

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS
SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO E PRODUTORAS DE
AUXINAS EM SOLO COM CANA-DE-AÇÚCAR**

Rosangela Naomi Inui
Engenheira Agrônoma

JABOTICABAL, SP - BRASIL

Junho - 2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS
SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO E PRODUTORAS DE
AUXINAS EM SOLO COM CANA-DE-AÇÚCAR**

Rosangela Naomi Inui

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Câmpus de Jaboticabal-UNESP, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas.

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Junho de 2009

Inui, Rosangela Naomi
161i Isolamento e identificação de bactérias solubilizadoras de fósforo e
produtoras de auxinas em solo com cana-de-açúcar/ Rosangela
Naomi Inui. - - Jaboticabal, 2009.

x, 78 f. 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientador: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos
Banca examinadora: Claudia Barros Monteiro Vitorello, Roberto
Alves de Oliveira
Bibliografia

1. solubilização de fósforo. 2. ácido indolacético. 3. 16S rRNA. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52: 631.461.7

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO E PRODUTORAS DE AUXINAS EM SOLO COM CANA-DE-AÇÚCAR.

AUTORA: ROSANGELA NAOMI INUI

ORIENTADORA: Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS) pela Comissão Examinadora:

Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

Dra. CLAUDIA BARROS MONTEIRO VITORELLO

Dr. ROBERTO ALVES DE OLIVEIRA

Data da realização: 19 de junho de 2009.

Presidente da Comissão Examinadora
 Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ROSANGELA NAOMI INUI- nascida em 25 de Fevereiro de 1982, no município de São Paulo, Estado de São Paulo, é Engenheira Agrônoma formada pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal, em dezembro de 2006. Na graduação realizou a iniciação científica com bolsa de estudo da FAPESP. Em Março de 2007, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) na UNESP - FCAV, em Jaboticabal - SP, onde defendeu sua tese de mestrado em Junho de 2009. Durante o estudo de pós-graduação foi bolsista do CNPq e CAPES.

Aos meus pais, Tamotsu Inui e Yoshie Hatamoto Inui,

Aos meus irmãos, Ronaldo Yutaka Inui e Lillian Leiko Inui,

A minha avó, Ahi Inui (*In memoriam*),

Ao meu namorado, Luciano Takeshi Kishi,

Aos meus verdadeiros amigos,

Pelo amor, carinho, compreensão, respeito, amizade e dedicação que contribuíram e fazem parte de minha formação.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- A Deus por estar junto de mim e iluminar meu caminho;
- A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação.
- A minha família que é base da minha vida e que representa o que sou;
- Aos Professores desta instituição pela contribuição para a minha formação acadêmica;
- A Profa. Dra Eliana G. M. Lemos, pela oportunidade de crescimento e aperfeiçoamento profissional, e em especial pela amizade, confiança e atenção dispensadas;
- A João Carlos Campanharo, pela atenção e auxílio nas práticas laboratoriais fundamentais para a realização deste trabalho.
- Aos Professores Dra. Lúcia M. Carareto Alves e Dr João Martins Pizauro Junior pelas sugestões no Exame de Qualificação
- Aos Professores Dra Claudia Barros Monteiro Vitorello e Dr. Roberto Alves de Oliveira, pelas correções sugeridas na dissertação, as quais contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho;
- Ao Prof Dr. Dilermando Perecin coordenador do curso de pós-graduação em Agronomia (Genética e melhoramento de plantas) pela compreensão;
- Ao Prof. Dr José Carlos Barbosa pela elaboração da análise estatística;
- Aos amigos Luciano Takeshi Kishi e Simone Cristina Picchi pelo auxílio no sequenciamento e no uso de programas de análises filogenéticas;
- Aos funcionários do departamento de Tecnologia;
- Aos funcionários da seção de Pós-graduação pelo esclarecimento e condução nas tarefas de atendimento às normas regulamentares;
- Aos meus grandes amigos que conheci durante todos esses anos;
- A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro;
- Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
ABREVIATURAS	viii
RESUMO	ix
SUMMARY	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 A cultura da cana-de-açúcar.....	3
2.2 Importância do fósforo.....	4
2.3. Aplicação das rochas fosfatadas.....	5
2.4 Importância das bactérias solubilizadoras de fósforo.....	8
2.5 Caracterização das bactérias solubilizadoras de fósforo.....	11
2.6 Bactérias produtoras de fitormônios.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Estirpe–padrão e fontes de fósforo.....	18
3.2. Amostras de solo e variedades de cana-de-açúcar.....	18
3.3 Isolamento de bactérias.....	19
3.4 Cultivo e Caracterização de novos isolados.....	19
3.4.1 Cultivo de Bactérias, extração e purificação do DNA genômico.....	19
3.4.2 Quantificação do DNA genômico.....	20
3.4.3 Amplificação do DNA por <i>primers</i> correspondente ao gene 16S	
rRNA.....	21

3.4.4 Amplificação do DNA por <i>primer</i> correspondente a sequência repetitiva BOX-A1R.....	21
3.4.5 Eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etídio e documentação.....	22
3.4.6 Reação da PCR para sequenciamento do fragmento gênico 16S rDNA.....	23
3.4.7 Sequenciamento dos produtos da PCR utilizando o equipamento capilar ABI 3700.....	23
3.4.8 Análises Individuais e Combinadas dos Produtos da PCR.....	24
3.4.9 Análises individuais e combinadas dos produtos de PCR da sequência repetitiva BOX-A1R.....	25
3.5 Avaliação de Solubilização em Meio Sólido e Líquido.....	25
3.6 Avaliação dos Isolados selecionados quanto à síntese de AIA.....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 Isolamento e Condições Ambientais.....	28
4.2 Avaliação da solubilização em meio NBRIP sólido.....	34
4.3 Análise da qualidade do DNA genômico.....	35
4.4 Análise taxonômicas individuais dos isolados.....	36
4.5 Filogenia dos isolados baseado no marcador 16S rDNA.....	38
4.6 Avaliação da amplificação por PCR utilizando o <i>primer</i> BOX-A1R.....	42
4.7 Efeito das fontes fosfatadas sobre a taxa de crescimento.....	45
4.8 Atividade da Solubilização das fontes fosfatadas pelos isolados.....	51
4.9 Produção de AIA pelos isolados.....	59
5 CONCLUSÕES.....	64
6 REFERÊNCIAS.....	65

ABREVIATURAS

- AIA - Ácido Indolacético
- AT- T - Azul de Tripán - Tetraciclina
- BSF - Bactéria Solubilizadoras de Fósforo
- BOD - Demanda biológica de oxigênio
- BOX - Elemento BOX.
- BOX - A1R- Subunidade A do elemento BOX
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- dNTP - trifosfato de deoxinucleotídeo
- DO - Densidade óptica
- DYGS - Dextrose Yeast Glucose Sucrose
- EDTA - Ácido etileno diaminoacético
- ERIC - “Enterobacterial Repetitive Intergenic” (Sequência Intergênica Repetitiva Enterobacteriana)
- MEMBM - Moléculas estáveis de baixo peso molecular
- NBRIP - National Botanical Research Institute’s Phosphate
- PCR - “Polimerase Chain Reaction” (Reação em Cadeia da Polimerase)
- PCAT - *Pseudomonas cepacia* ácido azeláico tryptamina
- RAPD - “Random amplified polymorphic DNA” (DNA polimórfico amplificado ao acaso)
- RPCP - Rizobactéria Promotora de Crescimento de Plantas
- RDP II - Ribosomal Database Project II
- RNase - Ribonuclease A
- REP – “Repetitive Extragenic Palindromic” (Sequência Palindrômica Extragênica Repetitiva)
- rep-PCR - referente à técnica de PCR utilizando qualquer uma das três sequências repetivas (REP,ERIC ou BOX)
- SDS - Duodecil sulfato de sódio
- Tris - Hidroximetil aminometano
- UFC - Unidade Formadora de Colônia

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO E PRODUTORAS DE AUXINAS EM SOLO COM CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO - A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) apresenta grande importância econômica para o Brasil. Dessa forma, para propiciar boas condições de desenvolvimento e produtividade, deve-se dar grande importância ao suprimento de fósforo. Bactérias solubilizadoras de fósforo (BSF) vêm sendo utilizadas como biofertilizantes comerciais, trazendo benefícios à agricultura. A seleção de bactérias com capacidade de solubilização do fósforo pode ser feita através de caracterizações genotípicas. Os objetivos deste trabalho foram isolar e caracterizar bactérias solubilizadoras de fosfato provenientes de solos sob cultivo de cana-de-açúcar por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA e da região BOX-A1R. Além disso, foi realizada avaliação da atividade microbiana sobre a solubilização das fontes de fosfato até 168 horas. O sequenciamento permitiu identificar gêneros como *Burkholderia* e *Enterobacteriaceae*, conhecidos quanto à solubilização. Os isolados identificados como *Arthrobacter* e *Labrys* apresentam capacidade para biodegradação de compostos tóxicos ao ambiente. O fosfato de cálcio foi a fonte mais solubilizada. Os isolados *Burkholderia* sp. (A5I55), *Candidatus B. verschuerenii* (A9IG), *Enterobacter* sp. (USC8) e *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* (USC7) apresentaram resultados semelhantes a *B. ferrariae*. As bactérias-padrão obtiveram os melhores resultados para a solubilização das fontes fosfatadas. *Candidatus B. verschuerenii* (A9IG) e *Burkholderia* sp. (A3I14) e *B. gladioli* (A6I8) apresentaram os melhores valores para solubilização das rochas fosfatadas. Além disso, foi detectada a produção de AIA pelos isolados do gênero *Enterobacter* (USC7 e USC8) *Labrys portucalensis* (A5I42) e *Burkholderia* sp. (A5I55). Assim estes isolados poderiam ser indicados em testes para solubilização em culturas de campo.

Palavras-chave: rochas fosfatadas, solubilização de fósforo, ácido indolacético (AIA), cana – de - açúcar, 16S rRNA, BOX-A1R.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PHOSPHORUS SOLUBILIZING BACTÉRIA AND AUXIN PRODUCING IN SOIL WITH SUGARCANE

SUMMARY - The culture of sugarcane (*Saccharum* spp.) has a great economic importance to Brazil. Thus, providing good conditions for development and productivity should be given great importance to phosphorus supply. Phosphate solubilizing bacteria - PSB, have been used as biofertilizers, bringing benefits to agriculture. Selection of phosphorus solubilizing bacteria can be done by genetic characterization. The aim of this work is to isolate and characterize PSB from sugarcane productive soils through the sequencing of 16S rRNA gene and BOX-A 1R genomic regions. Furthermore, the microbial activity of phosphate source was assessment until 168 hours. The sequencing has identified genus as *Burkholderia* and *Enterobacteriaceae*, known as PSB. The isolates identified as *Arthrobacter* and *Labrys* have the capacity to biodegradation of toxic compounds in the environment. The calcium phosphate was the source more soluble. Isolates *Burkholderia* sp. (A5I55), *Candidatus B. verschuerenii* (A9IG), *Enterobacter* sp. (USC8) and *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* (USC7) showed results similar to *B. ferrariae*. The bacteria-standards showed the best results for phosphates sources solubilization. *Candidatus B. verschuerenii* (A9IG) and *Burkholderia* sp. (A3I14) and *B. gladioli* showed the best values for solubilization of rock phosphate. Furthermore, the production of AIA was detected by *Enterobacter* (USC7 and USC8), *Labrys portucalensins* (A5I42) and *Burkholderia* sp. (A5I55). Therefore these isolates could be recommended for phosphorus solubilization tests and auxin producing in fieldcrops.

Key Words: rock phosphate, phosphorus solubilization, 16S rRNA, BOX-A1R, indolacetic acid (IAA)

1 INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) tem grande importância econômica para o Brasil, porque possui diversos usos, como produção de açúcar e álcool para o consumo interno e para a exportação, gerando divisas para o País. O álcool é considerado uma via alternativa ao petróleo. Além disso, a cana-de-açúcar pode ser utilizada como forragem na alimentação de ruminantes, no período de estiagem (MARTINS, 2004). Para possibilitar boas condições de desenvolvimento e produtividade da planta, deve-se dar grande importância ao suprimento de fósforo, muito requerido no processo do metabolismo fotossintético. Além disso, a presença do fósforo no caldo da cana é papel essencial no processo de clarificação. Caldos com baixos teores de fósforo são de difícil floculação, e, neste caso, a sedimentação de impurezas (bagacilho, argila, clorofila, entre outros) é ruim. Caldo turvo e com coloração intensa implica produção de açúcar de pior qualidade e de baixo valor econômico (KORNDÖRDER, 2004).

O fósforo é considerado um macronutriente essencial, logo após o nitrogênio, e, portanto, pode limitar o crescimento da planta, tendo em vista sua atuação estrutural, funcional e na transferência de energia. Muitos tipos de solos são deficientes em P, tendo sua concentração menor que 10 μM em pH 6,5, no qual o P está mais solúvel (SOBRAL, 2003). Os solos agricultáveis contêm grande reserva de fósforo, devido a aplicações regulares. Contudo, uma larga proporção do fósforo inorgânico na forma solúvel é rapidamente adsorvida logo após a aplicação de adubos fosfatados, tornando-se indisponível para a planta (RODRIGUEZ & FRAGA, 1999; IGUAL et al., 2001). O processo de adsorção do fósforo pode ser estimado em torno de 75% do conteúdo aplicado (LIN et al., 2005). A adsorção do fósforo e a precipitação que ocorre no solo são geralmente dependentes do pH e do tipo de solo. Em solos ácidos, óxidos fracos e hidróxidos de alumínio e de ferro têm a capacidade de reter o fósforo; já, em solos alcalinos, a fixação ocorre devido à presença de cálcio, causando baixa eficiência na solubilização de fertilizantes fosfatados (IGUAL et al., 2001).

Devido à grande importância do fósforo para as plantas e à grande expressão econômica da cana-de-açúcar nos setores agrícola e industrial, torna-se importante a busca de métodos alternativos que possam viabilizar ao máximo a produção.

Dentre os diversos gêneros bacterianos, algumas espécies de bactérias, que se encontram associadas na rizosfera, podem trazer benefícios para o crescimento da planta (GLICK, 1994; IGUAL et al., 2001). Este grupo é conhecido como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) (IGUAL et al., 2001), e, dentro deste grupo, vale ressaltar as bactérias solubilizadoras de fósforo (BSF), que já vêm sendo utilizadas como biofertilizantes comerciais (RODRIGUEZ & FRAGA, 1999) e as bactérias produtoras de auxina (AIA) que atua no desenvolvimento radicular e na divisão celular (VESSEY, 2003). Entretanto, o número de RPCP presentes no solo não é considerado grande para competir com outras bactérias que já se encontram estabelecidas no ambiente. Dessa forma, deve-se realizar a inoculação com microrganismos que podem propiciar um aumento no número das RPCP, promovendo benefícios para a cultura. Para que ocorra o incremento das RPCP, muitos estudos e metodologias devem ser realizados para identificar as melhores estirpes bacterianas (IGUAL et al., 2001).

A seleção de bactérias com grande capacidade de solubilização do fósforo e produção de auxina pode ser feita através de caracterizações genotípicas e fenotípicas. A caracterização fenotípica é feita por métodos bioquímicos tradicionais, e a genotípica, através da aplicação de novas técnicas moleculares que contribuíram para a classificação e a descrição de microrganismos (IGUAL et al., 2001).

Neste contexto, o trabalho em questão apresentou como objetivo geral o isolamento e a identificação de bactérias solubilizadoras de fósforo com grande potencial de solubilização de fósforo em cana-de-açúcar, e como objetivo específico a avaliação quanto à solubilização de fosfato de cálcio, rocha fosfatada de Araxá - MG, rocha fosfatada de Catalão-GO, e determinação de produção de AIA.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma planta que pertence à família das Poaceas junto com os gêneros *Zea* e *Sorghum*. Seis espécies de *Saccharum* são reconhecidas: *S.officinarum*; *S.sinense*; *S.barberi*; *S.eduli*; *S.spontaneum*, e *S.robustum*. O centro de origem está localizado nas regiões leste da Indonésia e da Nova Guiné (DANIELS & ROACH, 1987; MARTINS, 2004).

Atualmente, observa-se forte tendência de aumento de área nas futuras safras de cana-de-açúcar, motivada pelo interesse crescente na obtenção de fonte alternativa de energia, que contribua na redução da emissão CO₂, hidrocarbonetos e óxidos de nitrogênio e enxofre (URQUIAGA et al, 2005).

Entre as culturas que apresentam baixo balanço energético, ou seja, a relação entre o total de energia contida no biocombustível e o total de energia fóssil contida no processo de obtenção deste, a cultura cana-de-açúcar, por apresentar alta produção de biomassa e baixa adubação nitrogenada possui baixo balanço energético, sendo então viável sua utilização para bicomcombustível (URQUIAGA et al, 2005).

Segundo a estimativa realizada pela UNICA (2009) (União da Indústria de Cana-de-Açúcar) para a nova safra na região Centro-Sul, que contribui com 86% da produção nacional, a cana moída deverá atingir 498,1 milhões de toneladas, um crescimento de 16% em relação à safra de 2007/2008, quando foram moídos 431,2 milhões de toneladas de cana.

A previsão para esta safra é de 28,6 milhões de toneladas de açúcar, 9% acima do observado para o período anterior, cuja produção foi de 26,2 milhões. Do total produzido, o álcool anidro atingirá 7,65 bilhões de litros, correspondendo a um acréscimo de 6% em relação à safra anterior. Já para o álcool hidratado, a previsão é que ocorra um aumento de 27%, obtendo uma produção de 16,6 bilhões de litros.

A produção total de álcool poderá atingir 24,3 bilhões de litros, representando um crescimento de 19% em relação aos 20,3 bilhões de litros registrados na safra de

2007/2008. Dessa forma, a produção será distribuída em 42% e 58% para açúcar e álcool respectivamente.

O volume de etanol exportado será 27% superior ao da safra passada, atingindo 3,9 bilhões de litros. Estados Unidos e Europa respondem por boa parte do avanço nas exportações. Já o açúcar terá um incremento de 15%, atingindo 18,9 milhões de toneladas, e os principais mercados serão Rússia, Arábia Saudita e Emirados Árabes.

Nos dias atuais, diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de propiciar as melhores condições de desenvolvimento e produção da cana-de-açúcar. Como exemplos, a obtenção de novas variedades obtidas por meio do melhoramento genético e a inoculação de microrganismos que contribuam para a disponibilização de nutriente, reduzindo gastos com fertilizantes.

2.2 Importância do fósforo

O elemento fósforo é um macronutriente de grande importância, constituindo cerca de 0,2% de massa seca das plantas. Participa como componente estrutural dos ácidos nucleicos e fosfolipídios, e também de adenosina trifosfato (ATP), sendo um elemento-chave de vias metabólicas e bioquímicas, como as várias etapas das vias de plantas C3 e C4 do ciclo de Calvin e glicólise. A maior parte do fósforo que se encontra no solo, apresenta-se não disponível para as. Devido a isso, tornam-se necessárias aplicações de fósforo inorgânico no solo para garantir boa produtividade. A recuperação de fósforo durante o ciclo de produção é limitada. Aproximadamente 80% do total de fósforo aplicado no solo tornam-se indisponíveis, sendo imobilizados, adsorvidos e/ou transformados em forma orgânica (HOLFORD, 1997). A baixa concentração no solo ($2\mu\text{M}$) e nos tecidos vegetais (10mM) influenciam na produção agrícola no mundo, (MIMURA, 1999)

Dessa forma, a adubação fosfatada torna-se bastante dispendiosa, além de poder acarretar problemas ao meio ambiente. Por isso, devem-se realizar esforços para melhorar a absorção e disponibilidade pelas plantas, o que pode ser feito pelo controle do pH e pelo uso de microrganismos que possibilitem melhor aproveitamento do fósforo.

Para a cana-de-açúcar, pode ser considerado um elemento-chave, uma vez que também é de extrema importância na produção de açúcar. Devido à grande influência que apresenta sobre o rendimento da cana-de-açúcar e da qualidade do caldo produzido, a aplicação de fósforo tornou-se essencial no processo de adubação da cultura.

HAAG et al. (1987), citados por MARTINS (2004), realizaram um trabalho com plantas de cana-de-açúcar vegetando em uma solução sem fósforo, as quais apresentaram desenvolvimento reduzido quando comparadas com a testemunha onde o fósforo estava presente. Observou-se que a brotação foi reduzida, os colmos apresentaram internódios curtos, as raízes ficaram atrofiadas e a relação parte área-raiz diminuiu significativamente. Estes e outros resultados demonstram a importância do elemento fósforo na cultura de cana-de-açúcar. Assim, tornam-se importantes estudos que possibilitem o melhor aproveitamento do nutriente, reduzindo os custos de produção.

2.3 Aplicação das Rochas fosfatadas

As rochas fosfatadas são utilizadas como matéria prima na fabricação de fertilizantes fosfatados, sendo mais comum o uso das apatitas, que é um recurso natural não renovável. A produção de fertilizantes fosfatados solúveis (superfosfatos e termofosfatos) requer gasto elevado de energia. Dessa forma, torna-se necessário, estabelecer estratégias para o uso eficiente e econômico das rochas fosfatadas (GOEDERT & SOUSA, 1986). A utilização dos fosfatos de rocha na forma bruta é muito limitada devido à baixa solubilidade, sendo mais usados em culturas perenes na mistura com fertilizantes solúveis, devido sua lenta solubilização no solo (OLIVEIRA et al., 1977).

Os fosfatos naturais em geral são classificados, em relação à sua origem, em vulcânicos (apatitas) e sedimentares (fosforitas e bauxitas fosfóricas). Os que possuem origem vulcânica apresentam alto grau de cristalização e devido a isso, são pouco solúveis, por outro lado os de origem sedimentar são mais solúveis de acordo com o índice "*absolute citrate solubility*". Existem algumas características intrínsecas aos

fosfatos que causam estas diferenças como o grau de cristalinidade, o grau de substituição isomórfica na rede cristalina do mineral, a porosidade e a granulometria (LEHR & MCCLELLAN, 1972).

A eficiência agronômica dos fosfatos é dependente de vários fatores, tais como (i) características químicas e físicas do solo; (ii) propriedades do solo; (iii) clima e; (iv) cultura. Dessa forma, dependendo da origem e da reatividade da rocha, assim como as condições edafoclimáticas, a liberação do P presente nos fosfatos de rocha pode ser suficientemente adequada ou não em relação à cultura (OLIVEIRA JUNIOR, 2007).

Segundo LÉON et al. (1986), existem três grupos de rocha fosfatada: rochas fosfáticas de alta eficiência as provenientes de Gafsa (Tunísia), Arad (Israel), Sechura e Bayovar (Peru) e Carolina do Norte (EUA); média eficiência, provenientes do Centro da Flórida e Tennessee (EUA), Pesca e Huila (Colômbia); baixa eficiência, as apatitas de Patos de Minas, Araxá, Abaeté, Jacupiranga, Tapira e Catalão.

