



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

**OCORRÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS EM SIMBIOSE COM *Mimosa* spp. EM ÁREAS DE SOLO
ULTRAMÁFICO**

CLEMENTE BATISTA SOARES NETO

Orientador: Prof. Dr. Helson Mario Martins do Vale

Brasília – DF - Março, 2015.



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

**OCORRÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS EM SIMBIOSE COM *Mimosa* spp. EM ÁREAS DE SOLO
ULTRAMÁFICO**

CLEMENTE BATISTA SOARES NETO

Orientador: Prof. Dr. Helson Mario Martins do Vale

Dissertação apresentada à
Universidade de Brasília, como parte
das exigências do Programa de Pós-
graduação em Biologia Microbiana,
para obtenção do título de Mestre.

Brasília – DF - Março, 2015.

**OCORRÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS EM SIMBIOSE COM *Mimosa* spp. EM ÁREAS DE SOLO
ULTRAMÁFICO**

CLEMENTE BATISTA SOARES NETO

Banca Examinadora:

Pesquisador. Dr. Marco Aurélio Caldas de Pinho Pessoa Filho - Embrapa Cerrados (Titular)

Profa. Dra. Maria Lucrécia Gerosa Ramos - Universidade de Brasília (Titular)

Pesquisador. Dr. Fábio Bueno dos Reis Junior – Embrapa Cerrados (Suplente)

Prof. Dr. Helson Mario Martins do Vale- Orientador

Brasília – DF - Março, 2015.

Aos meus pais, Alberto e Mariza, por toda dedicação

e amor incondicional!

Á minha filha, Maria Cecília, por ser minha estrela-guia!

A minha amada esposa Alexandra!

Ao meu irmão e cunhada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me direcionar cada dia durante essa fase da minha vida.

Ao meu orientador prof. Dr. Helson Mario, pelo acolhimento, ensinamentos, paciência e por ter acreditado em meu potencial.

Ao Dr. Fábio Bueno, pela convivência, pelas incontáveis orientações, ensinamentos, críticas necessárias. Obrigado por me apresentar um mundo novo da Microbiologia Agrícola!

Aos Drs. Euan Kevin James (The James Hutton Institute) e Valter Antônio Baura (UFPR) pelas valiosas contribuições nos trabalhos de microscopia e sequenciamento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro ao projeto.

A CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo auxílio financeiro.

A Universidade de Brasília e ao Programa de Pós Graduação em Biologia Microbiana.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Cerrados, assim como, a empresa Mineradora Anglo American do Brasil, por toda logística de realização dos experimentos. Em especial aos laboratórios de Microbiologia de Solos, Fitopatologia e Biologia Molecular por todo apoio.

A todos os colegas do laboratório de Microbiologia de Solos da Embrapa, em especial aos técnicos Lucas e Clodoaldo, por todo apoio e convivência diária e a Dra. Iêda pelo acolhimento e preocupação.

Aos IC'S do laboratório e em especial Carlos e Vera por todo o apoio na realização dos trabalhos.

A todos os Colegas de Pós-graduação e em especial a Lucas, Geysiane, Érica, Marcos, Cataherine e Flávia. Meus amigos e incentivadores, em especial Félix Siqueira, meus familiares obrigado pelas orações e toda torcida... A cada um que fez parte dessa história... Meu muito Obrigado!

RESUMO

Solos ultramáficos são caracterizados por apresentarem baixa disponibilidade de nutrientes e altos teores de metais pesados, incluindo o níquel. As leguminosas, como *Mimosa* spp., estão entre os vegetais que ocorrem naturalmente em áreas com esse tipo de solo. Para fixarem nitrogênio essas plantas se associam simbioticamente com bactérias diazotróficas, incluindo as beta-proteobactérias. O objetivo desse estudo foi avaliar a ocorrência, caracterizar e identificar bactérias diazotróficas noduladoras em simbiose com plantas do gênero *Mimosa* no maciço ultramáfico de Barro Alto-Goiás. Para tal, foram coletadas amostras de nódulos de *Mimosa somnians* e *Mimosa clausenii*, dos quais foi feito o isolamento das bactérias presentes nos nódulos em meio YMA. Foram obtidos setenta e oito isolados, caracterizados por meio de análises morfológicas, moleculares e bioquímicas. O sequenciamento do gene 16S RNAr mostrou que 54 isolados eram pertencentes ao gênero *Burkholderia* e seis a *Pseudomonas*. Não foi possível obter as sequências completas desse gene para 18 isolados. Somente nove isolados, incluindo as seis *Pseudomonas*, foram capazes de solubilizar fosfato em meio com fosfato de cálcio. Não houve solubilização em meio com fosfato de alumínio por nenhum dos isolados. Os isolados não apresentaram tolerância ao Ni. Trinta e oito isolados foram capazes de produzir sideróforos e todos produziram o fitormônio AIA, variando de 8,7 a 54,1 µg/mL. Entre as enzimas avaliadas, todos os isolados produziram celulases, lipases e pectinases, enquanto nenhum isolado produziu urease, lipase e xilanase. Os testes de nodulação em meio Jensen com *M. pudica* e vasos com substrato (areia e carvão) com *Phaseolus vulgaris* mostraram a capacidade de nodulação por *Burkholderia*. Porém, apesar de nodularem o feijoeiro, os isolados não foram eficientes em fixar o nitrogênio atmosférico em simbiose com essa planta. Os isolados de *Pseudomonas* spp. não apresentaram capacidade para formação de nódulos nas condições testadas. Entretanto, os genes *nodC* e *nifH*, avaliados por meio de PCR, se mostraram presentes nos isolados W14 e W24 pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. Esses resultados apontam a ocorrência de beta-proteobactérias pertencentes ao gênero *Burkholderia* em solos ultramáficos associados à *Mimosa* spp. Apesar de também terem sido isoladas de nódulos, para bactérias do gênero *Pseudomonas*, ainda permanece a necessidade de outros estudos sobre sua capacidade simbiótica. Os isolados apresentaram potencial para diversas características de importância agrícola e poderão ser prospectados para sua utilização em programas de recuperação de áreas degradadas.

Palavras-chave: *Burkholderia*, leguminosas, fixação biológica de nitrogênio, nódulos, níquel, metais pesados.

ABSTRACT

Ultramafic soils are characterized by low nutrient availability and high levels of heavy metals, including nickel. Legume plants, such as *Mimosa* spp., are among plants that occur naturally in areas with this type of soil. To fix nitrogen symbiotically these plants are associated with diazotrophic bacteria, including beta-proteobacteria. The aim of this study was to evaluate the occurrence, characterize and identify bacteria in symbiosis with nodulating nitrogen fixing plants from the genus *Mimosa* from the ultramafic massif of Barro Alto - Goiás. Samples were collected from nodules of *Mimosa sommiensis* and *Mimosa clausenii* from which the isolation of bacteria on YMA medium was made. Seventy-eight isolates were obtained and characterized by means of morphological, molecular and biochemical analyses. The sequencing of the gene 16S rRNA showed that 54 isolates belonged to the genus *Burkholderia* and six to *Pseudomonas*. It was not possible to get the complete sequences of the 16S rRNA gene for the 18 remaining isolates. Only nine isolates, including six *Pseudomonas*, were able to solubilize phosphate in medium containing calcium phosphate. There was no dissolution in medium with aluminum phosphate. The isolates showed no tolerance to Ni. Thirty-eight strains were able to produce siderophores and all produced the phytohormone IAA, ranging from 8.7 to 54.1 µg / mL. Among the evaluated enzymes, all isolates produced cellulases, lipases and pectinases, while none were able to produce urease, lipase and xylanase. Nodulation tests in Jensen medium with *M. pudica* and pots with substrate (sand and coal) with *Phaseolus vulgaris* showed nodulation capacity by *Burkholderia*. But despite the capacity to nodulate common bean they were not efficient to fix atmospheric nitrogen in symbiosis with the plant. Isolates of *Pseudomonas* spp. showed no ability for nodule formation in the tested conditions. However, *nodC* and *nifH* genes, assessed by PCR, were present in the isolates W14 and W24. These results indicate the presence of beta-proteobacteria of the genus *Burkholderia* in ultramafic soils associated with *Mimosa* spp. Although bacteria from the genus *Pseudomonas* have also been isolated from nodules, further studies of their symbiotic ability remains needed. The isolates showed potential for several traits of agricultural importance and may be prospected to be used in restoration of degraded areas.

Keywords: *Burkholderia*, legumes, biological nitrogen fixation, nodules, nickel, heavy metals.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Distribuição dos locais no mundo onde ocorrem solos com aflorações serpentínicas.....19
- Figura 2** Imagem esquemática, representando os locais de coleta no município de Barro Alto, em Goiás.....42
- Figura 3** Detalhes fitofisionômicos das áreas de solos ultramáficos onde foram coletados os nódulos de *Mimosa* spp. em Barro Alto, Goiás.....43
- Figura 4** Diagrama esquemático mostrando uma síntese da metodologia para avaliação dos isolados44
- Figura 5** Esquema de imagens mostrando a metodologia empregada durante o experimento de nodulação de isolados de bactérias diazotróficas oriundos de *Mimosa* spp em meio Jensein.....47
- Figura 6** Imagens de nódulos *Mimosa somnians* (A, B); e nódulos de *M. clausenii* (C, D), em solos ultramáficos de Barro Alto - GO.....60
- Figura 7** Locais onde já foi relatada a ocorrência de *Mimosa somnians*.....61
- Figura 8** Locais no Brasil onde já foi relatada a ocorrência de *Mimosa clausenii*.....61
- Figura 9** Fotomicrografias obtidas de microscopia óptica mostrando a estruturas típica de nódulo em *M. somnians* e *M. clausenii* imuno-marcado (A,B) com anticorpo contra *Cupriavidus taiwanensis* e bacteróides em nódulos de *M. clausenii* e *M. somnians* imuno-marcados (C,D) com anticorpo contra *B. phymatum*63
- Figura 10** Árvore filogenética construída pelo método de *Weighbor Joining* utilizando as sequências do gene 16S RNAr dos isolados bacterianos de nódulos de *Mimosa* spp.....67
- Figura 11** Monitoramento do crescimento de *Mimosa pudica* durante todo o experimento de nodulação de isolados de bactérias diazotróficas oriundos de *Mimosa* spp em meio Jensein69
- Figura 12** Fotografias evidenciando o experimento de teste de Especificidade hospedeira de isolados de bactérias diazotróficas oriundos de *Mimosa* spp. inoculados em plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*). (A) Visão geral do experimento aos 15 DAG (A), 20 DAG (B) e 30 DAG (C); comparação entre plantas não inoculadas (testemunhas) e plantas que receberam nitrogênio mineral aos 30 DAG (D.....71

- Figura 13** Fotografias evidenciando o experimento de teste de Especificidade hospedeira de isolados de bactérias diazotróficas oriundos de *Mimosa* spp. inoculados em plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*). Visão geral do experimento aos 30 DAG: Plantas não inoculadas e PRF81 (estirpe padrão de inoculante de feijão) (A); plantas não inoculadas e isolado (W3) de *Burkholderia* (B); isolados (W3) e W (32) de *Burkholderia* e isolado PRF81 (estirpe padrão de inoculante de feijão), respectivamente; (C) e (D); nódulos formados pela inoculação da estirpe padrão inoculante de feijão (E) e isolado de *Burkholderia* W41 (F). (C,D).....72
- Figura 14** Produtos de amplificação do gene *nifH* de alguns isolados de nódulos provenientes de *Mimosa somnians* e *M. clausenni*.74
- Figura 15** Produtos de amplificação do gene *nodC* para alguns isolados de nódulos provenientes de *Mimosa somnians* e *M. clausenni*.74
- Figura 16** Exemplo de isolados de nódulos de *Mimosa* em meio YMA com azul de bromotimol (A) e vermelho congo (B).....75
- Figura 17** Dendograma de similaridade entre isolados de nódulos de *Mimosa* spp, provenientes de solos ultramáficos de Barro Alto (GO), gerado pelo algoritmo UPGMA e matriz de similaridade calculada pelo índice *Simple matching*, a partir dos dados de morfologia de colônias em meio YMA.....78
- Figura 18** Teste de solubilização de fosfato em meio NBRIP para os isolados W2, W5 e W1 e em meio YED-P para os isolados W14, W15 e W16.....79
- Figura 19** Teste de tolerância ao Ni em meio de cultivo YMA. São mostradas placas controle (A) e com 0,5 mM de Ni (B).....82
- Figura 20** Teste de produção de sideróforos para os isolados W21 e W8. Após 72 horas de incubação a 28 °C.....84
- Figura 21** Produção da enzima urease por isolado utilizado como controle positivo (A); e resultados dos isolados testados nesse trabalho (B).91
- Figura 22** Produção da enzima protease por isolado utilizado como controle positivo, (A); e isolados testados nesse trabalho para produção dessa enzima (B).92
- Figura 23** Isolados testados nesse trabalho para produção da enzima xilanase.....93

Figura 24 Produção da enzima celulase mostrando os resultados obtidos pelos isolados avaliados.....	94
Figura 25 Produção de pectinases. Halo de degradação característico para 87% dos isolados avaliados (A); 13% dos isolados com maior produção de pectinases, (B).....	95
Figura 26 Produção de lipase mostrando os resultados obtidos pelos isolados avaliados.....	96
Figura 27 Dendograma de similaridade entre isolados de nódulos de <i>Mimosa</i> spp, provenientes de solos ultramáficos de Barro Alto (GO), gerado pelo algoritmo UPGMA e matriz de similaridade calculada pelo índice <i>Simple matching</i> , a partir dos dados de morfologia de colônias em meio YMA e produção de enzimas.....	98
Quadro 1 Resultados da produção de ácido-indol-acético produzido pelos 78 isolados bacterianos caracterizados nesse estudo, provenientes de nódulos de <i>M. sommiensis</i> e <i>M. clausenii</i>	90

LISTAS: TABELAS e ANEXOS

Tabela 1 Propriedades químicas de dois solos ultramáficos e um solo de Cerrado não-ultramáfico usados no presente estudo	40
Tabela 2 Concentração de metais biodisponíveis em dois solos ultramáficos e um solo de Cerrado não ultramáfico usados no presente estudo	41
Tabela 3 Origem dos isolados de nódulos de <i>Mimosa</i> spp. oriundos de solos ultramáficos de Barro Alto (GO) utilizados nesse trabalho.....	56
Anexo 1 Tabela 1 Quadro geral de resultados de caracterização de isolados de <i>Mimosa</i> spp. utilizadas no trabalho.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIA- Ácido-Indol-Acético

Al- Alumínio

AlPO₄- Fosfato de Alumínio

Ca- Cálcio

CAS-Chromeazurol Agar Assay

cm- Centímetro

Co- Cobalto

Cr-Cromo

Cu-Cobre

D.O- Densidade óptica

DAG- Dias Após Germinação

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FBN- Fixação biológica de nitrogênio

Fe- Ferro

FeCl₃.6H₂O- Cloreto de ferro hexaidratado

g- Grama

g/l- Grama por litro

GO- Goiás

h- Hora

HClO₄- Ácido perclórico

K- Potássio

M- Molar

Mg- Magnésio

min- Minuto

mL- Mililitro

mM- Milimolar

Mn- Manganês

N- Nitrogênio

N₂- Nitrogênio atmosférico

NBRIP-National Botanical Research Institute's Phosphate

Ni-Níquel

Nm- Nanômetro

°C- Graus Celsius

P- Fósforo

PCR - "Polimerase Chain Reaction" (Reação em Cadeia da Polimerase)

PGPRs-Rizobactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (Plant Growth Promoting Rhizobacteria)

Rpm- Rotação por minuto

TSB- Caldo de triptona de soja

YMA- Agar Manitol Extrato de Levedura

µg- Micrograma

µL- Microlitro

µm- Micrometro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
1.REFERENCIAL TEÓRICO	18
1.1 Os solos ultramáficos e atividade mineradora de Ni.....	18
1.2 As leguminosas e as bactérias comumente chamadas de rizóbios.....	20
1.3 Nodulação de <i>Mimosa</i> por beta-proteobactérias.....	21
1.4 Evolução das simbioses com beta-proteobactérias.....	22
1.5 Fisiologia/Bioquímica e Potencial biotecnológico de isolados bacterianos.....	24
1.5.1 Interação planta-bactéria na disponibilização de nutrientes.....	24
1.5.1.1 Disponibilização de fósforo	25
1.5.1.2 Bactérias e Tolerância a Ni.....	26
1.5.1.3 Disponibilização de Fe por meio de sideróforos.....	27
1.5.1.4 Produção de fitormônio: Ácido-Indol-Acético (AIA)	28
1.5.1.5 Produção de enzimas por isolados bacterianos	30
1.5.1.6 Importância do uso de ferramentas moleculares na identificação de bactérias diazotróficas .	36
2.OBJETIVOS	38
2.1 Objetivo Geral.....	38
2.2 Objetivos Específicos.....	38
3.MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Áreas de coleta e métodos de amostragem.....	39
3.2 Análises microscópicas.....	44
3.3 Isolamento de bactérias presentes em nódulos de <i>Mimosa</i> spp.....	44
3.4 Amplificação e sequenciamento do gene 16S RNAr e construção de árvore filogenética.....	45
3.5 Confirmação da capacidade de nodulação dos isolados bacterianos.....	46
3.6 Teste de especificidade hospedeira de isolados de bactérias diazotróficas oriundos de <i>Mimosa</i> spp. inoculados em plantas de feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	48
3.7 Amplificação dos genes simbióticos <i>nifH</i> e <i>nodC</i>	49
3.8 Caracterização dos isolados bacterianos.....	50
3.8.1 Caracterização morfológica dos isolados de bactérias nodulantes.....	50
3.8.2 Capacidade de solubilização de fosfatos	50
3.8.3 Avaliação de tolerância a níquel	51
3.8.4 Produção de sideróforos.....	51
3.8.5 Produção de hormônio de crescimento vegetal do tipo Ácido-Indol-Acético (AIA)	52
3.8.6 Produção de enzimas: celulases, ureases, proteases, pectinases, xilanases e lipases	53

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1 Espécies de <i>Mimosa</i> , nodulação e isolamento de bactérias diazotróficas.....	56
4.2 Análises microscópicas.....	61
4.3 Identificação dos isolados por meio do sequenciamento do gene 16S RNAr.....	64
4.4 Confirmação da capacidade de nodulação dos isolados bacterianos.....	68
4.5 Teste de especificidade hospedeira de isolados de bactérias diazotróficas oriundos de <i>Mimosa</i> spp. inoculados em plantas de feijoeiro comum.....	69
4.6 Amplificação dos genes simbióticos <i>nifH</i> e <i>nodC</i>	72
4.7 Caracterização morfológica dos isolados.....	75
4.8 Caracterização fisiológica/bioquímica dos isolados bacterianos.....	79
4.8.1 Capacidade de solubilização de fosfatos.....	79
4.8.2 Avaliação de tolerância a níquel.....	82
4.8.3 Produção de Sideróforos.....	84
4.8.4 Produção de hormônio de crescimento vegetal do tipo Ácido-Indol-Acético.....	86
4.8.5 Produção de enzimas: celulasas, ureases, proteases, pectinases, xilanases e lipases.....	91
5 CONCLUSÕES	99
6 REFERÊNCIAS	101
7. ANEXOS	125

INTRODUÇÃO

Solos ultramáficos apresentam excesso de metais potencialmente tóxicos, tais como cobalto, cromo, cobre e, principalmente, níquel, além de baixa disponibilidade de nutrientes, como cálcio, fósforo e nitrogênio, resultando em forte desequilíbrio mineral. No Brasil, complexos ultramáficos, do estado de Goiás, possuem grande importância econômica devido à intensa atividade de mineração nestas áreas, desde o final dos anos 1970. Essas operações de mineração resultaram na degradação de extensas áreas de vegetação nativa.

