendo centrifugados a 20.817 x g, na temperatura de 4

°C por 30 min. O sobrenadante foi descartado adicionando-se 1,0 mL de etanol 70% gelado, centrifugando os tubos novamente a 20.817 x g, na temperatura de 4 °C por 5 min. Logo após ao descarte do sobrenadante, os tubos tiveram o excesso de etanol evaporado em Concentratorplus (Eppendorf), na opção D-AL e sem ajuste de temperatura. O DNA foi ressuspensionado em 100 µL de TE (10:1) pH 8,0 e deixado “*overnight*” na geladeira na temperatura de 4 °C.

4.4 Quantificação do DNA genômico

Foi realizada eletroforese em gel de agarose 0,8% p/v contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL), para detectar a presença e tamanho em pares de base (pb) do DNA genômico extraído em comparação a um padrão conhecido, GeneRuler™ 1 kb DNA ladder (Fermentas). Foi utilizada cuba modelo Horizon 58 com adição de tampão TBE 1X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3). No gel foram aplicados 3,0 µL de DNA e 5,0 µL de tampão de carregamento [0,025% de azul de bromofenol (p/v) e 50% de glicerol (v/v)], conduzindo a eletroforese em voltagem constante de 90 V por aproximadamente 90 min.

A imagem do gel de agarose foi documentada em um aparelho fotodocumentador (BIO RAD – GEL DOC 1000), através do software QuantityOne® (BIO RAD™, HERCULES, CA, USA). Para quantificar o DNA e avaliar a contaminação por proteína ou solução residual, foi utilizado o aparelho Nanodrop 1000 Spectrophotometer (ThermoScientific – Uniscience) onde o critério de avaliação de contaminação por proteínas ou solução residual foi baseado nos resultados obtidos pela relação dos comprimentos de onda 260/280 em relação a uma amostra negativa (branco) e, a concentração do DNA obtida em nanogramas por microlitro (ng/µL), ambos utilizando o *software* ND-1000 v3.7.1. As amostras de DNA foram estocadas em *freezer* -20 °C.

4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os DNAs genômicos extraídos dos isolados tiveram os 1,5 kb (1.500 pb) do gene *16S rRNA* amplificados por PCR para a identificação do gênero a que pertenciam.

A reação de amplificação do gene *16S rRNA* a partir do DNA genômico dos isolados LGA02-EV08 e LGA03-V20B consistiu de 2,0 µl de Tampão 10X (Invitrogen), 0,7 µl de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen), 0,4 µl de Desoxirribonucleotídeos Trifosfatos (dNTPs) 10 mM (Invitrogen), 0,2 µl da enzima Taq Polimerase (Invitrogen a 5U/µl), 1,5 µl de cada primer universal FD1 <5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'> e RD1 <5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3'> (WEISBURG et al., 1991) a 5 pmol/µL, 2,0 µl de DNA de molde a 20,0 ng/µl e 9,5 µl de água Milli-Q ultra pura filtrada e autoclavada. A reação de amplificação dos isolados LGA01-EV05 e LGA04-V20G consistiu de 2,0 µl de Tampão 10X (Invitrogen), 0,5 µl de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen), 0,4 µl de dNTPs 10 mM, 0,2 µl da enzima Taq Polimerase (Invitrogen), 1,0 µl de cada primer universal FD1 e RD1 a 5 pmol/µL, 2,0 µl de DNA molde a 20,0 ng/µl e 12,9 µl de água Milli-Q ultra pura (filtrada e autoclavada).

Após desnaturação inicial do DNA a 94°C por 5 min., o programa do termociclador (PTC-100™ ProgrammableThermalController (MJ Research, Inc.) continha os seguintes passos para amplificação dos produtos de PCR: 35 ciclos de desnaturação do DNA a 94 °C por 30 s, pareamento dos primers a 56 °C por 40 s, extensão a 72 °C por 1 min e 30 s e, após o término dos ciclos, extensão final a 72 °C por 7 min.

Os amplicons gerados foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v), contendo brometo de etídio e tampão de corrida TEB 1X em voltagem constante de 90 V por 1 h e 30 min. O gel foi fotografado em fotodocumentador para visualização das bandas do tamanho de 1,5 kb conforme descrito no item 4.5.

4.6 Sequenciamento dos produtos da PCR

Devido à qualidade da reação de PCR, os produtos dos amplicons dos quatro isolados foram sequenciados diretamente sem a necessidade de purificação e de clonagem dos fragmentos em vetor plasmidial. Para o sequenciamento dos 1,5 kb do gene *16S rRNA* dos quatro isolados, foram utilizados os primers FD1, F362, F786, F1.203 e RD1 (MENNA et al., 2006). Nesta disposição (com exceção do RD1), os primers abrangem desde o primeiro par de base do gene amplificado até os 1300 pb em média.

As reações de sequenciamento foram padronizadas para um volume final de 10,0 µl para todos os isolados. Para sequenciar o *16S rRNA* dos isolados LGA01-EV05 e LGA04-V20G utilizando os primers FD1 e RD1 (5 pmol/µl), foram utilizados 4,0 µl do tampão de sequenciamento, 1,0 µl de cada um dos primers FD1 ou RD1, 1,0 µl de enzima BigDye e 1,3 µl de DNA a 50 ng/µl. Nas reações dos primers F362, F786 e F1.203, foi utilizado 0,6 µl de cada primer a 5 pmol/µl, 4,0 µl de tampão de sequenciamento, 1,0 µl de BigDye e 1,3 ng/µl dos produtos de PCR. Para o sequenciamento do gene *16S rRNA* dos isolados LGA02-EV08 e LGA03-V20B utilizando os primers FD1, F786, F1.203 e RD1 (5 pmol/µl), foram utilizados 4,0 µl do tampão de sequenciamento, 1,0 µl de cada um dos primers, 1,0 µl de enzima Big Dye e 1,3 µl de DNA a 50 ng/µL. Na reação do primer F362, foi utilizado 4,0 µl do tampão de sequencimaneto, 1,0 µl de BigDye, 1,0 µl do primer a 5 pmol/µl e 1,3 ng/µl dos produtos de PCR. A reação foi submetida ao termociclador seguindo desnaturação inicial a 96 °C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos a 96°C por 10 segundos, 52 °C por 20 segundos e 60 °C por 4 min. Ao final da reação, o aparelho manteve temperatura constante de 10 °C até que as amostras fossem retiradas do aparelho e armazenadas em temperatura de 4 °C.

Posteriormente à reação de sequenciamento, os fragmentos de DNA foram precipitados e os Dideoxynucleotídeos Trifosfatos (ddNTPs) marcados por fluorescências não incorporados foram retirados por sucessivas lavagens. No primeiro momento foram adicionados 80,0 µl de isopropanol 75% (v/v), sendo as microplacas de 96 poços agitadas sutilmente. Logo após, as amostras foram

mantidas por 15 min. à temperatura ambiente (25 °C), sendo posteriormente centrifugadas a 3.220 x g na temperatura de 15 °C por 45 min. Após a centrifugação foi descartado o sobrenadante e as microplacas foram mantidas por 5 min. invertidas em papel toalha absorvente. Aos poços das microplacas, foram adicionados 180 µL de etanol 70% (v/v) gelado, seguindo para centrifugação a 3.220 x g na temperatura de 20 °C por 5 min.. Esta última operação foi feita por mais duas vezes e as amostras foram secas em fluxo laminar por 1 h.

Em seguida, as amostras foram ressuspensas com 9,0 µL Hi-Di Formamide-Catálogo-P/N 4311320 (ABI Prism) e desnaturadas a 95 °C por 5 min. O sequenciamento dos amplicons foi realizado no sequenciador capilar modelo ABI 3100-Perkin Elmer.

4.7 Análises de Bioinformática

Os eletroferogramas gerados pelo sequenciador capilar foram avaliados quanto à qualidade (Phred $\geq$ 20). O gene 16S *rRNA* foi montado nos seus aproximadamente 1,5 kb pelo pacote de programas *Phred/Phrap/Consed* (GORDON et al., 1998).

Após a montagem dos *contigs* do 16S *rRNA*, as sequências foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos contra os bancos de dados que possuem outras sequências conhecidas depositadas: (i) o GenBank, acessado através do *site* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) utilizando a ferramenta *nucleotide BLAST* (BLASTn) e (ii) *Ribosomal Database Project* (RDP II), utilizando confiabilidade de 95% e a ferramenta *Seqmatch*.

Com o objetivo de verificar se as informações obtidas com a comparação das quatro sequências dos isolados (*query*) com os dados contidos nos bancos de dados (*subject*) foi realizada a construção de um dendrograma. A seleção das sequências de comparação foi realizada tendo como parâmetro a escolha de sequências que apresentassem as maiores similaridades ($\geq$ 97% no BLASTn e score próximo a 1,0 no *Seqmatch*).

Para o alinhamento e tratamento das sequências brutas, utilizou-se o programa BioEdit v.7.0.5.3, disponível para *download* em <http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/BioEdit.shtml>. As sequências editadas foram submetidas ao programa MEGA 6 para a construção da árvore filogenética utilizando o método de Máxima Verossimilhança com *Bootstrap* para 1.000 réplicas. Este software está disponível em: <http://www.megasoftware.net/> (TAMURA *et al.*, 2011).