Deste modo, assumem grande importância o grau de moagem do fosfato, o modo de aplicação e a sua incorporação ao solo. Para fontes de baixa solubilidade recomenda-se a aplicação sob a forma de pó, o qual deve ser incorporado para se obter o máximo contacto com as partículas do solo (COSTA et al., 2008).

Na região Amazônica, predominam solos ácidos, com baixo conteúdo de P disponível e elevada saturação por alumínio e, conseqüentemente, apresentam alta capacidade de fixação de P, implicando em menores taxas de absorção pelas plantas forrageiras. Logo, a utilização de fosfatos de rocha, como fonte de P, surge como uma alternativa tecnicamente viável, considerando-se que suas eficiências agronômicas, notadamente as taxas de dissolução, são estimuladas pela acidez do solo. Geralmente, estes apresentam menor custo unitário e maior efeito residual. Recomenda-se o uso combinado de fontes de P com alta e baixa solubilidade. Deste modo, a fonte mais solúvel forneceria no curto prazo, o P necessário para o rápido crescimento inicial, período crítico de competição com as plantas invasoras. A fonte menos solúvel (fosfato de rocha) liberaria o P paulatinamente, possibilitando maior persistência da pastagem (COSTA et al., 2008).

PROCHNOW et al. (2004) avaliaram a Eficiência Agronômica Relativa (EAR) do fosfato de rocha (FR) de Patos de Minas (rocha de baixa reatividade), aplicado

isoladamente na forma farelada ou em misturas com superfosfato simples (SS), na proporção 1:1, tanto na forma granulada (compactada) quanto em pó. Por meio deste trabalho, verificaram que a EAR do FR combinado com SS foi estatisticamente semelhante com a utilização isolada de SS, para mistura na forma granulada. A EAR quando utilizada somente a FR variou de 1 a 30% concomitantemente para o cultivo de trigo e do azevém. Por meio das equações de regressões, estes autores estimaram a eficiência relativa do FR na presença do SS verificando um aumento de 82 e 95% na matéria seca do azevém e do trigo, respectivamente.

MASSESSINI (2007) verificou diferença no potencial de solubilização em relação à fonte de fósforo (FR de Araxá e Catalão), quanto à topografia (topo, encosta e baixada), a classe de diâmetro de árvores (inferior, médio e superior) e ao solo rizosférico e não rizosférico. O maior potencial de solubilização pela microbiota do solo foi obtido em solo rizosférico de árvores com diâmetro médio do topo na presença de fosfato de Catalão. Para todas as posições topográficas, o fosfato de Catalão, foi superior ao fosfato de Araxá. Dessa forma, pode-se concluir que o FR de Catalão seria o mais recomendado para esta situação.

FACTUR (2008) avaliou o desempenho de fontes de fósforo e matéria orgânica no crescimento e produtividade da cultura de cana-de-açúcar (RB72454) em cana-planta. Os tratamentos utilizados foram: 100 Kg de P_2O_5 ha^{-1} de superfosfato triplo, fosfato reativo de Daoui e fósforo natural de Alvorada. Para o fósforo natural, foram utilizadas 100 (1x), 200 (2x) e 400 (4x) Kg P_2O_5 ha^{-1} suplementado com 2, 4 e 6 Mg ha^{-1} de composto orgânico, respectivamente. Aos 180 dias foi verificado que não houve diferença significativa em relação ao teor de P no tecido foliar para o fosfato reativo e fosfato natural 1x. Além disso, foi verificado que não houve diferença entre o fósforo natural (2x) e o fósforo solúvel. O teor de fósforo no solo foi semelhante entre o fosfato reativo e fosfato natural (2x e 4x) e entre fosfato solúvel e fosfato natural (1x). O rendimento não foi influenciado por nenhum dos tratamentos. Concluiu-se que a utilização de composto orgânico pode favorecer aumento dos teores de P no solo por favorecer melhores condições a este e sua microbiota. Além disso, esta autora concluiu que não há diferença entre as fontes de fósforo associadas ou não a compostos orgânicos.

2.4 Importância das bactérias solubilizadoras de fósforo

Alguns microrganismos presentes nos solos, como bactérias e fungos, possuem papel importante no ciclo natural de P, sendo responsáveis pela hidrólise do fósforo para a forma inorgânica, tornando-o disponível para as plantas. Estes processos são mediados por enzimas (RODRIGUÉZ et al., 2000; GYANESHWAR et al., 2002; SOBRAL, 2003). As bactérias solubilizadoras de fósforo atuam sobre o fosfato insolúvel por meio de fosfatases, principalmente fosfatases ácidas, com a produção de ácidos orgânicos e inorgânicos e/ou redução do pH, obtendo-se então o fosfato disponível para as plantas (NAUTIYAL, 1999; VASQUEZ et al., 2000; VASSILEV & VASSILEVA, 2003; SOBRAL, 2003). Devido ao potencial desses microrganismos, diversos estudos vêm sendo realizados para avaliar a capacidade de solubilização de fósforo inorgânico. Entre os gêneros bacterianos que são conhecidos com esta capacidade, estão as *Pseudomonas*; *Burkholderia*; *Rhizobium*; *Agrobacterium*; *Azotobacter* e *Erwinia* (GOLDSTEIN et al., 1999; RODRIGUEZ et al., 2000; VERMA et al., 2001; GARG et al., 2001).

Entre as bactérias que atuam na solubilização do fósforo inorgânico, as *Burkholderia* estão presentes em um grande número de ambientes de importância ecológica. Muitas bactérias deste gênero foram isoladas dos solos e mostraram uma relação simbiótica com a rizosfera das plantas (COENYE & VANDAME, 2003; PAYNE et al., 2006). As bactérias do gênero *Burkholderia* podem manter interações benéficas como promotoras de crescimento, como agentes biopesticidas (PAYNE et al., 2006) e com capacidade de fixação biológica de nitrogênio (MINERDI et al., 2001; PAYNE et al., 2006) de solubilização de fósforo e de catabolizar substâncias consideradas poluentes (GORIS et al., 2004; PAYNE et al., 2006). O gênero *Burkholderia* consta atualmente de 34 espécies descritas (COENYE & VANDAME, 2003; PAYNE et al., 2006), sendo que nove formam o complexo com *Burkholderia cepacia*.

A habilidade das bactérias endofíticas e epifíticas em relação à solubilização do fosfato inorgânico despertaram grandes interesses em microbiologistas agrícolas. As bactérias endofíticas ganham grande importância durante o processo de colonização,

pois podem inicialmente colonizar superficialmente o hospedeiro e, conseqüentemente, fornecer o nutriente fósforo para o desenvolvimento das plantas (SOBRAL, 2003).

Devido a isso, existe grande interesse por parte do setor agrícola em utilizar essas bactérias como biofertilizantes. Segundo RODRIGUEZ et al. (2000), a estirpe *Burkholderia cepacia* IS-16 tem sido utilizada como biofertilizante, promovendo melhor crescimento nas culturas mais importantes desenvolvidas em Cuba.

A inoculação de bactérias solubilizadoras de fósforo ou o manejo da população destes microrganismos em culturas agronomicamente importantes, como a cana-de-açúcar, traz grandes benefícios ao desenvolvimento das plantas, melhorando o suprimento de fósforo (SOUCHIE et al., 2005). Segundo TORO et al. (1997), citado por SOUCHIE et al. (2005), as bactérias solubilizadoras de fósforo podem atuar como “mychorriza helper bacteria”, favorecendo o estabelecimento de fungos micorrízicos, além de promover a solubilização de fosfatos através da liberação de ácidos orgânicos, produtos do metabolismo bacteriano, favorecendo o desenvolvimento vegetal (GULL et al., 2004; SOUCHIE et al., 2005).

SOUCHIE et al. (2005) realizaram um trabalho com o objetivo de observar os efeitos da inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares, na formação de mudas de espécies arbóreas de *Anadenanthera macrocarpa*, *Mimosa caesalpiniiifolia*, *Acácia holosericea*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Schinus terebinthifolius* e *Eucalyptus grandis* em viveiro. As espécies fixadoras de nitrogênio foram inoculadas com rizóbios e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), e as não fixadoras apenas com FMAs. A metade das mudas foi inoculada com bactérias BSF. A população de BSF decresceu durante a formação da muda, entretanto a inoculação com BSF foi benéfica para formação de mudas de *Anadenanthera macrocarpa*, *Mimosa caesalpiniiifolia* e *Acácia holosericea*, inibindo, contudo, o desenvolvimento de *Enterolobium contortisiliquum*, o que, muito provavelmente, possa ter sido consequência de alguma forma de incompatibilidade.

Para a cana-de-açúcar, existem poucos estudos sobre a solubilização de fósforo e, devido a sua grande expressão econômica, devem-se maximizar os estudos para possibilitar maior benefício para a cultura. YADAV & SINGH (1990) observaram aumento na germinação e no rendimento da cana-de-açúcar quando utilizada a bactéria

Bacillus megatherium, solubilizadora de fósforo, com diferentes doses de fertilizantes fosfatados, na região de Bihar-Índia, em solos aluviais.

BARROTI & NAHAS (2000) avaliaram o efeito de diferentes espécies de plantas, fontes de fósforo e calagem sobre a população microbiana total e solubilizadora de fosfato. Foi feito o isolamento de fungos e bactérias com capacidade de solubilizar hidroxiapatita, fornecendo fósforo solúvel. No experimento, foram conduzidas espécies de plantas (controle, braquiária e guandu), fertilizantes (controle, superfosfato simples e fosfato de rocha, ambos com uma dose de 400 kg ha^{-1} de P_2O_5) e calagem. Observou-se que houve aumento da população bacteriana com a aplicação de calcário. Os fungos aumentaram de forma independente nas parcelas cultivadas com braquiária e fertilizadas com superfosfato. Constatou-se incremento da biomassa microbiana para o controle (23,9%), e com aplicação de superfosfato (30,9%) e da calagem (46,9%). O número de bactérias solubilizadoras de fósforo aumentou com a calagem ou com o plantio de guandu quando adubado com fosfato de rocha, ou com braquiária sem adubação. Os fungos solubilizadores aumentaram na ausência de planta e de adubação, e na presença de guandu com fosfato natural.

SUNDARA et al. (2002) realizaram um trabalho com cana-de-açúcar utilizando diferentes fontes de fósforo e doses de fosfato com ou sem a aplicação de 10 kg ha^{-1} de bactérias solubilizadoras de fosfato (BSF) a uma concentração de 10^8 células g^{-1} . A aplicação de BSF sem a aplicação de fertilizantes fosfatados aumentou a população destes microrganismos e, conseqüentemente, a disponibilidade de fósforo. Entretanto, foi observado que, quando a aplicação de BSF era realizada junto com a adubação fosfatada, um melhor efeito pode ser observado. Em todos os tratamentos onde houve a aplicação conjunta de fertilizantes fosfatados e BSF, foi observado aumento significativo tanto na população de BSF quanto na disponibilidade de fósforo quando comparados com os tratamentos onde não foi feita a aplicação de fósforo. Entre as fontes de fósforo, superfosfato simples e rochas fosfatadas, a população de BSF e os teores de fósforo foram maiores onde o fósforo utilizado provinha de rochas fosfatadas. Quando ocorre a utilização conjunta de BSF e fertilizantes fosfatados, as bactérias solubilizadoras de fósforo podem reduzir o requerimento da dosagem de fósforo em até 25%. Além disso, 50% dos superfosfatos podem ser substituídos por outras fontes de

fósforo, como as rochas fosfatadas, que, além de serem mais baratas que o superfosfato, apresentou maior viabilidade na utilização junto a microrganismos.

MIKANOVÁ & NOVÁKOVÁ (2002) realizaram um estudo para verificar a atividade de bactérias solubilizadoras de fósforo em meio de cultura com doses de KH_2PO_4 (0; 5; 10; 15; 20 e 25 mmol L^{-1} de P). Foram avaliados nove isolados, dos quais seis conseguiram solubilizar mais do que a metade de fosfato tricálcico adicionado ao meio (40 mg L^{-1}). Apenas um isolado conseguiu solubilizar completamente o fosfato tricálcico adicionado e não teve sua atividade afetada pelas quantidades de fosfato solúvel adicionado. Outro isolado já apresentou sua atividade afetada com 5 mmol L^{-1} de P.

SOUCHIE et al. (2005) avaliaram a capacidade e a eficiência de solubilização de Ca_3PO_4 , AlPO_4 e apatita de Araxá em meio sólido e de AlPO_4 e apatita de Araxá em meio líquido por fungos e bactérias de solos. Em meio sólido, todos apresentaram capacidade de solubilização de Ca_3PO_4 . Nenhum apresentou atividade sobre a apatita de Araxá e apenas um isolado de fungo solubilizou fosfato de alumínio. A baixa capacidade de solubilização dos isolados em meio sólido não significa que estes não apresentam esta atividade, pois demonstraram capacidade de solubilização destas fontes de fosfato em meio de cultura líquido. A maioria dos isolados bacterianos apresentaram maior habilidade em solubilizar a apatita de Araxá do que o fosfato de alumínio. Isto pode ter ocorrido pela presença de alumínio que, provavelmente, inibiu o crescimento destes isolados. Dos quatro isolados bacterianos, apenas um apresentou comportamento diferente dos demais no meio com fosfato de alumínio por meio da acidificação do meio, sugerindo que este isolado bacteriano apresenta comportamento parecido com os fungos.

2.5 Caracterização das bactérias solubilizadoras de fósforo

As comunidades microbianas mudam espacial e temporariamente na rizosfera da planta com a presença de fungos micorrízicos que são responsáveis pela indução da qualidade e quantidade de exsudatos em função da microbiota. O desenvolvimento de métodos moleculares para a identificação de comunidades microbianas muda

rapidamente as informações sobre a diversidade de microrganismos associados com fungos micorrízicos em raízes (BIANCIOTTO & BONFANTE, 2002). MARSCHENER et al. (2001) usaram o gene 16S rRNA e análises multivariadas para verificar a mudança da comunidade bacteriana em raízes de milho com a presença de associações micorrízicas.

BIANCIOTTO & BONFANTE (2002) estudaram a interação entre fungos micorrízicos arbusculares e endobactérias. Foi encontrada no interior de *Gigaspora margarita* (BEG 34) uma endobactéria identificada com base na sequência 16S rDNA como pertencente ao gênero *Burkholderia*. Foi realizada a amplificação da região 16S rDNA de isolados de *Scutellospora percica*, *S.castanea* e *G.margarita* e, posteriormente, ocorreram o sequenciamento e o alinhamento com sequências de outras bactérias presentes nos bancos de dados. Por meio da análise pelo *neighbour-joining*, verificou-se que todas as bactérias endossimbióticas sequenciadas em Gigasporaceae puderam ser identificadas como pertencentes ao gênero *Burkholderia*, assim como *Ralstonia* e *Pantoea*.

As bactérias que sintetizam as enzimas fosfatases ácidas apresentam amplo espectro de atividades entre as diferentes espécies. Devido a isso, alguns genes que codificam as fosfatases de diferentes espécies bacterianas, têm sido isolados e caracterizados. RODRIGUEZ et al. (1999) construíram uma biblioteca de *Burkholderia cepacia* IS-16 em *Escherichia coli*, realizando a digestão do DNA cromossomal, com a enzima de restrição *Sau3AI* e o vetor Bluescript SK. Essa biblioteca foi feita para a escolha de clones capazes de crescer em meios seletivos para a detecção de colônias fosfatases - positivas. Dentre os clones obtidos, pFS1, pFS2 e pFS3 continham o plasmídeo recombinante com insertos de DNA de 5,0; 8,0 e 9,0 Kb, respectivamente. A hibridização de DNA realizada constatou a presença de sobreposição de fragmentos de DNA nos três clones, e estes, por sua vez, são todos derivados do DNA genômico de *Burkholderia cepacia* IS-16. A análise do sequenciamento junto com gel de poliacrilamida de proteínas, produzida por *E.coli* contendo pFS3, sugere que o isolado com um fragmento de DNA de 9,0 Kb codifica a porção funcional do transporte da proteína-fosfato.

Os estudos taxonômicos atuais revelaram que o complexo *B. cepacia* contém 9 espécies de bactérias: *B. cepacia*; *B. multivorans*; *B. cenocepacia*; *B. vietnamiensis*; *B. stabilis*; *B. dolosa*; *B. ambifaria*; *B. anthina*, e *B. pyrrocinia* (PIRONE et al., 2005). Esse complexo de bactérias é naturalmente encontrado na rizosfera do milho. PIRONE et al. (2005), estudaram a composição de espécies pertencentes ao complexo *B. cepacia* na rizosfera de milho por meio de métodos dependentes e independentes de cultivo. As bactérias pertencentes ao complexo foram coletadas de raízes de milho e isoladas em meio seletivo de *Pseudomonas cepacia* ácido azelaico tryptamina (PCAT) e Azul de Tripan – Tetraciclina (AT – T), foram submetidas à identificação através da técnica de RFLP e amplificação por reação de PCR específica, utilizando o gene *recA*. Através do método dependente de cultivo, as espécies *B. cepacia*; *B. cenocepacia*; *B. ambifaria*, e *B. pyrrocinia* foram identificadas, enquanto com o método independente de cultivo, apenas *B. vietnamiensis* pôde ser identificada. Além disso, alta heterogeneidade pode ser observada através de *recA* e RFLP entre os clones nomeados para a espécie *B. cenocepacia* quando comparados entre os isolados de *B. cenocepacia* através de meio seletivo.

As bactérias solubilizadoras de fósforo, quando utilizadas como inoculante, propiciam muitas vantagens para a planta e sua produtividade. Devido a isso, existem diversas técnicas moleculares que podem ser utilizadas para a detecção e o isolamento de bactérias eficientes no processo de disponibilização de fósforo à planta. IGUAL et al. (2001) analisaram diferentes métodos para a caracterização de bactérias solubilizadoras de fósforo, sendo a sequência do gene 16S rRNA a mais utilizada como marcador filogenético para a ecologia microbiana. A alta conservação presente na sequência do gene 16S rRNA possibilita uma estimativa da distância filogenética. Os amplicons obtidos através da região 16S rDNA são sequenciados e analisados usando um banco de dados onde estão depositadas sequências do gene 16S rRNA por meio de softwares apropriados, permitindo rápida identificação de bactérias com base na sequências ribossomais. Entretanto, a sequência 16rRNA apresenta nível de resolução taxonômico, viável para a classificação das bactérias quanto ao gênero, mas insuficiente para classificá-las quanto às subespécies. Devido a sua alta conservação, a região 16S rDNA não é suficiente para identificar todas as bactérias presentes no

complexo de *B.cepacia*. Existem estudos que utilizam o gene *recA*, pois este gene permite melhor discriminação do que o gene 16S rRNA para a diferenciação dentro deste grupo (PAYNE et al., 2006).

Uma nova técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida determinado como “Staircase Electrophoresis – (SCE)” tem permitido melhor separação de moléculas estáveis de baixo peso molecular (MEBM). Os perfis de MEBM incluem 5S rRNA e tRNA em microrganismos procariotos e 5,8S rRNA, 5S rRNA e tRNA em eucariotos. Estas moléculas são de grande interesse para a taxonomia com o propósito de verificar a presença destas sequências conservadas em todas as células executando o mesmo papel. Esta técnica foi utilizada em diferentes grupos de microrganismos: *Rhizobiaceae*, *Frankia*, *Clavibacter* e leveduras. Para estes microrganismos, foram obtidos diferentes perfis eletroforéticos, permitindo verificar que todas as estirpes pertencentes a mesma espécie apresentaram o mesmo perfil de MEBM para 5S rRNA e tRNA, e que todas as estirpes do mesmo gênero apresentaram perfil de alta semelhança para 5S rRNA (IGUAL et al., 2001).

Mais recentemente, uma nova variação da PCR denominada “Two Primers - RAPD *fingerprinting*”, tem sido descrita para a caracterização de bactérias. O uso deste método tem como objetivo obter um RAPD *fingerprinting* específico baseado na sequência do gene 16S rRNA de *E.coli*. Dessa forma, tanto o MEBM como a técnica de TP-RAPD podem ser utilizados para identificar as bactérias a nível de espécie e subespécie (RIVAS et al., 2001).

Três famílias de pequenas sequências intergênicas repetitivas têm sido encontradas em eubactéria, nomeadas de REP (Repetitive Extragenic Palindromic) (35-40 pb) (STERN et al., 1984), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) (124-127 pb) (HULTON et al., 1991) e BOX-Box A (54 pb), Box B (43 pb) e Box C (50 pb) (MARTIN et al., 1992). Este método apresenta alto fator de discriminação para a diferenciação de espécies muito próximas taxonomicamente. Os elementos repetitivos parecem estar localizados em distintas posições intergênicas no genoma, em ambas as orientações. Em relação ao BOX, apesar da existência de três elementos, somente a subunidade Box A apresenta-se altamente conservada em bactérias (KOEUTH et al., 1995). Devido a graus elevados de polimorfismo, essas regiões gênicas podem ter uma

participação em processos de evolução adaptativa (VAN BERKUM, 1999). A síntese de *primers* para amplificação desses elementos pode ser realizada a partir de repetições invertidas dos elementos REP, ERIC e da subunidade Box A e, se as repetições estiverem distribuídas no genoma em orientação invertida, então um único primer pode ser suficiente para gerar polimorfismo de DNA (VERSALOVIC et al., 1994).

De acordo com os resultados apresentados por PAYNE et al. (2006), as espécies de *Burkholderia* podem ser discriminadas por meio da análise de uma sequência interna de 385-bp do gene *recA*. Além disso, os autores relatam a análise de parte da sequência do gene *recA*, obtida através pelo uso de primers específicos BUR 3 e BUR 4, tendo como resultado a construção de uma árvore filogenética com a mesma topologia e discriminação quase completa do gene *recA*. Entretanto, as análises obtidas do gene *recA* não são exatamente semelhantes às obtidas pela filogenia da sequência do gene 16S rRNA, indicando maior grau de resolução entre espécies relacionadas dentro do gênero *Burkholderia*.

VALVERDE et al. (2006) realizaram o isolamento de uma bactéria gram-negativa na região de minério de ferro localizado no Estado de Minas Gerais - Brasil, denominada de *Burkholderia ferrariae* (FeGI 01) e com grande potencial para a solubilização de fósforo. Foram feitas análises das sequências baseadas no gene 16S rRNA presentes em FeGI01, com *B.tropicia*, *B.sacchari* e *B.unamae*, apresentando, como resultados, um grau de parentesco próximo (97,5; 97,5 e 97,3% com sequências similares baseadas no gene 16S rRNA). O padrão de ácidos graxos da estirpe FeGI 01 confirmou sua proximidade com o gênero *Burkholderia*. Os resultados das hibridizações DNA-DNA e experimentos fisiológicos e bioquímicos mostraram algumas diferenças genotípicas e fenotípicas das espécies de *Burkholderia*.

2.6 Bactérias produtoras de fitormônios

Entre os mecanismos utilizados por bactérias promotoras de crescimento, destaca-se a produção de fitormônios, como auxinas, citocinas e giberelinas (GRAY & SIMITH, 2005).