Nos projetos que vêm sendo desenvolvidos pela Embrapa Cerrados e parceiros, plantas do gênero *Mimosa* foram identificadas como pioneiras, com alta rusticidade, boa produção de biomassa e tolerância a altas concentrações de Ni, figurando entre as espécies predominantes nos solos ultramáficos de Barro Alto (GO) (ANDRADE, 2011). Estudos sobre a ocorrência e caracterização de bactérias diazotróficas em simbiose com essas leguminosas, nativas desse ambiente, podem ser parte importante para o delineamento de metas e estratégias de programas que busquem a conservação ambiental e recuperação de áreas degradadas, a exemplo do que já vem sendo realizado em áreas da floresta amazônica e da mata atlântica. Para as condições de Cerrado, notadamente em áreas de mineração, praticamente não existem trabalhos nessa linha.

Recentemente descobriu-se que espécies de *Mimosa*, oriundas principalmente dos biomas Cerrado e Caatinga, formam simbiose com bactérias diazotróficas conhecidas como beta-rizóbios, particularmente *Burkholderia* spp., e que provavelmente desempenhem papel de destaque na ciclagem de N nesse ecossistema. Esses mesmos estudos sugerem que características ambientais, em maior proporção que as espécies hospedeiras, são responsáveis por determinar a distribuição de espécies de *Burkholderia* (BONTEMPS et al.; 2010; REIS JR et al.; 2010). Diante disso, é lógico acreditar que em um ambiente tão particular quanto os solos ultramáficos a fixação biológica de nitrogênio seja conduzida por microsimbiontes ainda desconhecidos.

O presente trabalho tem por objetivo avaliar a ocorrência, caracterizar e identificar bactérias diazotróficas noduladoras em simbiose com plantas do gênero

Mimosa no maciço ultramáfico de Barro Alto (GO). Espera-se que os resultados desse projeto auxiliem no avanço do conhecimento da simbiose entre bactérias diazotróficas e leguminosas presentes nesses solos com altas concentrações de metais, assim como, forneçam subsídios básicos para programas de recuperação de áreas impactadas pela mineração.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Os solos ultramáficos e atividade mineradora de Ni

Os solos formados sobre maciços ultramáficos são caracterizados por apresentarem teores excessivos de metais (Ni, Cr, Mn, Co), excesso de Mg em relação ao Ca, forte desequilíbrio mineral, e baixo nível de nutrientes (N,P, K, Ca, etc).

As aflorações ultramáficas ocorrem em aproximadamente 1% da superfície terrestre. Os solos, derivados de rochas ultramáficas, são encontrados em várias partes do mundo (Figura 1), como Índia, Portugal, Itália, Áustria, Espanha, Cuba e Nova Caledônia (ANTIC-MLADENOVIC et al., 2011; PEREIRA et al., 2008; REEVES et al., 1999; PILLON et al., 2010). No Brasil, ocorrem nos estados de Goiás, Bahia e Minas Gerais (CORRÊA, 2010). Por estarem em uma região caracterizada por solos derivados desses tipos de rochas, os municípios brasileiros de Niquelândia e Barro Alto, em Goiás, são muito importantes no contexto geológico brasileiro, pela ocorrência de depósitos minerais e por possuírem uma das maiores reservas mundiais de Ni, metal altamente demandado na produção de aço inoxidável (BARBOSA et al., 2013; VIDAL-TORRADO et al., 2006; REEVES et al., 2007).

Embora a atividade mineradora tenha elevada importância socioeconômica, os impactos ambientais decorrentes da exploração são intensos e se revelam na supressão da vegetação da área explorada, na degradação do solo, na deposição de diversos rejeitos e na conseqüente contaminação dos solos e corpos d'água adjacentes (MERCHI; SANCHES, 2012). Em função deste quadro, esforços vêm sendo aplicado pela sociedade, por meio das instituições governamentais e organizações não governamentais e das empresas mineradoras, para minimizar o problema. No entanto, as ações realizadas a fim de reabilitar os locais degradados pelas atividades mineradoras são ainda insuficientes.

Uma forma de minimizar os impactos ambientais decorrentes da exploração mineral seria a utilização de técnicas de recuperação de áreas degradadas. Os programas de recuperação devem apoiar-se, preferencialmente, nos trabalhos de botânica e de ecologia vegetal para propor estratégias de revegetação, assim como, em conhecimentos ligados a biodisponibilidade dos metais e a adaptação dos seres

vivos. O sucesso das tentativas de revegetação dependerá, portanto, da disponibilidade dos elementos metálicos no solo e da escolha adequada das espécies vegetais para recolonizar o meio.

A utilização de espécies vegetais nativas na recuperação de áreas impactadas pela mineração de níquel, sobretudo espécies vegetais de solos ultramáficos, parece ser uma estratégia adequada, uma vez que os níveis de metais pesados no solo, notadamente o Ni, afetam o desenvolvimento de espécies não adaptadas a tal ambiente (PANDEY, 2007). A caracterização da biodiversidade destes maciços ultramáficos está apenas na sua fase inicial. As primeiras prospecções florísticas, realizadas entre 1988 e 1990 (BROOKS et al., 1992), no Brasil essas ações têm sido seguidas, recentemente no âmbito de ações desenvolvidas pela Embrapa Cerrados, em parceria com outras instituições.

As características dos solos ultramáficos, ou serpentínicos, levam à ocorrência de uma gama de espécies vegetais adaptadas a condições extremas e mecanismos fisiológicos distintos (PANDEY, 2007). A presença dessa flora característica certamente está relacionada a uma associação estreita com os micro-organismos do solo e da rizosfera, o que deve contribuir para o condicionamento das características adaptativas. Um grupo particularmente importante desta microbiota e especificamente relacionado ao ciclo do nitrogênio é aquele constituído pelas bactérias fixadoras do nitrogênio atmosférico.

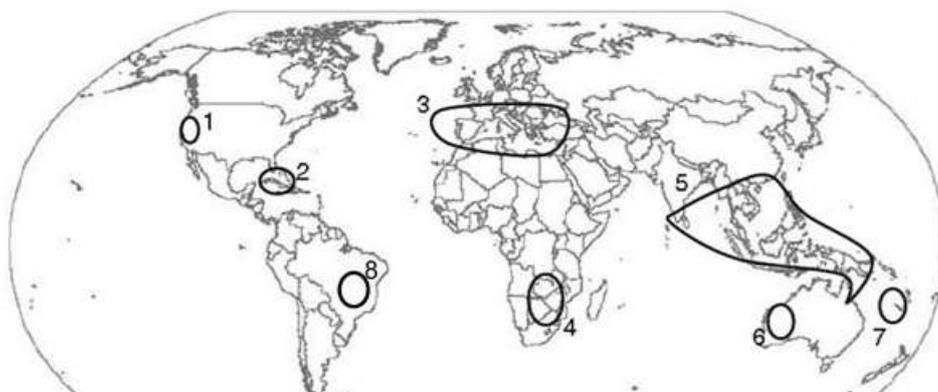


Figura 1 Distribuição dos locais no mundo onde ocorrem solos com aflorações serpentínicas.

1. Oregão, norte de Califórnia. 2. Cuba. 3. Sul da Europa e Ásia Menor. 4. Zimbawe, Zambia, Zaire e África do Sul. 5. Sudeste Asiático. 6. Austrália Ocidental. 7. Nova Caledonia. 8. Brasil. Fonte: Modificado de (MENGONI et al., 2010).

1.2 As leguminosas e as bactérias comumente chamadas de rizóbios

Leguminosae é a maior família de plantas terrestres, formada por aproximadamente 19.327 espécies (LEWIS et al., 2008), que desempenham um importante papel ecológico. Essas plantas são bastante diversas em morfologia, habitat e ecologia (RIVAS et al., 2009). São comumente empregadas em diversos setores da economia, que variam bastante, desde a indústria alimentícia, seu principal pilar, até a indústria de produção de fármacos (GAO et al., 2010).

As leguminosas representam um quarto do total da produção agrícola mundial. Outro fato importante é que mais de um terço das exigências nutricionais de nitrogênio de toda a humanidade são supridos pelo consumo desses vegetais (RIVAS et al., 2009).

Essa família vegetal desenvolveu um tipo de associação mutualística com um grupo polifilético de bactérias comumente chamadas de rizóbios (BOURNAUD et al., 2013), as quais podem viver como saprófitas no solo e em simbiose com as plantas. Elas induzem a formação de nódulos, nos quais é fixado o nitrogênio atmosférico e, em troca, as plantas providenciam compostos de carbono. Estas simbioses ocorrem dentro da família das leguminosas, na maioria de suas espécies, que se encontram distribuídas nas subfamílias Papilionoidae, Mimosoidae e Caesalpinoidae (MARCHETTI et al., 2011), constituindo o principal sistema de fixação biológica de nitrogênio terrestre (BONTEMPS et al., 2010). Esse processo é importante na manutenção e equilíbrio de diferentes ambientes (XAVIER et al., 2006).

As leguminosas são capazes de realizar simbiose com membros da classe das alfa-proteobactérias, pertencentes à ordem Rhizobiales, que inclui os gêneros: *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorzhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* (*Enfiser*), *Devosia*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium* e mais recentemente *Aminobacter* e *Microvirga* (GYANESHWAR et al., 2011).

Até pouco tempo a literatura mostrava que apenas as alfa-proteobactérias poderiam ser capazes de formar nódulos em leguminosas. Este quadro foi

modificado por estudos recentes que permitiram novas descobertas e trouxeram as primeiras evidências de que leguminosas poderiam ser noduladas também por beta-proteobactérias (CHEN et al., 2001; MOULIN et al., 2001). Esses trabalhos também foram importantes para definir que plantas do gênero *Mimosa* são noduladas, em sua maioria, por beta-proteobactérias, especificadamente por *Burkholderia* spp. e *Cupriavidus* spp. E em relação à capacidade de nodulação e fixação biológica de nitrogênio efetiva, para membros de *Burkholderia*, estudos desenvolvidos por BONTEMPS et al. (2012), mostraram que diferentes isolados desse gênero provenientes de diversas espécies de *Mimosa* que ocorrem em vários locais no Brasil, apresentaram-se como efetivos nos nódulos avaliados, sendo capazes de induzir eficazmente a nodulação e a fixação biológica de nitrogênio.

Geralmente, os termos alfa e beta-rizóbios são utilizados para denominar alfa-proteobactérias e beta-proteobactérias diazotróficas formadoras de nódulos, respectivamente. Estes têm sido propostos por conveniência, já que ao longo dos anos o termo “rizóbio” foi usado para nomear bactérias que são capazes de fixar o nitrogênio em simbiose com leguminosas (PEREIRA, 2008; JR et al., 2006).

1.3 Nodulação de *Mimosa* por beta-proteobactérias

A nodulação por *Burkholderia* e *Cupriavidus* foi confirmada por diversos estudos e estes gêneros encontram-se particularmente associados a espécies de *Mimosa* (das quais a maioria dos beta-rizóbios têm sido isolados) sub-família Mimosoideae, porém com exceções cada vez mais numerosas, como *B. tuberum* que nodula com o legume *Cyclopia*; *B. phymatum* com *Machaerium lunatum*; e *Burkholderia* spp. com Hypocalyptae e Podalyrieae; todos da subfamília Papilionoideae (CHEN et al., 2005a; ELLIOTT et al., 2007).

Mimosa é um grande gênero de leguminosas, com aproximadamente 500 espécies, muitas destas nativas do Novo Mundo (SIMON et al., 2011). O maior centro de diversidade dessas plantas é o Brasil central, no qual muitas espécies podem ser observadas nas vegetações da Caatinga e do Cerrado, onde *Mimosa* é o gênero mais diverso (MENDONÇA et al., 1998). O bioma Cerrado é também um

importante centro de endemismo para essas leguminosas (SIMON; PROENÇA, 2000).

Considerando seu tamanho e sua importância ecológica potencial, até bem pouco tempo existiam poucos estudos sobre o processo de nodulação e de fixação de N₂ no gênero *Mimosa*, exceto nas espécies arbóreas, *M. caesalpinifolia* e *M. scabrella*, as quais vêm sendo avaliadas para o uso em recuperação de áreas degradadas no Brasil, particularmente em áreas que foram devastadas por atividades de mineração (DOBEREINER, 1967; FRANCO; DE FARIA, 1997; DE FARIA et al., 2010).

Estudos sobre a diversidade de microsimbiontes em *Mimosa* vêm sendo realizados entre as regiões tropicais, com uma particular atenção para três espécies, devido à sua característica de ser invasiva em diversos locais, que são: *M. pudica*, *M. pigra* e *M. diplotricha*. Até o ano de 2010, apenas 11 espécies foram estudadas quanto à presença de beta-rizóbios e a maioria com plantas que se desenvolviam fora de seu habitat nativo (CHEN et al., 2003, 2005a, 2005b; BARET; PARKER, 2005, 2006; ANDAM et al., 2007). Esse quadro foi alterado após a publicação dos trabalhos de REIS JR et al. (2010) e BONTEMPS et al. (2010), no qual foram coletados nódulos de 70 espécies de *Mimosa* no Cerrado e na Caatinga e a quase totalidade das bactérias em simbiose com essas plantas foram identificadas como pertencentes ao gênero *Burkholderia*. REIS JR et al. (2010) mostraram que mimosas eram noduladas por beta-rizóbios (*Burkholderia* spp.), incluindo espécies raras e ameaçadas, como *M. splendida* (SIMON; AMARAL, 2003), *M. setosissima* e *M. decorticans* (SIMON; HAY, 2003). Para explicar tal relação REIS JR et al. (2010) sugerem a existência de fatores genéticos e fisiológicos que determinariam a preferência dessas plantas para a nodulação por beta-rizóbios.

1.4 Evolução das simbioses com beta-proteobactérias

O beta-rizóbio *Cupriavidus taiwanensis* LMG 19424 é um simbiote específico de espécies de *Mimosa* (SAAD et al., 2012). Por outro lado, estirpes de *Cupriavidus necator* são capazes de formar nódulos efetivos em diferentes leguminosas (FERREIRA et al., 2012), estes autores verificaram que a inoculação com *C. necator* proporciona benefícios para as leguminosas avaliadas em seu

estudo, principalmente quando foram usadas as estirpes UFLA01-659 e UFLA02-71 nas leguminosas *M. pudica*, *Leucaena leucocephala* e *M. caesalpiniiifolia*. Isto indica que essas estirpes são eficientes em fixar nitrogênio atmosférico. No entanto, para *Enterolobium contortisiliquum*, *Acacia mangium*, *M. pigra* e *M. acutistipula*, quando comparado à taxa de incremento de matéria seca da parte aérea, estas apresentaram menor incremento em relação às espécies *M. pudica*, *Leucaena leucocephala* e *M. caesalpiniiifolia*.

Estudos realizados por DA SILVA et al. (2012) demonstraram que *C. necator* foi capaz de nodular *M. caesalpiniiifolia*, *Macroptilium atropurpureum* e *Vigna unguiculata*. Os resultados também mostraram uma estirpe de *C. necator* ineficiente (UFLA 01 - 657) e outra com alta eficiência simbiótica (UFLA02 -129) com *Phaseolus vulgaris* e uma eficiência moderada para ambas as cepas com *M. caesalpiniiifolia*. Além disso, relações simbióticas ineficientes foram demonstradas para *L. leucocephala*, *M. atropurpureum* e *V. unguiculata*.

Dados da literatura apontam para o fato de que há uma falta de clareza sobre as origens da simbiose com *Cupriavidus* (BOURNAUD et al., 2013). No Uruguai, cepas de *C. necator* foram isoladas de nódulos de *Parapiptadenia rigida* (TAULÉ et al., 2012), enquanto que no Brasil elas foram isoladas de solos com *L. leucocephala* e *P. vulgaris* (DA SILVA et al., 2012).

O gênero *Burkholderia*, foi originalmente criado para acomodar sete espécies que antes pertenciam a *Pseudomonas* (YABUUCHI et al., 1992). Esse gênero dispõe atualmente de 89 espécies (<http://www.bacterio.net/burkholderia.html>. Acesso em 25 de fevereiro de 2015). Os membros desse gênero ocupam uma grande diversidade de nichos que vão desde solos até à água, podendo habitar plantas e animais (BONTEMPS et al., 2010), isso pode incluir até mesmo solos bastante ácidos como os solos amazônicos (DA SILVA et al., 2012). Todas as espécies podem crescer em condições aeróbicas, no entanto apresentam bastante versatilidade metabólica. *Burkholderia* é um dos gêneros mais conhecidos e estudados, principalmente por algumas estirpes atuarem na promoção de crescimento de plantas e outras são patogênicas para plantas ou animais (MICHAEL, T; MADIGAN, 2015). Um exemplo entre esses representantes é a bactéria *B. cepacia*, incluída no grupo dos patógenos oportunistas humanos (VANDAMME;DAWYNDDT, 2011).

Dez espécies de *Burkholderia* que são capazes de formar nódulos já foram descritas: *B. tuberum*, *B. phymatum*, *B. mimosarum*, *B. nodosa*, *B. sabiae*, *B. diazotrophica*, *B. fungorum*, *B. symbiotica*, *B. caribensis* e *B. phenoliruptrix* (BEUKES et al., 2013; BONTEMPS et al., 2010; BOURNAUD et al., 2013; GYANESHWAR et al., 2011; SHEU et al., 2013).