4.8 Teste para atividade de solubilização de fosfato

Após a padronização da D.O. dos quatro isolados (item 4.2), todos foram testados para atividade de solubilização de fosfato em National Botanical Research Institute's Phosphate (meio NBRIP), (composição para 1L: 10,0 g de Glicose, 5,0 g de $MgCl_2 \times 6H_2O$, 0,25 g de $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0,20 g de KCl, 0,10 g de $(NH_4)_2SO_4$ e 20 ml de $Ca_5(OH)(PO_4)_3$; pH 7,0). A concentração de Fosfato nestas condições era de 2 mg/ml.

As células congeladas em freezer $-80^\circ C$ foram descongeladas sob gelo. Para o *start* dos isolados, foram inoculados 100 μl (D.O. 0,8) de suspensão bacteriana em 50 ml de meio TY estéril. Após 17-48 h de crescimento, aproximadamente 5 ml de suspensão foi transferida para 50 ml de meio NBRIP estéril para a realização do pré-inóculo (fase de adaptação) por aproximadamente 24 h. Transcorrido às 24 h, inoculou-se aproximadamente a D.O. de 0,1 em 5 erlenmeyers contendo 50 ml de meio NBRIP estéril para cada uma das quatro bactérias. O primeiro erlenmeyer teve a D.O. aferida a cada 2 h (total de cinco leituras no dia) e o restante dos erlenmeyers tiveram as D.O.s aferidas após 24 h, 48 h, 72 h e 96 h do inóculo. O branco neste caso foi o meio NBRIP estéril e as leituras foram feitas em triplicata.

Além disto, também foi medido a D.O. de células ressuspensas em H_2O milli-Q estéril. Para isso, 1 ml do cultivo de cada tempo em triplicata (com exceção do primeiro dia) foi reservado em microtubos de 1,5 ml estéreis, sendo centrifugados a $10.600 \times g$, por 2 min a $25^\circ C$. O pellet foi lavado duas vezes em H_2O milli-Q estéril. Após ressuspensão em H_2O milli-Q, foi dado o branco no biofotômetro com

H₂O milli-Q e foi realizada a leitura de Biomassa Ressuspendida (BR) para todos os tempos. Para aferir o peso de Biomassa Seca (BS) e quantificar a presença de fosfato solúvel (PS) e fosfato insolúvel (Pi) no meio, após 15 min de precipitação de particulados insolúveis a temperatura ambiente, foi realizada uma centrifugação a baixa rotação de 420,0 x g, 2 min a 25 °C. O sobrenadante foi coletado em triplicata e reservado, bem como o precipitado. A partir de uma solução de K₂HPO₄ a 500 µM, foi construída uma curva padrão usando diferentes concentrações de fosfato solúvel (TAUSSKY ; SHORR, 1953). Após a construção da equação da reta (R^2 0.9998), os valores de D.O. medidos para cada tempo de crescimento em NBRIP foram utilizados para o cálculo das concentrações de fosfato solubilizado pelas bactérias a partir da amostra PS, onde foi usado D.O. de 700 nm e o branco utilizado foi descrito por Taussky ; Shorr(1953). Para Pi, foi dado o branco no biofotômetro usando os sais do meio NBRIP com leitura na D.O. de 600 nm.

A quantificação do Pi, foi feita também através da técnica de azul de fosfomolibdênio de acordo com Chen et al. (2006). O meio ao qual os isolados foram submetidos para esta técnica, foi o NBRIP líquido, conforme descrição acima supracitada. As alíquotas (1 ml) foram centrifugadas a 420,0 x g por 5 min. Em um erlenmeyer, foram adicionados 450 µl de água Milli-Q, 250 µl do sobrenadante, 50 µl do meio NBRIP, 500 µl do reagente 1 (íons molibdato em solução sulfúrica) e 500µl do reagente 2 (ácido ascórbico e pequena quantidade de antimônio).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Perfil da eletroforese após a amplificação do gene 16S rRNA a partir do DNA genômico

A Figura 3 representa a foto do DNA genômico em duplicata dos quatro isolados bacterianos LGA01-EV05, LGA-02-EV08, LGA03-V20B e LGA04-V20G. Nota-se um perfil que demonstra a qualidade satisfatória dos mesmos, considerando o aparecimento de uma banda de alto peso molecular no topo de gel. A qualidade e

pureza das amostras de DNA genômico são fundamentais para os processos subsequentes de experimentação, particularmente a obtenção de um amplicon *16S rRNA* com eficiência e especificidade a partir da PCR (Figura 4). Este amplicon aparece próximo a banda de 1,5 Kb do marcador, referenciando o tamanho esperado do amplicon *16S rRNA*.

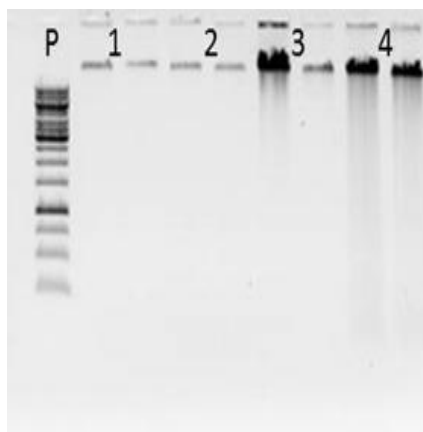


Figura 3. Perfil da eletroforese em gel de agarose 0,8%(p/v) da amostra de DNA genômico obtido dos quatro isolados bacterianos. Na canaleta P foi aplicado 3,0 µl de padrão GeneRuler™ 1 kb DNA ladder (Fermentas). O DNA genômico dos quatro isolados, 1 (LGA01-EV05), 2 (LGA02-EV08), 3 (LGA03-V20B) e 4 (LGA04-V20G) está com altura maior que 10 kb.

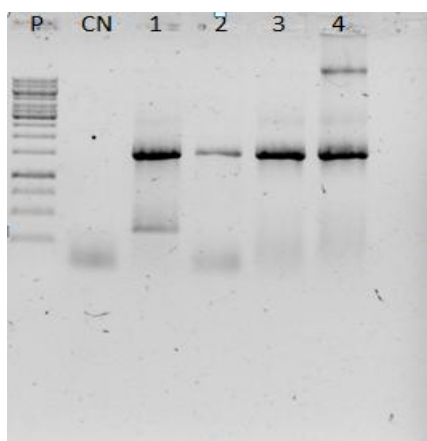


Figura 4. Padrão dos amplicons *16S rRNA* obtidos através da PCR dos quatro isolados bacterianos: 1 (LGA04-V20G), 2 (LGA03-V20B), 3 (LGA02-EV08) e 4 (LGA01-EV05).

5.2 Filogenia dos quatro isolados bacterianos baseados no gene 16S rRNA

O agrupamento das análises dos quatro isolados bacterianos LGA01-EV05, LGA02-EV08, LGA03-V20B e LGA04-V20G, baseadas nas sequências do gene 16S rRNA, permitiu o agrupamento coerente entre os gêneros distribuídos no dendrograma (Figura 5). Os isolados deste estudo agruparam em três diferentes ramos da árvore, sendo que LGA01-EV05 aparece no ramo Microcobacteriaceae, LGA03-V20B e LGA04-V20G no ramo pertencente a Micrococcaceae, ambos do filo Actinobacteria, e LGA02-EV08 isolado dos demais dentro do filo Firmicutes.

De acordo com Nunes (2006) o maior percentual de espécies bacterianas identificadas está principalmente nos filos Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria, os quais podem corresponder por mais de 90% das espécies conhecidas. Em contrapartida, há filos bacterianos com exemplares inusitados e com poucos representantes.

Vale mencionar que mudanças na frequência de aparecimento nos grupos de micro-organismos identificados podem ser verificadas no decorrer do ano, e são provocadas por divergências em fatores abióticos do solo como temperatura, umidade e pH (BOSSIO et al., 1998). Inclusive, há indícios de que a aplicação de vinhaça favorece para a predominância de certos táxons bacterianos nos solos sob cultivo de cana-de-açúcar, como os caracterizados nesse trabalho (OMORI, 2014). O clima tropical típico do Brasil está submetido a muitas alterações climáticas ao longo do ano e assim, pode intervir na composição da comunidade bacteriana em certas épocas (VAL-MORAES, 2008). Adicionalmente, as práticas agrícolas adotadas podem provocar mudanças nas características do solo, agindo de forma direta na comunidade microbiana, sendo que esta deve adequar a tais alterações da composição, fator este imprescindível para a manutenção de uma comunidade no ecossistema (BERNARDES; SANTOS, 2006).

O isolado LGA01-EV05 mostrou alta similaridade com 98% de sequência de nucleotídeos com *Curtobacterium albidum* (AB046363), o isolado LGA02-EV08 denota 97% de similaridade com *Brevibacillus nitrificans* (AB507254), os isolados LGA03-V20B e LGA04-V20G evidenciam elevado grau de similaridade entre si e 98% com *Sinomonas soli* (HQ605707).