O ácido indolacético (AIA) ou auxina é um fitormônio requerido em baixas concentrações, sendo conhecido por sua capacidade de atuar no desenvolvimento da raiz e na divisão celular. Este hormônio é comumente produzido por bactérias promotoras de crescimento como *Aeromonas veronae*, *Agrobacterium* sp., *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium* sp., *Rhizobium* sp., *Enterobacter* sp., entre outras (VESSEY, 2003).

ZAHAROVA et al. (1999) verificaram que 80% das bactérias isoladas de rizosfera são capazes de produzir AIA. Apesar disso, existem poucos trabalhos sobre a síntese de auxinas por microrganismos no solo, mas sabe-se que o aminoácido L-triptofano (L-Trp) é um precursor fisiológico para a produção de auxinas em diversas plantas e microrganismos, e que a enzima chamada ipdC (indole-3-pyruvate decarboxylase-EC 4.1.1.74) é a enzima-chave para a biossíntese deste fitormônio (LEBUHN & HARTMANN, 1993).

EL-KHAWAS & ADACHI (1999) demonstraram que as espécies *Azospirillum brasilense* (ATCC 2970) e *Klebsiela pneumoniae* (ATCC 13883) têm potencial para a produção de AIA em condições laboratoriais. Além disso, verificou que a quantidade deste hormônio produzido pode ser ajustada *in vitro*, o que se torna uma importante característica para a promoção do crescimento vegetal.

MIRZA et al. (2001) estudaram o potencial de isolados do gênero *Enterobacter* como promotores de crescimento em plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas. Neste estudo, pode-se observar aumento de 55% da biomassa de raízes de todas as plântulas inoculadas quando comparadas com o controle. Comparando-se os isolados, observou-se que o incremento máximo da área superficial de raízes ocorreu devido à inoculação com isolados que já são relatados quanto ao potencial de síntese de fitormônio (BASHAN & HOLGUIN, 1997). Entretanto, alguns isolados, apesar de possuírem capacidade para produção de auxina, apresentaram resultados contraditórios. Isto pode ter ocorrido devido a altas concentrações de hormônios que causam a inibição do desenvolvimento de raízes em algumas culturas (BROEK et al., 1999).

Dentre os gêneros de bactérias capazes de influenciar positivamente na fisiologia de plantas, destaca-se a família *Rhizobiaceae* pela capacidade de fixação de N₂ e

solubilização de compostos de fosfato inorgânico (GYANESHWAR, et al., 2002). Além disso, estas bactérias podem colaborar no desenvolvimento de raízes por meio da produção de AIA e formação de nódulos em leguminosas (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004).

DA SILVA (2005) observou por meio do estudo de promoção de crescimento em mudas de cacaueteiro, os efeitos positivos quanto a capacidade de produção de AIA e solubilização de fósforo detectados em *Serratia* sp., *Pseudomonas* sp. e *Enterobacter* sp. Bactérias que apresentam mais de uma característica para a promoção de crescimento vegetal, como por exemplo, a capacidade de mineralização de nutrientes e produção de sideróforos ou solubilização de fósforo e produção de auxinas, são desejáveis para uma possível aplicação no campo, proporcionando o aumento da produção agrícola (VERMA et al., 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estirpe-padrão e fontes de fósforo

As estirpes utilizadas como padrões de solubilização de fósforo *Burkholderia ferrariae* FeGI01 e *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 foram adquiridas da *Colección Española de Cultivos tipo* (CECT) - *Universidad de Valencia* e EMBRAPA - Agrobiologia, respectivamente. As fontes de fósforo utilizadas foram fosfato de cálcio $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$ e os fosfatos de rocha de Catalão (28% de P) e Araxá (24% de P), cedidas por Adubo Catalão Com. e Indústria Ltda. - Catalão-GO, e pela Bunge Fertilizantes S.A.-Unidade Araxá-MG, respectivamente.

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica de Plantas e Microorganismos (LBMP), na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Jaboticabal-SP.

3.2 Amostras de solo e variedades de cana-de-açúcar

As amostras de solo foram coletadas de 0 a 20 cm de profundidade, seguindo os procedimentos para coleta de amostra de solo (EMBRAPA, 2005) em áreas de Usinas sucroalcooleiras, nos municípios de Pontal (Latossolo Vermelho Escuro) (21°02'51,20" S 48°06'31.81" W), Pitangueiras (Latossolo Roxo) (20°59'43.13" S 48°09'52.26" W) e Jaboticabal (Latossolo Roxo)(21°18'20.99"S 48°11'31.42"W).

As regiões amostradas nos municípios de Pontal e Pitangueiras receberam adubação com torta de filtro, em área total, na dosagem de 75 t ha⁻¹ e vinhaça (240 kg de K₂O ha⁻¹). Nestes municípios, a cana-soca estava com cerca de um mês após o corte realizado com o auxílio da queimada ou colheita mecanizada. No município de Jaboticabal, a cana-de-açúcar recebeu 500 kg ha⁻¹(8-28-16) de NPK e estava com aproximadamente um ano.

Para facilitar o reconhecimento e a identificação da área amostrada, os isolados foram nomeados da seguinte forma: A5 (Amostra 5) I42 (isolado 42) para Pontal e

Pitangueiras, sendo que nestes municípios o número de amostras foram 9 (A1 a A9). Para o município de Jaboticabal os isolados foram identificados por USC.

As variedades de cana-de-açúcar SP791011(áreas A1 a A3) e SP801842 (USC) foram cultivadas nos municípios de Pontal e Jaboticabal, respectivamente. A variedade RB855453 foi cultivada em Pontal (A4 e A5) e Pitangueiras (A6 a A9)

3.3 Isolamento de bactérias

Para o isolamento, as amostras de solos foram peneiradas para retirar a presença de raízes, folhas e outros materiais. As diferentes estirpes bacterianas foram isoladas fazendo-se diluição seriada de uma suspensão homogênea de 10 g de solo em 90 mL de solução salina (NaCl 0,85 %), mantidas a 25°C por 30 min, sob agitação de 250 rpm. As diluições 10^{-5} a 10^{-8} foram plaqueadas no meio NBRIP sólido (NAUTIYAL et al., 1999): 10 g de glicose; 5g de $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$; 5g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g de KCl; 0,1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,5% de ágar e pH 7,0 para volume total igual a 1L. As bactérias foram incubadas por 15 dias, a 28°C.

A confirmação do isolamento de bactérias com capacidade de solubilização de fosfato de cálcio foi realizada por meio da presença de um halo claro ao redor da colônia.

Os isolados foram mantidos em meio de cultura DYGS: 2g de glicose; 1,5g de Peptona; 2g de extrato de levedura; 0,5g de $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; para 1L, pH 6,8 (RODRIGUEZ NETO et al., 1986) e depois foram estocados em glicerol a -80°C.

3.4 Cultivo e Caracterização de novos isolados

3.4.1 Cultivo de Bactérias, extração e purificação do DNA genômico

As diferentes linhagens foram cultivadas em meio DYGS sólido. Para a extração de DNA (SAMBROOK et al., 1989), os isolados foram crescidos em 50 mL do meio que proporcionou a menor quantidade de goma durante 24 horas, a 28° C, sob agitação de 180 rpm. Cada suspensão bacteriana foi centrifugada a 12.000xg por 30 min, a 4°C. O

sedimento foi lavado com solução salina (NaCl 0,85%) e coletado após centrifugação de 15.600xg por 5 min. Para lise bacteriana, o sedimento foi ressuspensionado em 1 mL de solução salina/1mM EDTA e pré - incubado a 37°C, por 10 minutos. Em seguida, colocou-se 500 µL de lisozima (5mg mL⁻¹) preparada em tampão Tris 24 mM/EDTA 10 mM/Dextrose 50 mM, e 15µL de RNase (10mg mL⁻¹) ,incubando-se 56°C, por 30 min.

Após este tempo de incubação, foram adicionados 500 µL de perclorato de sódio 5M, gota a gota, sob suave agitação, e 2 mL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1). As amostras foram deixadas por 1 hora, a 8°C (banho de gelo), sob agitação orbital a 220 rpm. Foi efetuada uma centrifugação de 12.000xg por 20 min, a 4°C. A fase superior aquosa foi recolhida e misturada com 2mL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), sendo mantida por 20 min, a 8 °C, sob agitação de 220 rpm. Foi feita mais uma centrifugação e, posteriormente, foi coletada a fase superior.

Para a precipitação do DNA genômico, foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto (-20°C) com incubação a -20°C, por cerca de 16 horas. O material foi centrifugado a 5.860 x g por 20 min, a 4°C. Após descartar o sobrenadante, o precipitado foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70% (-20°C) e secado à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspensionado em tampão TE 10:1(Tris-HCl-10 mM; EDTA-1 mM; pH 8,0) em espectrofotômetro em 260 nm e analisado através de eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.4.2 Quantificação do DNA genômico

Para a quantificação do DNA, fez-se uma diluição de 10X do DNA em água milli-Q. A leitura da absorbância foi realizada em um espectrofotômetro Beckmann-Du 640-B, onde se utilizou o comprimento de onda 280 nm para a determinação de possíveis contaminações do mesmo com proteína e/ou fenol. Otimizou-se o DNA quando a leitura da absorbância da relação 260/280 nm apresentou-se na faixa entre 1,7 e 2,0. Para os cálculos da concentração do DNA, considerou-se o padrão de uma unidade de absorbância a 260 nm, como equivalente a 50 µg de DNA por mL de solução (SAMBROOK et al.,1989).

A relação entre as absorbâncias 260/280 nm estima o grau de pureza do DNA. Essa relação é influenciada pelo pH e pela concentração de sais da solução na qual o DNA foi diluído. DNAs diluídos em água mantêm uma relação na faixa entre 1,5 e 1,9, enquanto DNAs diluídos em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 mantêm a relação entre 1,8 e 2,1. Contudo, quanto mais próximo de 1,8 for a relação, maior a pureza do DNA extraído. Se a relação não apresentar os valores adequados, pode-se fazer uma purificação do DNA com o objetivo de eliminar: proteínas, resíduos de fenol ou outro composto contaminante e, depois de obter uma relação adequada, apenas o valor de absorbância a 260 nm é utilizado para o cálculo da concentração de DNA.

A qualidade do DNA genômico foi avaliada por meio da comparação visual com a intensidade das bandas do 1Kb ladder (Fermentas[®]), por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8 %.

3.4.3 Amplificação do DNA por *primers* correspondente ao gene 16S rRNA

O gene 16S rRNA presente nos isolados foi amplificado pela Reação em cadeia da polimerase (PCR), usando os *primers* universais fD1 e rD1 (WEISBURG et al., 1991). A reação contendo 200 mM de deoxinucleotídeos, 5 pmoles de cada primer, 2 mM MgCl₂, 10X Tampão para PCR e 1,25U de Taq DNA polimerase (Fermentas) e 40 ng de DNA foi realizada em termociclador Gene Amp[®] PCR System 9700 Applied Biosystem, com um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 min; seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, pareamento a 56°C por 40 min; e extensão a 72°C por 1 min e 30 seg; extensão final a 72°C por 7 min; e manutenção a 4°C (WEISBURG et al., 1991).

3.4.4 Amplificação do DNA pelo *primer* correspondente a sequência repetitiva BOX-A1R

DNAs cromossômicos dos isolados foram amplificados usando-se o *primer* BOX - A1R (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G -3') (MARTIN et al., 1992).

As condições para reação de PCR utilizando o *primer* BOX-A1R foram: 30 ng de DNA molde, 10 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, tampão 10X, 5 pmoles μL^{-1} de primer, 1U de Taq DNA polimerase (Fermentas[®]) e água milli-Q esterelizada para completar o volume final de 20 μL .

A amplificação foi realizada no termociclador Gene Amp[®] PCR System 9700 Applied Biosystems. Para o *primer* BOX-A1R (Fermentas[®]), foi realizado o ciclo proposto por MITTAL & JOHRI (2007) com algumas modificações: 1 ciclo a 95°C por 5 min; seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min; pareamento a 60°C por 1 min; e extensão a 72°C por 1 min e 30 seg; extensão final a 72°C por 5 min e um ciclo final de 5°C.

3.4.5 Eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etídio e documentação

A separação dos produtos amplificados pela PCR foi feita em géis de agarose (BioRad), na concentração de 1,5% , 1 hora a 80V para os produtos de PCR da região 16S rDNA e 2%, 9 horas e 60V para o BOX-A1R em cuba horizontal (Max Cell EC360M), utilizando como peso molecular o marcador 1 kb DNA em tampão TBE (89 mM de Tris-base, 89 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA, pH 8,3).

A agarose foi fundida em tampão TBE 1X, em forno de micro-ondas, na potência máxima, deixando-a esfriar em temperatura ambiente até atingir aproximadamente 60°C, sendo em seguida adicionados brometo de etídio ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e agarose vertida na cuba da eletroforese. Uma vez a agarose solidificada, foram adicionados 1.800 mL de tampão TBE. Os produtos da amplificação (5 μL) foram misturados com 2 μL de tampão de amostra (glicerol 30%, EDTA 100 mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,30%) e aplicados nos poços do gel. Como padrão do peso molecular, foi usado 1 Kb DNA ladder (Fermentas[®]).

Os géis foram visualizados através da incidência de luz ultravioleta, identificados e registrados através de um sistema de documentação de géis GelDoc1000 (BioRad), com opção de imagem invertida, a fim de produzir imagem negativa, para facilitar a visualização das bandas.

3.4.6 Reação da PCR para sequenciamento do fragmento gênico 16S rDNA

O produto de PCR foi purificado utilizando-se do Kit GENE CLEAN® (Bio 101). As reações de sequenciamento foram realizadas em microplacas, utilizando cada *primer* de forma independente com 80 ng de DNA, 1,0 µL de dye (DYEnamic ET, Amersham Biosciences), Tampão 2,5X (400 mM Tris-HCl, pH 9,0; 10 mM MgCl₂), 1,0 µL dos *primers* fD1 e rD1 (5 pmoles) e 1,0 µL dos *primers* internos (3 pmoles): 362f (região 339-362) (5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3'), 786f região (746-786) (5'AAGCGTGGGGAGCAAACAGG-3') e 203f região (1179-1203) (5'AGGTGGGGATGACGTCA-3').

Para os *primers* internos, foi utilizado o seguinte programa: desnaturação a 95°C por 2 min; seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 seg, pareamento a 50°C por 4 seg, extensão a 60°C por 4 min; e manutenção a 4°C (MENNA et al., 2006).

3.4.7 Sequenciamento dos produtos da PCR utilizando o equipamento capilar ABI 3700

Após a reação, as amostras foram preparadas para o sequenciamento do produto de PCR em microplaca. Foram adicionados 80 µL de isopropanol 75%, sendo as mesmas agitadas levemente. Posteriormente, as amostras permaneceram por 15 min em temperatura ambiente e foram centrifugadas a 3.220 x g por 45 min, a 20°C. Após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante, e a placa foi deixada por 5 min em temperatura ambiente, invertida em papel absorvente. Foram adicionados 200 µL de etanol 70%, e a microplaca foi centrifugada a 3.220 x g por 10 min, a 20°C. Após a centrifugação, foi descartado novamente o sobrenadante, e a placa foi invertida novamente sobre papel absorvente para uma breve centrifugação da placa (spin). As amostras foram secas em fluxo laminar por 30 min.

3.4.8 Análise do sequenciamento e posição filogenética baseada no gene 16S rRNA

Para se verificar a qualidade das sequências geradas, foi utilizado o programa “Sequencing Analysis 3.4”, gerando os eletroforogramas que foram submetidos à análise pelo programa “Phred/Phrap/Consed” (GORDON et al., 1998). A seleção das sequências adequadas foi realizada utilizando os programas do pacote Phred/Phrap/Consed, o qual analisa a qualidade das sequências, visualizando graficamente, gerando arquivos no formato “fasta”, na qual o nível de exigência foi de 200 bases com qualidade Phred maior ou igual a 20 (EWING et al., 1998), auxiliado pelo programa “Contgen.pl”.

Preliminarmente, as sequências foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos, com sequências depositadas no banco de dados GenBank através do programa BLAST “Basic Local Alignment Search Tools” (ALTSCHUL et al., 1997), em uma “workstation” SUNBLADE 1000 (SUN Microsystems), pelo “site” do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (<http://lbmp.fcav.unesp.br/blast>).

Além disso, essas sequências foram comparadas com outras do Ribossomal Database Project II (RDPII), utilizando o programa Classifier com 95% de confiança para atribuir as sequências 16S rRNA (WANG et al., 2007). O RDP utiliza como classificador o Naive Bayesian rRNA Classifier (Versão 1.0, novembro 2003) e a taxonomia hierárquica baseia-se no Manual de sistemática bacteriológica Bergey (GARRITY et al., 2007).

As sequências obtidas foram alinhadas e comparadas pelo programa “CLUSTALX V.4.0.” (LARKIN et al., 2007) com base no gene 16S rRNA. Além disso, para esta comparação foi realizada a busca de sequências depositadas no GenBank, com o propósito de agrupar as bactérias nos respectivos gêneros.

Para matriz de distância das árvores filogenéticas foi utilizado o método de construção da árvore *neighbor-joining* (SAITOU & NEI, 1987) e o algoritmo “Jukes-Cantor” (JUKES & CANTOR, 1969), respectivamente processado pelo programa de Análise Genética de Evolução Molecular MEGA versão 4.0 (TAMURA et al. 2007).

3.4.9 Análises individuais e combinadas dos produtos de PCR da sequência repetitiva BOX- A1R

Para o cálculo da matriz de similaridade, foi utilizado o coeficiente de Jaccard (LEGENDRE & LEGENDRE, 1983). O coeficiente de Jaccard (i, j) é igual a $a/(a+b+c)$, onde a, b e c são coeficientes definidos da seguinte forma:

		J	
		presença	ausência
i	presença	a	b
	ausência	c	-

As letras “i” e “j” referem-se a duas estirpes, sendo indicadas presença e ausência de bandas; a é igual ao número de coincidências; b+c é igual a um número de discrepâncias.

A partir da análise do bandeamento produzido por cada reação de amplificação do marcador, é conferido parâmetro 1 para a presença de banda e zero para a ausência de banda, sendo possível à elaboração de uma matriz binária, analisada pelo programa de sistema de análise multivariada (NTSYS-PC). O dendrograma foi constituído pelo método do Agrupamento Hierárquico *neighbor-joining*, através do programa SAHN do NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) (ROHLF & SLICE, 1982), que compara as estirpes, duas a duas, agrupando-as de forma tanto mais similar quanto mais coincidente forem os fragmentos de mesmo peso molecular. Para a realização da análise foi utilizado o programa *Free -Tree* (PAVLICEK et al., 1999).

3.5 Avaliação de solubilização em meio sólido e líquido

A avaliação em meio NBRIP sólido contendo fosfato de cálcio (5 g L^{-1}) foi realizada até o 15º dia após a inoculação com um repique no centro da placa. Foi

mensurado o diâmetro do halo da colônia a cada cinco dias, e no 15º dia foi calculado o índice de solubilização (IS) por meio da razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia (BERRAQUEIRO et al., 1976).

De acordo com SILVA FILHO & VIDOR (2000), a solubilização pode ser classificada em baixa solubilização ($IS < 2$), média solubilização ($2 < IS < 3$) e alta solubilização ($IS > 3$). A partir de 61 isolados, foram selecionados os que obtiveram um índice maior ou igual a três, no 15º dia após a inoculação, além das bactérias *B. cepacia* e *B. ferrariae*, que foram utilizadas como padrões para avaliação quanto à solubilização biológica de fosfato de cálcio, fosfato de Catalão e fosfato de Araxá. Para os isolados selecionados, foi realizado novamente o repique em triplicata no meio de cultura NBRIP.

As bactérias utilizadas foram cultivadas em meio DYGS como pré-inóculo. Posteriormente os meios NBRIP com fosfato de cálcio (5 g L^{-1}) (NAUTIYAL, 1999) e com $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de cada rocha fosfatada (XIAO et al., 2008). foram inoculados com 2% v/v do pré-inóculo a $2 \times 10^{-8} \text{ UFC mL}^{-1}$ para o meio.

O experimento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x12 (3 fontes de fósforo x 12 isolados), com três repetições. Como testemunha, foi incubado o meio líquido e sólido sem inóculo. Os frascos foram vedados e incubados a 30°C, 160 rpm, por sete dias, em agitação constante (Innova™ 4335 New Brunswick Scientific).

Alíquotas de 1 mL foram coletadas assepticamente a cada doze horas para determinação de fósforo solúvel e taxa de crescimento (D.O. a 600 nm). Devido à presença de partículas insolúveis de $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$ no sobrenadante, as amostras foram sedimentadas por centrifugação a $15.294 \times g$, 15 min e à temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado para avaliação do fosfato solúvel pelo método de molibdato-vanadato sem digestão (MALAVOLTA et al., 1989). Ao precipitado, foi adicionado 1 mL de água Milli-Q para ressuspendê-lo. A DO foi monitorada a 600 nm no biofotômetro (Eppendorff®).

Ao final do período de incubação (168 horas) foi avaliado o pH de todos os isolados, para verificar as mudanças decorrentes do crescimento e da solubilização.

Os resultados obtidos foram analisados por meio da comparação de médias pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software AgroEstat (BARBOSA & MALDONADO JUNIOR, 2008).

3.6 Avaliação dos Isolados selecionados quanto à síntese de AIA

Dentre os isolados obtidos, foi feita uma pré-seleção como descrita anteriormente. Além da avaliação de solubilização de fósforo, também foi avaliada a produção de ácido indolacético (AIA) por meio do método colorimétrico descrito por GORDON & WEBER (1951), com algumas modificações. Inicialmente, as bactérias foram crescidas em 10 mL de meio DYGS (RODRIGUEZ NETO et al., 1986) por 24 h, a 30°C, sob agitação constante de 160 rpm. Posteriormente, este pré-cultivo foi utilizado para inocular 100 mL do mesmo meio com 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (TSAVKELOVA et al., 2005) de triptofano até 5 Kletts, que foi mantido sob as mesmas condições anteriores. A cada 12 horas, foram assepticamente coletados 2 mL de meio de cultura, onde se pode determinar a DO (600nm). Estas amostras foram centrifugadas por 10 min, a 10.000 xg e temperatura de 10°C. Em seguida, 1 mL do sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubo de ensaio de 25 mL, sendo adicionados 2 mL do reagente de Salkowisk ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2% e HCl_3 37%). Os tubos foram mantidos no escuro por 30 min (HARTMANN et al., 1983). A presença do hormônio foi visualizada pela coloração rósea e quantificada pela leitura da absorbância a 530 nm em um espectrofotômetro. Todas as dosagens foram realizadas em triplicata. Como controle negativo, utilizou-se apenas o meio de cultura DYGS. Para a estimativa de produção de AIA, utilizou-se uma reta - padrão com ácido indolacético (Sigma), com 98% de pureza, nas seguintes concentrações: 0; 1; 3; 5; 7; 10; 25; 50; 100 e 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e Condições Ambientais

O isolamento em meio NBRIP (NAUTIYAL, 1999) possibilitou a obtenção de 61 isolados (Tabela 1).