A recente disponibilidade de sequências de genoma de alfa e beta-rizóbios pode proporcionar uma melhor compreensão dos mecanismos de evolução da nodulação e da fixação de nitrogênio por membros dos gêneros *Burkholderia* e *Cupriavidus*. BONTEMPS et al., (2010) conduziram um estudo com o objetivo de investigar a diversidade dos simbiossomas de várias espécies de *Mimosa*, em três regiões do Brasil central. Através do sequenciamento de genes nucleares foi possível fornecer informações da evolução dos beta-rizóbios. Curiosamente esse trabalho sugere que a nodulação é uma função bastante antiga dentro do gênero *Burkholderia*. Esses autores afirmam ainda que a fixação de nitrogênio também é uma função antiga nesse grupo e são encontradas em várias espécies de *Burkholderia*, sejam elas simbióticas ou não. Além disso, a convergência filogenética demonstra que essa função foi herdada, através do processo genético de transferência vertical, fato sustentado por ser encontrado em muitas das espécies de *Burkholderia*.

1.5 Fisiologia/Bioquímica e Potencial biotecnológico de isolados bacterianos

1.5.1 Interação planta-bactéria na disponibilização de nutrientes

Para o seu crescimento, as bactérias necessitam de diversos nutrientes, alguns podem ser obtidos através do seu próprio metabolismo, outros podem estar dispersos no meio em que estas se encontram e para obtê-los esses micro-organismos se utilizam de diversas estratégias bioquímicas, para utilizá-las em quantidades necessárias para o seu desenvolvimento (GERARD; TORTORA, 2012). Em relação ao processo de interação das bactérias com as plantas, alguns dos mecanismos utilizados pelas bactérias podem fazer com que nutrientes também sejam disponibilizados para os vegetais (GALVÃO et al., 2010).

Existe um grupo de bactérias que são denominadas bactérias promotoras do crescimento vegetal, que podem disponibilizar nutrientes importantes para as plantas, como o fósforo e o ferro, por meio da solubilização de fosfatos inorgânicos e da produção de moléculas de baixo peso molecular chamada sideróforos (PODILE; KISHORE, 2006).

O uso de micro-organismos com a finalidade de aumentar a disponibilidade de nutrientes para as plantas é uma prática de grande importância e necessária para a agricultura (BURITY et al., 2000). Vários estudos têm verificado e avaliado esse tipo de relação.

1.5.1.1 Disponibilização de fósforo

Grande parte do fósforo no solo encontra-se indisponível para as plantas (FALCÃO; DA SILVA, 2004). No entanto, alguns micro-organismos podem ser capazes de adquirir P do solo por meio de vários mecanismos e podem estimular processos metabólicos que são efetivos na sua solubilização e mineralização (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Diversas bactérias apresentam potencial para serem utilizadas como inoculantes para diferentes culturas vegetais, visando a obtenção de fosfatos a partir da solubilização de fontes de P pouco solúveis (REIS, 2008). Algumas já estão sendo utilizadas como biofertilizantes comerciais (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999). De acordo com INUI (2009) as bactérias solubilizadoras de fosfatos, quando utilizadas como inoculante, podem propiciar muitas vantagens para a planta e sua produtividade.

Bactérias solubilizadoras de fosfato podem auxiliar, por exemplo, na formação de mudas de espécies arbóreas de *Anadenanthera macrocarpa*, *Mimosa caesalpinifolia*, *Acacia holosericea*, *Enterolobium contortisiliquum* (SOUCHIE et al., 2005).

Segundo RODRÍGUEZ e FRAGA (1999) os principais gêneros bacterianos que são hábeis na solubilização de fosfato inorgânico, promovendo o crescimento de plantas, são: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Aerobacter* e *Flavobacterium*.

A solubilização de fosfatos pelos micro-organismos pode contribuir para o aumento do aproveitamento do fósforo presente na fase sólida do solo (MARRA, 2012). Em solos com baixa concentração de nutrientes, como os ultramáficos, pode-se utilizá-los como uma possível alternativa para inoculação de plantas.

1.5.1.2 Bactérias e Tolerância a Ni

Os metais são componentes essenciais em diversos processos celulares em bactérias, plantas e animais. De acordo com TOTTEY et al. (2007), aproximadamente um terço das proteínas necessitam de metal para sua montagem e funcionamento correto. Em bactérias, esses metais são encontrados em diversos centros ativos de enzimas, envolvidas nos mais variados bioprocessos.

As bactérias podem necessitar de quantidades específicas de alguns metais, incluindo-se o Ni. No entanto, quantidades acima daquelas necessárias para o funcionamento normal, dentro da célula, podem causar severos efeitos. Entre esses efeitos, a toxicidade é o principal deles, devido ao deslocamento de metais essenciais de seus locais de ligação nativos e interações não específicas na estrutura dos ácidos nucléicos e proteínas, levando a alterações graves nos processos celulares (POOLE; GADD, 1989).

O Ni é um elemento químico bastante abundante na crosta terrestre, ocorrendo em toda a biosfera. Sua concentração em rochas ultramáficas é de cerca de 2000 mg/kg e é mais elevada nos solos ultramáficos (2500 mg/kg), devido à acumulação de metal. Estes valores são cerca de 60 vezes maiores do que aqueles encontrados em solos não ultramáficos (BAKER; BROOKS, 1989).

Alguns micro-organismos, incluindo as bactérias, desenvolveram diversos processos que lhes possibilitaram resistir a altas concentrações de metais. Ao menos seis mecanismos de resistência são conhecidos, que variam desde a alteração da permeabilidade da membrana para excluir o metal do meio intracelular até o transporte ativo de metais no interior da célula, através de sistemas de liberação de metais com maior ou menor especificidade (SANZ, 2014).

1.5.1.3 Disponibilização de Fe por meio de sideróforos

Vários micronutrientes são essenciais no desenvolvimento vegetal e entre estes o ferro (Fe) tem papel fundamental como co-fator em um grande número de enzimas essenciais para processos fisiológicos importantes, tais como respiração, fotossíntese e fixação biológica de nitrogênio (GALVÃO et al., 2010). Esse micronutriente também é importante para o metabolismo bacteriano. Ainda segundo GALVÃO et al. (2010), da mesma maneira que o fósforo, o Fe é abundante nos solos, mas a grande maioria é encontrado sob a forma de hidróxido de ferro, estando indisponível para as plantas.

Existem bactérias e alguns fungos que possuem a capacidade de desenvolver compostos quelantes de baixo peso molecular, os denominados sideróforos, também chamados “carreadores de ferro”. São metabólitos secundários, quelantes de ferro, que são liberados por vários organismos em condições limitadas desse metal (BARRY; CHALLIS, 2009). Estas moléculas são sintetizadas principalmente por micro-organismos que crescem em ambientes com baixas concentrações de ferro. As bactérias que detêm essa capacidade possuem alto nível de afinidade pelo ferro e, por meio de um sistema localizado em sua membrana, são capazes de interagir com o Fe^{3+} , absorvendo-o e posteriormente tornando-o disponível, tanto para o seu metabolismo, como também para o crescimento das plantas (NEILANDS, 1995, RAAIJMAKERS et al., 1995, LUVIZOTTO, 2010).

Diversos micro-organismos já foram identificados como produtores de sideróforos. Entre as bactérias produtoras é possível citar as entéricas que podem atuar como patógenos de humanos e animais, alguns patógenos de fungos e de plantas e bactérias de vida livre no solo, gram-positivas e gram-negativas, como *Aerobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella tyohimurim*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Paracoccus denitrificans*, *Azotobacter vinelandii*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescenputica*, *Micobacterium phlei*, *M. aurum*, *M. fortuitum*, *M. marinum*, *M. terrae*, *M. smegmatis*, *M. tuberculosis*, *Bacillus megaterium*, *Anabaena sp.*, *Artrobacter sp.*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Streptomices* e *Actinomices* (MACHADO; BENITE, 2002).

Vários trabalhos estão sendo feitos quanto a possíveis métodos de utilização desses micro-organismos ou aplicação dessas biomoléculas. Em estudo realizado por ESPOSITO e SOUZA (2010), foi realizada uma avaliação da capacidade de

produção de sideróforos de isolados de rizobactérias. Esses autores verificaram bactérias produtoras de sideróforos que foram provenientes de *Hipomeia sp.*, *Eritrina sp.*, *Mimosa sp.*, *Cecropia sp.* e *Tefrosia sp.*, sugerindo que essas forneceriam o Fe para as plantas. Os autores também destacam o fato de uma possível utilização dessas moléculas em estudos que correlacionem sua produção com a biorremediação de locais contaminados por metais pesados.

1.5.1.4 Produção de fitormônio: Ácido-Indol-Acético (AIA)

Existem várias maneiras pelas quais as bactérias promotoras de crescimento vegetal podem agir para facilitar o desenvolvimento das plantas hospedeiras. Uma forma direta de atuação é através da produção de fitormônios, que são biomoléculas importantes, produzidas pelas plantas com a finalidade de sua manutenção e desenvolvimento celular (GALVÃO et al., 2010; TAIZ; SEIGER, 2013). Por diversos motivos, as plantas podem não conseguir produzir essas biomoléculas, ou produzi-las em quantidades insuficientes. Quando os vegetais interagem com certas bactérias promotoras de crescimento, elas podem disponibilizar essas substâncias para as plantas (GALVÃO et al., 2010).

São vários os tipos de fitormônios necessários às plantas, os principais apontados pela literatura, segundo GALVÃO et al. (2010), podem ser divididos em cinco classes, as auxinas, as citocininas, as giberelinas, o ácido-abicísico e o etileno. No entanto, já foram descobertos outros tipos. Cada um deles tem funções muito importantes e peculiares no metabolismo vegetal, sendo possível citar o desenvolvimento de raízes e da parte aérea, a germinação de sementes, o crescimento e amadurecimento de frutos, a adaptação a estresses bióticos e abióticos, entre outros.

Dentre os diversos fitormônios, será descrito aspectos direcionados a um tipo de auxina, denominada Ácido-Indol-Acético (AIA) devido, principalmente, à sua importância e diversas pesquisas que relacionam à sua produção pelas bactérias e o efeito destas no desenvolvimento dos vegetais.

A principal auxina encontrada nas plantas é o AIA. Essa substância é produzida principalmente no meristema apical (gema) do caule e transportada através das células do parênquima até as raízes (MARCHIORO, 2005). O AIA é um

fitormônio requerido em baixas concentrações e está relacionado com os processos de embriogênese, diferenciação de órgãos, arquitetura de raízes e parte aérea e respostas trópicas (VESSEY, 2003; TAIZ; SEIGER, 2013; PEREIRA et al., 2012).

Vários estudos já apontaram que esse fitormônio é comumente produzido por diversas bactérias, incluindo *Azospirillum brasiliense*, *A. amazonense*, *Aeromonas veronii*, *Agrobacterium* spp., *Alcaligenes piechaudii*, *Bradyrhizobium* spp., *Comamonas acidovarans*, *Enterobacter* spp., *Rhizobium leguminosarum*, *Bacillus subtilis*, *B. methylotrophicus*, *B. tequilensis*, *Burkholderia gladioli*, *B. heleaia*. Inúmeros estudos mostraram relações positivas da produção desse fitormônio com a promoção e crescimento vegetal (KUSS, 2007; PERING et al., 2007; VESSEY, 2003; REIS JR et al., 2000; ANDRADE, 2012; PEREIRA et al., 2012).

Várias outras bactérias, incluindo as diazotróficas, vêm sendo avaliadas para essa característica. VAN et al. (2000), ao inocular a estirpe TVV75 de *Burkholderia vietnamiensis* em plantas de arroz, observaram um incremento no crescimento das plantas, além do aumento no processo de fixação de nitrogênio, atribuindo esse efeito a produção de fitormônios (AIA) mediados pela bactéria.

Diferentes isolados bacterianos (*Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, algumas linhagens de *Burkholderia* spp., *Azospirillum* spp., *Ochrabactrum* spp. e *Rizhobium* spp.) associados a abacaxizeiro, bananeira e palmeiras oleaginosas, são capazes de produzir AIA em diferentes quantidades (MARCHIORO, 2005).

Os estudos desenvolvidos por BERGAMASCHI et al. (2007) tiveram o objetivo de avaliar a ocorrência de bactérias diazotróficas associadas ao sorgo forrageiro e sua capacidade de produção de AIA. Foram obtidos 75 isolados, dos quais a maior parte era pertencente às espécies *Herbaspirillum seropedicae*, *Azospirillum brasilense* e *Burkholderia tropica*.

Para TEIXEIRA et al. (2007) diversos micro-organismos endofíticos associados à cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) são capazes de produzir AIA. Os autores avaliaram diferentes isolados bacterianos associados às plantas de mandioca coletadas em áreas comerciais do Estado de São Paulo e de etnovarietades dos estados do Amazonas e Bahia. Os isolados AIA positivos provenientes de plantas da Bahia foram representados por espécies de micro-organismos pertencentes aos subgrupos γ -Proteobacteria, Bacilli e Actinobacteria. De plantas advindas do Estado de São Paulo foram obtidos isolados AIA positivos

pertencentes aos subgrupos γ -Proteobacteria e Bacilli. Dos isolados obtidos de plantas oriundas do Amazonas, apenas a β -Proteobactéria *Burkholderia cepacia* foi AIA positiva. Entre os γ -Proteobacteria é bastante comum à produção de AIA por *Pseudomonas* spp. LATA et al. (2006) evidenciaram a produção por uma bactéria endofítica, *Pseudomonas stutzeri*, que foi isolada a partir de *Echinaceae*.

Por vezes, a produção de AIA pode ser observada por bactérias que ocorrem em associações nodulíferas com plantas leguminosas. Como observado por CHAGAS JR. et al. (2009), que avaliaram a produção de AIA por rizóbios isolados de solo de terra firme e várzea da região amazônica, usando feijão Caupi (*Vigna unguiculata*) como planta isca. Foi verificado que todos os 92 isolados foram capazes de produzir tal hormônio vegetal, em diferentes quantidades.

Rizóbios obtidos de nódulos do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L), também vêm sendo avaliados. COATTI et al. (2010), ao avaliarem 31 estirpes elites de rizóbios, também mostraram que todos os isolados foram AIA positivos, sendo a estirpe IPR-Pv e *Rhizobium tropici* (SEMIA 4088=H12) os maiores produtores, alcançando valores similares a *Azospirillum* spp. Isolados da planta do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) também foram estudadas quanto a produção de AIA por MARCONDES et al. (2010) e dentre os 15 isolados obtidos, os gêneros *Rizhobium* e *Burkholderia* estavam representados, respectivamente por 6 e 7 isolados, e todos capazes de produzir AIA.

1.5.1.5 Produção de enzimas por isolados bacterianos

A produção de enzimas é, sem dúvida, um dos fatores cruciais para a existência da vida, quer seja animal, vegetal ou microbiana. As enzimas podem ser definidas como macromoléculas biológicas que são produzidas por um organismo vivo, com função principal de catálise, estando presentes em todas as etapas do desenvolvimento celular. Essas moléculas são muito diversas, possuem especificidade para seus substratos e basicamente todas as reações químicas celulares ocorrem devido à presença desses biocatalisadores (GURUNG et al., 2013; NELSON; COX, 2010).

A produção de diferentes enzimas por isolados bacterianos é utilizada em estudos de caracterização de bactérias. Diante disso, serão mostrados informações

gerais de algumas enzimas que foram utilizadas para caracterizar os isolados de bactérias no presente estudo, sendo feitas breves correlações entre a produção e suas prováveis aplicabilidades.

Lipases

As lipases (Triacilglicerol acilhidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de lipídeos produzindo monoglicerídeos, diglicerídeos, ácidos graxos livres e glicerol (WEI, H.N; WU, B, 2008; SHARMA, R; CHISTI, Y; BANERJEE, 2001); sendo óleos e gorduras os seus substratos naturais.

Essas enzimas estão distribuídas em animais, plantas e os mais diversos micro-organismos. Recentemente, as lipases tem ganhado bastante atenção, devido a algumas características como: (1) em meio aquoso elas catalisam reações de hidrólise, além disso, em baixas concentrações aquosas ou solventes orgânicos elas catalisam reações de esterificação, transesterificação e aminólise; (2) elas não requerem cofatores para ativação; (3) exibem um alto grau de enantioselectividade e regioselectividade; (4) possuem uma alta variação de espectro de substrato incluindo substratos naturais e artificiais; (5) são menos desfavoráveis ao ambiente quando aplicadas em reações do que a catálise química convencional (6) há a possibilidade de preparação de enzimas imobilizadas e reutilização contínua das lipases (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001, 2008; GURUNG et al., 2013; HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004).

Diante de tais propriedades e de acordo com uma revisão de literatura recente sobre enzimas microbianas e suas diferentes aplicações, feita por GURUNG et al. (2013) as lipases são consideradas como o maior grupo de enzimas com interesse em biotecnologia, principalmente devido às suas características de produção.

Com relação às lipases bacterianas essas são mais interessantes do ponto de vista de produção, por serem mais estáveis do que as lipases de origem animal ou vegetal. Entre as várias bactérias produtoras de lipases, incluem-se alguns gêneros, como: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, que são importantes produtoras de enzimas comerciais. Há ainda um grande número de bactérias capazes de produzir lipases, no entanto somente algumas poucas são exploradas

comercialmente como cepas selvagens ou recombinantes (PALEKAR; VASUDEVAN; YAN, 2000).

Celulases

As celulases, de maneira geral são um sistema enzimático celulósico, composto por três componentes principais de enzimas que agem sinergisticamente: endo- β -glucanase (EC 3.2.2.4) que hidrolisam a região amorfa que ficam expostas do polímero celulose, exoglucanases (Celobiohidrolases, EC 3.2.1.91) que atuam nas extremidades reductoras e não reductora, liberando a celobiose e , β -glucosidase (EC 3.2.1.21) que clivam a celobiose de cadeia curta transformando os oligossacarídeos em glicose. (SUKUMARAN; SINGHANIA; PANDEY, 2005;).

De acordo com a revisão de literatura realizada por SUKUMARAN; SINGHANIA e PANDEY (2005), sobre as aplicações das enzimas celulases microbianas, a degradação da celulose é feita por vários tipos de micro-organismos, além disso, é destacado que esse substrato é bastante comum, sendo o biopolímero renovável mais abundante do planeta. Nesse mesmo trabalho é citado que essas enzimas despertam interesse em diversas áreas, como nas indústrias têxteis, indústria de papel e indústrias de alimentos, entre outras aplicações diversas.

Fungos e bactérias são capazes de produzir as enzimas celulases. Os fungos tem importante papel na produção dessas enzimas extracelulares, devido ao seu processo de nutrição, no entanto as bactérias também são tidas como boas produtoras. São inúmeros os exemplos de bactérias que produzem celulases, tanto aeróbias quanto anaeróbias. Dentre os maiores grupos das produtoras, destacam-se os seguintes: *Acidothermus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Rodhotermus* (SUKUMARAN; SINGHANIA; PANDEY, 2005).

Urease

A urease (Uréia amidohidrolase, EC. 3.5.1.5) é uma metaloenzima níquel dependente que catalisa a hidrólise de ureia para produzir amônia e carbamato, este composto por sua vez, hidrolisa espontaneamente para formar o ácido carbônico e uma outra molécula de amônia (HAUSINGER; MOBLEY, 1989; UPADHYAY, 2012).