Na avaliação da diversidade de micro-organismos é adotado o conceito de Operational Taxonomic Units (OTU), ou Unidade Taxonômica Operacional, ou ainda Filotipos (NUBEL et al., 1999; STACH et al., 2003). Tais unidades taxonômicas podem reportar-se a qualquer nível taxonômico, necessitando de definição clara dos seus limites. Por exemplo, similaridade maior ou igual a 97% em um alinhamento de fragmentos do gene *16S rRNA*, é um valor geralmente usado como uma aproximação para espécies, identidade maior ou igual a 95%, como uma aproximação para gênero e maior ou igual a 80% como uma aproximação para filo (BORNEMAM; TRIPLET, 1997; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005). Conforme Stach et al. (2003) o emprego de OTU é propício para verificar riqueza relativa quando sequências do gene *16S rRNA* são comparadas conforme a mesma região no gene.

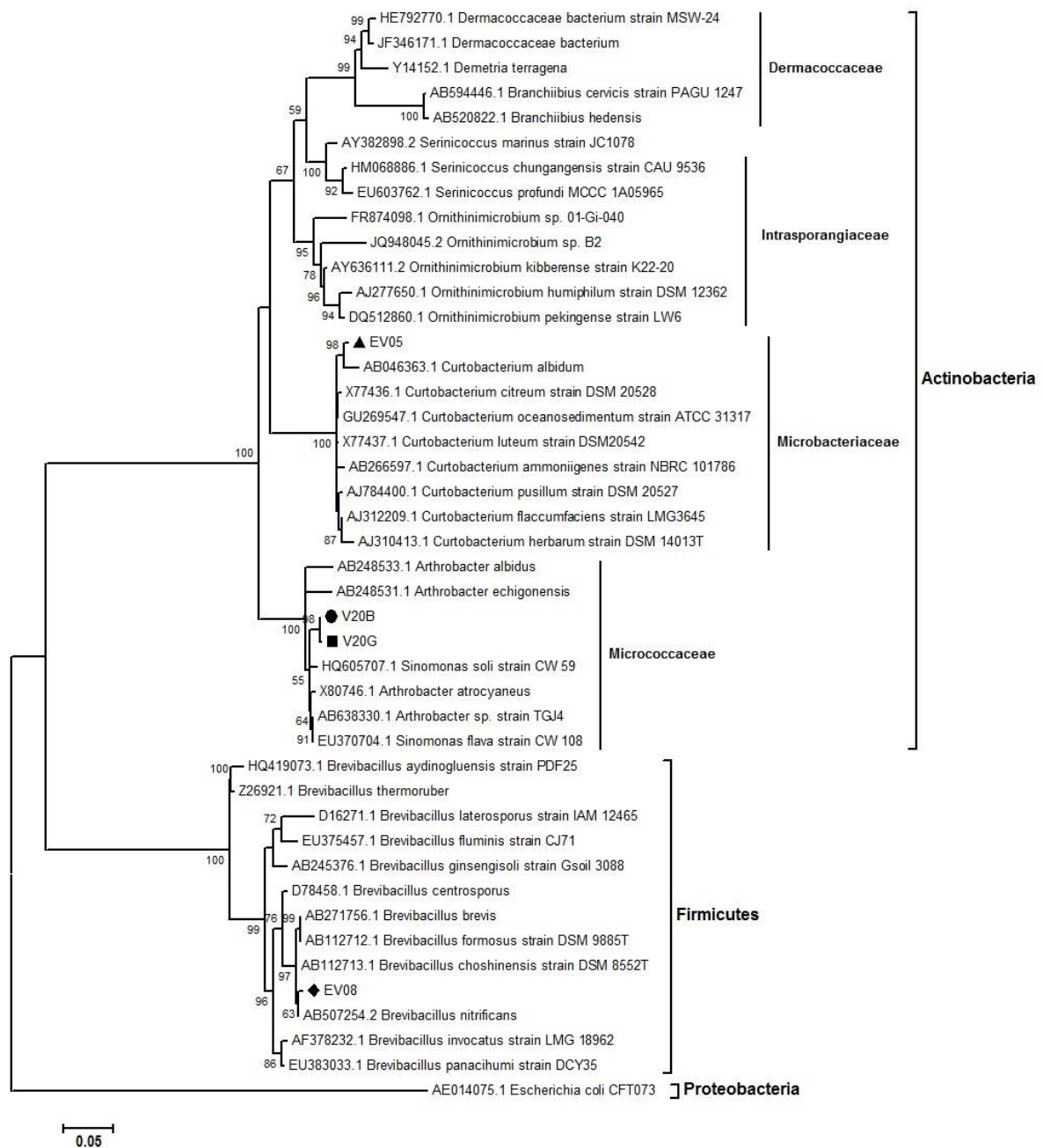


Figura 5. Árvore ilustrando a classificação das Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) relacionadas aos filos Actinobacteria e Firmicutes recuperadas de EV e V. A escala mostra que a cada posição ocorrem 0,05 substituições de nucleotídeos. Os números mostrados nas conexões indicam os valores de bootstrap (percentual de 1000 repetições). Os números à frente da classificação taxonômica indicam a Sequência de acesso do banco de dados NCBI.

Para a construção da árvore, conforme descrito no item 4.7 foi utilizado o método da máxima verossimilhança. A abordagem empregada por este método é

especialmente aprimorada e alguns estudos indicam que ele pode recuperar a árvore correta com maior frequência que outros métodos de construção de árvores filogenéticas (GUINDON; GASCUEL, 2006).

5.3 Características e Potencial dos isolados verificados em solos com manejo de vinhaça

As bactérias podem apresentar vários efeitos no crescimento da planta hospedeira (KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004). A título de exemplo, podem ser utilizadas como biofertilizantes, elevando a produtividade da cultura através de uma associação de mecanismos que podem contribuir para produção de fitormônios, fixação biológica de nitrogênio, acréscimo da disponibilidade de nutrientes do solo e controle de doenças (COCKING, 2003). Paradoxalmente, os agroquímicos usados com incidência nos sistemas de produção agrícola acarretam muitos impactos nos ecossistemas, provocando o mecanismo de seleção natural de linhagens de micro-organismos resistentes e dificultando assim o controle de doenças (COLLADO et al., 2007). O controle de patógenos presentes no solo abarca várias dificuldades. Entretanto, o controle biológico é documentado como uma técnica de grande sucesso, além de ser menos prejudicial aos ecossistemas (JOHN et al., 2010; HOOPEN et al., 2012).

É provável que os micro-organismos caracterizados neste trabalho tenham eventual potencial para serem utilizados em favor de um equilíbrio natural nos ecossistemas.

As Actinobactérias são procariotos Gram positivos que possuem grande concentração de guanina e citosina (G + C) em seu DNA, podendo compor cerca de 70% do total de bases nucleotídicas (GÃO; PARAMANATHAN; GUPTA, 2006; MIÃO; DAVIES, 2010; RODRIGUES, 2006). Sua distribuição ocorre principalmente no solo, mas podem ser encontradas também na água e em outros locais. Tais micro-organismos são aeróbios estritos, possuem filamentos micelianos, semelhantes às hifas dos fungos e são conhecidas no mundo todo pela produção de antibióticos e pela capacidade de estabelecer uma relação de colonização com a

rizosfera da planta hospedeira (PADILHA, 1998; UJIKAWA, 2003; HOSTER et al., 2005). Outro papel importante das Actinobactérias é a liberação de enzimas extracelulares, como as de atividade celulolítica que atuam sobre a degradação de certos componentes da parede celulósica dos vegetais e de metabólitos secundários, que agem direta e/ou indiretamente na promoção do crescimento da planta (MERZAEVA; SHIROKIKH, 2006; SOUSA et al., 2009).

Esses dados sobre a importância ecológica das Actinobactérias foram comprovados por Bulgari et al. (2011) ao relatarem que, algumas bactérias do gênero *Curtobacterium* são utilizadas como controle biológico, promovendo o mecanismo de resistência sistêmica induzida (ISR), contra possíveis patógenos, observado em cultivares de pepinos (*Cucumis sativus*). Nessa mesma linha de pesquisa, Reiter et al. (2002) comprovaram que o desenvolvimento da doença provocada por *Erwinia carotovora*, uma bactéria patogênica que ataca a raiz da cenoura (*Daucus carota*), pode ser inibido por inoculação do gênero em questão. Há também estudos comprobatórios que detalham que estirpes pertencentes ao gênero *Curtobacterium* podem auxiliar na absorção de Níquel (Ni) em solos com esse elemento. O Ni é um micronutriente catiônico está associado às rochas ígneas e é um dos elementos mais recentemente identificado como essencial para as plantas (IDRIS et al., 2004). Dentre as funções desse metal para os vegetais, destacam-se a atuação no metabolismo do nitrogênio, acréscimo da atividade da urease foliar, contribuição para o crescimento, metabolismo, envelhecimento e absorção de Ferro (Fe), aumento do mecanismo de resistência das plantas à doenças.

Segundo Tsavkelova et al.(2007) além da produção em tecidos da planta, a síntese de ácido indolacético (AIA) é disseminada entre bactérias associadas às plantas. Neste contexto, bactérias endofíticas e epifíticas do gênero *Curtobacterium* spp, podem favorecer o crescimento vegetal.