Os solos de Pitangueiras e Jaboticabal são classificados como latossolo roxo, enquanto que em Pontal o solo recebe a denominação de latossolo vermelho escuro. Todas as amostras apresentaram teor de argila maior que 35%, sendo considerados argilosos. Solos com textura argilosa apresentam maior retenção de água e capacidade de troca catiônica (CTC) resultando em maiores teores de nutrientes (ESPERA & NASCIMENTO JUNIOR, 2006).

As concentrações de P no solo (mg dm^{-3}) não influenciaram na taxa de isolamento, pois, para os maiores (Jaboticabal e Pitangueiras) e menores (Pontal) valores de P, foi encontrado o menor número de isolados, sendo que o maior número de isolados foi obtido em áreas com valores de 49 e 21 mg dm^{-3} de P, respectivamente (Tabela2).

A baixa taxa de isolamento em Jaboticabal quando comparado a Pontal e Pitangueiras pode ter ocorrido devido à aplicação de vinhaça e torta de filtro, que influencia nos aspectos físicos e químicos do solo.

Confrontando os municípios de Pontal e Pitangueiras que receberam o mesmo manejo, a diferença da taxa de isolamento pode ocorrer devido à concentração do elemento cálcio que pode interferir no processo de solubilização. A disponibilização de fósforo ocorre principalmente pela formação de ácidos orgânicos e inorgânicos, e os elevados teores de cálcio favoreceriam complexação do íon fosfato ao cálcio (COSTA et al., 2008)

Existem diversos estudos sobre o efeito da vinhaça nos solos, ao longo do tempo, como o aumento do pH, da CTC, fornecimento e disponibilidade de alguns nutrientes, melhoria da estrutura do solo e da atividade biológica microbiana. O aumento da atividade microbiana deve-se à existência de matéria orgânica na vinhaça,

fornecendo energia aos microrganismos e possibilitando o crescimento e a atividade da massa microbiana sob as transformações no solo (FERREIRA & MONTEIRO, 1987).

A torta de filtro é um resíduo proveniente da filtração a vácuo para separar o lodo dos decantadores com o bagacilho no processo de produção de açúcar. KORNDÖRFER & ANDERSON (1997) afirmam que a torta de filtro promove alterações na disponibilidade de nutrientes como P, Ca e N, aumento nos teores de C orgânico, aumento na CTC e diminuição nos teores de Al trocável.

Durante a queima do canavial, a temperatura nas camadas superficiais pode chegar acerca de 200°C, o que ocasiona no solo, a perda de nutrientes essenciais para o desenvolvimento como N, P e S. Apesar disso, a atividade microbiológica não é afetada diretamente pelas altas temperaturas decorrentes das queimadas, mas, sim, pela redução do palhiço, ano após ano, que favorece a redução do teor de matéria orgânica, essencial para atividade microbiana (RIPOLI & RIPOLI, 2004). Os dados apresentados por estes autores confirmam aos resultados obtidos neste trabalho, que obteve a maior taxa de isolamento em regiões com queimada (amostras 1, 2, 3, 4,5 e 6).

O número de isolados foi maior em áreas com queimadas e aplicação de vinhaça e torta de filtro, mostrando que a queimada não prejudicou os benefícios destes resíduos da indústria canvieira sob a atividade microbiana.

CASAGRANDE (1991) mostra que a ordem de absorção para cana-de-açúcar é de: N > K > Ca > Mg > S > P; K > N > Ca > Mg > S > P; K > N > Ca > Mg > P > S, respectivamente para as unidades de solo Latossolo Vermelho escuro (LE), Latossolo Roxo (LR) e Podzólico Vermelho Amarelo (PV). Para cana-soca a ordem é de: K > N > Mg > Ca > S > P; K > N > Mg > Ca > P > S; K > N > Mg > Ca > P > S, respectivamente para as unidades LE, LR e PV. Podendo concluir que o fósforo é um elemento pouco extraído pela cana-de-açúcar em ambos os solos estudados.

Dentre as três variedades de cana-de-açúcar utilizada a RB855453 (variedade precoce) foi a que apresentou o maior número de isolados (45) seguido de SP791011 (variedade média) com 14 e 2 para SP801842 (variedade média)

Realizando uma comparação entre classe de solo e variedade, a maior taxa de isolamento obteve-se com RB855453 em latossolo vermelho escuro no município de

Pontal. Já em Pitangueiras com a mesma variedade, mas com latossolo roxo, o número de isolados foi menor.

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam que existe uma interação entre variedade, solo e microrganismo como observado por TASSO JUNIOR (2007), que realizou um estudo sobre caracterização agrotecnológica de cultivares de cana-de-açúcar nos municípios de Colina e Olímpia – SP utilizando diferentes variedades de ciclo precoce, médio e tardio. Em relação ao acúmulo de macronutrientes nos colmos das variedades cultivadas no município de Colina, a variedade precoce RB855156, destacou-se para o acúmulo K, Mg e S, sem, contudo ser a mais produtiva. A variedade mais produtiva (RB855453) destacou-se apenas o que se refere ao acúmulo de N, Mg e S. Por outro lado, a variedade menos produtiva (SP89-1115) apresentou grande acúmulo de P, N, Ca, Mg e S. Essas mesmas variedades cultivadas em Olímpia apresentaram comportamentos diferentes, ou seja, não houve destaque em termos de acúmulo de macronutrientes para uma variedade específica.

Tabela 1. Índice de solubilização (diâmetro do halo solubilizado/diâmetro da colônia (BERRAQUEIRO et al., 1976) calculado para todos isolados obtidos.

Avaliação da Eficiência de solubilização de fosfato (mm)			
Isolado	15 dias		IS-15dias
	Øcolônia	Øhalo	
A5I74	1,2	1,8	1,50
A2I61	0,4	1,5	3,75
A2I62	0,9	1,4	1,56
A2I63	1,0	1,5	1,50
A5I72	0,9	2,4	2,67
A5I71	0,7	1,5	2,14
A5I73	1,0	1,9	1,90
A5I66	1,7	2,3	1,35
A4I65	0,8	1,5	1,88
A5I67	1,3	2,6	2,00
A2I58	0,5	1,2	2,40
A2I57	0,6	1,1	1,83
A2I60	0,4	1	2,50
A5I42	0,5	2,5	5,00
A5I44	1,3	1,5	1,15
A5I55	0,4	1,6	4,00
A2I19	1,4	1,7	1,21
A2I20	1,5	1,6	1,07
A5I37	1,8	3,3	1,83
A2I21	0,6	1,5	2,50
A5I35	1,1	2,1	1,91
A5I34	1,3	1,7	1,31
A5I32	0,8	1,5	1,88
A5I41	0,7	1,8	2,57
A5I40	0,9	2,2	2,44
A5I53	0,5	2,1	4,20
A5I50	1,3	3,5	2,69
A5I51	1,3	3,2	2,46
A5I52	1,9	2,3	1,21
A5I46	0,6	2	3,33
A5I47	0,6	1,3	2,17
A5I56	0,4	1,0	2,50
A2I23	1,1	1,4	1,27
A2I25	1,4	1,7	1,21
A2I24	1,1	1,8	1,64
A5I54	0,9	2,0	2,22

Continuação Tabela 1:

Isolado	Ø colônia	Ø halo	IS-15 dias
A5I38	1,1	1,8	1,64
A4I27	1,0	1,5	1,50
A4I30	0,8	2,0	2,50
A4I31	1,1	1,8	1,64
A4I26	0,5	1,3	2,60
A5I45	1,0	1,5	1,50
A3I14	0,4	2,5	6,25
A7I12	0,9	2,0	2,22
A7I15	0,7	1,3	1,86
A7I11	1,9	4,3	2,26
A7I11.1	0,8	2,1	2,63
A7I16	0,5	1,2	2,40
A7I17	0,8	2	2,50
A6ID	0,8	2	2,50
USC8	0,6	3,0	5,00
USC7	0,4	1,7	4,25
A1I3	1,2	2,0	1,67
A8I1	1,3	3,5	2,69
A7I10	0,4	1	2,50
A1I5	1,0	2	2,00
A6I8	0,2	0,8	4,00
A5I36	1,2	3,0	2,50
A5I73	0,8	1,8	2,25
A6I9	0,5	1,2	2,40
A9IG	0,4	3,0	7,50
<i>Burkholderia ferrariae</i>	0,6	3,2	5,33
<i>Burkholderia cepacia</i>	0,8	3,3	4,13

Tabela 2. Análise química de solo das áreas correspondente às amostras.

Áreas	Solo	Nº de Isolados	pH	CaCl ₂	M.O.	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	CTC	V %
A6		3	6,3	35	111	5,4	82	23	0	19	129,4	85,3	
A7/A8/A9	Pitangueiras	10	5,8	38	75	5,8	86	28	0	26	145,8	82,2	
A5/A4	Pontal	32	6,3	31	49	5,1	66	16	0	17	104,1	83,7	
USC	Jaboticabal	2	5,9	19	96	9,7	70	17	0	20	116,7	82,9	
A1/A2	Pontal	13	5,4	23	21	7,1	25	13	0	30	75	60	
A3		1	5,2	23	9	5,4	28	14	0	33	80	58,9	

4.2 Avaliação de solubilização em meio sólido

Antes de realizar o teste de eficiência de solubilização em meio líquido foram selecionados os isolados que obtiveram valores de $IS > 3$ no 15º dia após a inoculação em meio sólido com fosfato de cálcio.

A maioria dos isolados apresentaram IS médio ($2 < IS < 3$), somente dez isolados e as duas bactérias utilizadas como padrões de solubilização apresentaram alto índice de solubilização ($IS > 3$) (Tabela 3 e Figura 1). Estes índices de solubilização e a proporção com que eles foram encontrados são semelhantes aos obtidos por SILVA FILHO & VIDOR (2000), MASSENSINI, (2007) e NAUTIYAL (1999), que obteve o diâmetro dos halos variando de 2 a 7 mm. para os isolados do gênero *Pseudomonas* e de 2 a 5 mm para *Bacillus*. Os isolados *Candidatus B.verschuerenii* (A9IG) e *Burkholderia* sp. (A3I14) apresentaram IS igual a 7,33 e 6,47, respectivamente, sendo estes superiores aos obtidos pelas bactérias utilizadas como padrões. Os outros isolados selecionados apresentaram IS entre 3,17 e 5,4, valor próximo aos obtidos por *B.cepacia* e *B.ferrariae*.

Tabela 3. Avaliação da capacidade de solubilização em meio NBRIP sólido.

Isolado	IS - 15 dias
<i>Arthrobacter</i> sp. (A2I61)	3,92 ef
<i>Labrys portucalensis</i> (A5I42)	4,91 cd
<i>Flexibacter sancti</i> (A5I53)	4,35 cd
<i>Chlorella protothecoides</i> (A5I46)	3,17 f
<i>Burkholderia</i> sp (A3I14)	6,47 b
<i>Enterobacter</i> sp (USC8)	5,40 c
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i> (USC7)	4,08 e
<i>Candidatus Burkholderia verschuerenii</i> (A9IG)	7,33 a
<i>Burkholderia gladioli</i> (A6I8)	4,25 de
<i>Burkholderia</i> sp (A5I55)	3,75 ef
<i>Burkholderia ferrariae</i> (BF)	5,31 c
<i>Burkholderia cepacia</i> (BC)	4,31 f

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si a 5% a de probabilidade pelo teste de Tukey.

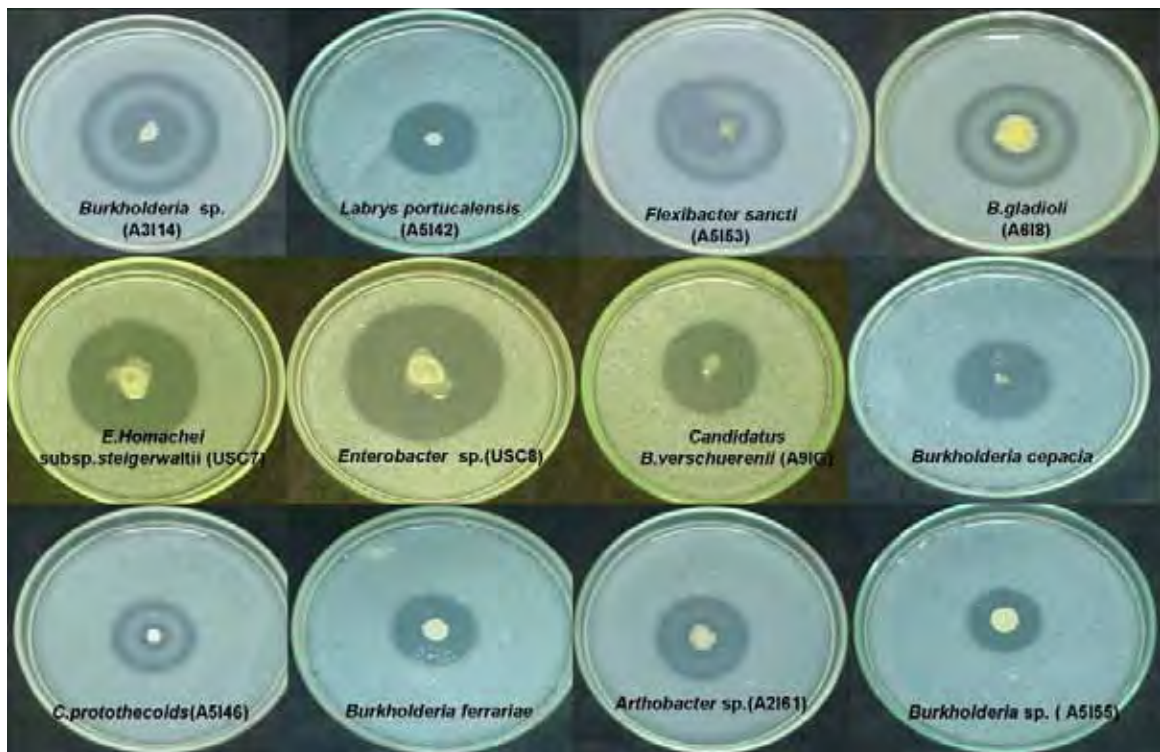


Figura 1. Capacidade de solubilização dos isolados selecionados no 15º dia após a inoculação.

4.3 Avaliação da qualidade do DNA genômico

A qualidade do DNA genômico isolado foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose. Foi utilizado o padrão 1 Kb DNA *ladder* (Fermentas®) como padrão de tamanho molecular. O aparecimento de uma única banda íntegra de alto peso molecular indica que o processo de extração do DNA foi bem-sucedido, e o mesmo não se encontra degradado (Figura 2).

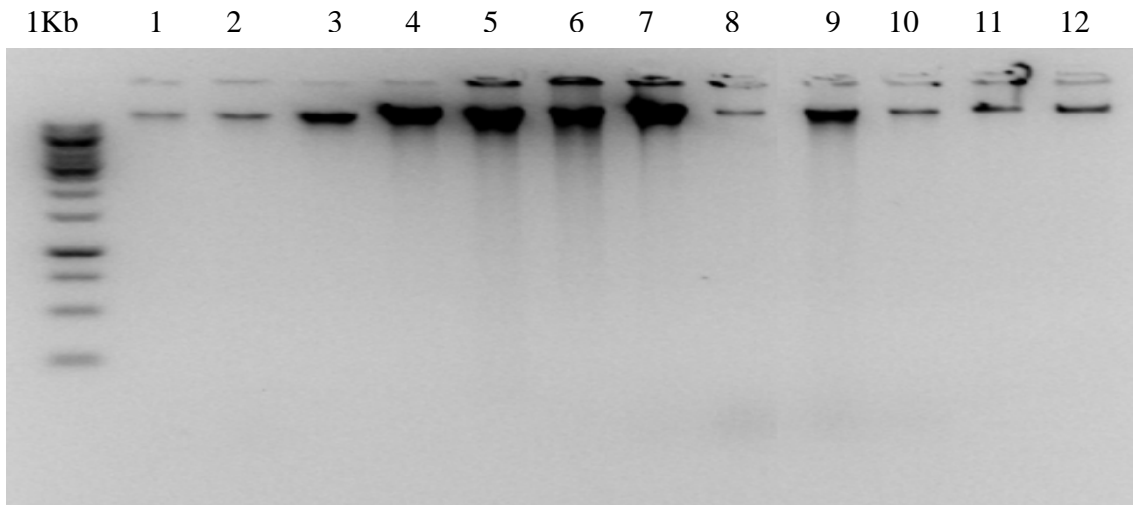


Figura 2. Avaliação do DNA genômico extraído dos 10 isolados e das duas estirpes-padrão, através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. P-padrão 1 Kb DNA ladder (Fermentas®); 1 - *Arthrobacter* sp.(A2I61); 2 - *Burkholderia* sp. (A3I14); 3 - *Labrys portucalensis* (A5I42); 4 - *C. protothecoides* (A5I46); 5 - *Flexibacter sancti* (A5I53); 6 - *Burkholderia* sp. (A5I55); 7 - *B. gladioli* (A6I8); 8 - *C.B. verschuerenii* (A9IG); 9 - *E. homachei* subsp. *steigerwaltii* (USC7); 10 - *Enterobacter* sp. (USC8); 11-*Burkholderia cepacia*; 12-*Burkholderia ferrariae*.

4.4 Análises taxonômicas individuais dos isolados

Com o programa BLAST do GenBank realizou-se uma pesquisa cuja comparação ocorreu entre os dados obtidos neste trabalho com os que já se encontram no banco de dados. Permitiu a caracterização e verificou a similaridade dos isolados com uma porcentagem de identidade variando de 91 a 99%. O isolado A5I46 apresentou baixa similaridade com os resultados depositados no Banco de Dados, supostamente devido ao isolamento e sequenciamento de novos organismos pouco estudados. O isolado A5I46 foi identificado como *C. protothecoides*. Existem relatos quanto à capacidade de solubilização de fosfato por microalgas, como descrito é GRUPTA et al. (1998) que observaram esta atividade em cianobactérias.

Os resultados obtidos para os isolados A3I14; A5I55; A6I8 e A9IG confirmam os resultados de que o gênero *Burkholderia* é um dos principais quanto à solubilização de fosfato. Além disso, os isolados USC7 e USC8 foram identificados como sendo enterobactérias, que também é considerado outro grupo com capacidade solubilizadora (KAMPFER, 2003). O isolado A3I14 apresentou alta similaridade com *Burkholderia caribensis* (AY586519 GenBank), que foi identificada como sendo bactéria diazotrófica endofítica da cultura de cana-de-açúcar.

O isolado A5I42 foi identificado dentro de um gênero da família Rhizobiaceae, que apresenta alguns estudos quanto à atividade solubilizadora de fosfato (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999). Este isolado apresentou similaridade com *Labrys portucalensis* na comparação com o NCBI GenBank. CARVALHO et al. (2008) detectaram a presença de *L. portucalensis* com capacidade de degradar fluorobenzeno em sedimentos contaminados por resíduos industriais no norte de Portugal.

Além dos isolados que apresentaram similaridade com os microrganismos já estudados, foi identificado novo isolado *Flexibacter sancti* (A5I53) com potencial para o estudo de solubilização de fosfato (Tabela 4).

No banco de dados RDPII, foi utilizado um limite de confiança de 95%; portanto, sequências com valores abaixo deste estabelecido não conseguiram sua classificação a nível de gênero como os isolados A5I46 e USC8, que se apresentaram como “unclassified cloroplast” e “unclassified Enterobacteriaceae”, respectivamente.

O isolado A9IG foi classificado como “*Candidatus Burkholderia verschuerenii*” pelo NCBI GenBank, e como *Citrobacter* pelo RDPII. Esta diferença pode ter ocorrido, pois o primeiro banco analisa similaridade entre as sequências estudadas com uma enorme quantidade de sequências mantidas neste banco de dados; já o segundo é uma ferramenta especializada que utiliza a algoritmo Bayesiana, permitindo, assim, a classificação em táxons. Este gênero pertence à família das Enterobacteriaceae e, além de possuir capacidade quanto à solubilização (KAMPFER, 2003), alguns microrganismos desta família, como *Pantoea*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, também são conhecidos pela capacidade de fixar o nitrogênio anaerobicamente (VERMA et al., 2001).

Os isolados A2I61; A3I14; A5I42; A5I46; A5I55; A6I8; USC7; USC8 e as duas bactérias utilizadas como padrões coincidiram com os resultados obtidos para ambos os bancos de dados utilizados (Tabela 4).

O isolado A5I53 foi identificado como *Flexibacter sancti* pelo NCBI GenBank, mas, quando analisado pelo RDPII, foi identificado ao nível de gênero como *Chitinophaga*. Isto se deve à nova classificação realizada por KAMPFER et al. (2006) que, por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA, transferiram o gênero *Flexibacter* para *Chitinophaga*.

Tabela 4. Resultados da busca por similaridade no NCBI GenBank e RDP

Isolado	NCBI GenBank		% Id	RDPII
	GenBank	Descrição		Descrição
A2I61	FJ890893	<i>Arthrobacter</i> sp. FJ389669.1	99	Arthrobacter
A3I14	FJ890892	<i>Burkholderia</i> sp TJ 182 AJ505301.1	99	Burkholderia
A5I42	FJ890891	<i>Labrys portucalensis</i> strain AY362040.1	98	Labrys unclassified
A5I46	FJ890890	<i>C.prothecoides</i> X65688.1	91	cloroplast
A5I53	FJ890894	<i>Flexibacter sancti</i> AB078067.1	97	Chitinophaga
A5I55	FJ890895	<i>Burkholderia</i> sp Ak-5 AB103080.1	97	Burkholderia
A6I8	FJ890896	<i>Burkholderia gladioli</i> EU090891.1	97	Burkholderia
A9IG	FJ890897	<i>Candidatus B. verschuerenii</i> AY 277699.1	97	Citrobacter
USC7	FJ890898	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i> AI853890.1	98	Enterobacter unclassified
USC8	FJ890899	<i>Enterobacter</i> sp J11 EU099377.1	98	Enterobacter
BC	-	<i>Burkholderia cepacia</i> AB252073.1	99	Burkholderia
BF	-	<i>Burkholderia ferrariae</i> DQ514537.1	99	Burkholderia

4.5 Filogenia dos isolados baseada no marcador 16S rDNA

A análise por clusterização baseada nas sequências do gene 16S rRNA permitiu um agrupamento mais congruente entre todos os gêneros distribuídos no dendrograma (Figura 3).

Os resultados alcançados com o sequenciamento do gene 16S rRNA podem ser corroborados pelas similaridades observadas com sequências depositadas em banco de dados, as quais podem ser acessadas neste tipo de análise. Essa similaridade entre

as sequências obtidas no Laboratório de Bioquímica de Plantas e Microrganismos e outras já depositadas pôde ser observada para todos os isolados estudados.

Para os isolados que apresentaram elevada similaridade ao gênero *Burkholderia*, grupo B, pelo NCBI GenBank, somente o isolado denominado *Candidatus Burkholderia verschuerenii* (A9IG) não foi classificado neste grupo, localizando-se no grupo C próximo a *Citrobacter amalonaticus* e *Citrobacter farmeri*, o que evidencia a importância do banco de dados RDP II, que por meio de sequências ribossomais permitiu definir este isolado pertencente ao gênero *Citrobacter*.