Esta enzima é encontrada, principalmente em sementes, microrganismos e invertebrados. Nas plantas, a urease é um hexâmero, que consiste em seis cadeias idênticas, e localiza-se no citoplasma. Em bactérias, é constituída por duas ou três subunidades diferentes (SIRKO; BRODZIK, 2000).

De acordo com SIRKO e BRODZIK (2000), diferentes grupos de microrganismos são capazes de produzir urease, incluindo-se fungos e bactérias. Tais microrganismos causam diversas patologias a humanos e animais; essas enzimas ativam o processo de infecção. Ainda de acordo com esses autores, dentre as bactérias produtoras de urease incluem-se, entre outras, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophiticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Urealiticum*, *Ureaplasma*. Há uma ocorrência em especial de membros da família Enterobacteriaceae, *Pseudomonas*, *Haemophilus spp* e outras bactérias Gram-negativas (QADRI et al., 1984 apud SENTHIL; FAZILA ; JAYALAKSHMI, 2012)).

Bactérias de origens diversas podem também produzir essas enzimas em escalas laboratoriais e já vem sendo estudadas, incluem-se nesse grupo até mesmo bactérias de origem marinha como estirpes de *Klebsiella spp* (SENTHIL; FAZILA; JAYALAKSHMI, 2012). Devido à importância dessas enzimas há grande interesse no seu estudo, desde a área médica, até na sua atuação na ciclagem de nutrientes do solo. Essas enzimas têm importante papel na utilização de compostos nitrogenados do meio ambiente e podem ser utilizadas em fertilizantes à base de ureia (MOBLEY; HAUSINGER, 1989).

Xilanase

De acordo com o database CAZy (Carbohydrate-Active Enzyme) (<http://www.cazy.org>), as Xilanases (EC 3.2.1.8) são encontradas no grupo das glicosil hidrolases (GH). Estas são capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas 1,4- β -D-xilosídicas da cadeia principal da xilana, que é o segundo maior polissacarídeo de ocorrência natural. Essa característica é uma das aplicações mais importante nas indústrias, incluindo a indústria de alimentos, fabricação de papel, usos na agricultura, bem como na saúde humana (COLLINS, GERDAY et al., 2005; MOTA; ANDRADE; SANTANA, 2013; POLIZELI et al., 2005; RAMALINGAN; HARRIS, 2010).

As xilanases são uma classe de enzimas capazes de hidrolisar a hemicelulose. Esse polímero de glicose, é o componente principal da hemicelulose, atua ajudando a manter as ligações e estruturas da parede celular. Essas enzimas estão presentes em fungos e bactérias, no entanto, de acordo com POLIZELI et al. (2005), a sua produção em bactérias é usualmente mais baixa do que em fungos. Apesar disso, é possível encontrar dentro do grupo das bactérias diversas espécies produtoras, como as do gênero *Bacillus*, e outras como: *Acidobacterium capsulatum*, *Micrococcus* e *Staphylococcus spp.* *Thermoanaerobacterium* e *Thermotoga maritime* (HARRIS; RAMALINGAM, 2010; PAES; BERRIN; BEAUGRAND, 2012).

Pectinases

Enzimas pectinases são um grupo complexo e heterogêneo de enzimas que atuam na hidrólise das substâncias pécticas (PIRES; FINARDI-FILHO, 2005). São produzidas por plantas superiores e vários micro-organismos. Elas são responsáveis pela degradação de moléculas longas e complexas, denominadas pectinas, que ocorrem como polissacarídeo estrutural na lamela média da parede primária de células de plantas jovens (KASHYAP; VOHRA; TEWARI, 2001). Além disso, agem no amolecimento de determinados tecidos vegetais durante o amadurecimento e armazenagem (MURAD; AZZAZ, 2011).

Essas enzimas atuam por meio de reações de desesterificação (esterases) e despolimerização (hidrolases e liases). As enzimas mais conhecidas e estudadas são aquelas que degradam as cadeias de homogalacturonana (HG) da pectina. Entre as várias enzimas é possível citar: Pectina metil esterases (EC 3.1.1.11), Pectina acetil esterases (EC 3.1.1.6), Endo-polimetilgalacturonanases (EC 3.2.1.41), Endo-pectina liases (4.2.10) e Exo-pectato liases (4.2.2.9), entre outras (JARAMILLO, 2014).

As pectinases são usadas na indústria têxtil, de papel e na indústria alimentícia de uma forma geral. As pectinases de alimentos e resíduos de bioprodutos processados são responsáveis por cerca de um terço a um quarto da produção de enzimas utilizadas nessa indústria em todo mundo (KASHYAP; VOHRA; TEWARI, 2001; GURUNG et al., 2013).

A produção bacteriana destas enzimas vem tendo um destaque no cenário comercial. Em 2001, KASHYAP, VOHRA e TEWARI apresentam uma revisão de literatura sobre as principais aplicações destas enzimas comerciais e encontraram diferentes espécies utilizadas, tais como: *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Bacillus spp.* RK9, *Bacillus sp.* NT-33, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus pumilis*, *Xanthomonas campestris*, *Bacillus* No. P-4-N, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea*.

Proteases

As proteases são um grupo de enzimas cuja função catalítica é hidrolisar ligações peptídicas de proteínas. São também chamadas de enzimas proteolíticas. As proteases se diferem na sua capacidade de hidrolisar várias ligações peptídicas, em que cada tipo de protease quebra uma ligação peptídica específica. São exemplos de proteases: as aminopeptidases, dipeptidases, carboxipeptidases, serina, cisteína e metalo proteases (CARNEIRO, 2003).

As proteases são produzidas por animais, vegetais e micro-organismos, no entanto, as proteases microbianas são preferencialmente escolhidas pela indústria, devido à sua capacidade de possuir basicamente todas as características desejadas em aplicações biotecnológicas. As enzimas de origem bacterianas são bastante usadas comercialmente, sendo utilizadas principalmente aquelas produzidas pelo gênero *Bacillus* (RAO et al., 1998).

São produtoras de proteases: *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. clausenii*, *B. lentus*, *B. alkaliphilicus* e *B. haloduram* (MAURER, 2004). No entanto, outras bactérias podem produzir tais enzimas, como: *Burkholderia cepacia*, *Klebsiella oxytoca*, e *Pseudomonas aeruginosa* (NAJAFI; DEOBAGKAR Dileep; DEOBAGKAR Deepti, 2005), além de diferentes estirpes de Enterobacteriaceae (NÖRNBERG, 2009).

Dentre as aplicações das proteases, destaca-se a sua longa utilização nas indústrias de alimentos e detergentes (RAO et al., 1998). Pode-se encontrá-las também na indústria de couros e na indústria farmacêutica. Essas enzimas também podem ser usadas em processos de biorremediação (NAJAFI; DEOBAGKAR; DEOBAGKAR, 2005).

Exemplos de trabalhos envolvendo a produção de diferentes enzimas.

A produção de enzimas por bactérias vêm sendo tema de estudos de diversos pesquisadores em todo o mundo. Esse também é o caso da produção por isolados bacterianos (rizóbios) capazes de formar simbioses com leguminosas.

Em seu estudo, OLIVEIRA et al. (2006) tiveram como objetivo verificar a atividade de enzimas extracelulares hidrolíticas, produzidas por bactérias isoladas dos nódulos de feijão-caupi e obtiveram resultados positivos para as enzimas amilase, protease, urease e carboximetilcelulase. Esses autores citam que estirpes de outras espécies de rizóbios, como *Rhizobium leguminosarum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium* spp., já foram avaliados e apresentaram atividades positivas para produção de diferentes enzimas. Tais estudos demonstram que esses isolados podem ser fontes importantes para a produção de enzimas, com prováveis aplicações industriais (biotecnológicas).

Outro exemplo foi realizado por BUENO et al. (2014) verificando a produção de enzimas por isolados bacterianos, especificadamente a produção de lipases. Ao analisarem seus dados, 39 dos 40 isolados obtidos tiveram a produção dessa enzima detectada em placas de Petri. Previamente identificados, esses isolados foram então selecionados como bons produtores de lipases, sendo selecionadas *Burkholderia* sp., *Bacillus* sp., *Penicillium lanosum* e *Corynebac glutamyl*. Dentre as produtoras, destaca-se a espécie *Burkholderia cepacia*, que já é tida como altamente promissora para produção de tais enzimas.

1.5.1.6 Importância do uso de ferramentas moleculares na identificação de bactérias diazotróficas

A aplicação e avanço das técnicas moleculares nos estudos de identificação e caracterização dos micro-organismos, trouxeram novas oportunidades para a descoberta de espécies não identificadas e suas funções, assim como para estudos diversos de diversidade e ecologia microbiana (SCHMIDT, 2006; JIANPING XU, 2006; PROSSER et al., 2007; GOMES et al., 2009).

Entre os genes utilizados para estudos de identificação de bactérias, o gene dos ácidos ribonucleicos ribossomais (rRNA) vem assumindo importante papel. Isso

decorre do fato dos rRNA serem considerados os biopolímeros mais adequados para diversos estudos envolvendo bactérias e archaea, incluindo aqueles de caracterização molecular. Entre as características importantes do rRNA citam-se a distribuição universal de seus genes, o elevado grau de conservação entre diferentes táxons. Sua variabilidade pode ocorrer em maior ou menor extensão, em diferentes regiões da molécula (AMANN; LUDWIG, 2000).

O gene comumente utilizado com o propósito de identificação de procariotos é o que codifica a subunidade 16S do RNA ribossômico (RNAr 16S). O estudo das sequências do gene 16S RNAr tornou-se padrão na determinação de relações filogenéticas, avaliação da diversidade em amostras ambientais e detecção e quantificação de populações específicas (HEAD; SAUNDER; PICKUP, 1998; KIRK et al., 2004). Análises das sequências de regiões altamente conservadas do genoma bacteriano, tal como a subunidade do gene 16S RNAr, têm sido utilizadas como método universal para classificação microbiana, bem como para estabelecer relações evolutivas entre organismos (ROESCH, 2007). Devido à variação em suas regiões conservadas, com as informações do gene 16S do RNAr, é possível inferir várias distâncias em estudos filogenéticos, desde o nível de domínio até espécie (AMANN; LUDWIG, 2000).

Existe um grande interesse em estudos de caracterização de bactérias diazotróficas, devido ao seu potencial de aumento de produção em diversas culturas agrícolas, por meio da fixação biológica de nitrogênio, ou pela produção de fitormônios que agem regulando o crescimento vegetal (ROESCH, 2007).

Usualmente, diversos trabalhos utilizam além das técnicas tradicionais para caracterização de bactérias diazotróficas, as técnicas baseadas na amplificação de DNA (“*polymerase chain reaction*”) de genes marcadores. Essas técnicas facilitam o monitoramento de estirpes bacterianas específicas, como aquelas que possuem os genes responsáveis pela síntese da enzima nitrogenase, cujo mais utilizado é o gene *nifH* (MERCANTE et al., 2000; ROESCH, 2007; LOIRET et al., 2004). Para essas bactérias também podem ser usados os genes marcadores *Nod*, que são específicos de bactérias formadoras de nódulos, por serem essenciais à infecção e formação dessas estruturas. (HUNGRIA; ARAÚJO, 1994; SARITA et al., 2005). Os genes *nodC* e *nifH* vêm sendo utilizados por trabalhos em que abordam a

identificação e caracterização de isolados bacterianos provenientes de nódulos de *Mimosa* spp., tanto alfa, quanto beta proteobactérias. Esses genes são utilizados em análises filogenéticas diversas e comumente empregados para rizóbios, dado a sua importância no estabelecimento dessa simbiose mutualística (YOUNG, 2005; BONTEMPS et al., 2010). A utilização de ferramentas moleculares, baseadas em genes marcadores específicos, como os exemplos citados, pode levar ao aumento do entendimento sobre as bactérias (incluindo as diazotróficas) associadas às plantas e essas informações podem ter grande impacto no delineamento de estratégias de recuperação de áreas degradadas e na descoberta de genes e produtos de interesse biotecnológico (PESSOA FILHO, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ocorrência, caracterizar e identificar bactérias diazotróficas noduladoras em simbiose com plantas do gênero *Mimosa* presentes em distintos ambientes quanto à concentração e disponibilidade de Ni no maciço ultramáfico de Barro Alto (GO).

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a ocorrência de nodulação e bactérias diazotróficas em simbiose com leguminosas do gênero *Mimosa*;
- Caracterizar morfológica, fisiológica e geneticamente os isolados de bactérias diazotróficas oriundos de nódulos de *Mimosa* spp.;
- Identificar os isolados de bactérias diazotróficas oriundos de nódulos de *Mimosa* spp., com base no sequenciamento do gene do 16S RNAr.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Áreas de coleta e métodos de amostragem

Foi realizado um levantamento florístico para avaliar a ocorrência de *Mimosa* spp. em áreas remanescentes de Cerrado sujeitas à exploração de níquel, no maciço ultramáfico de Goiás. Plantas desse gênero foram coletadas e identificadas em áreas da mineradora Anglo American do Brasil, localizada no município de Barro Alto (Figura 2). O levantamento florístico foi realizado em áreas previamente selecionadas, que se dividem em duas categorias quanto à concentração de Ni e sua biodisponibilidade no solo:

1) Área com alta concentração de Ni e alta biodisponibilidade de Ni no solo (solo saprolítico);

2) Área com alta concentração de Ni e menores teores de Ni biodisponíveis no solo (solo laterítico).

A área sob solo saprolítico (Figura 3), de textura argilosa, localizada nas coordenadas 15° 06' 04.4" S; 49°00' 38.4 W, apresenta uma fitofisionomia de "Campo Sujo", formando um mosaico com "Cerrado Ralo", com presença de afloramentos rochosos. A área de solo laterítico (Figura 3), de textura franco argilo arenosa, situada nas coordenadas 15°06'31.1" S; 49°01'15.0" W, possui uma vegetação do tipo "Cerrado Ralo" formando um mosaico com "Campo Sujo".

Uma área de cerrado nativo, sob Latossolo argiloso não ultramáfico, localizada nas coordenadas 15°05'05.0" S; 48° 58'54.6" W, foi utilizada como referencia. Essa área apresenta fitofisionomia do tipo "Cerradão".

Análises físico-químicas dos solos sob cada área, incluindo a disponibilidades de metais são apresentadas nas tabelas 1 e 2.

Plantas das diferentes espécies de *Mimosa* identificadas foram coletadas com auxílio de um enxadão, procurando extrair o sistema radicular de modo mais intacto possível. Os nódulos, quando presentes, eram coletados e preservados sob condições dissecantes com tubos contendo sílica gel até serem preparados para o isolamento das bactérias diazotróficas no Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Cerrados (Planaltina-DF)

Tabela 1 Propriedades químicas de dois solos ultramáficos e um solo de Cerrado não-ultramáfico. Valores medidos em triplicata ^a

Áreas	pH	H+Al	Mg	Ca	P	K	MOS	Argila	Areia	Silte
	(H ₂ O)	----- cmol _c dm ⁻³ -----			----- mg dm ⁻³ -----		g kg ⁻¹	----- g kg ⁻¹ -----		
Solo										
Saprolítico	6,9	6,46	5,19	1,53	0,6	59	64	253	410	337
Solo										
Laterítico	6,49	3,24	6,95	0,82	0,3	31	18	260	477	263
Latossolo-										
Cerrado-	5,86	9,79	0,15	nd	1,9	67	40	300	347	353

^a Foram coletadas amostras de 0-20 cm de profundidade, nd: não detectado.

Tabela 2 – Concentração de metais biodisponíveis no solo. Valores medidos em triplicata ^a

Áreas	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn
	----- mg kg ⁻¹ -----				
Solo Saprolítico	1,36	6,72	1,46	603,53	0,15
Solo Laterítico	1,89	23,85	19,70	134,66	0,41
Latossolo – Cerrado	2,97	66,94	88,91	5,20	0,61

^a Foram coletadas amostras de 0-10 cm de profundidade

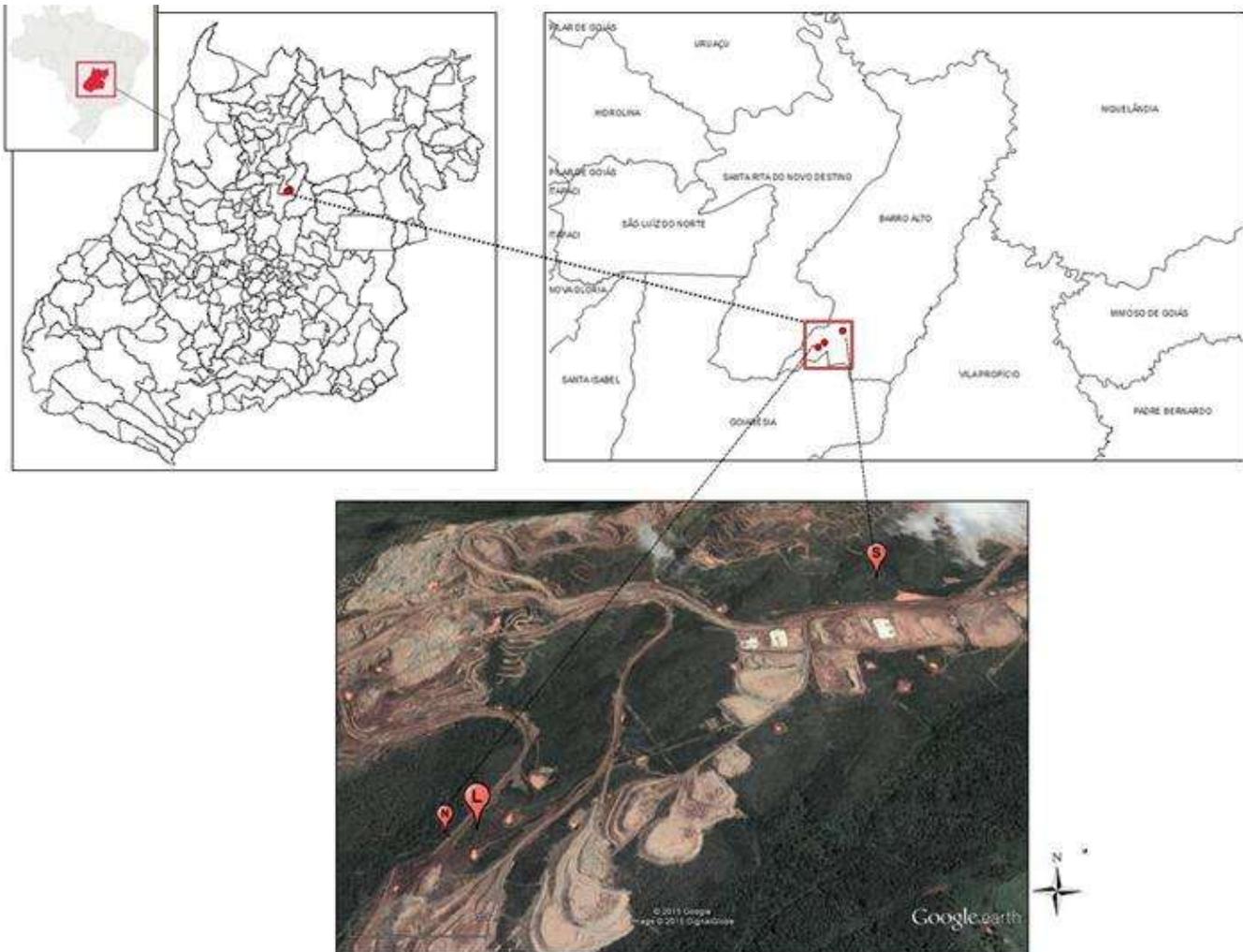


Figura 2 Imagem esquemática, representando os locais de coleta no município de Barro Alto, em Goiás. Os pontos: S, L e N representam respectivamente as áreas sob solo Saprolítico, solo Laterítico, e Latossolo não ultramáfico. Fonte: *Software Arcgis* versão 5.9.2 e *Google Earth*.