Curtobacterium são muito bem adaptados à sobrevivência nos mais variados habitats, inclusive em ambientes aonde as condições são desfavoráveis (da SILVA et al., 2013).

De acordo com os estudos de Moreira e Siqueira (2006) *Sinomonas* spp. são numerosas no meio, extremamente versáteis com relação à nutrição, degradam pesticidas, herbicidas e outras moléculas sintéticas.

As Firmicutes são na maioria bactérias Gram-positivas com pequena quantidade de guanina e citosina (G + C). Os gêneros *Bacillus* e *Clostridium* são os que possuem maior representatividade nesse filo. Estes organismos podem ser de um modo geral classificados com relação à taxa de guanina e citosina no DNA. Em uma pesquisa realizada por Jansen (2006) foi analisada 32 bibliotecas feitas a partir da amplificação de genes *16S rRNA* de amostras de solo coletadas em diferentes países. O filo Firmicutes apresentava, em média, apenas 2% do total da composição das bibliotecas analisadas, sendo os dois gêneros acima supracitados que possuíam maior número de representantes. Essa pequena abundância de membros desse filo é apresentada por outros estudos de avaliação de diversidade bacteriana de solos. Como o trabalho realizado por Youssef e Elshaned (2009) que ao avaliarem cinco grandes bibliotecas de clones puderam observar tanto a abundância dos membros dos filos mais representativos, quanto à diversidade dos mesmos. Esses autores verificaram a pequena quantidade dos membros do filo Firmicutes nas amostras, mas em compensação, era o filo que possuía maior diversidade de micro-organismos.

Vale salientar que, a pequena quantidade dos membros do filo Firmicutes nas bibliotecas montadas a partir da amplificação do gene *16S rRNA* acontece pela dificuldade em lisar células vegetativas e esporos (YOUSSEF; ELSHANED, 2009; JANSSEN, 2006). Essa característica, de formar esporos, está presente em muitos representantes dos seus gêneros, o que possibilita resistência às condições adversas (da SILVA et al., 2013). Vreeland et al.(2000) obtiveram o isolamento de esporos em representantes do filo Firmicutes em amostras de cristais de cloreto de sódio (NaCl) datadas do período Permiano, com aproximadamente 250 milhões de anos. Esses relatos corroboram sobre a enorme resistência desses esporos.

Já foi demonstrado que cada espécie faz uso de recursos distintos e ocupam nichos diferentes na comunidade, logo, as comunidades mais diversificadas possuem uma maior contribuição ao ecossistema (GIOVANNONI, 2004; BELL et al., 2005). Essa mesma ideia pode ser generalizada para linhagens com maior diversidade, como é o caso dos membros do filo Firmicutes e realça a importância do grupo para a manutenção das comunidades da microbiota do solo.

Nesse contexto, os representantes desse filo são pouco identificados em análises feitas com o uso de técnicas moleculares avançadas, isso demonstra a necessidade de isolamento e identificação de novas amostras (JANSSEN, 2006; ZHANG; XU, 2008).

Pelas razões explícitas é fundamental uma ampliação de pesquisas de caracterização de integrantes do filo Firmicutes para expandir o conhecimento essencial desses micro-organismos e o número de sequências depositadas em bancos de dados para que estes viabilizem mais dados para outras pesquisas de descrição filogenética das comunidades microbianas.

Em outros estudos foi comprovada a capacidade de biorremediação de solos utilizando espécies do gênero *Brevibacillus*, que foram eficientes na neutralização de metais tóxicos (RUIZ-LOZANO; AZCÓN, 2011). Esses dados são concordantes com Singh et al. (2012) que avaliaram, a partir de solos contaminados com malation, inseticida organofosforado amplamente utilizado no Brasil, um alto percentual de aproximadamente 72,20% de degradação por *Brevibacillus* sp.

Em razão dessa característica, o potencial deste gênero para biorremediação de solos por óleos ou por agrotóxicos está sendo amplamente investigado. Da Silva et al. (2013) demonstram a importância de muitos representantes desse filo, serem fixadores de nitrogênio, solubilizadores de fostato, ou produtores de auxinas, responsáveis pelo crescimento das plantas.

Os resultados de classificação taxonômica deste trabalho estão de acordo com Dini-Andreote et al. (2010) que ao realizarem caracterização molecular de isolados bacterianos de solos oriundos de plantação de cana-de-açúcar da região de Piracicaba, estado de São Paulo, constataram que os filos predominantes foram: Proteobactéria, Actinobacteria, Firmicutes e Acidobacteria. De forma similar Omori (2014) ao propor um estudo sobre a classificação taxonômica de isolados bacterianos de solos sob cultivo de cana-de-açúcar com manejo de vinhaça de uma região de Nova Europa, estado de São Paulo, verificou onze filos diferentes e dentre estes Actinobactérias, foi um dos filos de maior representatividade. O filo Firmicutes também foi caracterizado no referido trabalho com uma considerável percentual. Esses dados se enquadram com os resultados obtidos neste trabalho.

Esse tipo de estudo amplia as possibilidades da microbiologia clássica na identificação de novos micro-organismos, contribuindo assim com a alimentação dos bancos de dados do mundo todo, além de explorar as rotas metabólicas dos mesmos, de maneira a garantir a sustentabilidade e o funcionamento dos ecossistemas terrestres.

Pesquisas futuras através de outros testes bioquímicos, além da solubilização de fosfato são sugeridas entre os quatro isolados utilizados no presente trabalho, para avaliar a atividade metabólica dos mesmos com a finalidade de validar e/ou descobrir produtos de interesse biotecnológico, de maneira a contribuir para práticas agrícolas mais adequadas e sustentáveis.

5.4 Avaliação da solubilização de fosfato em meio NBRIP líquido

Foram realizadas curvas de crescimento para os isolados em meio NBRIP, para estabelecer o comportamento metabólico e determinar o potencial dos mesmos para solubilização de fosfato nos ensaios bioquímicos (Figura 6). Ao longo do crescimento bacteriano em meio de cultura líquido, as bactérias mostram uma curva de crescimento padrão, quando este é determinado como o logarítmo do número de bactérias num intervalo de tempo, constituída de quatro fases diferentes: fase lag, fase log, fase estacionária e fase de declínio (KONEMAN et al., 2001). A partir destes dados constatou-se que os isolados LGA02-EV08 e LGA04-V20G apresentaram um menor índice de crescimento, porém, foram as bactérias que demonstraram melhores taxas de solubilização de fosfato.

Foi construída também uma curva padrão usando diferentes concentrações de fosfato solúvel. Após a construção da equação da reta, os valores de D.O. medidos para cada tempo de crescimento em NBRIP foram utilizados para o cálculo das concentrações de fosfato solubilizado (Figura 7).

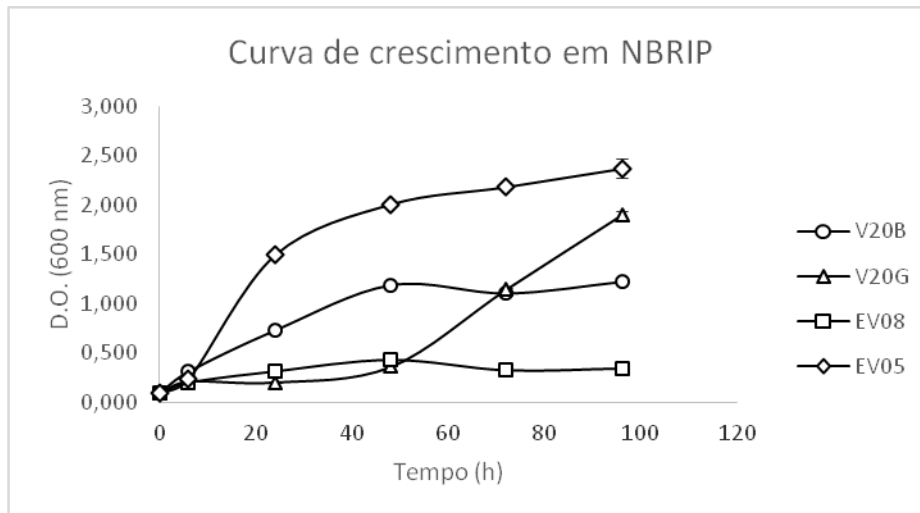


Figura 6. Avaliação do número de células dos isolados bacterianos durante o intervalo de tempo de 96 h. As D.Os. dos quatro isolados foram aferidas numa variação de 24 h. No total foram feitas quatro leituras em triplicata para cada isolado.