O isolado *Burkholderia* sp. (A3114) apresentou alta similaridade com as espécies de *B.caribensis* (AY586519 GenBank) diazotrófica endofítica de cana-de-açúcar, *B. hopsita* e *Burkholderia* sp. TJ 182. Já o isolado *Burkholderia* sp. (A5155), apesar de estar localizado no grupo B, apresentou-se em um ramo diferente de *Burkholderia* sp. (A3114), apresentando maior similaridade a sequências obtidas do banco de dados de *Candidatus Burkholderia verschuerenii*.

As bactérias utilizadas como padrões para solubilização, *B.cepacia* e *B.ferrariae*, ficaram agrupadas no grupo B, mas separadas em ramos diferentes, podendo ser devido a uma pequena diferença entre os genomas.

B. gladioli (A6I8) e *Arthrobacter* sp. (A2I61) apresentaram alta similaridade, com as sequências depositadas no Banco de dados, não possibilitando dessa forma a separação de bactérias pertencentes à mesma espécie.

Os isolados *Enterobacter homachei* subsp. *steigerwaltii* (USC7) e *Enterobacter* sp.(USC8) apresentaram alta similaridade entre si e foram agrupadas no grupo E, com as demais espécies do banco de dados.

C.protothecoides (A5I46), *Flexibacter sancti* (A5I53) e *Labrys portucalensis* (A5I42) apresentaram baixa distância filogenética em relação às sequências depositadas no banco de dados, agrupando-se nas mesmas politomias L, A, F e CP.

Os resultados apresentados na Figura 3, mostram que o sequenciamento do gene 16S rRNA possibilitou a separação a nível de gênero e de espécies próximas, entretanto não diferenciou isolados de uma mesma espécie, coincidindo com os resultados obtidos por COENYE et al. (2005).

GONZÁLEZ (2008) verificou que o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA foi inadequado para o agrupamento a nível de espécie, das estirpes *Rhizobium* e *Sinorhizobium*. Apesar disso, o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA pode ser eficiente para a caracterização de bactérias já estudadas, como realizado por TOLEDO et al. (2009) que realizaram o sequenciamento parcial de rizóbios indicados para a produção de inoculantes. Entretanto, quando se realiza um estudo sobre novos isolados, o sequenciamento parcial pode não ser suficiente. WANG et al. (2007) sugerem que o erro devido ao sequenciamento completo do gene 16S rRNA, pode ocorrer devido a erros taxonômicos já existentes, enquanto para o sequenciamento parcial o problema também pode estar correlacionado a pequenas sequências que podem não ser suficientes para a comparação entre outros microrganismos. Estes mesmos autores sugerem que sequências parciais e pequenas são comumente utilizadas para sequências ambientais. Dessa forma, os resultados obtidos neste trabalho e por MENNA et al. (2006) demonstram que a utilização de *primers* internos é bastante eficiente, possibilitando para quase todos os isolados o sequenciamento completo do gene 16S rRNA.

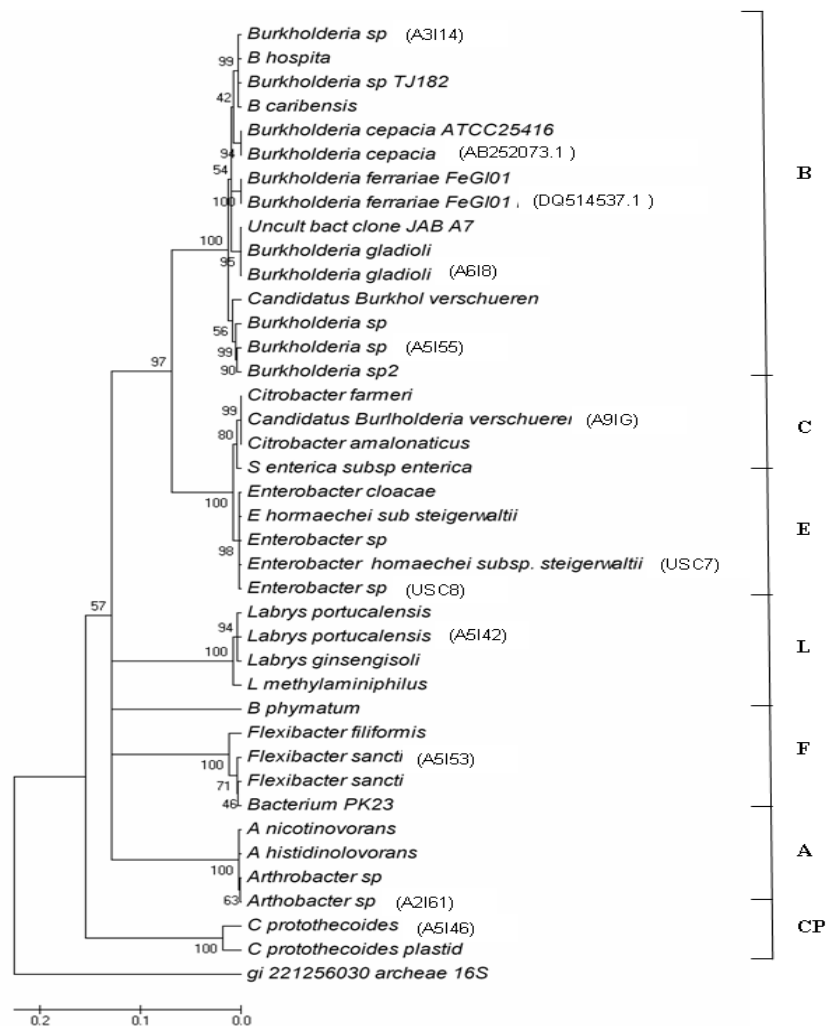


Figura 3. Dendrograma baseado na sequência do gene 16S rRNA, mostrando as posições filogenéticas dos isolados em relação às sequências já depositadas em banco de dados. As legendas indicadas na figura, quanto à divisão das chaves em subgrupos, têm apenas efeito didático, não seguindo uma ordem específica de ramificação do dendrograma. Os isolados e as bactérias-padrão estão identificados com siglas entre parênteses. Os números internos representam a porcentagem de vezes em que foi possível reconstruir o agrupamento em questão. A régua é a distância de similaridade do agrupamento em questão.

4.6 Avaliação da amplificação por PCR utilizando o *primer* BOX– A1R

Os perfis dos produtos de amplificação do DNA das estirpes em estudo, com o *primer* BOX-A1R, apresentaram bastante eficiência na produção de bandas polimórficas, inclusive entre o mesmo gênero (Figura 4). Para esta análise, utilizou-se DNA previamente purificado e quantificado (Figura 2).

O *primer* BOX-A1R sintetizado corresponde à região conservada presente em diversos gêneros bacterianos. As avaliações para diferenciação entre as estirpes, baseadas na análise BOX-A1R, foram efetuadas com base no número de bandas em géis de agarose 2 %, conforme observado na Figura 4.

Uma análise detalhada dos resultados obtidos para a caracterização de estirpes recomendadas para produção de inoculantes demonstrou que a análise por BOX-PCR resulta em perfis com maior número de bandas e menor custo na análise quando comparado ao REP e ERIC (HUNGRIA et al., 2008).

O *primer* BOX–A1R foi altamente eficiente na discriminação dos isolados por amplificar um perfil único de bandas para cada isolado; entretanto, somente *Flexibacter sancti* (A5I53) apresentou banda única. As *Enterobacteriaceae* ficaram separadas, sendo que *Enterobacter homachei* subsp. *steigerwaltii* (USC7) apresentou o perfil de bandejamento mais parecido a *Flexibacter sancti* (A5I53), resultando em alta similaridade entre elas, como observado no braço 2a4. Já *Enterobacter* sp. (USC8) não se agrupou a nenhum isolado permanecendo isolado, no ramo 2a1 (Figura 5).

Para a análise filogenética com base no gene 16S rRNA, todas as bactérias do gênero *Burkholderia* ficaram agrupadas no grupo B, já para o *primer* BOX–A1R, obteve-se uma discriminação entre todos os isolados deste gênero, sendo que *Burkholderia* sp. (A3I14) foi a que apresentou a menor similaridade, distanciando-se dos demais isolados.

As bactérias utilizadas como padrões foram reunidas na chave 3a, mas devido a pequenas diferenças detectadas pelo padrão de bandejamento, elas foram colocadas em ramos diferentes. A proximidade destas bactérias corrobora os resultados obtidos pelo sequenciamento do gene 16S rRNA.

Na análise pelo 16S rDNA, os isolados *Labrys portucalensis* (A5142), *Flexibacter sancti* (A5153), *Arthrobacter* sp. (A2161) e *C.protothecoides* (A5146) ficaram em grupos distintos; já pela análise polimórfica, ocorreu o agrupamento entre *Arthrobacter* sp. (A2161), *Labrys portucalensis* (A5142) (2b) e *Burkholderia* sp (A5155), *C.protothecoids* (A5146) (3b).

Os isolados *B.gladioli* (A618) e *C.B.verschuerenii* (A91G) ficaram em chaves diferentes pela análise com base no gene 16S rRNA. Já para o BOX-A1R, estas ficaram localizadas na mesma chave 2a3, mas em ramos diferentes.

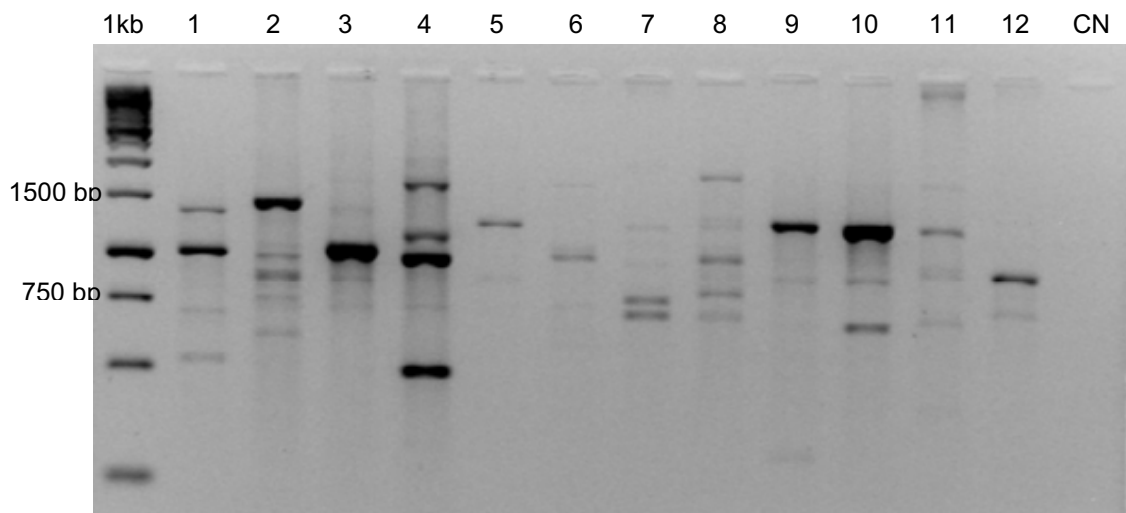


Figura 4. Perfil eletroforético dos produtos de amplificação do DNA genômico com o primer BOX-A-1R em gel de agarose 2%: (P) – padrão 1 Kb DNA ladder (Fermentas); (CN)-Controle negativo da PCR; 1 - *Arthrobacter* sp. (A2161); 2 - *Burkholderia* sp. (A3114); 3 - *Labrys portucalensis* (A5142); 4 - *C.protothecoides* (A5146); 5 - *Flexibacter sancti* (A5153); 6 - *Burkholderia* sp. (A5155); 7 - *B.gladioli* (A618) 8 - *Candidatus B.verschuerenii* (A91G); 9 - *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* (USC7) 10 - *Burkholderia ferrariae*; 11 - *Burkholderia cepacia*; 12 - *Enterobacter* sp.(USC8).

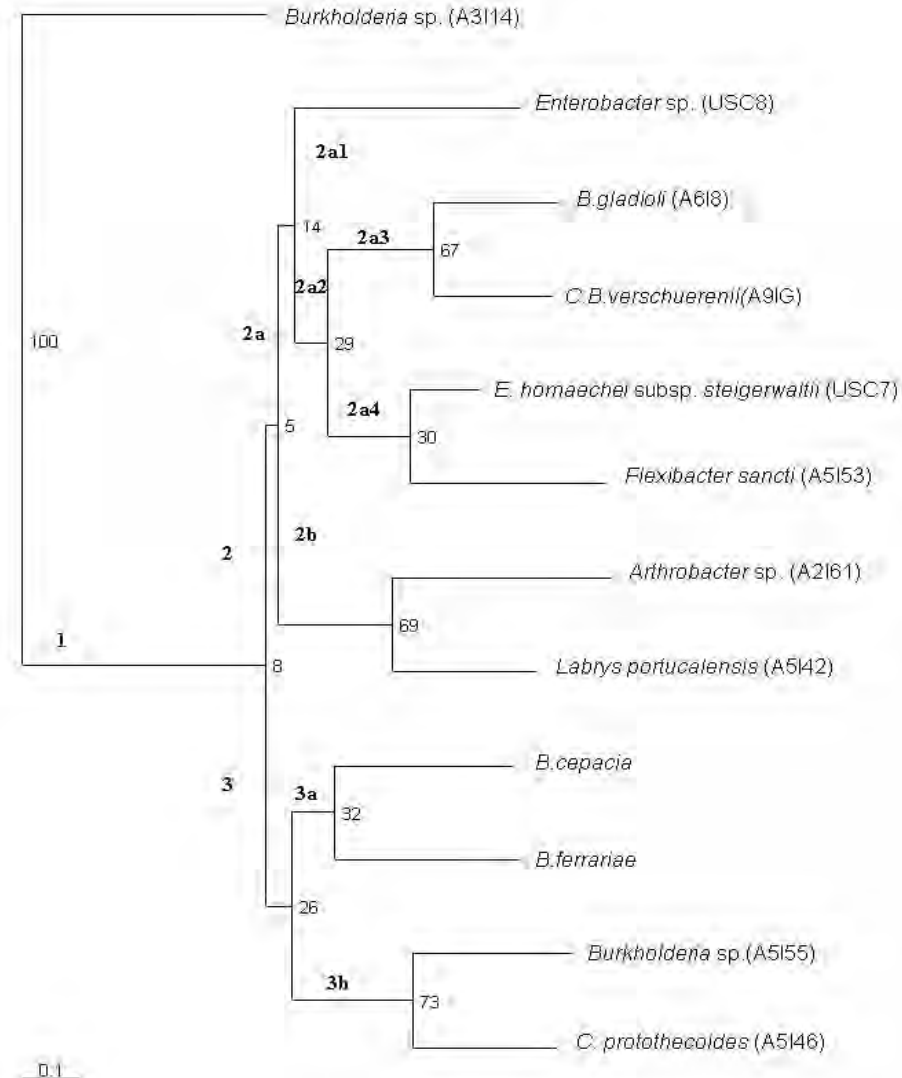


Figura 5. Dendrograma do agrupamento hierárquico baseado na sequência repetitiva BOX-A1R mostrando as posições taxonômicas dos isolados, obtido pelo método *neighbor-Joining*, com bootstrap de 1.000 vezes. As legendas em negrito indicadas na figura, quanto à divisão das chaves em subgrupos, têm apenas efeito didático, não seguindo uma ordem específica de ramificação do dendrograma. Os números internos representam a porcentagem de vezes em que foi possível reconstruir o agrupamento em questão.

4.7 Efeito das fontes fosfatadas sobre o crescimento

Ao verificar a densidade óptica, foi observado que todos os isolados diferiram significativamente entre si para a fonte de fosfato de cálcio. Os isolados *Burkholderia* sp (A5155) e *B. gladioli* (A618) apresentaram a maior e a menor média, respectivamente. Já para as rochas fosfatadas, os isolados que apresentaram o maior e o menor valor foram *Labrys portucalensis* e *B.cepacia*, respectivamente. Além disso, pode-se verificar que os isolados *Arthrobacter* sp. (A2161), *Enterobacter* sp. (USC8) e *Burkholderia* sp. (A3114) não apresentaram diferença significativa quanto ao desenvolvimento em relação ao fosfato de Catalão. Para as rochas fosfatadas, os resultados obtidos para *Labrys portucalensis* (A5142) e *B.cepacia* representaram os maiores e menores valores. Os isolados *Flexibacter sancti* (A5153), *Burkholderia* sp (A3114) e *B. gladioli* (A618) e *B.cepacia* não apresentaram diferença na taxa de crescimento para o fosfato de Araxá (Tabela 5).

Ao verificar o efeito de cada fonte estudada para cada isolado, não houve diferença significativa para o isolado *Flexibacter sancti* (A5153) entre as fontes de Catalão e Araxá. Já o isolado *B. gladioli* (A618) apresentou resultados semelhantes para o fosfato de cálcio e fosfato de Araxá e superior para fosfato de Catalão. O isolado *E. hormaechei* subsp.*steigerwaltii* (USC7) obteve menor taxa de crescimento para o fosfato de cálcio quando comparado às rochas fosfatadas, que não apresentaram diferença entre si (Tabela 5).

Ao realizar a análise da taxa de crescimento, observou-se por meio de regressão polinomial (Figura 6), o efeito do tempo sobre a fonte. Para os fosfatos de Catalão e Araxá, o tempo exerce fator semelhante sobre as curvas de crescimento obtidas para estas fontes, resultando em valores inferiores aos obtidos para o fosfato de cálcio. Para o fosfato de cálcio e para as rochas fosfatadas, pode-se verificar que o comportamento dos isolados apresentou um pico de crescimento a 60 e 50 horas, respectivamente, seguido de decréscimo.

O comportamento semelhante entre as duas fontes de rocha fosfatada demonstra que algum fator pode estar limitando o crescimento dos isolados. Os íons

fosfato nas duas fontes de rocha utilizadas podem encontrar - se complexados de forma mais cristalina quando comparados ao fosfato de cálcio. Além disso, durante o crescimento, pode ocorrer a liberação de substâncias que causam mudanças no meio de crescimento. As rochas utilizadas apresentam grandes quantidades de cátion cálcio e uma fração de metais pesados (Tabela 6), o que afeta o processo de solubilização. Além disso, a presença de metais pesados nestas fontes de fosfato pode afetar a atividade dos microrganismos quanto à solubilização e ao crescimento (SOUCHIE et al., 2007). Os metais pesados podem ser classificados em: (A) elementos essenciais: sódio, potássio, cálcio, ferro, zinco, cobre, níquel e magnésio; (B) microcontaminantes ambientais: arsênico, chumbo, cádmio, mercúrio, alumínio, titânio, estanho e tungstênio; (C) elementos essenciais e simultaneamente microcontaminantes: cromo, zinco, ferro, cobalto, manganês e níquel. Alguns desses elementos são requeridos para o desenvolvimento microbiano, entretanto Hg e Pb não apresentam funções biológicas, enquanto que Zn, Cu, Ni, Co, Cd e Cr são essenciais para plantas, animais e microrganismos, mas requeridos em pequenas quantidades (CHAUDRI et al., 1992). Apesar disso, deve-se considerar que todos são potencialmente tóxicos, dependendo da concentração e do organismo (SIQUEIRA et al., 1994).

A partir da regressão polinomial, também foram avaliados o efeito do tempo sobre o desenvolvimento de cada isolado. Na figura 7, os isolados podem ser divididos em quatro grupos: G1 - *Labrys portucalensis* (A5I42) e *Chlorella protothecoids* (A5I46); G2 - *Burkholderia* sp (A5I55) e *B.ferrariae*; G3 - *Arthrobacter* sp. (A2I61), *Burkholderia* sp (A3I14), *Flexibacter sancti* (A5I53), *Candidatus B. verschuerenii* (A9IG), *E. hormaechei* subsp.*steigerwaltii* (USC7) e *Enterobacter* sp.(USC8), e G4 - *B.cepacia* e *B.gladioli* (A6I8)

Os grupos G1 e G2 possuem DO variando entre 2,0 e 3,0; entretanto, o segundo tem um pico a 48 horas e depois decresce; G1 apresenta comportamento crescente, seguido da fase estacionária; *B.cepacia* e *B.gladioli* são os que apresentaram menor crescimento; já o G3 apresenta taxa de crescimento intermediário aos demais grupos.

O decréscimo na taxa de crescimento, observado principalmente para G2 (*B.ferrariae* e *Burkholderia* sp (A5I55)), pode ter ocorrido devido à liberação de

compostos tóxicos de alguns metais, além da liberação de compostos do metabolismo bacteriano que pode alterar as condições do meio de cultura, como a redução do pH (KARAMUSHJA et al, 1996; NAHAS et al.,1994).

Tabela 5. Densidade óptica média (600nm) obtida até 168 horas de crescimento para as três fontes de fosfato utilizadas.

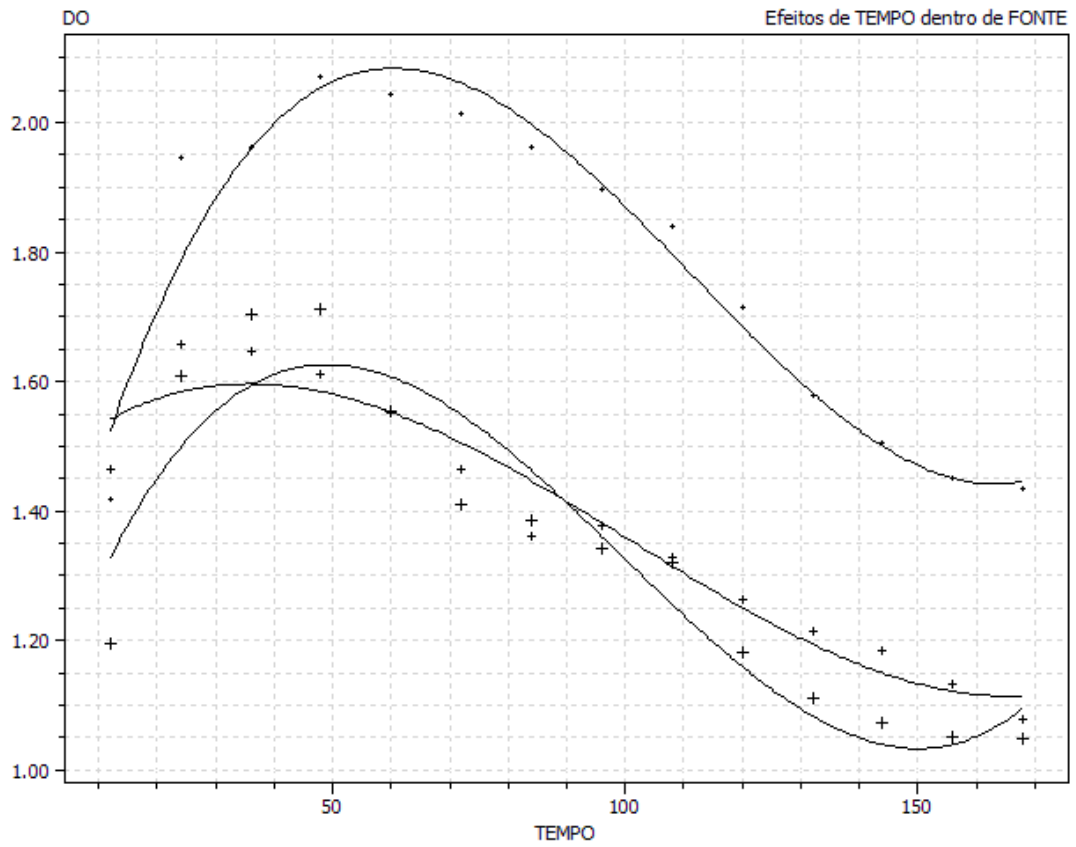
	Fosfato de Cálcio	Fonte Fosfato de Catalão	Fosfato de Araxá	Teste F
<i>Arthrobacter</i> sp (A2I61)	2,352 Ad	1,294 Bf	1,203 Cf	4899,46**
<i>Burkholderia</i> sp (A3I14)	1,695 Ag	1,259 Bf	1,382 Ce	607,26**
<i>Labrys portuacalensis</i> (A5I42)	2,669 Ac	2,542 Ba	2,618 Ca	49,37**
<i>Chlorella protothecoides</i> (A5I46)	2,299 Ae	2,340 Bb	2,263 Cb	17,67**
<i>Flexibacter sancti</i> (A5I53)	1,391 Ah	1,451Be	1,404 Be	12,25**
<i>Burkholderia</i> sp (A5I55)	2,891 Aa	1,721Cc	1,901 Bd	4768,45**
<i>Burkholderia gladioli</i> (A6I8)	0,343 BI	0,555 Ai	0,337 Bj	184,87**
<i>Candidatus Burkholderia verschuerenii</i> (A9IG)	2,196 Af	1,008 Bh	0,885 Ch	6299,68**
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i> (USC7)	0,619 Bk	1,079 Ag	1,069 Ag	829,28**
<i>Enterobacter</i> sp (USC8)	1,231Bi	1,291 Af	0,698 Ci	1279,80**
<i>Burkholderia cepacia</i>	0,752 Aj	0,357 Bj	0,212 Cj	703,09**
<i>Burkholderia ferrariae</i>	2,846 Ab	1,673 Bd	1,951 Cc	4510,82**
Teste F	9680,26**	4877,63**	6504,00**	-

Médias na coluna (minúsculas) e nas linhas (maiúsculas) seguidas por letras iguais não diferem entre si a 5% a de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 6. Composição das rochas fosfatadas de Araxá e Catalão.