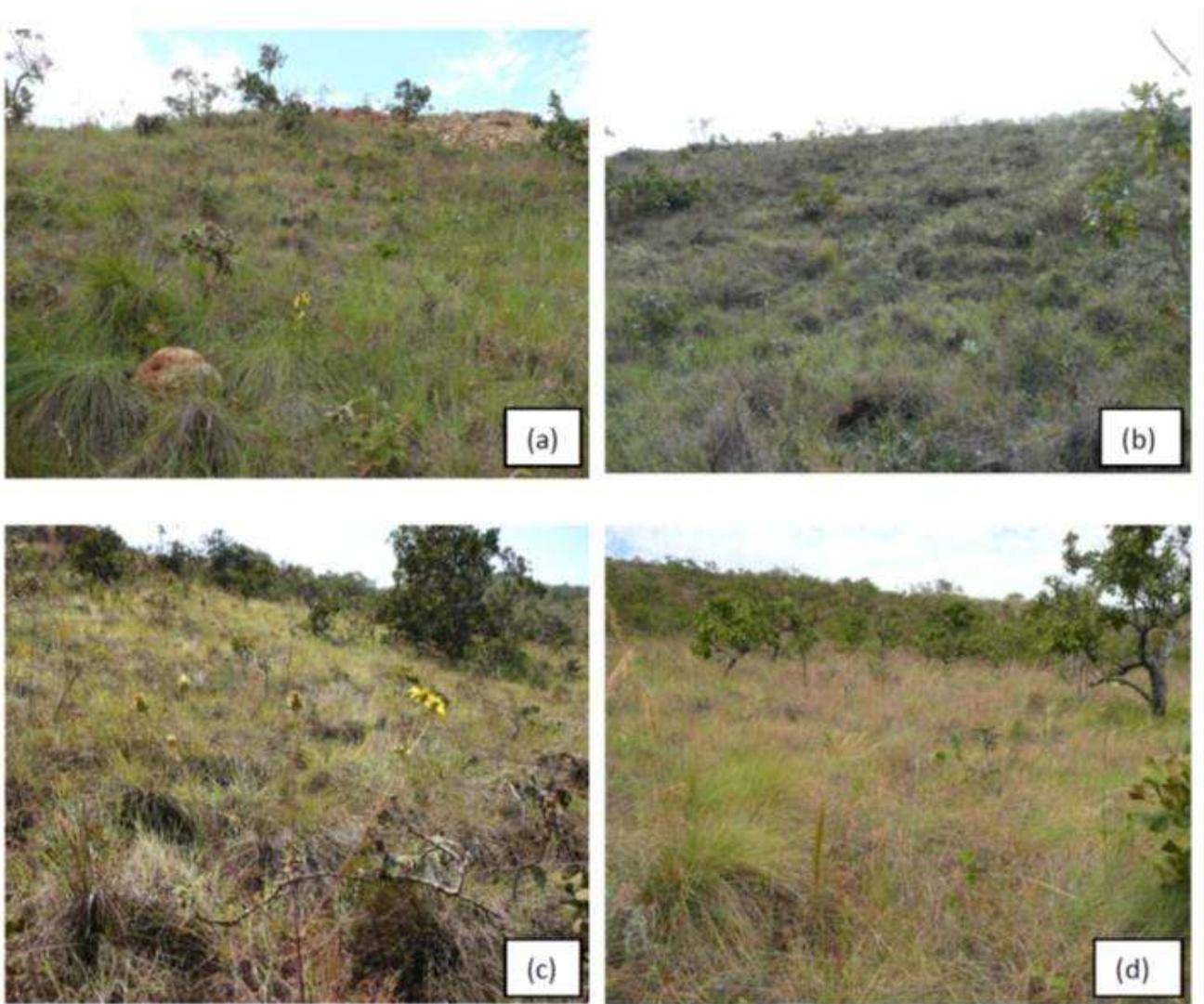


Figura 3 Detalhes fitofisionômicos das áreas de solos ultramáficos onde foram coletados os nódulos de *Mimosa* spp. em Barro Alto, Goiás. Área sob solo Saprolítico (a e b); Área sob solo Laterítico (c e d).

Na figura 4 é apresentado um quadro-resumo da metodologia empregada nesse trabalho, que será detalhada a seguir.

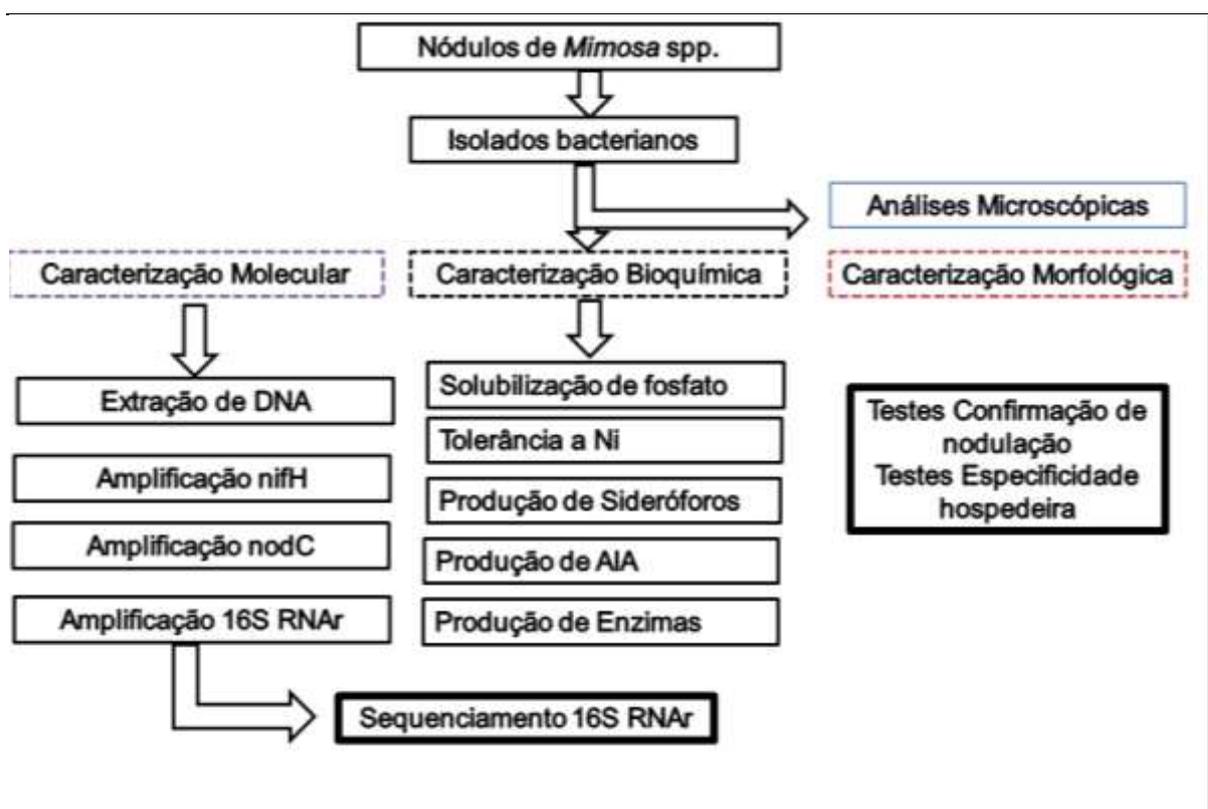


Figura 4 Diagrama esquemático mostrando uma síntese da metodologia para caracterização e identificação dos isolados bacterianos avaliados no presente estudo.

3.2 Análises microscópicas

Ainda no campo alguns nódulos coletados foram cortados pela metade e aqueles que se apresentaram potencialmente ativos e efetivos, com coloração rosada resultante da presença de leghemoglobina, foram transferidos para tubos com capacidade de 2,0 mL contendo 2,5% de glutaraldeído em 50 mM de tampão fosfato (pH 7,5). Esse procedimento foi adotado para posterior análise de microscopia óptica e imunomarcagem com anticorpo contra *Burkholderia* spp. e *Cupriavidus* spp., para determinar se havia bactérias desses dois gêneros no interior dos nódulos (REIS JR. et al., 2010).

3.3 Isolamento de bactérias presentes em nódulos de *Mimosa* spp.

A partir de nódulos de *Mimosa* spp. desinfectados superficialmente, foi feito o isolamento das bactérias diazotróficas seguindo os protocolos clássicos propostos por VINCENT (1970) e SOMASEGARAN; HOBEN (1994).

3.4 Amplificação e sequenciamento do gene 16S RNAr e construção de árvore filogenética.

A região do gene 16S RNAr foi amplificada por PCR com a utilização dos iniciadores Y1 e Y3 propostos por YOUNG et al., (1991), com os seguintes desenhos, Y1 5' TGG CTC AGA ACG AAC GCT GGC GGC 3' e Y3 5' TAC CTT GTT ACG ACT TCA CCC CAG TC 3'. A reação de amplificação ocorreu em 25 µL de uma mistura de 2,5 µL de tampão 10x + Mg; 0,5 µL de dNTP (200 µM); 1,0 µL (10 µM) de cada iniciador; 0,25 µL de Taq DNA Polimerase (5 U/µL) (Invitrogen) e 1,0 µL de amostra de DNA molde (30 ng/mL), completados com água miliq esterilizada. As condições de termociclagem foram: uma etapa inicial de desnaturação (94 °C por 3 min), seguida por 30 ciclos intermediários (94 °C por 2 min; 59 °C por 30 s; 72 °C por 1min) e uma etapa terminal de extensão (72 °C por 10 min).

O material amplificado foi sequenciado no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná. Os produtos de PCR obtidos foram purificados com Exo/SAP. Uma alíquota de 40 ng desse DNA purificado foi usada como matriz para as reações de sequenciamento, nas quais foi utilizado o kit *Big Dye*[®] (Life Technologies). As reações de sequenciamento foram precipitadas com etanol e inseridas no equipamento *ABI 3500 xL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems[®]).

Para a construção da árvore filogenética, sequências *forward* e *reverse* do gene 16S RNAr foram concatenadas com a utilização do programa SeqTrace 0.9.0 (STUCKY, 2012). Essas sequências consenso foram analisadas com as ferramentas *Sequence Match* (SeqMatch) e *Tree Builder* do *Ribosomal Database Project* (RDP) (COLE et al., 2014). Sequências de estirpes padrão mais similares com os isolados coletados foram incluídas na construção de uma árvore filogenética pelo método *Weighbor Joining* (BRUNO et al., 2000). A árvore foi construída após alinhamento das sequências e a geração de uma matriz de distância genética pelo modelo corrigido de Jukes-Cantor. A árvore foi editada para visualização com o programa

MEGA 6.06 (TAMURA et al., 2013). Essa árvore possibilita mostrar a relação entre os isolados desse trabalho com espécies conhecidas de bactérias formadoras de nódulos (CHEN et al., 2001; VANDAMME et al., 2002).

3.5 Confirmação da capacidade de nodulação dos isolados bacterianos

Para verificar a capacidade de nodulação dos isolados, foi utilizado a técnica de inoculação e cultivo em meio Jensen (JENSEN; COLLINS, 1985). Esta é uma técnica alternativa de cultivo protegido, na qual o solo é substituído por um meio de cultivo sólido, contendo os elementos minerais indispensáveis ao desenvolvimento dos vegetais.

Foram testados os isolados bacterianos obtidos nesse trabalho. Estes foram crescidos em meio TSB 1/5 durante 48 horas sob agitação, em temperatura média de 28 °C. Após o crescimento bacteriano foi realizada a inoculação junto às radículas da planta hospedeira *Mimosa pudica*, recém-germinada.

O meio de cultivo sólido foi preparado para um volume final de 6 L, misturando-se os seguintes reagentes: 3,75 g CaHPO₄; 1,2 g K₂HPO₄.2H₂O; 1,2 g MgSO₄.7H₂O; 1,2 g NaCl; 0,96 g FeCl₃.6H₂O; 90g ágar; e 6 mL de solução NH₄NO₃ (0,571 g)/(mL). Após o preparo, o meio foi adicionado a tubos de ensaio de 50 mL, com um volume final de 37,5 mL. Posteriormente os tubos foram autoclavados a temperatura de 121 °C por 15 minutos. Em paralelo, foram preparadas as sementes de *M. pudica*. Inicialmente essas sementes já haviam sido previamente selecionadas para a realização dos processos de escarificação, desinfestação e pré-germinação. As sementes foram escarificadas, permanecendo 5 minutos em ácido sulfúrico (puro), seguido de 10 lavagens abundantes com água corrente. Logo após, foi feita a desinfestação superficial durante 30 segundos em álcool 96%, seguidos por 3 minutos em hipoclorito de sódio 25% e mais seis lavagens em água destilada esterilizada. Essas sementes foram pré-germinadas em uma bandeja preenchida com papel toalha e algodão esterilizados e umedecidos com água destilada. Essa pré-germinação foi conduzida em câmara de incubação, por três dias, a 28 °C. Finalmente, os isolados bacterianos foram inoculados nas plantas pré-germinadas (1 mL de solução de bactérias na concentração de aproximadamente 10⁸ células/mL)

plantadas nos tubos com meio Jensen, levando-se em consideração os devidos cuidados para evitar contaminação (Figura 5).



Figura 5 Esquema de imagens mostrando a metodologia empregada durante os testes de nodulação dos 78 isolados bacterianos estudados. Amostras das sementes de *Mimosa pudica* após pré-germinação durante incubação por três dias em estufa a 28 °C (A). Sementes de *M. pudica* plantadas com o meio Jensen (B). Isolados bacterianos em meio TSB 1/5, após o crescimento durante 48 horas em agitação, com temperatura média de 28 °C (C). Inoculação de 1 mL na concentração de 10^8 células/mL dos isolados bacterianos nas radículas em

crescimento em meio Jensen (D). Isolados bacterianos inoculados e organizados em duplicata, bem como controle positivo e negativo, ainda no laboratório de Microbiologia de Solos da Embrapa Cerrados (E). Amostras nos tubos em casa de vegetação para crescimento e verificação de formação de nódulos (F).

3.6 Teste de especificidade hospedeira de isolados de bactérias diazotróficas oriundos de *Mimosa* spp. inoculados em plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*)

Foi conduzido um experimento em que plantas de feijão comum foram inoculadas com isolados obtidos de *Mimosa* spp. para avaliação da nodulação.

O experimento foi realizado de acordo com De FARIA e De LIMA (1998), sob condições controladas, em casa de vegetação, na Embrapa Cerrados, a fim de verificar a capacidade dos isolados bacterianos em nodular e fixar nitrogênio atmosférico em simbiose com uma planta diferente do gênero *Mimosa*. Foram escolhidos 17 isolados para serem testados.

O substrato utilizado nesse experimento foi composto de uma mistura de areia e carvão vegetal moído na proporção de 2:1 (CARVALHO, 2008). Esse substrato foi esterilizado em autoclave durante 30 min a 121 °C a 1 atm, em dois dias consecutivos. Em seguida, na casa de vegetação, o substrato foi disposto em vasos plásticos previamente desinfetados (com hipoclorito a 10% e álcool 70%) com capacidade para 2L. Após esterilização superficial (30 s em álcool 90-100%, 3 min em hipoclorito de sódio 25% e dez lavagens em água destilada estéril), quatro sementes de feijão foram plantadas por vaso. Após a germinação, aproximadamente uma semana após do plantio, foi realizada a inoculação das plantas. Previamente, os isolados foram crescidos em meio TSB 1/5 durante 48 horas sob agitação, em temperatura média de 28 °C. Um mL de solução de bactérias na concentração aproximada de 10^8 células/mL foram inoculadas junto às radículas de cada uma das quatro plantas semeadas nos vasos. Até os primeiros 10 dias após a germinação (DAG) os vasos receberam apenas água esterilizada. Após esse período começaram a receber solução nutritiva de Norris (VINCENT, 1970) isenta de N, previamente esterilizada e com ajuste de pH para 6,0. Aos 15 DAG foi feito um

desbaste, deixando-se duas plantas por vaso. Foram utilizadas quatro repetições para cada tratamento, totalizando 68 vasos.

Aos 30 DAG as plantas foram retiradas dos vasos e levadas para o laboratório de Microbiologia de Solos, onde as raízes foram lavadas e a formação de nódulos foi verificada.

3.7 Amplificação dos genes simbióticos *nifH* e *nodC*

Como complemento para os estudos de capacidade de nodulação, foram realizadas amplificações dos genes *nodC* e *nifH* dos isolados bacterianos.

A extração do DNA total dos isolados foi realizada com a utilização do Pure Link Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. O DNA extraído de cada isolado foi utilizado como molde para as reações de PCR.

Para a amplificação do gene *nodC* foram utilizados os iniciadores propostos por SARITA et al. (2005), *NodCfor540* (5' TGA TYG AYA TGG ART AYT GGC T 3') e *NodCrev* 1160 (5 -CGY GAC ARC CAR TCG CTR TTG-3'). A reação de amplificação ocorreu em 25 µL de uma mistura de 2,5 µL de tampão 10x + Mg; 0,5 µL de dNTP (200 µM); 1,0 µL (10 µM) de cada iniciador; 0,25 µL de Taq DNA Polimerase (5 U/µL) (Invitrogen) e 1,0 µL de amostra de DNA molde (30 ng/mL), completados com água miliQ esterilizada. As condições de termociclagem foram: uma etapa inicial de desnaturação (95°C por 5min), seguida por 35 ciclos intermediários (95°C por 1min; 60°C por 2min; 72°C por 2min) e uma etapa final de extensão (72°C por 5 min).