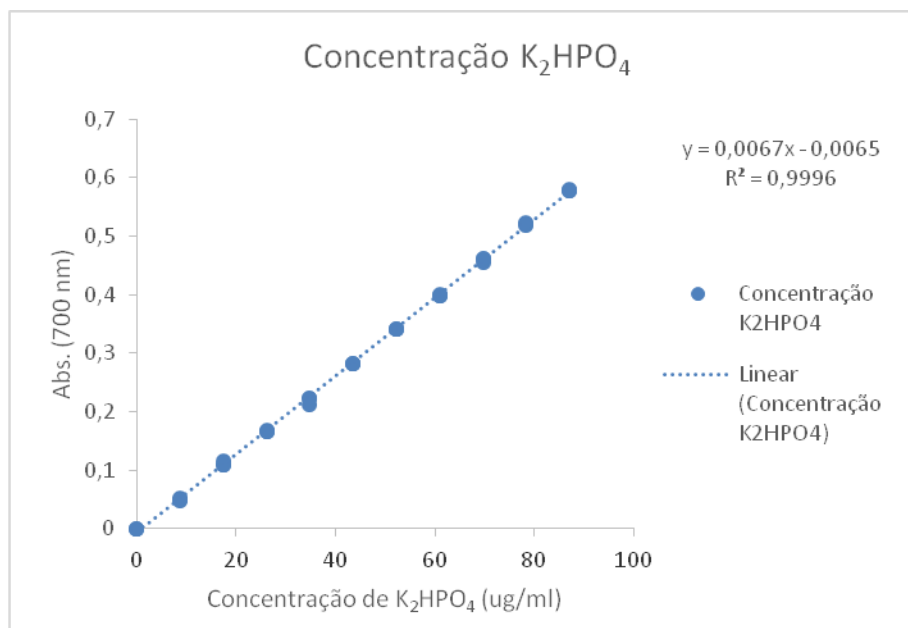


Figura 7. Reta padrão das curvas de solubilização de fosfato, evidenciando a qualidade e confiabilidade das mesmas.

A avaliação do potencial bacteriano para solubilização de fosfato foi realizada por meio de ensaio bioquímico em meio NBRIP contendo fosfato particulado

insolúvel. Os quatro isolados bacterianos demonstraram boas taxas de solubilização (Figura 8). Foram feitas análises estatísticas dos dados da solução padrão de K_2HPO_4 usada como parâmetro para descobrir a concentração de fósforo solubilizada no meio NBRIP pelas bactérias (Quadro 1). Observou-se que não houve diferença estatística entre os grupos LGA02-EV08 e LGA04-V20G, sendo as melhores bactérias solubilizadoras de fosfato. Elas apresentaram um rendimento cerca de quatro vezes superior ao grupo LGA03-V20B, o pior entre os analisados.

Houve diferença entre a LGA03-V20B e todos os grupos, em todos os tempos, com exceção dos tempos 48 h e 96 h comparado com o LGA01-EV05. Já o LGA01-EV05 teve diferença entre os grupos LGA02-EV08 e LGA04-V20G nos tempos 48 h e 96 h. A estatística usada foi two-way ANOVA com pós-test de Bonferroni. Foram consideradas diferenças significativas para $p < 0,01$.

A dosagem de fosfato solubilizado foi determinada também pelo método colorimétrico (Figura 9). Os componentes ácidos presentes nos reagentes 1 e 2 (conforme descrito no item 4.8) ocasionam a formação e redução do ácido fosfomolibdico. O máximo de absorção do azul de fosfomolibdênio formado na presença de antimônio ocorre no comprimento de 880 nm.

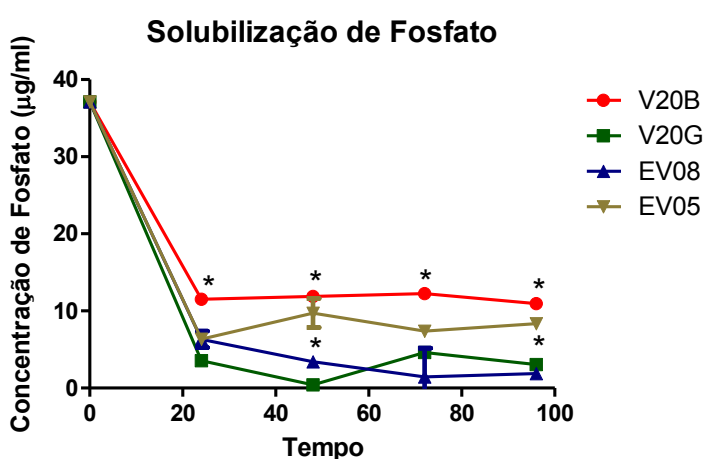


Figura 8. Avaliação da solubilização de fosfato dos quatro isolados bacterianos: LGA01-EV05, LGA02-EV08, LGA03-V20B e LGA04-V20G aferida no intervalo de tempo de 24 h. No total de quatro leituras.

Quadro 1. Análises estatísticas da concentração de fósforo solubilizada no meio NBRIP pelos quatros isolados bacterianos

	Tempo	Média	Desvio
NBRIP inóculo V20B	0	37,120	0,000
	24	11,50 ^a	0,7242
	48	11,90 ^a	0,3718
	72	12,24 ^a	0,3915
	96	10,94 ^a	0,1326
V20G	0	37,120	0,000
	24	3,5522 ^d	0,3433
	48	0,4179 ^e	0,7238
	72	4,6269 ^d	0,8687
	96	3,0498 ^d	0,7421
EV08	0	37,120	0,000
	24	6,3134 ^b	1,8292
	48	3,4328 ^d	0,0651
	72	1,4577 ^{bc}	6,4441
	96	1,8756 ^e	1,3129
EV05	0	37,120	0,000
	24	6,3582 ^b	0,1952
	48	9,7214 ^a	3,2583
	72	7,3887 ^c	0,4877
	96	8,3383 ^c	1,2294

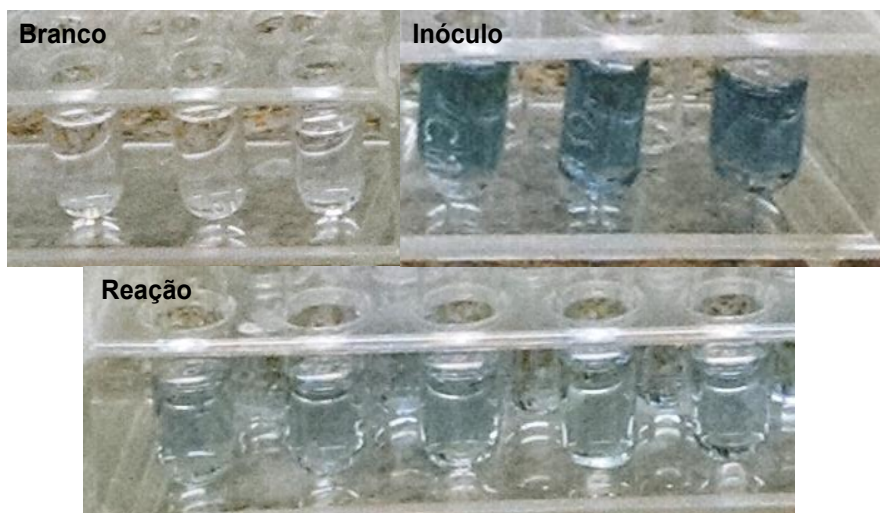


Figura 9. Dosagem de fosfato precipitado por meio colorimétrico através da técnica de azul de fosfomolibdênio.

Devido ao decréscimo de fontes naturais de fósforo, que é um nutriente indispensável ao crescimento das plantas sendo usado na fertilização dos solos agrícolas, novas alternativas vêm sendo estudadas, destacando-se os micro-organismos solubilizadores de fosfatos. Estes são imprescindíveis no ciclo do fósforo, porque podem disponibilizar esse nutriente para as plantas através da solubilização de fosfato insolúvel (MALBOOBI et al., 2009; ZENG et al., 2012).

Neste sentido, procura-se caracterizar e avaliar isolados bacterianos que expressem atividades para solubilização de fosfato. Esta bioprospecção é resultado do grande potencial desses micro-organismos que podem interferir de forma positiva no desenvolvimento das plantas. Dessa maneira, várias pesquisas buscam analisar a eficiência de bactérias que solubilizem fosfato inorgânico com o objetivo de ampliar o uso da biotecnologia microbiana e posterior aplicabilidade nos modos de produção agrícola (GYANESHWAR et al., 2002, TAURIAN et al., 2010; COMPANT et al., 2010).

Estudos apontam que as Actinobactérias proporcionam o crescimento das plantas por meio de métodos diretos e indiretos, dentre os quais merecem destaque a solubilização de fósforo pelas fosfatases e fixação biológica de nitrogênio (N_2), além da produção de substâncias antimicrobianas (NIMNOI et al., 2010; SOLANS et al., 2011). Em trabalho similar, Meena et al. (2013) observaram que dentre as 26 Actinobactérias isoladas de um ecossistema marinho, 8 produziram fosfatases, além de outras enzimas importantes que podem ser empregadas na indústria. A validação dessa potencial atividade de liberação de fosfatases pelo referido filo, foi comprovada por Ribeiro e Cardoso (2012) que ao estudarem 96 bactérias em associação às raízes da *Araucaria angustifolia*, constataram que 83 isolados (85%) produziram fosfatases. Portanto, é possível avaliar o papel das Actinobactérias em produzir substâncias importantes que podem ser aplicadas nas plantações visando o desenvolvimento sustentável da agricultura (HOLGUIN et al., 2000; SOLANS et al., 2011).