Fonte	
Rocha fosfatada de Catalão	Rocha fosfatada de Araxá
28,1% P ₂ O ₅	24% P ₂ O ₅
35% CaO	35,73% CaO
15,5% Fe ₂ O ₃	17,13% Fe ₂ O ₃
2% SiO ₂	1,27% SiO ₂
0,4% Al ₂ O ₃	0,33% Al ₂ O ₃
0,7% MgO	0,73% MgO
0,25% SO ₄	-
5,5% TiO ₂	4,44% TiO ₂
0,7% BaO	1,18 % BaO
-	3,37%BaSO ₄
-	0,47% Nb ₂ O ₅
-	0,25% CeO ₂
-	1,69 % Flúor
-	0,22% Na ₂ O
-	0,02% K ₂ O
-	0,33% MnO
-	0,06% MoO

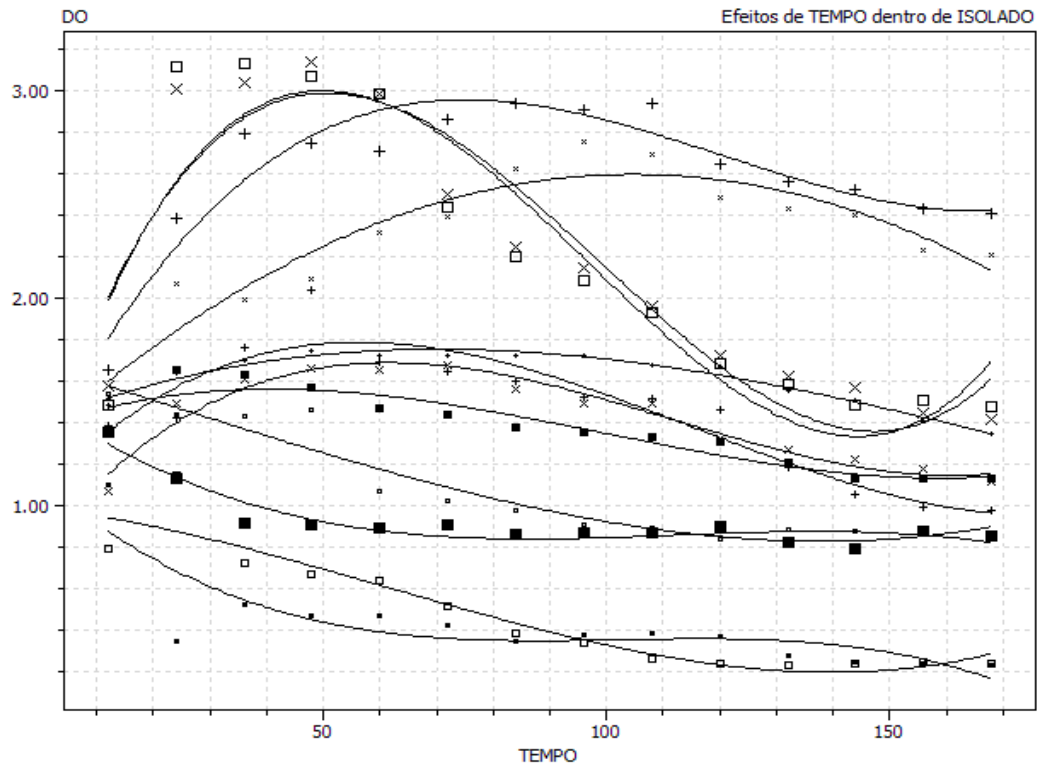
BARBOSA, J. C.; MALDONADO JR, W.; AgroEstat, Versão 1.0, 2008



LEGENDA	F	R ²	EQUAÇÕES
• TEMPO d. FON CALCIO	1509,04**	0,9442	$y = 1,16094492 + 0,03490941x - 0,00039657x^2 + 0,00000118x^3$
+ TEMPO d. FON CATALAO	209,68**	0,9439	$y = 1,46626881 + 0,00783714x - 0,00013326x^2 + 0,00000044x^3$
+ TEMPO d. FON ARAXA	1421,55**	0,8824	$y = 1,07151568 + 0,02537336x - 0,00034323x^2 + 0,00000115x^3$

Figura 6. Regressão polinomial dos isolados quanto à densidade óptica (DO 600nm) para as três fontes fosfatadas (+) Fosfato de cálcio; (+) Fosfato de Catalão; (+) Fosfato de Araxá até 168 horas.

BARBOSA, J. C.; MALDONADO JR, W.; AgroEstat, Versão 1.0, 2008



LEGENDA	F	R ²	EQUAÇÕES
• TEMPO d. ISO A2I61	7,86***	0,9687	$y = 1,40090065 + 0,01089141x - 0,00009554x^2 + 0,00000017x^3$
+ TEMPO d. ISO A3I14	264,80***	0,8823	$y = 1,04907293 + 0,02935592x - 0,00034440x^2 + 0,00000099x^3$
+ TEMPO d. ISO A5I42	568,92***	0,8862	$y = 1,22765102 + 0,05426389x - 0,00052491x^2 + 0,00000145x^3$
* TEMPO d. ISO A5I46	2101,96***	0,8873	$y = 1,32333394 + 0,02434890x - 0,00011627x^2$
× TEMPO d. ISO A5I53	328,42***	0,9502	$y = 0,80787246 + 0,03281796x - 0,00036870x^2 + 0,00000110x^3$
× TEMPO d. ISO A5I55	3497,80***	0,8678	$y = 1,19131857 + 0,08044335x - 0,00106951x^2 + 0,00000360x^3$
▪ TEMPO d. ISO A6I8	161,73***	0,6856	$y = 1,12509590 - 0,02373775x + 0,00023735x^2 - 0,00000078x^3$
■ TEMPO d. ISO A9IG	73,70***	0,8867	$y = 1,36980864 + 0,01022002x - 0,00015693x^2 + 0,00000052x^3$
■ TEMPO d. ISO USC7	81,04***	0,8853	$y = 1,50418670 - 0,01952966x + 0,00018414x^2 - 0,00000055x^3$
◻ TEMPO d. ISO USC8	11,33***	0,9248	$y = 1,67712332 - 0,00842394x - 0,00001197x^2 + 0,00000021x^3$
◻ TEMPO d. ISO BC	47,67***	0,8920	$y = 0,98714985 - 0,00313323x - 0,00007703x^2 + 0,00000042x^3$
◻ TEMPO d. ISO BF	4189,73***	0,8362	$y = 1,13148174 + 0,08495831x - 0,00114843x^2 + 0,00000395x^3$

Figura 7. Regressão polinomial dos isolados quanto à densidade óptica (DO 600nm) para as três fontes fosfatadas durante intervalo de tempo. G1-*Labrys portucalensis* (A5I42) (+) e *Chlorella protothecoides* (A5I46) (x), G2-*Burkholderia* sp (A5I55) (x) e *Burkholderia ferrariae* (◻); G3-*Arthrobacter* sp. (A2I61)(+), *Burkholderia* sp.(A3I14) (+), *Flexibacter sancti* (A5I53) (x), *Candidatus B. verschuerenil* (A9IG) (■), *E. hormaechei* subsp.*steigerwaltii* (USC7)(■) e *Enterobacter* sp. (USC8) (◻) e G4-*B.cepacia*(◻) e *B.gladioli* (A6I8) (■).

4.8 Atividade da solubilização das fontes fosfatadas pelos isolados

Ao realizar a análise dos efeitos da fonte na atividade do isolado, foi verificado para o fosfato de cálcio que o isolado *B.cepacia* apresentou a melhor solubilização, enquanto *Arthrobacter* sp. (A2I61), apesar de ter apresentado IS >3, obteve o menor valor. Já os isolados *Candidatus B.verschuerenii* (A9IG) e *Enterobacter* sp. (USC8) apresentaram resultados semelhantes em relação à solubilização para o fosfato de cálcio (Tabela 7). Apesar do bom potencial de solubilização por ambos os isolados caracterizados como *Enterobacter*, estes apresentam restrições de uso devido a problemas de patogenicidade humana (PAUUW et al., 2008).

B.ferrariae, *Burkholderia* sp. (A5I55) e *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* (USC7) apresentaram valores menores que 280 µg mL⁻¹ de P solúvel. E os demais diferiram entre si, obtendo taxa de solubilização entre 160 a 200 µg mL⁻¹.

Os isolados *Labrys portucalensis* (A5I42) e *Burkholderia* sp. (A5I55) não apresentaram diferença entre si e obtiveram como eficiência de solubilização aproximadamente 1/3 da obtida pelos padrões em relação às rochas fosfatadas. Já para o fosfato de cálcio, *Burkholderia* sp. (A5I55) apresentou os melhores valores para solubilização. Para estes isolados, foram encontrados trabalhos que indicaram a utilização destes na biorremediação de áreas contaminadas por meio de compostos como fluorbenzeno (CARVALHO et al, 2008) e 4-Aminofenol (TAKENAKA et al., 2003).

O resultado para *B.ferrariae* confirmou o potencial desta bactéria-padrão para solubilização de fosfato, descrito por VALVERDE et al. (2006), que isolaram este microrganismo em m de ferro e a consideraram com grande potencial solubilizador. *Burkholderia* sp. (A3I14) e *Candidatus Burkholderia verschuerenii* (A9IG) não diferiram entre si, tendo uma eficiência de aproximadamente 50% para as duas rochas fosfatadas; além disso, apresentaram valores próximos quanto à solubilização de fosfato de cálcio em relação aos resultados obtidos pelas bactérias-padrão. O isolado *Candidatus B.verschuerenii* foi encontrado associado à *Psychotria verschuerenii*, planta da família Rubiaceae (ROBBRECHT, 1988). A simbiose pode ser observada pela formação de galhas na parte abaxial das folhas. A presença da simbiose nestas plantas

é um requisito para o seu desenvolvimento normal *Burkholderia* sp. (A3114), além de possuir a capacidade de solubilização, pode apresentar também capacidade para fixar nitrogênio atmosférico (AY586519 Gen Bank).

Os isolados *Flexibacter sancti* (A5153), *C.protothecoides* (A5146) e *Arthrobacter* sp. (A2161). Apresentaram as menores taxas de solubilização para todas as fontes utilizadas.

As bactérias-padrão apresentaram os maiores valores de solubilização para todas as fontes em relação às demais, entretanto *B. cepacia*, apesar de ter resultados satisfatórios para a solubilização de fosfato, é responsável pela fibrose cística em humanos e causa a podridão bacteriana em cebola (GONZÁLEZ et al., 2007). Os resultados obtidos por ela foram superiores a *B.ferrariae* e aos demais isolados, *B.ferrariae* não apresenta características patogênicas, então é mais interessante seu uso do que o de *B.cepacia*.

Apesar de *B.gladioli* (A91G) ter sido o isolado que apresentou maior eficiência para a solubilização das rochas fosfatadas, ele é citado por GONZALEZ et al. (2007) como sendo patógeno, principalmente de plantas ornamentais do gênero *Galdiolous*, podendo ter seu uso limitado para utilização em cana-de-açúcar, pois ambas são monocotiledôneas, da mesma família Poaceae.

A análise de atividade solubilizadora durante o tempo permitiu observar que a solubilização de fosfato de Catalão e Araxá se sobrepõem, e o fosfato de cálcio destacou-se com maior eficiência de solubilização (Figura 8). Este resultado pode ser confirmado pelos resultados obtidos por NAHAS (1996), que também obteve os melhores resultados para o fosfato de cálcio (3g L^{-1}) depois de um período de incubação de nove dias, para os isolados bacterianos pertencentes ao gênero *Bacillus* e *Pseudomonas cepacia* ($500\ \mu\text{g mL}^{-1}$ a $1205,97\ \mu\text{g mL}^{-1}$). Entretanto, os resultados obtidos por esse mesmo autor para o fosfato de Araxá variaram de -7,64 a 133,21; isto ocorre devido ao comportamento que alguns microrganismos apresentam em consumir o fosfato disponível ao invés de atuar na solubilização, produzindo resultados baixos ou até mesmo negativos. Por outro lado, NAHAS (1996) também observou que os isolados fúngicos foram mais eficientes na solubilização do fosfato de Araxá e de Patos de

Minas, quando comparados aos isolados bacterianos. Já para a fonte de Gafsa, que apresenta alta reatividade, os isolados bacterianos apresentaram valores variando de 36,40 a 674,22 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e os isolados fúngicos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Eupenicillium* de 170,94 a 603,80 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O isolado bacteriano que apresentou os melhores resultados, para todas as fontes utilizadas por NAHAS (1996), foi a *Pseudomonas cepacia*, reclassificada como *B.cepacia*. Dessa forma, a baixa eficiência quanto à solubilização das três fontes de fósforo para *Arthrobacter* sp. (A2I61), e das rochas fosfatadas para *C. prothotecoides* (A5I46) e *Flexibacter sancti* (A5I53) pode ser explicada pela imobilização ou consumo deste elemento (NAHAS, 1996), perda da capacidade de solubilização, devido ao período de armazenamento e complexidade do elemento fósforo nas fontes utilizadas (SOUCHIE et al., 2007).

O fosfato de cálcio foi o que apresentou maior taxa de solubilização em relação aos demais, o que se deve ao fato de ser uma fonte mais facilmente assimilável. Além disso, o isolamento destes microrganismos nesta fonte pode levar a seleção de microrganismos solubilizadores eficientes de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ em detrimento das demais (SOUCHIE et al. 2005).

A minoria dos isolados apresentaram melhor taxa de solubilização para o fosfato de Araxá, como obtido por MASSENSINI (2007), por seus isolados de solo sob cultivo de eucalipto. Somente *Arthrobacter* sp. (A2I61), *C. protothecoides* (A5I46), *C.B. verschuerenii* (A9IG) e *B.cepacia* apresentaram melhor solubilização para o fosfato de Araxá (Tabela 7).

Na Figura 9 pode-se dividir os isolados em 3 grupos: **GA** - *B. cepacia* e *B.ferrariae*; **GB** - *Candidatus Burkholderia verschuerenii* (A9IG); *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* (USC7); *Enterobacter* sp. (USC8); *Burkholderia* sp. (A5I55); *Burkholderia* sp. (A3I14); *B. gladioli* (A6I8); *Flexibacter sancti* (A5I53). *Chlrorella protecoides* (A5I46) e *Labrys portucalensis* (A5I42) e **GC**-*Arthrobacter* sp (A2I61). As bactérias-padrão foram as que apresentaram os melhores valores de solubilização durante o intervalo de tempo, e entre elas pode-se observar que *B.cepacia*, apesar de ter uma eficiência de solubilização final menor, pode ser considerada melhor do que a *B.ferrariae*, pois esta tem crescimento maior do que *B.cepacia* (Figura 2). O isolado *Arthrobacter* sp. (A2I61),

apesar de possuir $IS > 3$, foi o que se apresentou o menor valor para solubilização das três fontes utilizadas. Já os isolados *Chlorella protecoides* (A5I46) e *Labrys portucalensis* (A5I42) apesar de possuírem potencial mediano de solubilização, apresentam capacidade de solubilização menor que as demais do grupo GB, pois apresentaram crescimento maior para valores de solubilização semelhante.

Os valores de solubilização e de pH para a estirpe-padrão *B. cepacia* foram semelhantes aos resultados obtidos para *B. cepacia* DA23 por SONG et al. (2008).

Os resultados obtidos para a solubilização do fosfato de cálcio foram superiores aos isolados estudados por NAUTIYAL (1999), que alcançou o maior valor de solubilização $90 \mu\text{g mL}^{-1}$ de fósforo solúvel.

Um dos mecanismos utilizados pelos microrganismos para realizar a solubilização é a acidificação do meio (SILVA FILHO et al., 2002). Os ácidos liberados podem atuar diretamente sobre o fosfato mineral, realizando a troca do ânion fosfato por um ânion contido na substância ácida ou por complexar com os íons Fe e Al presentes nas rochas fosfatadas. As bactérias solubilizadoras de fósforo produzem ácidos orgânicos, tais como: acetato, lactato, oxalato, tartarato, succinato, citrato, gluconato, e glicolato (GYANESHWAR et al., 1998). Entretanto, a acidificação não foi o único mecanismo de solubilização ressaltado neste trabalho, pois, para o isolado *Burkholderia* sp. (A3I14) (Tabela 8), ocorreu a elevação do pH do meio de cultura, resultado semelhante ao obtido por CHAGAS JUNIOR (2007). Isto pode ter ocorrido devido à atividade enzimática ser dependente de uma série de fatores, como a concentração de substrato e da enzima, a composição do meio de reação, temperatura, pH, íons, inibidores, entre outros.

A classificação das fosfatases, incluindo as bacterianas é baseada em critérios bioquímicos e biofísicos da enzima, como pH ótimo (ácido, alcalino ou neutro), substrato (específico ou não específico) e no tamanho molecular. Seguindo critério de pH ótimo as fosfatases são divididas em dois grandes grupos, o das fosfatases alcalinas, com pH ótimo na faixa de 8 a 10,5 e o das fosfatases ácidas com pH ótimo de 2,5 a 6 (DVORAK et al, 1988).

NAHAS et al. (1994) verificaram que o número de fungos produtores de fosfatase ácida no solo, superou em 150% o de produtores de fosfatase alcalina; constataram ainda que os fungos e as bactérias possuem maior atividade da fosfatase ácida e alcalina, respectivamente. Entretanto, ROMBOLA (2008) detectou a presença de fosfatase ácida ligada à membrana de *Burkholderia* sp. e conclui que a presença desta enzima representa um mecanismo de solubilização do fosfato mineral no solo o tornando disponível para as plantas. Além desse trabalho, outros autores detectaram a presença de fosfatases ácidas em bactérias com diferentes pH ótimo como, *Escherichia coli* com pH 2,5 (TOUATI e DANCHIN 1987), a de *Mycobacterium tuberculosis* pH 6,5 (SALEH e BELISLE 2000), a de *Streptococcus equisimilis* com pH 5 (MALKE, 1998) e a da *Escherichia blattae* com pH 6,0 (ISIKAWA, et al, 2000).

Esses trabalhos mostram que apesar da presença da fosfatase ácida ser uma característica de fungos ela também pode ser encontrada em diversos gêneros bacterianos. Além disso, esses dados explicam a atividade de enzimas em diferentes faixas de pH como observado na tabela 8.

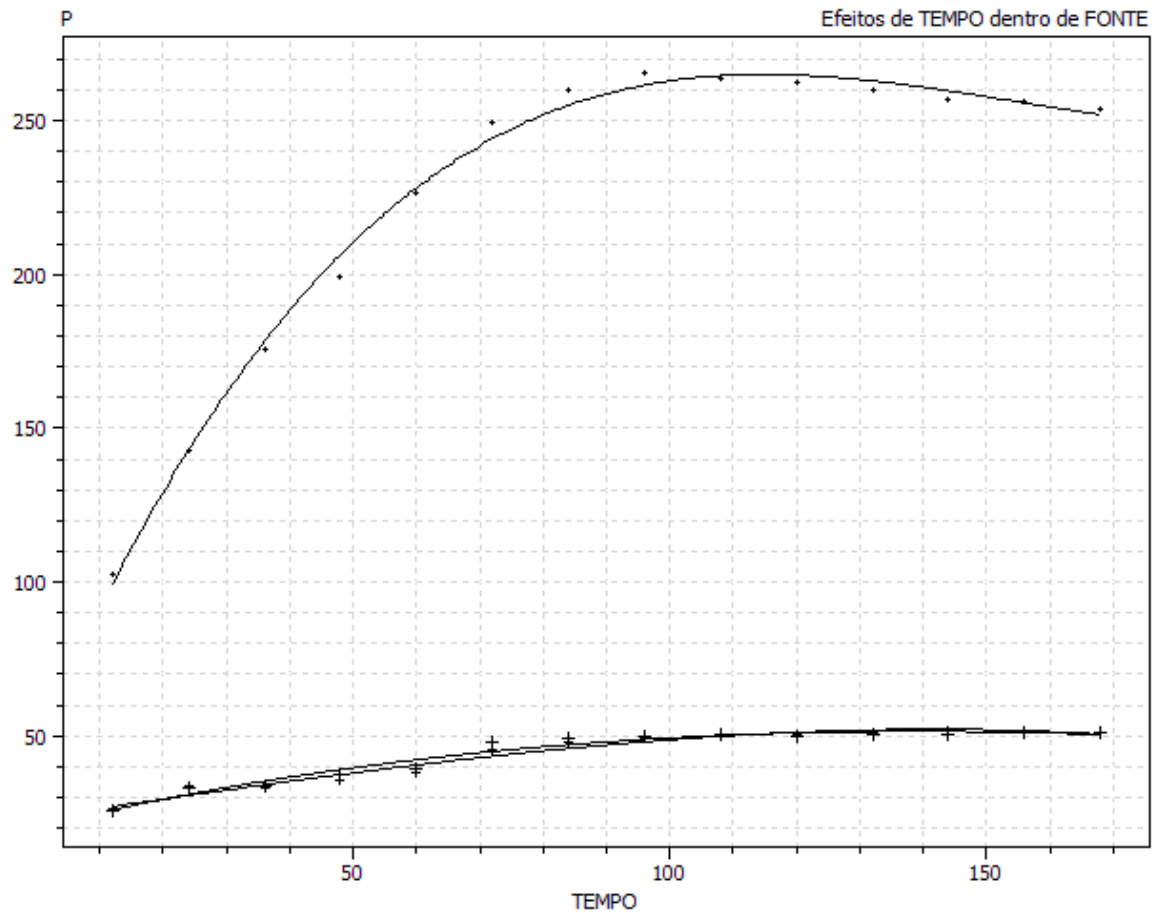
A variação no potencial de solubilização de microrganismos tem sido observada por vários autores e é utilizada como uma das principais características no processo de seleção (SILVA FILHO & VIDOR, 2000).