Para a amplificação do gene *nifH* foram utilizados os iniciadores *nifH-F* (5' AAA GGY GGW ATC GGY AAR TCC ACC AC 3') e *nifH-R* (5' TTG TTS GCS GCR TAC ATS GCC ATC AT 3') descritos por LOIRET et al. (2004). A reação de amplificação foi a mesma adotada para o gene *nodC* e as condições de termociclagem foram: uma etapa inicial de desnaturação (95°C por 2 min), seguida por 35 ciclos intermediários (94 °C por 30s; 60 °C por 30 s; 72 °C por 1,5 min) e uma etapa terminal de extensão (68 °C por 7 min). Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,0% em TAE 1X, a 80 V, por 2 h. As bandas resolvidas no gel foram visualizadas após coloração com brometo de etídeo sob iluminação ultravioleta.

3.8 Caracterização dos isolados bacterianos

Os isolados foram analisados por meio de uma série de caracterizações que nos permitiram um melhor conhecimento dos organismos obtidos, além de possibilitar a aquisição de informações preliminares sobre seu potencial biotecnológico para alguns processos de interesse agrícola e industrial.

3.8.1 Caracterização morfológica de isolados de bactérias nodulantes

As bactérias isoladas foram caracterizadas de acordo com sua morfologia e alguns parâmetros fisiológicos (CHEN et al., 2001; VANDAMME et al., 2002). Para isso, foi confeccionado um formulário para identificar as características de cada isolado, sendo avaliados: o tempo de crescimento, tamanho da colônia, forma, elevação, borda, superfície, produção de muco, consistência, detalhes ópticos e cromogênese. Essas informações foram utilizadas para uma análise de agrupamento a fim de determinar a existência de diversidade entre os isolados.

A técnica utilizada na caracterização dos perfis dos isolados (bactérias) foi o método de classificação multivariado de partição, chamado análise de *cluster*. Nesse caso, a análise de *cluster* é um conjunto de procedimentos que visa agrupar e discriminar grupos de indivíduos de acordo com as variáveis que foram utilizadas no estudo. As categorias das variáveis foram transformadas em dados binários. Para a realização da análise de agrupamento foi utilizado como medida de similaridade o coeficiente de Jaccard juntamente com o método das distâncias médias entre grupos (UPGMA). Essas análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences* - versão 19).

3.8.2 Capacidade de solubilização de fosfatos

A capacidade de solubilização de fosfatos foi avaliada com a utilização dos meios NBRIP (NAUTIYAL, 1999), YEP (PEIX et al., 2001), e GL + AIPO₄ (ILMER; BARBATO; SCHINNER, 1995). As placas contendo os três meios foram avaliadas

separadamente e cada uma divididas em três partes. Em cada uma das subdivisões um isolado foi testado inoculando-se três gotas (10 µL) de uma suspensão com aproximadamente 10^8 bactérias. A cada 24 horas verificou-se a formação de halos de solubilização por um período de até uma semana.

3.8.3 Avaliação de tolerância a níquel

A resistência dos isolados contra concentrações crescentes de Ni foi avaliada em placas de meio de cultivo seguindo metodologia proposta por KLONOWSKA et al., (2012). Foram utilizadas placas do meio YMA (VINCENT, 1970) com concentrações de 0,0 – 5,0 mM (em intervalos de 0,5 mM) de Ni, preparadas a partir de uma solução estoque de NiCl_2 (RAJA et al., 2009). As placas com diferentes concentrações de Ni foram divididas em três partes. Em cada uma das subdivisões um isolado foi testado inoculando-se três gotas (10 µL) de uma suspensão com aproximadamente 10^8 bactérias. Num período de até uma semana, com verificações diárias, o crescimento de colônias foi avaliado.

3.8.4 Produção de sideróforos

A capacidade de produção de sideróforos foi avaliada por meio da utilização de placas de *petri* contendo o meio CAS, de acordo com o método universal de determinação descrito por SCHWYN e NEILANDS (1987). Para isso, os isolados foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio TSB (NAVES; CAMPOS e SOUZA, 2004) diluído 1/5, seguido de incubação a 28 °C durante cinco dias. Posteriormente, foram recolhidos 1 mL desse cultivo, que foi centrifugado por 15 min. a 10.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e 250 µL inoculados em poços feitos nas placas de *petri* contendo o meio CAS. As placas foram cobertas com papel alumínio e incubadas por 72 horas a 28 °C. Após esse período, ao redor dos poços, observava-se a presença de halos de cor alaranjada, que indicaram a produção de sideróforos.

3.8.5 Produção de hormônio de crescimento vegetal do tipo Ácido-Índol-Acético (AIA)

A capacidade de produção de AIA pelas bactérias foi estimada utilizando-se a metodologia colorimétrica descrita por SARWAR e KREMER (1995) com modificações descritas por REIS JR et al. (2004). O método colorimétrico baseia-se na oxidação de compostos indólicos por sais férricos (MAYER, 1958). A reação de uma solução de AIA com o reagente de Salkowski (1,0 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,5 M em 50 mL de HClO_4 35%) resulta coloração amarelada para o teste negativo e rosa avermelhado para o teste positivo. Foi preparada uma solução padrão do ácido 3-índol-acético autêntico para confecção de uma curva analítica a partir dessa solução para determinação da precisão dos resultados, foi traçada uma curva padrão linear em diferentes pontos (0, 25, 50, 100, 200, 500, 1000 μM) e verificados se os valores obtidos correspondiam aos valores dentro dessa faixa.

As culturas puras de bactérias foram inoculadas e cultivadas por 24 h a 30 °C em caldo YMA sem indicador (VINCENT, 1970). Seu crescimento foi medido em espectrofotômetro Labsystem Multiskan Plus (Labsystems Oy, Helsinki, Finlândia) dotado de um filtro de interferência de 500 nm. Posteriormente, a densidade óptica dos cultivos foi ajustada para 0,5. Da suspensão resultante foram adicionados 2,0 mL em 28 mL de meio de crescimento, o mesmo caldo YMA, acrescido de 100 $\mu\text{g/mL}$ de triptofano filtrado em millipore (0,2 μm), dispostos em erlenmeyers de 50 mL. Foram utilizadas duas repetições para cada isolado. Os erlenmeyers foram incubados no escuro por 72 h a 30 °C. Após este período, alíquotas de 1,0 mL foram retiradas e colocadas em tubos eppendorf de 1,5 mL e centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos. Uma alíquota de 150 μL do material centrifugado foi aplicada em placas de poliestireno (capacidade para 300 μL) para reagir com 100 μL do reagente de Salkowisk mLmLpreviamente preparado. Após a incubação no escuro, à temperatura ambiente por 30min. foi observada a formação de cor rósea para o teste positivo e as leituras de absorbância foram realizadas utilizando-se o espectrofotômetro no comprimento de onda de 492 nm. Os dados foram armazenados e processados pelo programa Labsystems Transmit Multiskan Plus for Windows.

3.8.6 Produção de enzimas: celulases, ureases, proteases, pectinases, xilanases e lipases

Os isolados foram cultivados em meio TSB 1/5 sob agitação, a temperatura média de 28 °C, durante 48 horas e utilizados para as avaliações de produção de enzimas. Foram elaborados meios de cultivo específicos contendo o substrato indicado para cada enzima. Como procedimento comum a todas as avaliações, as placas contendo cada meio de cultivo foram divididas em três partes. Em cada uma das subdivisões, um isolado foi testado inoculando-se três gotas (10 µL) de uma suspensão com aproximadamente 10⁸ UFC. As placas foram incubadas a 28 °C durante 4-5 dias. A análise de confirmação da produção de celulases, proteases, pectinases, xilanases e lipases, foram baseadas na formação de halos de degradação ao redor da colônia. Para a urease a mudança de coloração do meio, de laranja para rosa, indicava a produção desta enzima.

Produção de celulases

Para a detecção de produção de celulases foi utilizada a metodologia proposta por CARDER (1986), onde se preparou o meio de cultivo composto com o substrato Carboxi-metil-Celulose (CmC) da seguinte maneira: foram adicionados 6 g/L de Na₂HPO₄; 3 g/L de KH₂PO₄; 0,5 g/L de NaCl; 7 g/L do substrato CmC; 20 g/L de agar e adicionado 3g/l de extrato de levedura, seguidos de esterilização em autoclave a 121 °C por 15 min e disposição em placas de Petri. Após o período de incubação das bactérias, para a comprovação da atividade enzimática, foi preparada uma solução de vermelho Congo a 0,1%, que foi adicionada às placas e deixadas em temperatura ambiente durante 20-30 minutos. Posteriormente, o excesso de vermelho Congo foi retirado das placas, revelando então os halos de degradação.

Produção de ureases

A constatação da atividade de hidrólise da uréia (produção de ureases) foi efetuada de acordo com a metodologia proposta por OSAKI et al., (2008). Adicionou-

se 1 g de peptona; 1g de glicose; 5 g de NaCl; 2 g de KH_2PO_4 ; 0,0012 g do indicador vermelho fenol e por último 20 g de agar, em 950 mL de água. Paralelamente, foram preparados 50 mL de solução de ureia a 40 %. A ureia e a base do meio de cultivo foram então autoclavados a 121 °C por 15 min para em seguida serem misturados e dispostos em placas de Petri.

Produção de proteases

Para a detecção de atividade proteolítica (proteases) seguiu-se a metodologia proposta por BACH e MUNCH (2000), com a utilização do meio *Skim Milk Agar*. A princípio foi preparado 100 mL de uma solução de leite em pó desnatado a 10%. Em seguida 900 mL da base do meio foram preparados com a adição de 5 g de triptona; 2,5 g de extrato de levedura; 1 g de glicose; e 20 g de ágar; ajustando-se o pH para 7. As partes do meio foram separadamente autoclavadas, sendo posteriormente misturadas em um volume de 1L, para em seguida serem dispostas em placas de Petri.

Produção de pectinases

A detecção da atividade de pectinases foi realizada segundo UENOJO e PASTORE (2006). Para isso, foi utilizado um meio suplementado com 2 % de pectina como única fonte de carbono, de acordo com CAO, ZHENG e CHEN (1992). Para o preparo de um litro do meio foram adicionados 20 g do substrato pectina; 1 g de extrato de levedura; 1 g de K_2HPO_4 ; 0,5 g de MgSO_4 ; 0,01 g de ZnSO_4 ; 0,01 g de FeSO_4 ; 0,5 g de KCl; 2,5 g de ureia; e 15 g de ágar, ajustando-se o pH para 7, seguido por esterilização em autoclave por 15 minutos a 121 °C. Posteriormente, o meio foi disposto em placas de Petri. Para auxiliar na visualização dos halos de degradação, após o período de incubação com as bactérias foram adicionados 10 mL de lugol, seguido de lavagem com água.

Produção de xilanases

Para a determinação de isolados produtores de xilanases, foi utilizado um meio base suplementado com 0,4% de xilana como única fonte de carbono, segundo BLANCO e PASTOR (1993). O preparo de um litro de meio seguiu a seguinte formulação: 6 g de Na_2HPO_4 ; 3 g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de NaCl ; 1 mL de solução MgSO_4 1 M; 1 mL de solução CaCl_2 1 M; 1g de extrato de levedura; 2,5 g de uréia; 4 g de xilana; 15 g de ágar. Após esterilização o meio foi disposto em placas de Petri.

Produção de lipases

A triagem dos isolados quanto à sua capacidade lipolítica (lipases) foi realizada segundo metodologia proposta por COLLINS e LYNE (1985). O meio foi feito à base de glicerina tributirato (5 mL) adicionando-se 20 g de ágar, 5 g de peptona e 3 g de extrato de levedura, completando-se com água destilada para o volume de 1 L. O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH e um sonicador foi utilizado para auxiliar no processo de homogeneização do meio durante 10 minutos. Após esterilização o meio foi disposto em placas de Petri.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Espécies de *Mimosa*, nodulação e isolamento de bactérias diazotróficas.

Após o levantamento florístico nas áreas selecionadas, as espécies do gênero *Mimosa* presentes foram identificadas como *Mimosa somnians* e *Mimosa clausenii*. Todas as plantas coletadas apresentavam nódulos e os isolados bacterianos avaliados nesse trabalho foram provenientes dessas duas espécies (Figura 6 A, B, C e D). A espécie *M. somnians*, assim como *M. pudica*, é popularmente conhecida como “dormideira”. É nativa do Caribe, América Central e América do Sul (Figura 7). Essas espécies são caracterizadas como herbáceas ou subarbustivas, suas folhas são sensitivas, ou seja, quando essas são tocadas se fecham rapidamente. *M. clausenii* é uma planta arbustiva e endêmica do Brasil, ocorrendo na região central do país, em áreas de Cerrado (Figura 8) (DUTRA, 2015. Acesso em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB31104>). As espécies desse gênero possuem uma relação conhecida com diversos tipos de bactérias que podem formar nódulos. Vários estudos apontam para essa associação também com as beta-proteobactérias (CHEN et al., 2001; VANDAMME; COENYE, 2003). No entanto, até o momento, nenhum estudo havia sido conduzido em solos ultramáficos no Brasil.

No total foram obtidos 78 isolados de nódulos de *M. somnians* e *M. clausenii* provenientes das áreas avaliadas nesse estudo. A Tabela 3 apresenta os códigos denominados para esses isolados, mostrando as espécies de origem e os solos de procedência.

Tabela 3 Origem dos isolados de nódulos de *Mimosa* spp. oriundos de solos ultramáficos de Barro Alto (GO) utilizados nesse trabalho.

Isolados	Espécie de <i>Mimosa</i>	Solo
W1	<i>M. somnians</i>	Latossolo não ultramáfico
W2	<i>M. somnians</i>	Latossolo não ultramáfico
W3	<i>M. somnians</i>	Latossolo não ultramáfico
W5	<i>M. clausenii</i>	Latossolo não ultramáfico

W6	<i>M. clausenii</i>	Latossolo não ultramáfico
W7	<i>M. clausenii</i>	Latossolo não ultramáfico
W8	<i>M. clausenii</i>	Latossolo não ultramáfico
W9	<i>M. clausenii</i>	Latossolo não ultramáfico
W10	<i>M. clausenii</i>	Latossolo não ultramáfico
W11	<i>M. clausenii</i>	Latossolo não ultramáfico
W13	<i>M. clausenii</i>	Latossolo não ultramáfico
W14	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W15	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W16	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W17	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W18	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W19	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W20	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W21	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W22	<i>M. clausenii</i>	Laterítico
W23	<i>M. clausenii</i>	Laterítico
W24	<i>M. clausenii</i>	Laterítico
W25	<i>M. clausenii</i>	Laterítico
W26	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W27	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W28	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W29	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W30	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W31	<i>M. clausenii</i>	Laterítico
W32	<i>M. clausenii</i>	Laterítico
W33	<i>M. somnians</i>	Laterítico
W34	<i>M. somnians</i>	Laterítico
W35	<i>M. somnians</i>	Laterítico

W36	<i>M. somnians</i>	Laterítico
W37	<i>M. somnians</i>	Laterítico
W39	<i>M. somnians</i>	Laterítico
W40	<i>M. somnians</i>	Laterítico
W41	<i>M. somnians</i>	Laterítico
W42	<i>M. clausenii</i>	Saprolítico
W43	<i>M. clausenii</i>	Saprolítico
W44	<i>M. clausenii</i>	Saprolítico
W45	<i>M. clausenii</i>	Saprolítico
W46	<i>M. clausenii</i>	Saprolítico
W47	<i>M. clausenii</i>	Saprolítico
W48	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W49	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W50	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W51	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W52	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W53	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W54	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W55	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W56	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W57	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W58	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W59	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W60	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W61	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W62	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W63	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W64	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W65	<i>M. somnians</i>	Saprolítico

W66	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W67	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W68	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W69	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W70	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W71	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W72	<i>M. Claussenii</i>	Latossolo não-ultramáfico
W73	<i>M. Claussenii</i>	Latossolo não-ultramáfico
W74	<i>M. Claussenii</i>	Latossolo não-ultramáfico
W75	<i>M. Claussenii</i>	Latossolo não-ultramáfico
W76	<i>M. Claussenii</i>	Latossolo não-ultramáfico
W77	<i>M. Claussenii</i>	Latossolo não-ultramáfico
W78	<i>M. Claussenii</i>	Saprolítico
W79	<i>M. Claussenii</i>	Saprolítico
W80	<i>M. Claussenii</i>	Saprolítico
W81	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W82	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W83	<i>M. somnians</i>	Saprolítico
W84	<i>M. somnians</i>	Saprolítico



Figura 6 *Mimosa somnians* e nódulos (seta vermelha) (A, B); *M. clausenii* e nódulos (seta vermelha) (C, D), em solos ultramáficos de Barro Alto - GO.

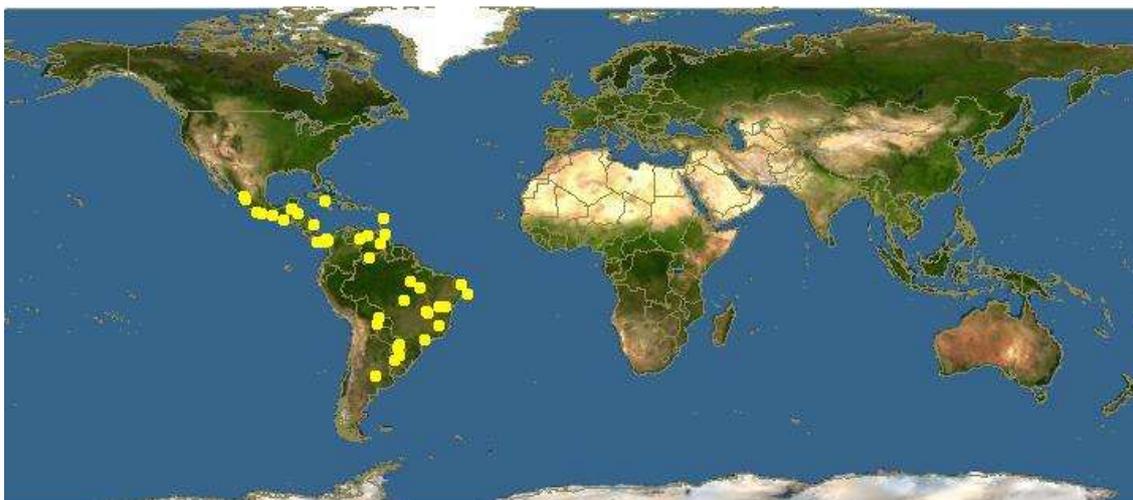


Figura 7 Locais onde já foi relatada a ocorrência de *Mimosa somnians*. Fonte: http://eol.org/data_objects/21328957. Acesso em 20 de fevereiro de 2015.



Figura 8 Locais no Brasil onde já foi relatada a ocorrência de *Mimosa clausenii*. Fonte: http://eol.org/data_objects/21328526. Acesso em 20 de fevereiro de 2015.