A atividade solubilizadora de fosfato do isolado LGA01-EV05 com alta similaridade à *Curtobacterium*, foi comprovada por Bulgari et al. (2011). Adicionalmente, estes autores demonstraram que este gênero apresenta também ação de produção de sideróforos, garantindo às plantas absorção de micronutrientes

como o íon ferro (Fe^{2+}), e produção de Ácido indolacético (IAA), hormônio que garante o crescimento das plantas. Esses metabólitos secundários produzidos pelo gênero *Curtobacterium* possuem um papel importante em termos biotecnológicos e ecológicos.

Pesquisas realizadas por Yadav et al. (2009) evidenciam sobre a importância de representantes do gênero *Brevibacillus* atuarem em solubilização de fosfato, garantindo o melhoramento da produtividade agrícola. Essa importante atividade bacteriana tem sido amplamente utilizada em novas tecnologias de biofertilização, utilizado pelas agroindústrias do mundo, o que resulta em uma diminuição de fertilizantes químicos (PÉREZ et al., 2007).

Estudos realizados por Khan et al. (2006) em solos aos Sul da Índia demonstram que estirpes pertencentes ao gênero *Sinomonas* possuem atividade promissora para solubilização de fosfato.

5.5 Medida do pH do meio de cultivo NBRIP líquido

O pH representa um importante fator limitante para a atividade e distribuição dos micro-organismos. As bactérias presentes no solo são mais adaptadas a valores que variam entre 6,0 e 8,0 (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Nesse sentido, é que o pH em torno de 7,0 foi utilizado para observar a correlação desse parâmetro químico, com a atividade de solubilização de fosfato desempenhada pelos quatros isolados bacterianos utilizados neste trabalho (Figura 10). Os isolados LGA04-V20G e LGA02-EV08 foram os que obtiveram melhores taxas de solubilização de fosfato (Quadro 01) o que sugere que a faixa de pH com valores próximos de 5,0 a 6,0 parece realmente estar relacionada com a otimização das atividades desses dois grupos. Porém, observa-se que não foi exatamente o menor valor de pH, o mais acidificado, que corroborou para melhor atividade de solubilização de fosfato entre estes dois isolados. Neste caso, pode-se especular que estes organismos exercem seu papel solubilizador por meio de atividade enzimática fosfatase em vez da liberação de ácidos. Há diversos relatos na literatura que indicam que o principal mecanismo relacionado com a solubilização de fósforo é

a produção e liberação de ácidos pelas bactérias, sendo os ácidos láctico, itacónico, isovalérico, isobutírico e acético, os mais descritos (VAZQUEZ et al., 2009, DIAS et al., 2009). Embora os mecanismos que envolvam a solubilização de fósforo por micro-organismos sejam considerados bastante complexos, que dependem de diversos fatores como disponibilidade de nutrientes, condições fisiológicas e de crescimento da cultura microbiana. Há autores que indicam que tais mecanismos ainda não estejam completamente elucidados (WELCH et al., 2002; YI et al., 2008).

Sendo assim, é indicado que sejam feitos outros testes para avaliar com mais precisão o mecanismo de solubilização de fosfato adotado pelos isolados caracterizados no presente trabalho.

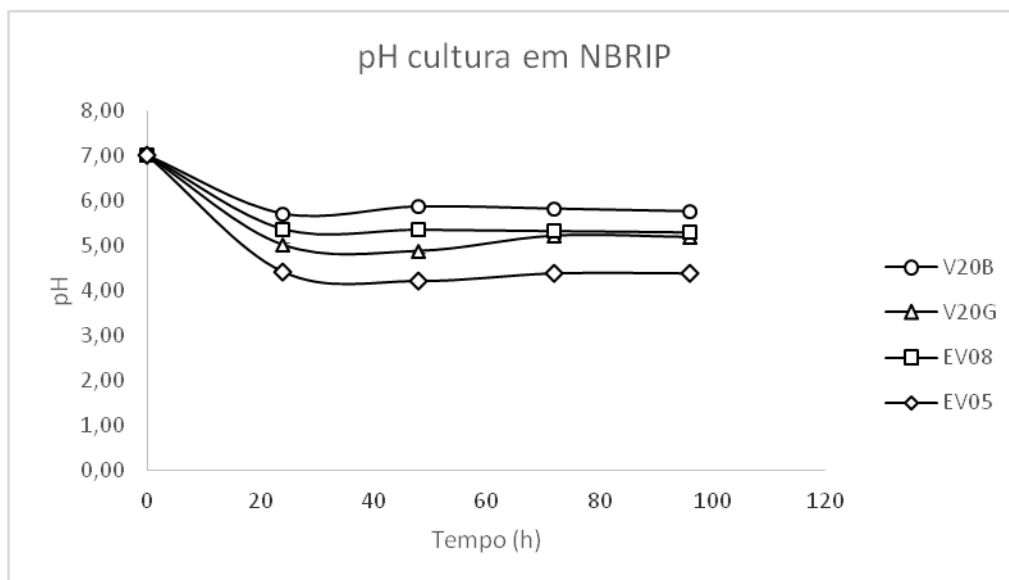


Figura 10. Avaliação do pH dos quatro isolados bacterianos aferida no intervalo de 24h. No total de quatro leituras.

6.0 CONCLUSÃO

- ✓ O sequenciamento do gene *16SrRNA* possibilitou a classificação taxonômica de isolados bacterianos de solos com manejo de vinhaça.
- ✓ O isolado LGA01-EV05 mostrou alta similaridade de sequência com *Curtobacterium albidum*, o isolado LGA02-EV08 denota similaridade com *Brevibacillus nitrificans*, os isolados LGA03-V20B e LGA04-V20G evidenciam elevado grau de similaridade entre si e com *Sinomonas soli*.
- ✓ A caracterização molecular possibilitou identificar filos e gêneros importantes para o processo de solubilização das fontes de fósforo;
- ✓ Os quatro isolados estudados neste trabalho demonstraram eficiência em solubilizar fosfato. Porém, os isolados LGA02-EV08 e LGA04-V20G foram quem mais se destacaram para essa atividade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACINAS, S. G.; MARCELINO, L. A.; KLEPAC-CERAJ, V.; POLZ, M. F. Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple *rrn* Operons. **J Bacteriol**, Cambridge, v.186, n. 9, p.2629–2635, 2004.

AISLABIE, J. M., CHHOUR, K. L., SAUL, D. J., MIYAUCHI, S., AYTON, J., PAETZOLD, R. F. e BALKS, M. R. Dominant bacteria in soils of Marble Point and Wright Valley, Victoria Land, Antarctica, **Soil Biology and Biochemistry**, p. 3041-3056, v. 38, 2006.

BARROS, R. P.; VIÉGAS, P. R. A.; SILVA, T. L.; SOUZA, R. M.; BARBOSA L.; VIÉGAS, R. A.; BARRETTO, M. C. de V.; MELO, A. S. Alterações em atributos químicos de solo cultivado com cana-de-açúcar e adição de vinhaça, **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.40, p.341-346, 2010.

BEDDINGTON, J. Food security: contributions from science to a new and greener revolution. *Philosophical Transactions B*. **The Royal Society**, v. 365, p. 61–71, 2010.

BELL, T.; NEWMAN, J.A.; SILVERMAN, B.W.; TURNER, S.L.; Lilley, A.K. The contribution of species richness and composition to bacterial services. **Nature**, v.436, p. 1157-1160, 2005.

BERNARDES, C.M.; SANTOS, M.A. Microbial population as indicator of interference in different cerrado soil managements cultivated with soybean crop. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 22, p. 7-16, 2006.

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 Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, n.7, p. 2647-2653, 1997.

BOSSIO, D. A.; SCOW, K. M.; GUNAPALA, N.; GRAHAM, K. J. Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management, season and soil type on phospholipids fatty acid profiles. **Microbial Ecology**, New York, v. 36, p. 1-12. 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Balanço nacional de cana-de-açúcar e agroenergia. Brasília: MAPA, **Secretaria de Produção**. p.139. 2007.

BULGARI, D.; CASATI, P.; CREPALDI, P.; DAFFONCHIO, D.; QUAGLINO, F.; BRUSETTI, L.; BIANCO, P.A. Restructuring of endophytic bacterial communities in grapevine yellows-diseased and recovered *Vitis vinifera* L. plants. **Appl. Environ. Microbiol.**, Baltimore, v.77, p.5018 –5022, 2011.

CHAN, O.C.; CASPER, P.; SHA, L.Q.; FENG, Z.L.; FU, Y.; YANG, X.D.; ULRICH, A.; ZOU, X.M. Vegetation cover of Forest, shrub and pasture strongly influences soil bacterial community structure as revealed by 16S rRNA gene TRFLP analysis. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 64, n. 3, p. 449-458, 2008.

CHEN, Y.; REKHA, P.; ARUN, A.; SHEN, F.; LAI, W.; YOUNG C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil ecology**, v.34, p33-41, 2006.

COCKING, C. E. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. **Plant and Soil**. V. 252, n. 1, p.169 – 175, 2003.

COLLADO, I. G.; SANCHES, A. J. M.; HANSON, J. N. Fungal terpene metabolites: biosynthetic relationships and the control of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Natural Products Report**, v. 24, n. 4, p. 674-686, 2007.