Tabela 7. Valores de solubilização das fontes de fósforo pelos isolados até 168 horas.

Isolados	Fósforo solúvel $\mu\text{g.mL}^{-1}$			Teste F
	Fosfato de Cálcio	Fosfato de Catalão	Fosfato de Araxá	
<i>Arthrobacter</i> sp. (A2I61)	83,916 Ak	18,802 Bg	22,790 Ci	17491,44**
<i>Burkholderia</i> sp (A3I14)	196,284 Ag	46,169 Bc	45,443 Bd	99116,90**
<i>Labrys portucaledensis</i> (A5I42)	160,148 Aj	33,081 Bf	29,361 Ch	72803,33**
<i>C. protothecoids</i> (A5I46)	183,461 Ah	17,066 Ch	21,395 Bj	118120,59**
<i>Flexibacter sancti</i> (A5I53)	169,702 Ai	14,474 Bi	13,391 Bk	106005,59**
<i>Burkholderia</i> sp (A5I55)	273,474 Ad	32,616 Bf	30,986 Cg	255660,71**
<i>B. gladioli</i> (A6I8)	199,341 Af	58,043Bb	59,703 Cc	86,375**
<i>C. B.verschuerenii</i> (A9IG)	297,027 Ab	45,955 Bc	45,092 Bd	276876,79**
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i> (USC7)	255,963 Ae	42,215 Bd	40,652 Ce	201458,25**
<i>Enterobacter</i> sp. (USC8)	296,891 Ab	36,609 Be	35,740 Bf	29,7532,62**
<i>B.cepacia</i>	327,79 Aa	90,876 Ba	97,694 Ca	238816,04**
<i>B.ferrariae</i>	277,828 Ac	90,454 Ba	88,273 Cb	155731,62**
Teste F	68473,34**	8442,21**	8875,67**	-

Médias na coluna (minúsculas) e nas linhas (maiusculas) seguidas, por letras iguais, não diferem entre si a 5%, de probabilidade pelo teste de Tukey.

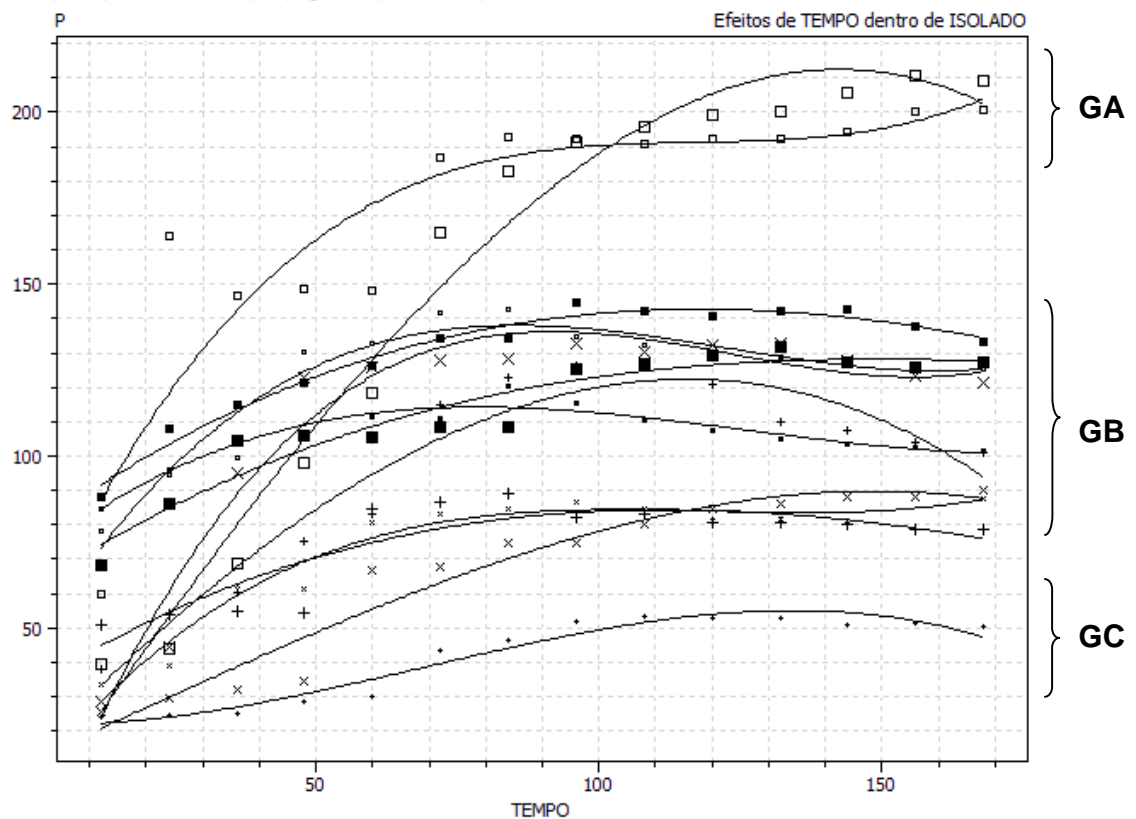
BARBOSA, J. C.; MALDONADO JR, W.; AgroEstat, Versão 1.0, 2008



LEGENDA	F	R ²	EQUAÇÕES
+ TEMPO d. FON CALCIO	5819,85**	0,9954	$y = 47,6635136 + 4,71109572x - 0,03261987x^2 + 0,00007033x^3$
+ TEMPO d. FON CATALAO	31,61**	0,9652	$y = 23,4072352 + 0,30015176x + 0,00004509x^2 - 0,00000518x^3$
+ TEMPO d. FON ARAXA	5,08*	0,9598	$y = 20,4671419 + 0,48536030x - 0,00217833x^2 + 0,00000208x^3$

Figura 8. Atividade de solubilização (P = fósforo solúvel em $\mu\text{g mL}^{-1}$) dos isolados até 168 horas para as três fontes de fosfato. (+) Fosfato de cálcio (5 g L^{-1}); (+) Fosfato de Catalão ($2,5 \text{ g L}^{-1}$), (+) Fosfato de Araxá ($2,5 \text{ g L}^{-1}$).

BARBOSA, J. C.; MALDONADO JR, W.; AgroEstat, Versão 1.0, 2008



LEGENDA	F	R ²	EQUAÇÕES
• TEMPO d. ISO A2I61	259,92**	0,9487	$y = 21,9812128 - 0,04365520x + 0,00615289x^2 - 0,00002973x^3$
+ TEMPO d. ISO A3I14	55,20**	0,9336	$y = 13,6943023 + 1,69692483x - 0,00496260x^2 - 0,00001370x^3$
+ TEMPO d. ISO A5I42	21,71**	0,7739	$y = 33,3005901 + 1,02244818x - 0,00601686x^2 + 0,00000859x^3$
* TEMPO d. ISO A5I46	674,22**	0,9517	$y = 6,79352914 + 2,01575984x - 0,01718289x^2 + 0,00004788x^3$
× TEMPO d. ISO A5I53	57,70**	0,9479	$y = 11,8728240 + 0,73776077x + 0,00064600x^2 - 0,00001401x^3$
× TEMPO d. ISO A5I55	2950,76**	0,9544	$y = -22,309998 + 4,29726249x - 0,03720147x^2 + 0,00010016x^3$
▪ TEMPO d. ISO A6I8	296,98**	0,9296	$y = 70,7376901 + 1,30175838x - 0,01201535x^2 + 0,00003178x^3$
■ TEMPO d. ISO A9IG	16,79**	0,9762	$y = 78,1228048 + 1,19987092x - 0,00642075x^2 + 0,00000755x^3$
■ TEMPO d. ISO USC7	21,89**	0,9231	$y = 61,9698331 + 1,07942765x - 0,00554726x^2 + 0,00000863x^3$
◻ TEMPO d. ISO USC8	1232,19**	0,9357	$y = 44,9529879 + 2,65071680x - 0,02380405x^2 + 0,00006472x^3$
◻ TEMPO d. ISO BC	2180,15**	0,8002	$y = 48,3507960 + 3,59217079x - 0,03033353x^2 + 0,00008609x^3$
◻ TEMPO d. ISO BF	248,44**	0,9751	$y = -3,3150097 + 2,43598565x - 0,00232660x^2 - 0,00002906x^3$

Figura 9. Atividade da solubilização ($P = \text{fósforo solúvel em } \mu\text{g mL}^{-1}$) para as três fontes de fósforo para cada isolado até 168 horas **GA** - *B. cepacia* (◻) e *B.ferrariae* (◻); **GB** - *Candidatus Burkholderia verschuerenii* (A9IG) (■), *E. hormaechei* subsp.*steigerwaltii* (USC7) (■), *Enterobacter* sp.(USC8) (◻), *Burkholderia* sp.(A5I55)(x), *Burkholderia* sp. (A3I14) (+), *B. gladioli* (A6I8) (■) *Flexibacter sancti* (A5I53) (x), *C. proteoides* (A5I46) (x) e *Labrys portucalensis* (A5I42) (+), e **GC**-*Arthrobacter* sp. (A2I61) (+).

Tabela 8. Valores de pH ao final do período de 15 dias de incubação.

Isolados	pH - Final		
	Fosfato de Cálcio	Fosfato de Catalão	Fosfato de Araxá
<i>Arthrobacter</i> sp. (A2I61)	6,53	5,23	5,25
<i>Burkholderia</i> sp (A3I14)	7,19	4,20	4,23
<i>Labrys portuacalensis</i> (A5I42)	4,53	4,95	4,90
<i>C.protothecoides</i> (A5I46)	5,42	4,74	4,34
<i>Flexibacter sancti</i> (A5I53)	5,02	4,24	4,14
<i>Burkholderia</i> sp. (A5I55)	5,95	4,63	4,67
<i>Burkholderia gladioli</i> (A6I8)	3,67	4,16	4,12
<i>C. B. verschuerenii</i> (A9IG)	4,43	4,39	4,38
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i> (USC7)	4,24	4,50	4,61
<i>Enterobacter</i> sp (USC8)	4,28	4,30	4,29
<i>B.cepacia</i>	3,77	3,67	3,76
<i>B.ferrariae</i>	3,68	3,87	3,61
Controle	6,80	6,50	6,40

4.9 Produção de AIA pelos isolados

Dos 10 isolados selecionados, apenas *Enterobacter* sp. (USC8), *E.hormaechei* subsp. *steigerwaltii* (USC7), *Labrys portuacalensis* (A5I42) e *Burkholderia* sp. (A5I55) apresentaram resultados relevantes para a produção de AIA.

Bactérias da rizosfera, produtoras de AIA, podem desempenhar um papel fundamental na promoção de crescimento das plantas, principalmente nos primeiros estádios de desenvolvimento e no processo de enraizamento. Sabe-se que esse estímulo é dependente da dosagem do hormônio, pois o excesso dele pode retardar ou até inibir o crescimento do vegetal (BROEK et al., 1999). Apesar disso, os isolados que apresentaram os melhores valores para produção de AIA foram *E.hormaechei* subsp.*verschuerenii* (USC7) e *Enterobacter* sp. (USC8) (Figuras 10 e 11) os quais foram obtidos em cultivo de cana-de-açúcar com cerca de um ano, indicando que o hormônio pode atuar em diversos estádios de desenvolvimento da planta, como perfilhamento e crescimento dos colmos.

A fase de perfilhamento é controlada pela auxina, que é formada no topo, e desce em fluxo contínuo em direção à base da planta. A auxina exerce nesta situação

dois efeitos: alongamento do colmo e impedimento do desenvolvimento das gemas laterais (dominância apical). Com alta luminosidade, o fluxo de auxina diminui e observa-se, então, decréscimo no grau de inibição das gemas laterais, o que resulta em maior formação de perfilhos (CASAGRANDE, 1991). O perfilhamento termina quando ocorre um balanceamento das substâncias que controlam a atividade da auxina, permitindo o crescimento dos colmos (IRVINE, 1983).

Segundo CERIGIOLI (2005), o AIA bacteriano é obtido na fase estacionária por ser um metabólito secundário, porém a duração da fase estacionária depende de cada espécie. Dessa forma, é necessário conhecer o comportamento de cada isolado, para realizar a leitura da síntese de auxina em diferentes tempos do desenvolvimento bacteriano, possibilitando a determinação do período em que ocorre a síntese máxima do hormônio. Os isolados deste estudo apresentaram a maior produção de AIA a uma DO em torno de 3,70 para todos os isolados. Entretanto, esta taxa de crescimento foi obtida em períodos diferentes. O isolado *E. homaechei* subsp. *verschuerenii* (USC7) apresentou esta DO a 60 h e $152,63 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA; *Enterobacter* sp. (USC8) a 48 h e $136,91 \mu\text{g mL}^{-1}$; *Labrys portucalensis* (A5I42) a 96 h e $17,63 \mu\text{g mL}^{-1}$ e *Burkholderia* sp. (A5I55) a 72 h e $58,34 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figuras 10-12).

O L-tryptofano funciona como precursor fisiológico para a biossíntese de auxinas em plantas e em microrganismos (KHALID et al., 2004). Exsudados de raízes são naturalmente fonte de triptofano (DAKORA & PHILLIPS, 2002) para os microrganismos, aumentando a biossíntese de auxina na rizosfera. CHAGAS JUNIOR (2007) avaliou a produção de AIA em meio de cultura com 0; 10; 25; 50; 100 e 150 mg mL^{-1} , de triptofano para isolados de rizóbio, podendo concluir que, na presença de 150 mg mL^{-1} ocorreu a maior produção de AIA.

A produção de AIA para os isolados *E. homaechei* subsp. *verschuerenii* (USC7), *Enterobacter* sp. (USC8), *Labrys portucalensis* (A5I42) e *Burkholderia* sp. (A5I55) foi avaliada com $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, obtendo valores superiores aos obtidos por DA SILVEIRA (2008) com isolados selvagens de arroz ($9,8$ a $29,36 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA), cultivados em meio DYGS suplementado com $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de triptofano. Entretanto, os resultados deste trabalho foram inferiores aos obtidos por isolados de rizóbios de solos ácidos e de

baixa fertilidade da Amazônia, que apresentaram níveis elevados de produção de AIA variando de 1.160 a 2.660 $\mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando 150 mg mL^{-1} de triptofano (CHAGAS JUNIOR, 2007).

PERIN (2007) avaliou a produção de AIA por bactérias do gênero *Burkholderia*, mas nenhum isolado produziu o hormônio vegetal, indicando que esta habilidade é rara em espécies diazotróficas deste gênero. O isolado identificado como *Burkholderia* sp. (A5I55) apresentou capacidade para produção de AIA, obtendo valor máximo de 58,34 $\mu\text{g mL}^{-1}$. TABACCHIONI et al., (1993), verificaram a capacidade para biossíntese deste hormônio somente para *B.vietnamensis* TVV75.

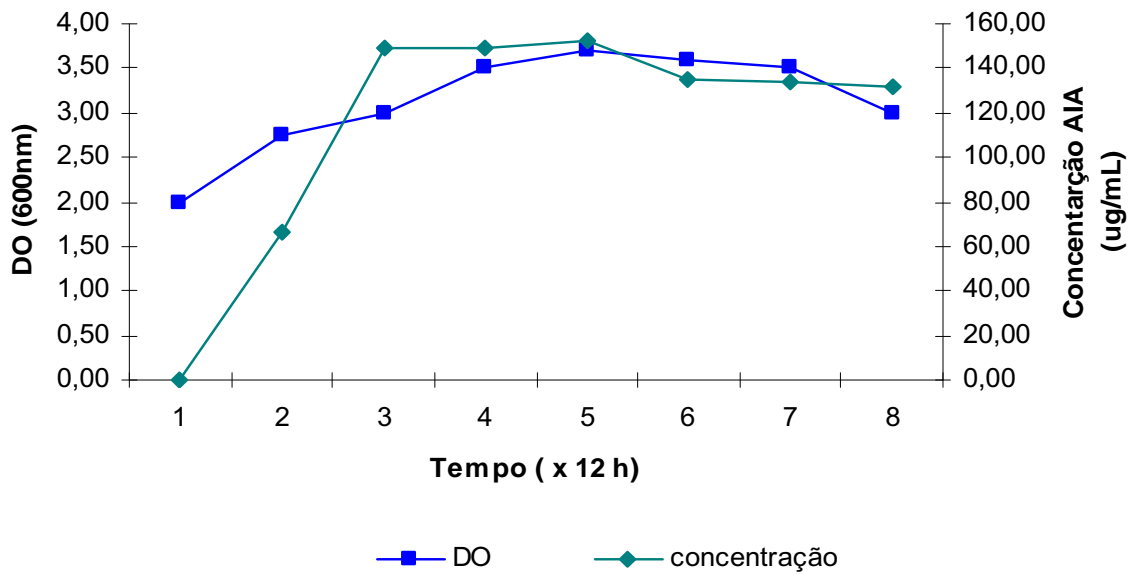


Figura 10. Curva de crescimento e concentração do AIA do isolado *E.homaechei* subsp. *verschuerenii* (USC7) a cada 12 horas.

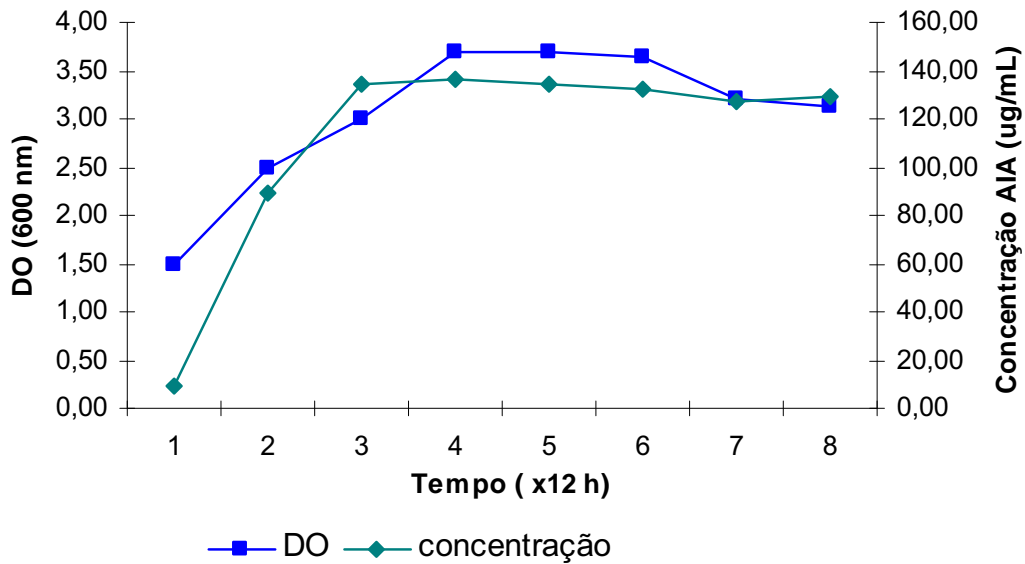


Figura 11. Curva de crescimento e concentração do AIA do isolado *Enterobacter* sp a cada 12 horas.

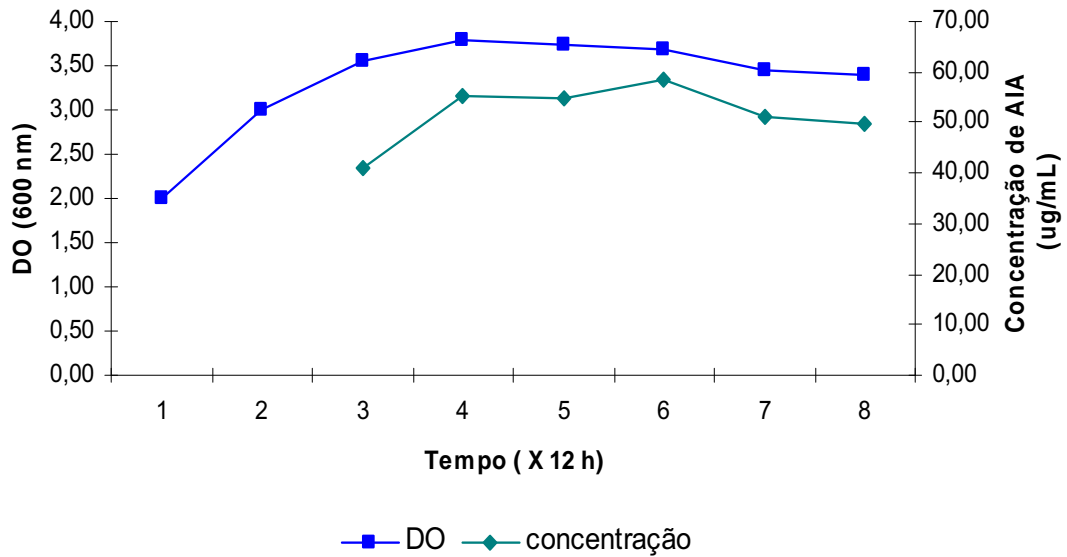


Figura 12. Curva de crescimento e concentração do AIA do isolado *Burkholderia* sp (A5I55) a cada 12 horas.

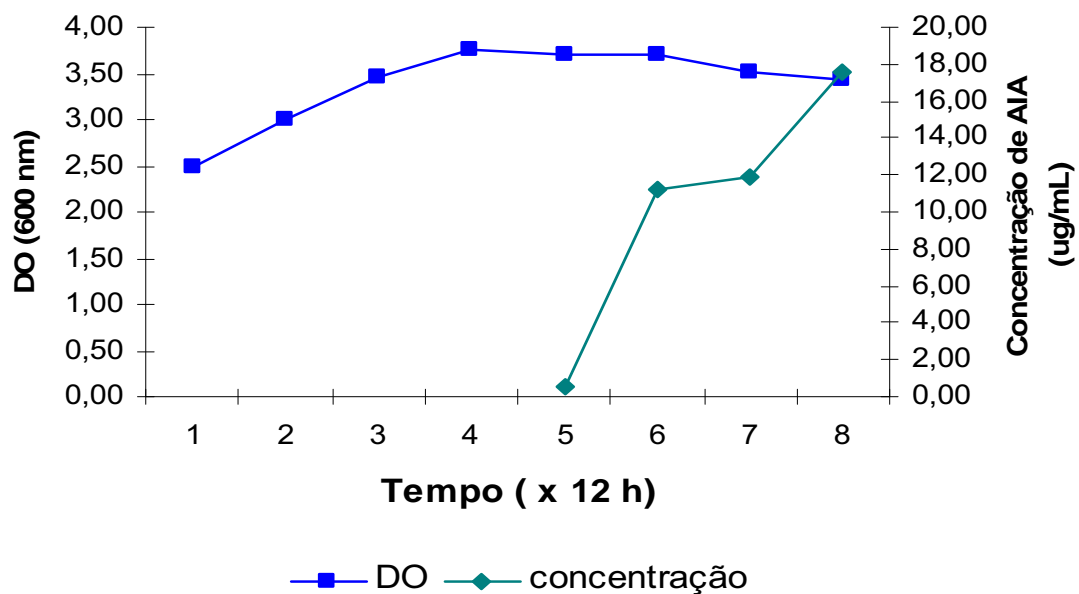


Figura 13. Curva de crescimento e concentração do AIA do isolado *Labrys portucalensis* (A5I42) a cada 12 horas.