4.2 Análises microscópicas

Nódulos examinados por microscopia óptica apresentaram estrutura típica e aparentemente funcional (Figura 9A).

Quando se utilizou um anticorpo contra *Cupriavidus* spp., os bacteroides não foram marcados (Figura 9B). Sabe-se que *Cupriavidus* é associado à *Mimosa* spp. e ocorre em solos com altos teores de metais, como observado para a espécie *C. taiwanensis* através do estudo de KLONOWSKA et al. (2012), os isolados foram

provenientes de nódulos de *M. pudica* de Nova Caledônia, em áreas de solos ultramáficos com alto teor de Ni. Apesar desses relatos, os resultados do presente trabalho apontam que *Cupriavidus* não é o simbionte preferencial de *Mimosa* spp. nas áreas de solo ultramáfico de Barro Alto.

As bactérias simbióticas presentes nos nódulos foram identificadas como *Burkholderia* por meio de imunomarcção com um anticorpo, gênero específico, produzido contra *B. phymatum* STM815 (Figuras 9 C e D). Esse resultado indica sua ocorrência, mesmo com características do solo, como altos teores de metais e pH próximo da neutralidade, aparentemente, não adequadas para essas bactérias (REIS JR et al., 2010).

Segundo BONTEMPS et al. (2010) o Brasil Central é um importante centro de ocorrência de *Mimosa* associada a *Burkholderia*, com base nesse estudo e os resultados do presente trabalho, *Burkholderia* permanece como o principal simbionte de *Mimosa* no Brasil, independente do tipo de solo.

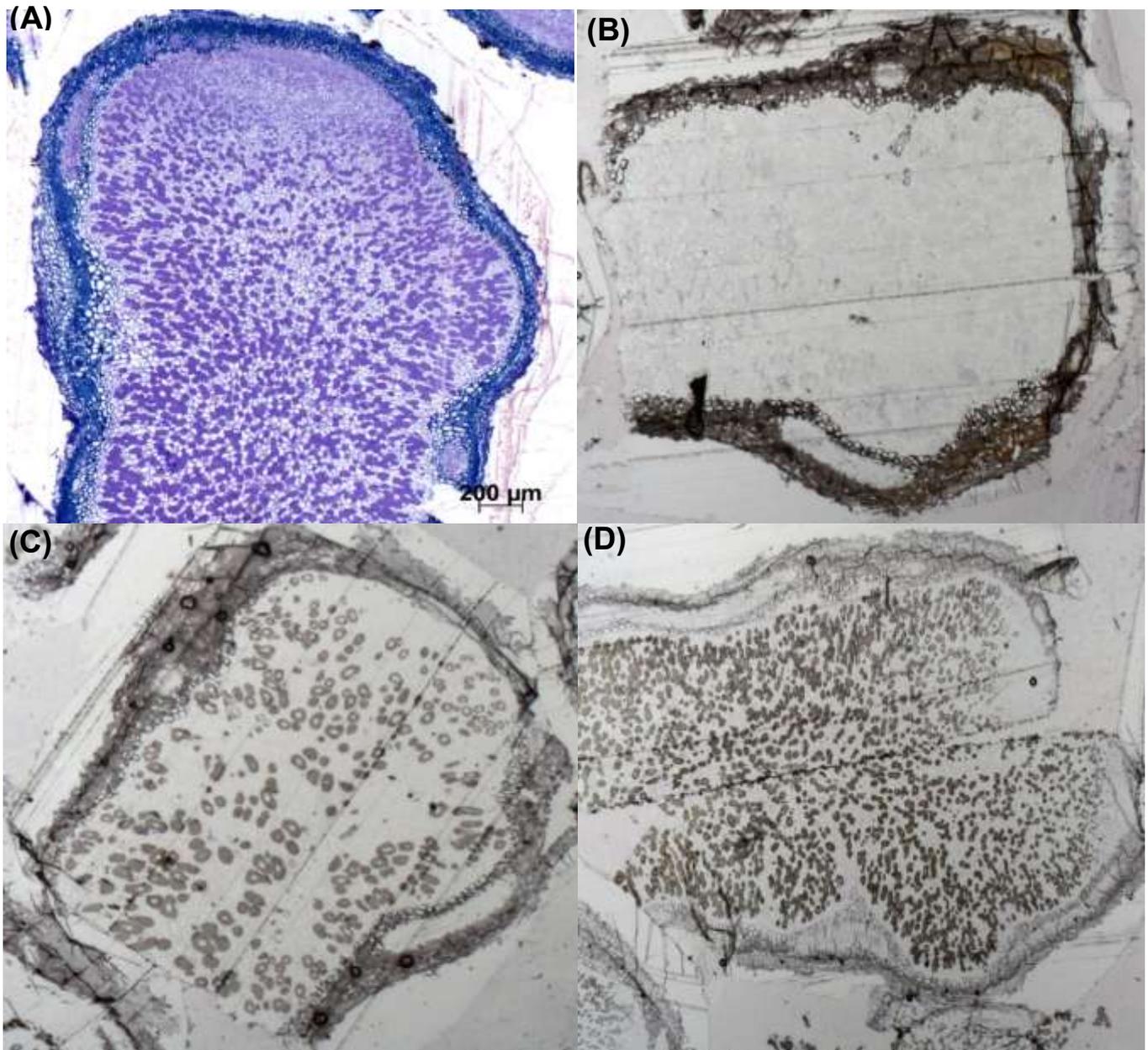


Figura 9 Fotomicrografias mostrando (A) estrutura típica de um nódulo em *M. somnians*; (B) nódulo de *M. clausenii* imuno-marcado com anticorpo contra *Cupriavidus taiwanensis* (reação negativa); (C) bacteróides em nódulos de *M. clausenii* e (D) *M. somnians* imuno-marcados com anticorpo contra *B. phymatum* (reação positiva).

4.3 Identificação dos isolados por meio do sequenciamento do gene 16S RNAr

A sequência completa do gene do 16S RNAr foi obtida para 60 dos 78 isolados avaliados no presente estudo.. Dentre os isolados sequenciados, 94% foram agrupados dentro do gênero *Burkholderia* (Figura 10). Esses resultados vão de encontro com as informações apresentadas por Reis JR et al. (2010), onde os autores afirmavam acreditar que o ambiente preferencial de *Burkholderia* spp., eram solos ácidos e com baixos teores de metais.

Dentre as beta-proteobactérias *Burkholderia* e *Cupriavidus* estão agrupadas entre os gêneros capazes de formar nódulos em leguminosas, apresentando diversas espécies hospedeiras dentro do gênero *Mimosa* (MOULIN et al., 2001; CHEN et al., 2001; VANDAME; COENYE , 2004; FERREIRA, 2012; KLONOWSKA, 2012).

Apesar da alta similaridade com *B. tuberum*, a maioria dos isolados forma um grupo suavemente separado, o que pode indicar que pertençam a outra espécie, provavelmente ainda não descrita (Figura 10). KLONOWSKA et al. (2012), trabalhando em áreas de solo ultramáfico em Nova Caledônia, também levantaram a possibilidade dos isolados de seu estudo serem novas espécies, apesar da similaridade com *B. nodosa* e *B. tuberum*, verificada após análise filogenética com dados das sequências do gene 16S RNAr e também recA.

Curiosamente, 10% (seis) dos isolados estudados foram agrupados junto a bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (Figura 10). Esses isolados são os nomeados com as siglas W5, W10, W11, W14, W15 e W24. Membros do gênero *Pseudomonas* já foram relatados como formadores de nódulos. O primeiro relato de gama-proteobactérias associadas à formação de nódulos em leguminosas foi realizado por BENHIZIA et al. (2004). Por outro lado, outros estudos têm mostrado que estirpes não simbióticas pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, também podem ser isoladas de nódulos de leguminosas (MARRA et al., 2012; COSTA, 2013). Aparentemente, em um ambiente natural, leguminosas podem hospedar espécies de rizóbios e não-rizóbios em seus nódulos. De acordo com REINHOLD-HUREK e HUREK (1998), quando isso ocorre essas bactérias podem ser denominadas

oportunistas. Com base nessas informações é válido questionar se os isolados de *Pseudomonas* do presente trabalho são organismos simbiotes, ou, apenas oportunistas.

Com relação ao caráter diazotrófico, isolados de *Pseudomonas* (CC35), provenientes de *Araucaria angustifolia*, foram relatados como capazes de reduzir acetileno para etileno, mostrando atividade da nitrogenase (RIBEIRO, 2010). Para a espécie *Pseudomonas stutzeri*, alguns experimentos têm mostrado que esta é uma bactéria diazotrófica endofítica, capaz de fixar nitrogênio em plantas não leguminosas (SETTEN, 2013). Novos estudos sobre essa espécie parecem ter comprovado que ela realmente é capaz de reduzir nitrogênio a amônia (XIE et al., 2006). Outros isolados de *Pseudomonas* spp., associados as raízes das plantas de arroz (BARRAQUIO; LADHA; WATANABE, 1983) e coqueiro (FERNANDES; FERNANDES; RODRIGUES, 2001) também apresentaram caráter diazotrófico.

Quanto à capacidade de nodulação, ROCHA (2007) caracterizou isolados provenientes de nódulos de *Arachis pintoi* (amendoim forrageiro) e por meio do sequenciamento do gene 16S RNAr identificou três gêneros pertencentes a gama-proteobactérias, com uma *Pseudomonas* entre eles. Este autor afirma que esse isolado pode ser considerado como um simbiote, mas também julga não ser possível descartar a possibilidade de ser um oportunista, ou, fruto de uma contaminação durante alguma fase do estudo.

Com base nos trabalhos citados anteriormente, fica evidente que algumas lacunas ainda precisam ser preenchidas, já que os poucos relatos de que membros de *Pseudomonas* spp. sejam capazes de formar nódulos não são conclusivos (BENHIZIA et al., 2004; SHIRAISHI et al., 2010). Para os isolados do presente estudo, outros tipos de análises devem ser realizadas, podendo-se levar em consideração técnicas de microscopia ótica e eletrônica, além de técnicas imunológicas e genéticas, que podem ser usadas para rastrear bactérias, genes, enzimas e/ou metabólitos induzidos pela interação bactéria-planta (REIS, 2006).

Nesse trabalho, as análises filogenéticas, por meio do sequenciamento do gene 16S RNAr, foram elucidativas até o nível de gênero (*Burkholderia* e *Pseudomonas*), no entanto, para se ter informações a nível de espécie, outras

técnicas moleculares deverão ser utilizadas. Comumente para esse fim utiliza-se a técnica de hibridização DNA-DNA e sequenciamento dos genes conhecidos como “*housekeeping*”, que são genes constitutivos e tem como função a manutenção celular (BUTTE, 2001).

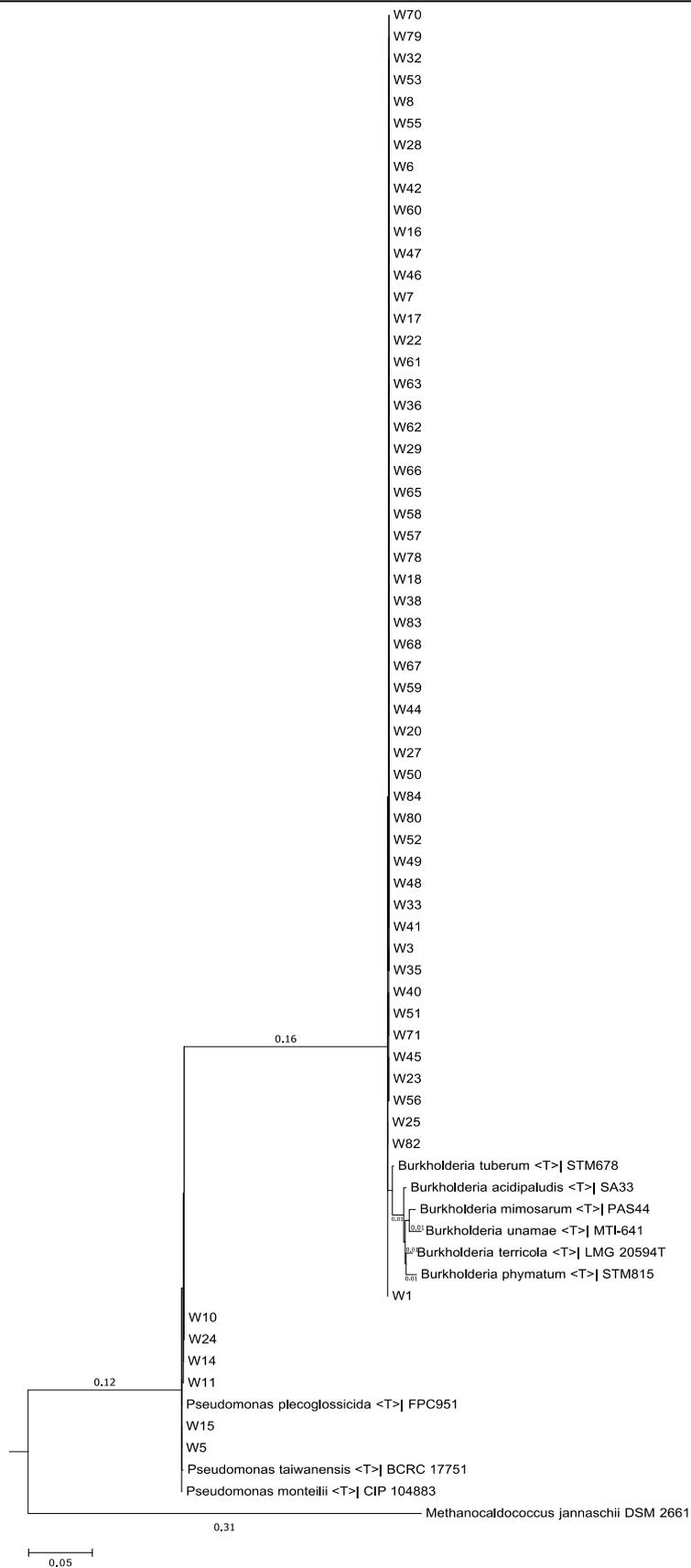


Figura 10 Árvore filogenética construída pelo método de Weighbor Joining utilizando as sequências do gene 16S RNAr dos isolados bacterianos de nódulos de *Mimosa* spp. A espécie *Methanocaldococcus jannaschii* foi utilizada como *outgroup*.

4.4 Confirmação da capacidade de nodulação dos isolados bacterianos

As avaliações visuais da presença ou ausência de nódulos nas plantas inoculadas podem ser realizadas, em geral, duas a três semanas após a inoculação. Cada planta foi referida como positiva, quando estavam presentes um ou mais nódulos, e negativa, quando nenhum nódulo era formado. Todos os isolados foram testados quanto à sua capacidade de nodulação em tubos contendo meio Jensen (JENSEN; COLLINS, 1985) utilizando-se *M. pudica* como planta teste. Dentre os cinquenta e quatro identificados como *Burkholderia* quarenta e três foram positivos, 10 negativos e um teste foi perdido devido à morte da planta. Para os identificados como *Pseudomonas* os seis foram negativos e para os 18 não identificados, 15 foram positivos e três negativos. A obtenção de resultados negativos não significa, definitivamente, que os isolados não sejam capazes de formarem nódulos. Vários são os motivos aparentes que podem interferir na formação de nódulos pelos isolados, como: método de preparo de meio para crescimento das plantas, variações de pH e temperatura, condições bioquímicas e fisiológicas dos inóculos, local de armazenamento e crescimento, entre outros.

Nesse teste, como não havia disponíveis quantidades suficientes de sementes do hospedeiro original, foram usadas sementes da espécie *M. pudica*. Isso se deve ao fato de que *M. pudica* é uma planta promíscua, com capacidade de ser nodulada por diferentes espécies de beta-proteobactérias (BONTENPS et al., 2010; REIS JR. et al., 2010). Essa espécie vem sendo bastante utilizada para essa finalidade. Imagens de diferentes fases do experimento são apresentadas na figura 11.



Figura 11 Monitoramento do crescimento de *Mimosa pudica* e verificação do começo de formação de nódulos, após 15 dias (A). Desenvolvimento das plantas, ultrapassando a tampa de algodão do tubo, após 35 dias (B). Amostras após 60 dias de crescimento, tempo total do experimento, já retiradas do meio Jensen, sendo possível visualizar a formação dos nódulos (C). Amostras juntas para ilustração, após o término do experimento (D).

4.5 Teste de especificidade hospedeira de isolados de bactérias diazotróficas oriundos de *Mimosa* spp. inoculados em plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*)

Para esse teste foram escolhidos 18 isolados, com base na sua identificação e origem. Desses, nove eram pertencentes ao gênero *Burkholderia*, quatro à *Pseudomonas* e cinco ainda não identificados. Os resultados foram avaliados com relação à presença ou ausência de nódulos e comparação visual com o controle não inoculado, com plantas que receberam nitrogênio em cobertura e plantas inoculadas com a estirpe PRF81 de *Rhizobium tropici*. Uma visão geral do experimento pode ser visualizada na figura 12

Todas as bactérias identificadas como *Burkholderia* foram capazes de formar nódulos em feijoeiro. Para bactérias desse gênero, alguns estudos apontam a possibilidade de formação de nódulos em feijoeiro comum e feijão caupi (TALBI et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2012), mostrando que a nodulação ultrapassa a especificidade com a subfamília *Mimosoidae*. Quatro dos cinco isolados ainda não identificados também apresentaram capacidade de formar nódulos. Por outro lado, não houve nodulação entre os isolados identificados como *Pseudomonas*.

De acordo com os resultados obtidos, é possível afirmar que os isolados de *Burkholderia* apresentam-se com característica de promiscuidade, já que foram oriundos de *Mimosa* spp. e são capazes de formar nódulos em feijoeiro. No entanto, essas associações não se mostraram eficientes, como pode ser visualizado claramente na figura 13, em que se comparam as plantas inoculadas com o isolado W3 e W32 com a estirpe PRF81, recomendada para inoculação do feijoeiro. Nessa mesma figura pode-se observar que não há distinção entre plantas inoculadas com o isolado de *Burkholderia* e a testemunha não inoculada.

É possível que os isolados que não nodularam as plantas nesses experimentos apresentem especificidade para os seus hospedeiros originais, *M. somnians* ou *M. clausenii*. Por outro lado, não se pode eliminar a possibilidade deles terem sido isolados de nódulos apenas por apresentarem-se como oportunistas. Esse estudo não foi conclusivo e novos experimentos, com a utilização de sementes para os hospedeiros originais, poderiam ajudar a

redimir as dúvidas que ainda permanecem.