COMPANT, S; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth promoting bacteria in the rhizo – and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 669-678 2010.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, safra 2014/2015** - Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília: Conab, v.1, n.3, p.1-27, 2014.

COSTA, R.; GOMES, N. C. M.; PEIXOTO, R. S.; RUMJANEK, N.; BERG, G.; MENDONÇA- HAGLER, L. C. S.; SMALLA, K. Diversity and antagonistic potential of *Pseudomonas* spp. associated to the rhizosphere of maize grown in a subtropical organic farm. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 2434-2447, 2006.

DANIEL, R. The metagenomics of soil. **Nature**, London, v. 3, n. 6, p. 470-480, 2005.

DANIELS, J.; ROACH, B. T. **Taxonomy and evolution**. In: HEINZ, D.J. Sugarcane improvement through breeding. New York: Elsevier, p.84, 1987.

DIAS, A.C.F., COSTA, F.E.C., ANDREOTE, F.D., LACAVA, P.T., TEIXEIRA, M.A., ASSUMPÇÃO, L.C., ARAÚJO, W.L., AZEVEDO, J.L.; MELO, I.S. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World J Microbiol Biotechnol**, n. 25, p. 189-195, 2009.

DINI-ANDREOTE, F.; ANDREOTE, F. D.; COSTA, R.; TAKETANI, R. G.; VAN ELSAS, J.D.; ARAUJO, W. L. Bacterial soil community in a Brazilian Sugarcane field. **Plant Soil**, 336, p. 337–349, 2010.

EPE – Empresa de Pesquisa Energética. **Perspectivas para o etanol no Brasil**. Brasília: EPE, 2008. 67 p. (EPE. Cadernos de Energia EPE).

FAORO, H, ALVES, A. C., SOUZA, E. M., RIGO, L. U., CRUZ, L. M., S. M. ALJANABI, MONTEIRO, R. A., BAURA, V. A. E PEDROSA, F. O. Influence of Soil Characteristics on the Diversity of Bacteria in the Southern Brazilian Atlantic Forest. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 4744 – 4749, 2010.

FIERER, N. & JACKSON, B. The diversity and biogeograph of soil bacterial communities. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v. 103, p. 626-631, 2006.

GÃO; B.; PARAMANATHAN, R.; GUPTA , R. S. Signature proteins that are distinctive characteristics of Actinobacteria and their subgroups. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 90, n.1, p. 69-91, 2016.

GYANESHWAR P.; KUMAR G.N.; PAREKH L.J.; POOLE P.S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant Soil**, v. 245, p. 83-93, 2002.

GIOVANNONNI, S. Oceans of bacteria. **Nature** ,v. 430, p. 515-516, 2004.

GORDON, K.D.; WITT, A.N.; FRIEDMAN, B.C. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research Cold Spring Harbor**, v. 8, p. 195-202. 1998.

GORAB, E. **Evolução de genes nucleares de RNA ribossômico**. Biologia Molecular e Evolução. Cap. 6, p. 64-69, 2001.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. 2006. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. **Systematic Biology**, v.5 n. 2, p. 696-704, 2006.

GYANESHWAR, P.; NARESH KUMAR, G.; PAREKH, L. J; POOLE, P. S. Role of Soil Microorganisms in Improving P Nutrition of Plants. **Plant and Soil**, v.245, p.83–93, 2002.

HOLGUIN, G., PUENTE, M., LOPEZ, E., CORTES, A. ; BASHAN, Y. Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semi arid coastal lagoon. **Biol Fertil Soils**, n. 30, p. 460-468, 2000.

HOOPEN, G. MARTIJN TEN.; KUATÉ, J.; ADIOBO, A.; NGONKEU, M. E. L.; AMBANG, Z.; AKOA, A., TONDJE, P.R.; BEGOU, B. A. D. *Trichoderma asperellum*: A potential biocontrol agent for *Pythium myriotylum*, causal agent of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) root rot disease in Cameroon. **Crop Protection**, v.36, p.18-22, 2012.

HOSTER, F.; SCHMITZ, J. E.; DANIEL, R. Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.66, p.434-442, 2005.

IDRIS, R.; TRIFONOVA, R.; PUSCHENREITER, M.; WENZEL, W. W.; SESSITSCH, A. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 2667-77, 2004.

JANSSEN, P.H. 2006. Identifying the dominant soil bacteria taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n.3, p.1719-1728,2006.

JOHN, R. P.; TYAGI, R. D.; PRÉVOST, D.; BRAR, S. K.; POULEUR, S.; SURAMPALLI, R.Y. Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. adzuki and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. **Crop protection**, v.29, n.12, p.1452-1459, 2010.

KHAN,M.; ZAIDI,A.; WANI,P. Role of Phosphate-solubilizing Microorganismsin Sustainable Agriculture – a review.**Agron. Sustain. Dev.**, India, v.26, p.29–43, 2006.

KÄMPFER, P. Taxonomy of Phosphate Solubilizing Bacteria. In: FIRST INTERNATIONAL MEETING ON MICROBIAL PHOSPHATE SOLUBILIZATION, 2002, **Springer**. p.101–106.

KIRK, J.E.; BEAUDETTE, L.A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J.N.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Methods of studying soil microbial diversity. **J. Microbiol. Meth**, v.58, p.169–188, 2004.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M. **Diagnóstico microbiológico**. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Medsi, 2001. 1465p.

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

LAIME, E. M. O.; FERNANDES, P. D.; OLIVEIRA, D. C. S.; FREIRE, E. A. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 5, n. 3, p.16, 2011.

MACEDO, H.S. **Comunidades bacterianas em solos de mata nativa e cultivados com cana-de-açúcar**. 2012.78p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

MALBOOBI, M. A.; OWLIA, P.; BEHBAHANI, M.; SAROKHANI, E.; MORADI, S.; YAKHCHALI, B.; DELJOU, A.; HERAVI, K. M. Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly. **World Journal of Microbiology anda Biotechnology**. Oxford, v. 25, p. 1471-1477, 2009.

MALIK, S.; BEER, M.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R.The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water.**Environment International**, Amsterdam, v. 34,p.265-276, 2008.

MARIANO, R. G. de B.; COURI, S.; FREITAS, S. P. Enzymatic technology to improve oil extraction from *Caryocar brasiliense* camb. (Pequi) Pulp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.31, n.3, p.637-643. 2009.

MARMUR, J. A. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. **Journal of Molecular Biology**, v. 3, p. 208-218, 1961.

MENNA P.; HUNGRIA M.; BARCELLOS F. G.; BANGEL E.; HESS P.N.; MARTINEZ-ROMERO E. Molecular phylogeny base on the 16 S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Syst and Appl Microbiol**, v. 29, p. 315-322, 2006.

MEENA, B.; RAJAN, L. A.; VINITHKUMAR, N. V.; KIRUBAGARAN, R. Novel Marine Actinobacteria from Emerald Andaman & Nicobar Islands: a Prospective Source for Industrial and Pharmaceutical Byproducts. **BMC Microbiology**, n.13, p.1-17, 2013.

MERZAEVA, O. V.; SHIROKIKH I. G. Colonization of plant rhizosphere by actinomycetes of different genera. **Microbiology**, v.75, p.226–230, 2006.

MIÃO, V.; DAVIES, J. Actinobacteria: the good, the bad and ugly. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 98, n.2, p. 143-150, 2010.

MORALES, S. E.; COSART, T.; JOHNSON, J. V.; HOLBEN, W. E. Supplemental programs for enhanced recovery of data from the DOTUR application. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, n. 3, p.572-575, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2008.07.017>>.

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

MOREIRA, F. M. S.; SIOUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: EDUFLA. 2006. 729 p.

NACKE, H.; THÜRMER, A.; WOLLHERR, A.; WILL, C.; HODAC, L.; HEROLD, N.; SCHONING, I.; SCHRUMPF, M.; DANIEL, R. Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types 72 in German forest and grassland soils. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n.2, e17000, 2011.

NEEFS, J.-M.; PEER, Y. V.; HENDRIKS, L.; WACHTER, R. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 2237- 2317, 1990.

NIMNOI, P.; PONGSILP, N.; LUMYONG, S. Endophytic Actinomycetes Isolated from *Aquilaria crassna* Pierre Ex Lec and Screening of Plant Growth Promoters Production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n.2, p. 193–203, 2010.

NORMA CETESB **P4.231 - Vinhaça – critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola**. São Paulo, 2006.

NOVACANA. **A cana-de-açúcar como fonte de energia elétrica**. Disponível em: <<http://www.novacana.com>>. Acesso em: 16 jun.2015.

NUBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; KUHL, M.; MUYZER, G. Quantifying microbial diversity: morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, p. 422-443, 1999.

NUNES, G. L. **Diversidade e estrutura de comunidades de Bacteria e Archaea em solo de mangue contaminado com hidrocarbonetos de petróleo**. Dissertação – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 84 p. 2006.

OMORI, W. P. **Construção da biblioteca metagenômica a partir de oligoiniciador para Cu/Zn-SOD**. Trabalho de Graduação (Graduação) - Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, Jaboticabal, 2011.