5 CONCLUSÕES

1. A maior taxa de isolamento em latossolo vermelho escuro sob o cultivo da variedade RB855453 evidencia que existe uma interação entre variedade, solo, microrganismo e manejo da cultura.
2. A análise do sequenciamento permitiu verificar a semelhança e a diferença quanto à identificação por meio do NCBI GenBank e RDP11.
3. Através de um perfil de bandeamento bastante distinto entre os isolados a seqüência repetitiva BOX-A1R permitiu a separação dos isolados, que pertencem ao mesmo gênero.
4. Alguns isolados como classificados dentro do gênero *Enterobacter* (USC7 e USC8), *Labrys portucalensis* (A5142) e *Burkholderia* sp (A5155), possuem mais de uma função como biofertilizante, promotora de crescimento e aplicações para biorremediação.
4. A acidificação é um dos mecanismos utilizados pelos microrganismos na solubilização de fosfatos naturais, mas existe a atividade de enzimas que necessitam de pH ideal para sua atividade.
5. Os isolados *Candidatus Burkholderia verschuerenii* (A91G) e *Burkholderia* sp.(A3114) foram os que apresentaram os melhores resultados e não apresentam relatos quanto a patogenicidade em plantas, animais ou humanos, podendo ser utilizados para futuros testes em campo de solubilização de fósforo.
6. O isolado *Burkholderia* sp.(A5155) poderia ser utilizado para testes de produção de fitormônio ácido indolacético, por não ser considerada patogênica e por apresentar também capacidade de solubilização de fósforo.

6 REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997.

BARBOSA, J.C., MALDONADO JUNIOR, W. **AgroEstat** - Sistema para Análises Estatística de Ensaios Agronômicos, versão 1.0.,2008.

BARROTI, G.; NAHAS, E. População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35,p.2043-2050,2000.

BASHAN, .Y, HOLGUIN G. *Azospirillum* - plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996). **Canadian Journal Microbiology**, v.43, p.103–121, 1997

BERRAQUEIRO, F.R.; BAYA, A.M. & CORMENZANA, A.R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilizacion de fosfatos por bacterias del suelo. **ARS Farmacéutica**, v.17, p.399-406,1976.

BROEK, A.V. Auxins upregulate expression of the indole-3- Pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p.1338-1342, 1999.

CASAGRANDE, A. A. **Tópicos de morfologia e fisiologia da cana-de-açúcar**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. 157p.

CARVALHO, M.F.; DE MARCO, P.; DUQUE, A.F.; PACHECO, C.C.; JANSEN, D.B. & CASTRO, P.M.L. *Labrys portucalensis* sp. nov., a fluorobenzene-degrading bacterium isolated from an industrially contaminated sediment in northern Portugal .**International Jounal Systematic Evolutionary Microbiology**, v.58,p.692-698,2008.

CERIGIOLI, M.M. Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L) e potencial para promoção de crescimento. 2005. 132p. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

CHAGAS JUNIOR, A.F. Características agronômicas e ecológicas de rizóbios isolados de solos ácidos e de baixa fertilidade da Amazônia. 2007. 158p. Tese (Doutorado em Biotecnologia para Agrofloresta). Universidade Federal do Amazonas, Manaus 2007.

CHAUDRI, A.M., McGRATH, S.P., GILLER, K.E., Metal tolerance of isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* from soil contaminated by past applications of sewage sludge. **Soil Biology and Biochemistry**, v.24, p.83-88, 1992.

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

COENYE, T., GEVERS, D., VAN DE PEER, Y., VANDAME, P., SWINGS, J. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. **FEMS Microbiology Review**, v.29, p.147-167, 2005.

COSTA, N.L., PAULINO, V.T., TOWNSEND, C.R., MAGALHÃES, I.A., PEREIRA, R.G.A. Calagem e adubação de pastagens na Amazônia. **Pubvet**, v.2, p.1-28, 2008.

DANIELS, J., ROACH, B. T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D.J. Sugarcane improvement through breeding. New York: **Elsevier**, 1967, 84p.

DA SILVA, A.C.M. Diversidade genética, densidade populacional e potencial de promoção de crescimento de rizobactérias associadas ao cacaueiro. 2007. 78f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2007.

DA SILVEIRA, E.L. Inoculações de bactéria promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva. 2008. 83p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

DAKORA, F.D.; PHILLIPS, D.A. Root exudates as mediators of mineral acquisition in lownutrient environments. **Plant and Soil**, v.245, p.35-47, 2002.

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Procedimento para coleta de amostra de solos. Ministério de agricultura pecuária e desenvolvimento, EMBRAPA Agrobiologia. 2005. Disponível em: http://www.cnpab.embrapa.br/servicos/analise_solos_coleta.html. Acesso em 15 de janeiro de 2007.

EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M., GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v.8, p.175 -185, 1998.

FACTUR, V.D. Fontes de fósforo associadas à adubação orgânica no plantio de cana-de-açúcar. 2008. 26p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2008.

FERREIRA, E. S.; MONTEIRO, A. O. Efeitos da aplicação da vinhaça nas propriedades químicas, físicas e biológicas do solo. Boletim Técnico. **COPERSUCAR**, Piracicaba, v.37, p.3-7, 1987.

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

GARRITY, G.M., LILBURN, T.G., COLE, J.R., HARRISON, S.H., ENZEBY, J., TINDALL, B.J. Taxonomic Outline of bacteria and archaea: TOBA release 7.7. Michigan: Michigan State University, 2007. Disponível em <<http://www.taxonomicoutline.org>>. Acesso 10 de fevereiro de 2009.

GLICK B.R., The enhancement of plant growth by freeliving bacteria, **Canadian Journal Microbiology**, v.41, p.109–117, 1995.

GOEDERT WJ, SOUSA DMG. Avaliação preliminar de fosfato com acidulação parcial. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.10, p.75-80, 1986.

GONZALEZ, C.F.; VENTURI, V. & ENGLEADOW. A.S. The phytopathogenic *Burkholderia*. In: *Burkholderia* Molecular Microbiology and Genomics. COENYE, T., VANDAME, P. Belgium, Horizon Bioscience, 2007. 303p.

GONZÁLEZ, T.O. Caracterização, diversidade genética e nodulação em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) de isolados de rizóbios do Brasil e da Venezuela. 2008.72f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

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

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Toronto, Pike, v. 26, p.192-195, 1991.

GORIS, J.; DEVOS, P.; CABALLERO-MELLADO, J. et al. Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1677–168, 2004.

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

GRUPTA, R.P.; VYAS, M.K., PANDHER, M.S. Role of phosphorus solubilizing microorganisms in P-economy and crop yield. In: Soil-Plant-microbe Interaction in Relation to nutrient Management, 1998, New Delhi Anais. New Delhi: **Venus Printer & Publisher**, p.95-101.

GULL, M.; HAFEEZ, F. Y.; SALEEM, M.; MALIK, K.A.; Phosphorus uptake and growth promotion of chickpea by co-inoculation of mineral phosphate solubilising bacteria and

mixed rhizobial culture. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.44, p.623-628,2004.

GYANESHWAR, P.; NARESH KUMAR, G.; PAREKH, L.J.. Effect of buffering on the phosphatesolubilizing ability of micro-organisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.14, p.669-673, 1998.

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

HAAG, H.P.; DECHEN, A.R., CARMELO, Q.A.C. Nutrição mineral da cana-de-açúcar. In: PARANHOS, S.B. Cana-de-açúcar, cultivo e utilização. Campinas: **Fundação Cargill**, cap1, p.88-159,1987.

HOLFORD, I.C.R. Soil phosphorus: its measurement and, its uptake by plants **Australian Journal of Soil Research**, v.35, p. 227-239, 1997.

HULTON, C.S.J.; HIGGINS, C.F.; SHARP, P.M.ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, v.5, p.825-762, 1991.

HUNGRIA, M.; MENNA, P.; BANGEL E.V.;BARCELLOS, F.G.; GRANGE, L.; PINTO, F.G.S.;RIBEIRO, R.A.; BATISTA, J.S.S.; BINDE, D.R.;PLOTTEGHER, F.; KASCHUK, G.; ALBERTON, A.;LOUREIRO, M.F.; CAMPO. R.J.; CHUEIRE, L.M.O.Identificação das metodologias mais adequadas para a análise da diversidade genética intra e interespecífica em rizóbios. In: RELARE, 14, 2008, Bonito: **Embrapa Agropecuária Oeste**, 2008. p.12.

IGUAL, J.M.; VALVERDE, A.; CERVANTES, E.; VELÁSQUEZ, E. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of update molecular techniques in their study, **Agronomie**, v.21, p.561-568, 2001.

IRVINE, J.E. Sugarcane. In: Potential productivity of field crops under different environments. **International Rice Research Institute**, v.10, p. 361-382. 1983.

JUKES, T.H., CANTOR, C.R. Evolution of protein molecules . In JUKES, T.H., CANTOR, C.R. Mammalian protein metabolism. New York: **Academic Press**, 1969. p.21-132.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal Applied Microbiology**, v.96, p.473-480, 2004.

KÄMPFER, P. Taxonomy of phosphate solubilizing bacteria. In: Development in Plant and soil science: First International Meeting on Microbial phosphate Solubilization, Salamanca, Spain, Anais. Netherlands, 2003. p.101-106.

KÄMPFER, P.; YOUNG, C.C.; SRIDHAR, K.R.; ARUN, A.B.; LAI, W.A.; SHEN, F.T. & REKHA, P.D. Transfer of [*Flexibacter*] *sancti*, [*Flexibacter*] *filiformis*, [*Flexibacter*] *japonensis* and [*Cytophaga*] *arvensicola* to the genus *Chitinophaga* and description of *Chitinophaga skermanii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p.2223-2228, 2006.

KARAMUSHKA, V. I.; SAYER, J. A.; GADD, G. M. Inhibition of H⁺ efflux from *Sacharomyces cerevisiae* by insoluble metal phosphates and protection by calcium and magnesium: inhibitory effects a result of soluble metal cations? **Mycological Research**, v. 100, n. 6, p. 707-413, jun. 1996.

KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J.R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Research**, v.5, p.408-418, 1995

KORNDÖRFER, G.H., ANDERSON, D.L. Use and impact of sugar-alcohol residues vinasse and filter cake on sugarcane production in Brazil. **Sugar y Azucar**, v.3, n.92, p.26-35, 1997.

KORNDÖRFER, G.H. Fósforo na cultura da cana-de-açúcar. In. YAMADA, T., ABDALLA, S.R.S. **Fósforo na agricultura Brasileira**. Piracicaba, 2004. Capítulo 11.

KUKLINSKY-SOBRAI, J., ARAÚJO, W.L., MENDES, R., GERALDI, I.O., PIZZIRANI-KLEINER, A.A., AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean-associated

bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental. Microbiology**, v.6, p.1244-1251, 2004.

LARKIN, M.A., BLACKSHIELDSG., BROWN, N.P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P.A., MCWILLIAM, H., VALENTIM, F. , WALLACE, L.M. , WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., HIGGINS, D.G.I Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p.2947-2948, 2007.

LEBUHN, M; HARTMANN, A. Method for the determination of indole-3-acetic acid and related compounds of L-tryptohan catabolism in soils. **Journal of Chromatography**, v.629, p.255-266, 1993.

LEGENDRE, L.;LEGENDRE, P. Numerical ecology. New York: **Elsevier**, 1983. 419 p

LIN, T.F.; HUANG, H.I. SHEN, F.T.; YOUNG, C.C., The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174. **Bioresource technology**, v.97, p.957-960, 2006.

LEÓN, L. A.;W. E. FENSTER & L. L. HAMMOND. Agronomic potential of eleven phosphate rocks from Brazil, Colombia, Perú and Venezuela. Soil Science Society of American Journal, v.50: 780-802,1986.

MALAVOLTA, E., VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. Avaliação de Estado Nutricional das Plantas: Princípios e aplicações. Piracicaba. Associação Brasileira pra Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1989, 193p.

MARTIN B.; HUMBERT O.; CAMARA M.; GUENZIE.; WALKER J.; MITCHELL T.; ANDREW P.; PRUDHOMME M.; ALLOING G.; HAKENBECK R.;MORRISON D.A.; BOULNOIS G.J.; CLAVERYYS J.P.A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v.20, p.3479–3483, 1992.

MARTINS, N.G.S. Os fosfatos na cana-de-açúcar. 2004. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Piracicaba, 2004.

MARSCHENER, P.; CROOWLEY, D.E.; LIEBEREI, R. Arbuscular mycorrhizal infection changes the bacterial 16S rDNA community composition in the rhizosphere of maize. **Mycorrhiza**, v.11, p.297-302, 2001.

MASSENSINI, A.M. Solubilização de fosfatos mediada por microrganismos do solo de plantio de Eucalipto. 2007. 95f. (Dissertação em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N., MARTINES-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p. 315-322, 2006.

MIKANOVÁ, O.; NOVAKOVÁ, J. Evaluation of the P – solubilizing of soil microorganisms and its sensitivity to soluble phosphate. **Rostlinná Výroba**, v. 48, p.397-400,2002.

MIMURA, T.Regulation of phosphate and homeostasis in plant cells. **International Review of Cytology**, v.190, n.2, p.149-200, 1999.

MINERDI, D.; FANI, R.; GALLO, R.; BOARINO, A.; BONFANTE, P., Nitrogen fixation genes in an endosymbiotic *Burkholderia* strain. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, p.725–732, 2001

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

MITTAL, S.; JOHRI, B.N. Assessment of rhizobacterial diversity of *Triticum aestivum* and *Eulisia coracana* from Northern region of India. **Current Science**, v. 93, p. 1530-1537, 2007.

NAHAS, E; CENTURION, J.F.; ASSIS, L.C. Phosphate-solubilizing and phosphate – producing microorganisms from various soils. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.18, p.49-53, 1994.

NAHAS, E. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.12,p.567-571,1996.

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

OLIVEIRA MCC DE, LOPES ES, SILVA MTR DE, NAGAI R. Influência de oxidação microbológica do enxofre na solubilização de apatita de Araxá. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.1, p.24-28, 1997.

OLIVEIRA JUNIOR, A. Eficiência agrônômica de fosfatos de rocha, utilizados isoladamente ou associados ao superfosfato triplo, para a cultura da soja. 2007. 127p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Piracicaba, 2007.

PAAUW,A.;CASPER,M.P.M;SCHUREN,F.H.;LEVERSTEIN-VAN HALL, M.A.; DELÉ TOILE, A.;MONTJIN,R.C.; VERHOEF, J., FLUIT, A.D.C. Genomic Diversity within the *Enterobacter cloacae* Complex. **PlosOne**, v.3, p.1-11, 2008.

PAVLICEK A., HRDA S, FLEGR J. FreeTree - Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. **Folia Biologica(Praha)**, v. 45, p.97-99, 1999.

PAYNE, G.W.;RAMETTEZ, A.; ROSE,H.L.; WEIGHTMAN, A.J.; JONES, T.H.; TIEDJE, J.M.; Mahenthalingam.E. ,Application of a *recA* gene-based identification approach to the maize rhizosphere reveals novel diversity in *Burkholderia* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 259, p.126-132, 2006.

PERIN, L. Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em associação com cana-de-açúcar e descrição de *Burkholderia silvattlantica*. 2007.108p. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

PIRONE, L., CHIARINI, L., DALMASTRI, C., BEVININO, A., TABACCHIONI, S.. Detection of cultured and uncultured *Burkholderia cepacia* complex bacteria naturally

occurring in the maize rhizosphere. **Environmental Microbiology**, v.11, p.1734-1742, 2005.

PROCHNOW, L.I., ALCARDE, J.J.C., CHIEN, S.H. eficiência Agronômica dos fosfatos totalmente acidulados. In. YAMADA, T., ABDALLA, S.R.S. **Fósforo na agricultura Brasileira**. Piracicaba, 2004. Capítulo 23.

RIPOLI, T.C.C., RIPOLI, M.L. Biomassa de cana-de-açúcar : colheita, energia e ambiente, Piracicaba, 2004,302p.

RIVAS, R., VELÁZQUEZ, E., VALVERDE, A., MATEOS, P.F., MARTÍNEZ-MOLINA, E. A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprint of bacteria species, **Electrophoresis**, v.22, p.1086 - 1089, 2001.

ROBBRECHT, E. Tropical woody Rubiaceae. Characteristic features and progressions. Contributions to a new subfamilial classification. **Opera Botanical Belgium**, v.1, p.1–272, 1988.

ROMBOLA, T.H. Indução da Expressão e Caracterização de uma possível fosfatase ácida ligada à membrana produzida por *Burkholderia* sp. 2008.36f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

ROHLF, F.J.; SLICE, D.E. NTSYS- Numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: **Exater Software**, 1992. 115p.

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

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

RODRIGUEZ NETO, J.; MALAVOLTA JUNIOR, V.A. VICTOR, O. Meio Simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *Citri* tipo B. **Summa Phytopathologica**, v.12, p.16 1986.

- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. **Molecular Biology Evolution**, v.4, p.406-25, 1987.
- SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2 ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 545p.
- SILVA FILHO, G.N., VIDOR, C. Solubilização de fosfato por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p.311-319, 2000.
- SILVA FILHO, G.N.; NARLOCH, C. & SCHARF, R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.847-854. 2002.
- SIQUEIRA, J.O., MOREIRA, F.M.S., GRISS, B.M., HUNGRIA, M., ARAÚJO, R.S. Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 142p. (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 45).
- SOBRAL, J.K. A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta. 2003. 108p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2003.
- SONG, O.R., LEE, S.J., LEE, Y.S., LEE, S.C., KIM, K.K., CHOIN, Y.L. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* da23 isolated from cultivated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p.151-156, 2008.
- SOUCHIE, E.L.; BAREA, J.M.; SAGGIN-JUNIOR, O.J. e DA SILVA, E.M.R. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.1149-1152, 2005.
- SOUCHIE, E.L.; ABOUD, A.C.S.; CAPRONI, A.L. Solubilização de fosfato *in vitro* por microrganismos rizosféricos de guandu. **Bioscience Journal**, v.23, p.53-60, 2007.

STERN, M.J., AMES, G.F.L., SMITH, N.H., ROBINSON, E.C., HIGGINS, C.F. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell**, v.37, p.1015–1026, 1984.

SPERA, A.T., NASCIMENTO JUNIOR, A. Sistema de Produção, 1 - 2ª Edição, Versão Eletrônica, 2006. Disponível em: [http:// sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/ Fontes HTML/Centeio/ Cultivo de Centeio_2 ed/solos](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Centeio/Cultivo_de_Centeio_2_ed/solos). Acesso em 25 de junho de 2009.

SUNDARA, B., NATARAJAN, V., HARI, K., Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. **Field Crops Research**, v.77, p. 43–49, 2002.

TABACCHIONI S., BEVIVINO A., CHIARINI L., VISCA P., DEL GALLO M. Characteristics of two rhizosphere isolates of *Pseudomonas cepacia* and their potential plant-growth promoting activity. **Microbiology Releases**, v.2, p.161-168, 1993.

TAKENAKA, S.; OKUGAWA, S.; KADOWAKI, M.; MURAKAMI, S. & AOKIL, K. The Metabolic Pathway of 4-Aminophenol in *Burkholderia* sp. Strain AK-5 Differs from That of Aniline and Aniline with C-4 Substituents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p.:5410-5413, 2003.

TAMURA, K. DUDLEY, J., NEI, M., KUMAR, S. MEGA 4: molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology Evolutionary**, v. 24, p.1596-1599, 2007.

TASSO JUNIOR, L.C. Caracterização agrotecnológica de cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) na região centro-norte do estado de São Paulo. 2007.167f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007

TOLEDO, B.F.B., MARCONDES, J., LEMOS, E.G.M. Caracterização de rizóbios indicados para produção de inoculantes por meio de seqüenciamento parcial do 16 S rRNA. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.384-391, 2009.

TORO N., AZCÓN R., BAREA J.M. Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock

phosphate bioavailability (^{32}P) and nutrient cycling. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.4408–4412, 1997.

TSAVKELOVA, E.A., CHERDYNTSEVA, T.A., NETRUSOV, A.I. Auxin production by bacteria associated with orchid roots. **Microbiology**, v.74, p.46-53, 2005

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Safra 2008/2009. Disponível em <http://www.unica.com.br/>. Acesso 10 de Março de 2009.

URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R. & BOODEY, R.M. Produção de Biocombustíveis - A questão do Balanço energético. **Revista Política Agrícola**, v.1, p.42-46, 2005.

VALVERDE, A., DELVASTO, P., PEIX, A., VELÁZQUEZ, E., SANTA-REGINA, I., BALLESTER, A., RODRÍGUEZ-BARRUECO, C. *Burkholderia ferrariae* sp. nov., isolated from an iron ore in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.2421–2425, 2006.

VAN BERKUM, P. Short sequence repeats in microbial pathogenesis and evolution. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.56, p.729-734, 1999.

VASQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, M.E.; LOPEZ-CORTEZ, A.; BASHAN, Y. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, p.460-468, 2000.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.61, p.435-440, 2003.

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

VERSALOVIC J., SCHNEIDER M., DE BRUIJN F.J., LUPSKI J.R., Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequences based on PCR (rep-PCR), **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v.5 p.25–40, 1994.

VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v.255, p.571-586., 2003.

XIAO, C.Q.; CHI, R.A.; HUANG, X.H; ZHANG, W.X.; QIU, G.Z. & WANG, D.Z. Optimization for rock phosphate solubilization by phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines. **Ecological Engineering**, v.3, p.187-193, 2008.

WANG, Q.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M., Cole J. R. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. **Applied Environmental Microbiology**, v. 7, p.5261-7. 2007.

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

YADAV, K., SINGH, T.. Effect of *Bacillus megatherium* on the solubilization of phosphatic fertilizers influencing yield and uptake by sugarcane. **Bharatiya Sugar**, v.15, p.15-23, 1990.

ZAKHAROVA E.A., SCHERBAKOV, A.A., BRUDNIK, A.V., SKRIPKO, N.G., BULKHIN, N.S., IGNATOY, V.V. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. **European Journal Biochemistry**, v. 259, p. 572- 576, 1999.