OMORI, W. P. **Diversidade bacteriana de amostras da indústria sucroenergética**. 2014.73p.Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

PACE, N. R. New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. **ASM News**, v. 62, p. 463-470, 1997.

PADILHA, G. (1998) Biologia molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**, 1.ed. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, 1998 p.327-343.

PEDRINHO, E. A. **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays* L.)** 2009. 87 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

PÉREZ E.; SULBARAN M.; BALL M.; YARZABAL L.A. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. **Soil Biol Biochem**, n.39, p.2905–2914, 2007.

PRADO, R. M.; CAIONE, G.; CAMPOS, C. N. S. Filter cake and vinasse as fertilizers contributing to conservation agriculture. *Applied and Environmental Soil Science*, v. 2013,2013.Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/581984>>.

RADMAN, R.; SAEZ, T.; BUCKE, C.; KESHAVARZ, T. Elicitation of plant sand microbial cell systems. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Malden, v.37, p.91–102, 2003.

REITER, B.; PFEIFER, U.; SCHWAB, H.; SESSITSCH, A. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. Atroseptica. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 5, p. 2261-2268, 2002.

RIBEIRO, C. M.; CARDOSO, E. J. B. N. Isolation, Selection and Characterization of Root-associated Growth Promoting Bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). **Microbiological Research**, v.167, n.2, p. 69–78, 2012.

RÖLING, W. F. M.; HEAD, I. M. Prokaryotic systematics: PCR and sequence analysis of amplified 16S rRNA genes. In: OSBORN, A . M.; SMITH, C. J. **Molecular microbial ecology**. 1.ed. New York:Taylor & Francis Group,2005, cap. 2., p.252-264.

RODRIGUES, K. **Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos de isolados de actinomicetos**. 2006. 129 p. Dissertação (Mestrado

em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

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

RODRÍGUEZ, H; FRAGA, R; GONZALEZ, T; BASHAN, Y. Genetics of Phosphate Solubilization and its Potential Applications for Improving Plant Growth-promoting Bacteria. **Plant Soil**, Mexico, v.287, n.1-2, p.15–21, 2006.

ROSSETO, R; DIAS, F. L. F. **Nutrição e adubação da cana-de-açúcar: indagações e reflexões**. Encarte de Informações Agrônomicas, n. 110, junho de 2005.

RUIZ-LOZANO, J.M.; AZCÓN, R. Brevibacillus, Arbuscular Mycorrhizae and Remediation of Metal Toxicity in Agricultural Soils. Em: **Endospore-Forming Soil Bacteria**. 1. ed. Springer, 2011.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1. ed., v. 1, 2006.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1501-1506, 2005.

SHENOY, V.V.; KALAGUDI, G.M. Enhancing Plant Phosphorus Use Efficiency for Sustainable Cropping. **Biotechnology Advances**, India, v.23, n.7-8, p.501–513, 2005.

SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p.108-114, 2007.

da SILVA, T. F.; VOLLÚ, R. E.; JURELEVICIUS, D.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; BLANK, A. F.; SELDIN, L. Does the essential oil of *Lippia sidoides* cham.(pepper-rosmarim) affect its endophytic microbial community?. **BMC Microbiology**, v. 13, p.29, 2013.

SILVEIRA, E.L.; PEREIRA, R.M.; SCAQUITTO, D.C.; PEDRINHO, E.A.N.; VALMORAES, S.P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES, L.M.; LEMOS, E.G.M. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 10, p. 1507-1516, 2006.

SINGH B.; KAUR J.; SINGH K. Biodegradation of malathion by *Brevibacillus* sp. strain KB2 and *Bacillus cereus* strain PU. *World J Microbiol Biotechnol.* v.28, n.3, p.1133-1141, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11274-011-0916y>>

SOLANS, M.; VOBIS G.; CASSÁN, F.; LUNA, V.; WALL, L. G. Production of Phytohormones by Root-associated Saprophytic Actinomycetes Isolated from the Actinorhizal Plant *Ochetophila trinervis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.27, n. 9, p. 2195–2202, 2011.

SOUSA, C.S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S.; LIMA, F.S. Estreptomicetos no controle de *Scutellonema bradys* em tuberas de inhame. **Revista Ciência Agronômica**, v.40, p.486-491, 2009.

STACH, J. E. M.; MALDONADO, L. A.; MASSON, D. G.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M.; BULL, A. T. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 6189-6200, 2003.

TAKAHASHI, S; ANWAR, M. R. Wheat Grain Yield, Phosphorus Uptake and Soil Phosphorus Fraction after 23 Years of Annual Fertilizer Application to an Andosol. **Field Crops Research**, Japan, v.101, n.2, p.160–171, 2007.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PERTERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p.2731-2739, 2011.

TAO, G. C; TIAN, S. J; CAI, M. Y; XIE, G. H. Phosphate-solubilizing and Mineralizing Abilities of Bacteria Isolated from Soils. **Pedosphere**, v.18, p.515–523, 2008.

TAURIAN, T.; ANZUAY, M. S.; ANGELINI, J. G.; TONELLI, M. L.; LUDUEÑA, L.; PENA, D.; IBÁÑEZ, F.; FABRA, A. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. **Plant Soil**, The Hague, v. 329, p. 421–431, 2010.

TAUSSKY, H. H.; SHORR, E.A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus.**J. Bol. Chem.**, 202, p. 675-685, 1953.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J; DAAE, F.L. DNA **High diversity in of soil bactéria.** **Applied Enviromental Microbiology**,v. 56, n. 3,p. 782-7, 1990.

TRIPURA, C; SASHIDHAR, B; PODILE, A. R. Ethyl Methanesulfonate Mutagenesis Enhanced Mineral Phosphate Solubilization by Groundnut-associated *Serratia marcescens* GPS-5.**Curr Microbiol** v.54, p.79–84, 2007.

TSVKELOVA, E. A., CHERDYNSTSEVA, T. A.; BOTINA, S. G.; NETRUSOV, A. I. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. **Microbiological Research**, Jena, v. 162, n.1, p. 69-76, 2007.

UJIKAWA, K. Antibióticos antifúngicos produzidos por actinomicetos do Brasil e sua determinação preliminar nos meios experimentais. **Brazilian Journal of Pharmacy Sciences**, Brasília, n.39, p.149-158, 2003.

ÚNICA. União da Indústria de Cana-de-açúcar. **Estimativa safra 2015/2016**.Disponível em:<[http// www. unicadata.com.br](http://www.unicadata.com.br)>. Acesso em: 31 maio 2015.

VAL-MORAES, S.P.; CARARETO-ALVES, L.M; LEMOS, E.G.M. **Impacto do lodo de esgoto na comunidade bacteriana do solo: avaliação por microarranjo de DNA**. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

VAL-MORAES, S. P.; VALARINI, M. J.; GHINI, R.; LEMOS, E. G. L.; CARARETO-ALVES, L. M. Diversidade de bactérias de solo sob vegetação natural e cultivo de hortaliças. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 40, n. 1, p.7-16, 2009.

VAZQUEZ, P., DIAS, A.C.F., COSTA, F.E.C., ANDREOTE, F.D., LACAVA, P.T., TEIXEIRA, M.A., ASSUMPÇÃO, L.C., ARAÚJO, W.L., AZEVEDO, J.L.; MELO, I.S. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World J Microbiol Biotechnol**,n. 25, p. 189-195, 2009.

VALARINI, M. J. Avaliação do impacto do lodo de esgoto na microbiota do solo utilizando o gene *16S rRNA*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 3, p. 443-448, 2009.

VREELAND, R.H.; ROSENZWEIG, W.D.; POWERS, D.W. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. **Nature**, v. 407, p. 897–900, 2000.

WANG, Y.; QIAN, P.Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **Public Library of Science**, v. 4, n. 10, e7401, 2009.

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

WELCH, S., TAUNTON, A., BANFIELD, J. Effect of microorganisms and microbial metabolites on apatite dissolution. **Geomicrobiology Journal**, v.19, p. 343–367, 2002.

XU, P.; LI, W.J.; WU, W.L.; WANG, D.; XU, L.H.; JIANG, C.L. *Streptomyces hebeiensis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 54, p.727–731, 2004.

YADAV, R.L.; SUMAN, A.; PRASAD, S.R.; PRAKASH, O. Effect of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Trichoderma viride* on soil health, yield and N-economy of sugarcane cultivation under subtropical climatic conditions of India. **European Journal of Agronomy**, v.30, p.296-303, 2009.

YI, Y.; HUANG, W.; GE, Y. Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.1059–1065, 2008.

YOUSSEF, N.H.; ELSHANED, M.S. Diversity rankings among bacterial lineages in soil. **The ISME Journal**, v.3, p. 305-313, 2009.

ZHANG, L.; XU, Z. Assessing bacterial diversity in soil. **Journal of soils and sediments**, v.8,p. 379-388, 2008.

ZENG, Q.; LUO, F.; ZHANG,Z.; YAN, R.; ZHU, D.Phosphate solubilizing rhizosphere bacterial T21 isolated from dongxian wild rice species promotes cultivated rice growth. **Applied Mechanics and Materials**, Millersville, v. 108, p.167-175, 2012.