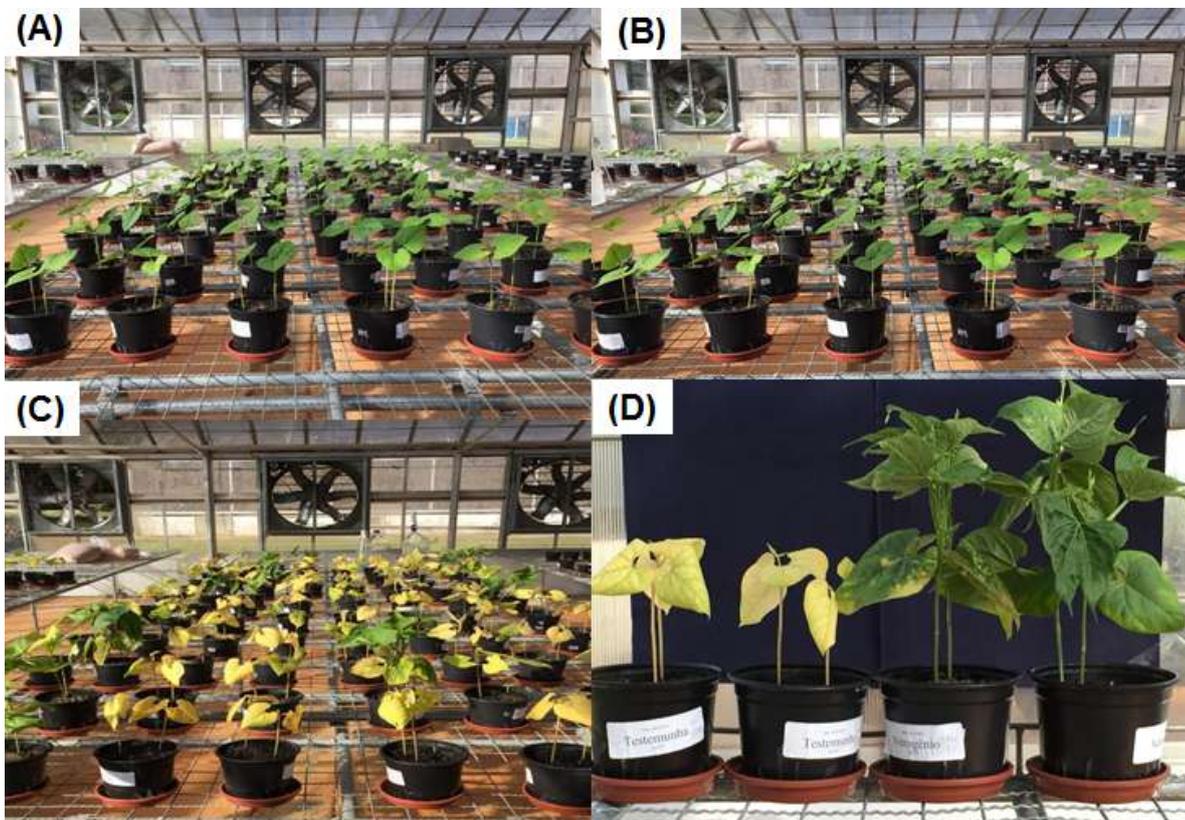


Figura 12 Visão geral do experimento aos 15 DAG (A), 20 DAG (B) e 30 DAG (C); comparação entre plantas não inoculadas (testemunhas) e plantas que receberam nitrogênio mineral aos 30 DAG (D).

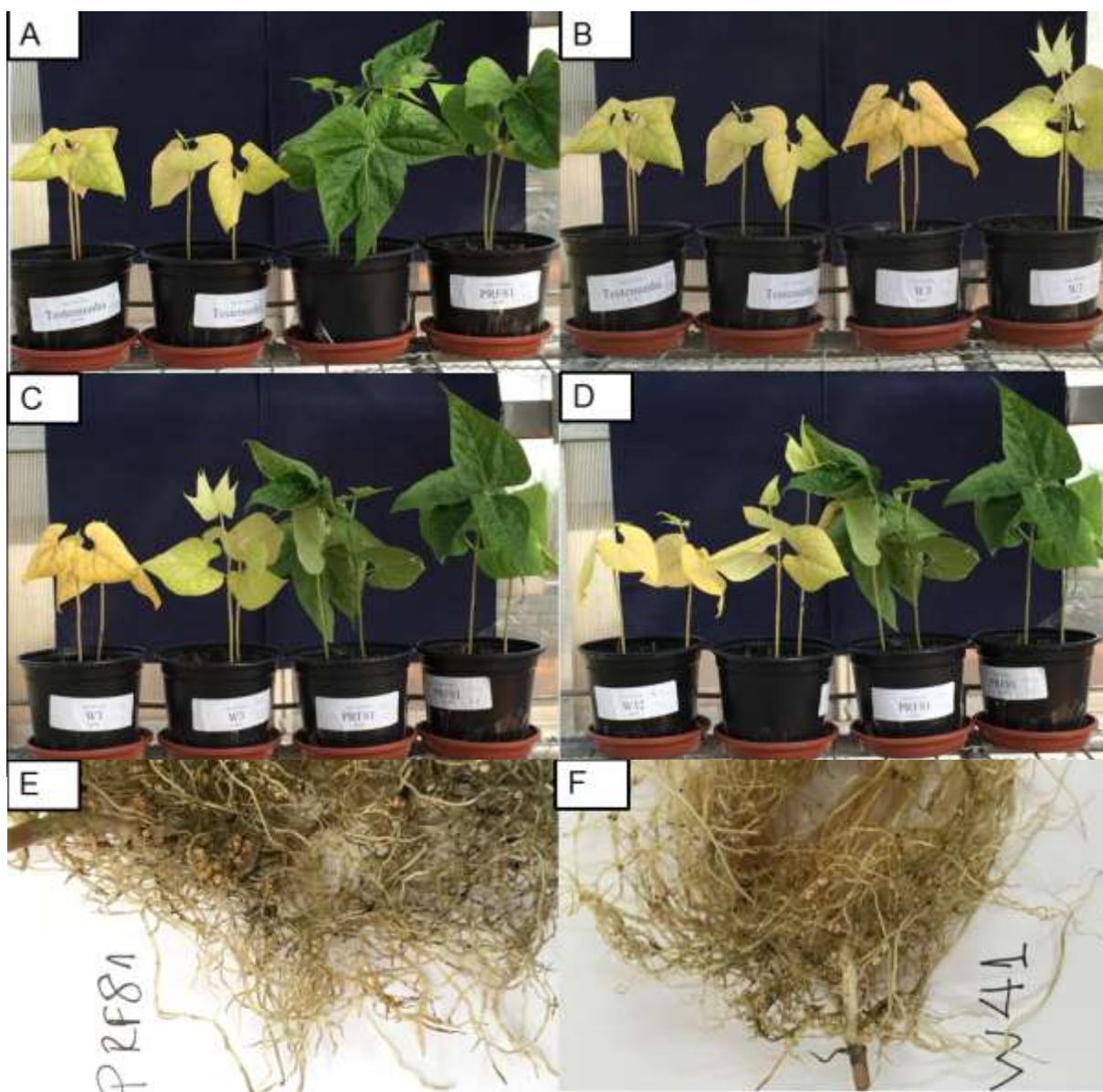


Figura 13 Visão geral do experimento aos 30 DAG. Plantas não inoculadas vs PRF81 (estirpe padrão de inoculante de feijão) (A); plantas não inoculadas vs isolado W3 de *Burkholderia* (B); isolados W3 e W 32 de *Burkholderia* vs PRF81 (estirpe padrão de inoculante de feijão) (C e D); nódulos formados pela inoculação da estirpe padrão de inoculante de feijão (E) e pelo isolado de *Burkholderia* W41 (F).

4.6 Amplificação dos genes simbióticos *nifH* e *nodC*

Para reforçar os resultados sobre o caráter simbiótico e diazotrófico dos isolados obtidos nesse estudo, se buscou, por meio de PCR, confirmar a presença

dos genes *nifH* e *nodC* nos genomas desses organismos. Como resultado, a presença desses genes foi confirmada para todos os isolados identificados como *Burkholderia*.

Para os 18 isolados ainda não identificados, somente para o isolado W13 não se conseguiu amplificação do gene *nodC*. Com relação à *Pseudomonas*, o gene *nifH* foi amplificado em quatro (W10, W14, W15, W24) dos seis isolados identificados como pertencentes a esse gênero. Por outro lado, a amplificação do gene envolvido na nodulação (*nodC*) só foi observada para dois isolados (W14 e W24).

Apesar de ser um forte indício, a não amplificação dos genes *nod* não necessariamente indicam que um isolado não seja capaz de nodular. GIRAUD et al. (2007) verificaram que estirpes de *Bradyrhizobium* não apresentaram o gene para nodulação em *Aeschynomene sensitiva* e *Aeschynomene*. Tal achado, implicou em atestar que os fatores de nodulação (*nodABC*) não são cruciais para o estabelecimento da simbiose *Bradyrhizobium Aeschynomene* e que essas estirpes desenvolveram outros mecanismos independentes dos fatores de nodulação. Talvez esse mecanismo poderia explicar o fato de alguns dos isolados do presente trabalho terem sido isolados de nódulos e não apresentarem o gene *nodC*. Por outro lado, também não se pode descartar completamente problemas que possam ter ocorrido com a PCR. Portanto, não é possível elucidar essa questão.

As figuras 14 e 15 mostram os resultados de amplificação desses genes para alguns isolados e os resultados completos estão apresentados no Anexo I tabela I.

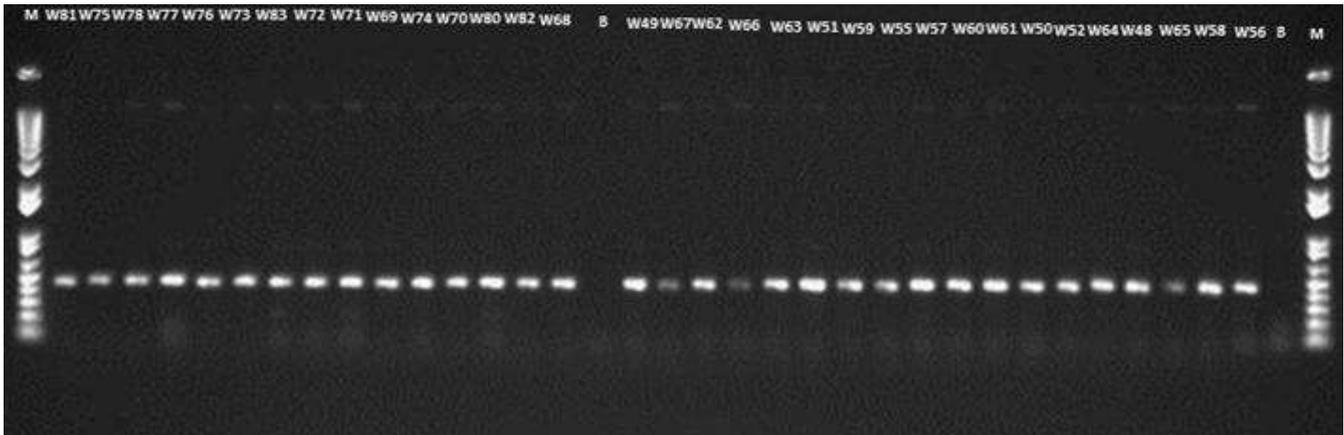


Figura 14 Produtos de amplificação do gene *nifH* de alguns isolados de nódulos provenientes de *Mimosa somnians* e *M. clausenni*. M - marcador molecular 100bp DNA ladder; W81 - W56 isolados; B controle sem DNA molde.

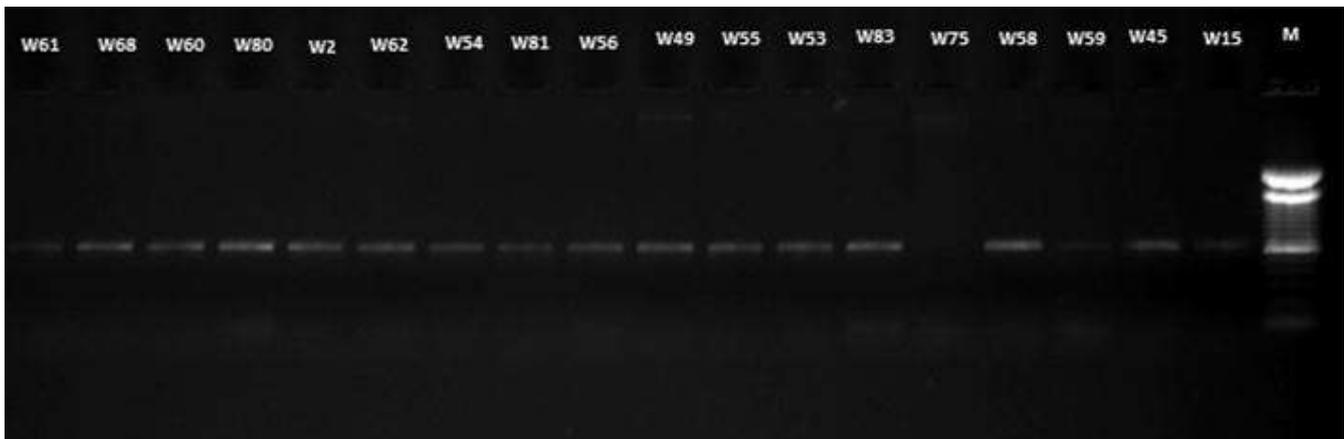


Figura 15 Produtos de amplificação do gene *nodC* para alguns isolados de nódulos provenientes de *Mimosa somnians* e *M. clausenni*. M - marcador molecular Low Mass ladder 200bp DNA -; W61 - W15 isolados.

4.7 Caracterização morfológica dos isolados

Foram avaliados 78 isolados de bactérias (cada isolado proveniente de um nódulo de *Mimosa* spp.). Desses, 50 foram oriundos de nódulos de *Mimosa somnians* e 28 de *Mimosa clausenii*, provenientes de solo de cerrado não ultramáfico, solo saprolítico (com maior biodisponibilidade de níquel) e laterítico (menor biodisponibilidade de níquel). A procedência dos isolados é mostrada na tabela I-Anexo I. Todos os isolados foram crescidos em meio YMA com azul de bromotimol e vermelho congo (Figura 16).

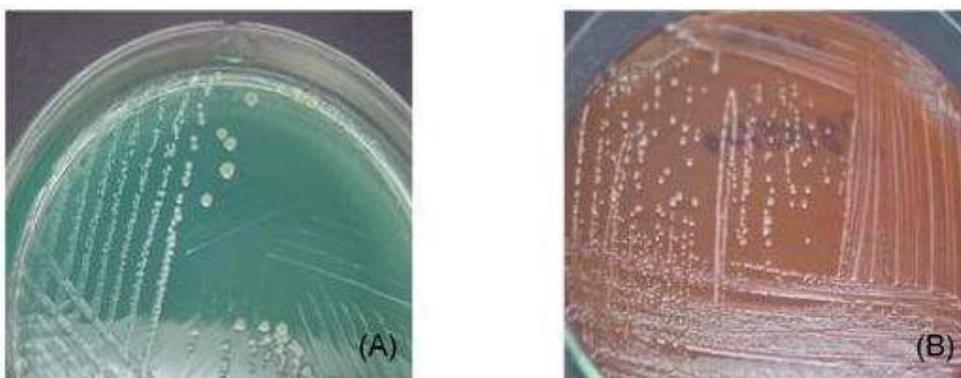


Figura 16 Exemplo de isolados de nódulos de *Mimosa* em meio YMA com azul de bromotimol (A) e vermelho congo (B)

Por meio da análise da ferramenta de *clusters* foi possível constatar que, apesar de a grande maioria dos isolados obtidos aparentarem pertencer ao gênero *Burkholderia*, observaram-se diferenças morfológicas entre suas colônias, indicando possível diversidade inter e/ou intra-específica.

O dendrograma construído a partir da análise de agrupamento mostra que, ao nível de 55% de distância, são formados dois grupos distintos (Figura 17). O primeiro grupo é formado por 67 isolados, enquanto o segundo contém os 11 isolados restantes. Dentro desses grupos observam-se alguns subgrupos com maior similaridade entre eles. Um dos fatores que se destacou para separação desses grupos foi a forma da colônia, sendo a maioria dos representantes do grupo 1 de forma circular, enquanto os isolados do grupo 2 todos apresentaram forma elíptica. PERIN (2007) ao caracterizar morfológicamente estirpes de bactérias diazotróficas *Burkholderia* spp., associadas a duas variedades de arroz, também verificou tal variação, com grupos que se definiram para essas características. A produção de muco também foi importante para a separação desses grupos, com representantes

do grupo 1, em sua maioria, apresentando pouca produção de exopolissacarídeos e a grande maioria dos isolados do grupo 2 mostrando produção moderada, exceção somente para um isolado (W35).

Sabe-se que, de acordo com os resultados de identificação por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA, aproximadamente 8% dos isolados pertencem ao gênero *Pseudomonas*. Esse grupo de bactérias é considerado um dos grupos mais complexos dentre as bactérias gram-negativas e possui similaridades fenotípicas com outros gêneros (ZAGO; DE-POLLI; RUMJANEK, 2011).

ZAGO; DE-POLLI e RUMJANEK (2011) ao caracterizarem 510 isolados de *Pseudomonas spp.* associadas à alface, cenoura e pepino, verificaram que entre as características fenotípicas que mais contribuíram para o agrupamento, está o tamanho da colônia. Dentre os isolados do presente trabalho pertencentes a esse gênero (W05; W10; W11; W14; W15 e W24), o tamanho da colônia também foi variável, sendo W10 e W11 com colônias de 3 mm, W24 e W15 de 2mm e W14 e W15 de 1mm. Ao se analisar o agrupamento desses isolados, não foi constatada nenhuma relação clara entre eles. Verifica-se que, devido à alta similaridade fenotípica com *Burkholderia spp.*, os isolados de *Pseudomonas* não formaram um grupo separado.

A maioria dos isolados presentes no grupo 1, são oriundos de solos saprolíticos. Além disso, das 50 bactérias isoladas nesse trabalho provenientes de nódulo de *M. somnians*, 48 pertenciam a esse grupo. Enquanto que, o grupo 2 é formado em sua maioria por isolados obtidos de áreas sob solo laterítico ou cerrado não ultramáfico e quase na sua totalidade oriundos de nódulos da espécie *M. clausenii*, exceção somente para dois isolados, um proveniente de *M. somnians* e solo saprolítico (W15) e outro também de *M. somnians* só que de solo laterítico (W35).

Apesar de não serem conclusivos, esses resultados são importantes porque levantam a hipótese de que o ambiente e a planta hospedeira estão influenciando a diversidade de "*Burkholderia*" nos solos estudados. RODRIGUES; BALDANI e BALDANI (2006) avaliaram a ocorrência e a diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas, associadas a duas variedades de arroz de solos diferentes, e demonstraram que os grupos de *Burkholderia*, com comportamentos nutricionais

distintos, estão distribuídos em diferentes regiões geográficas, visualizados pela origem dos solos utilizados.

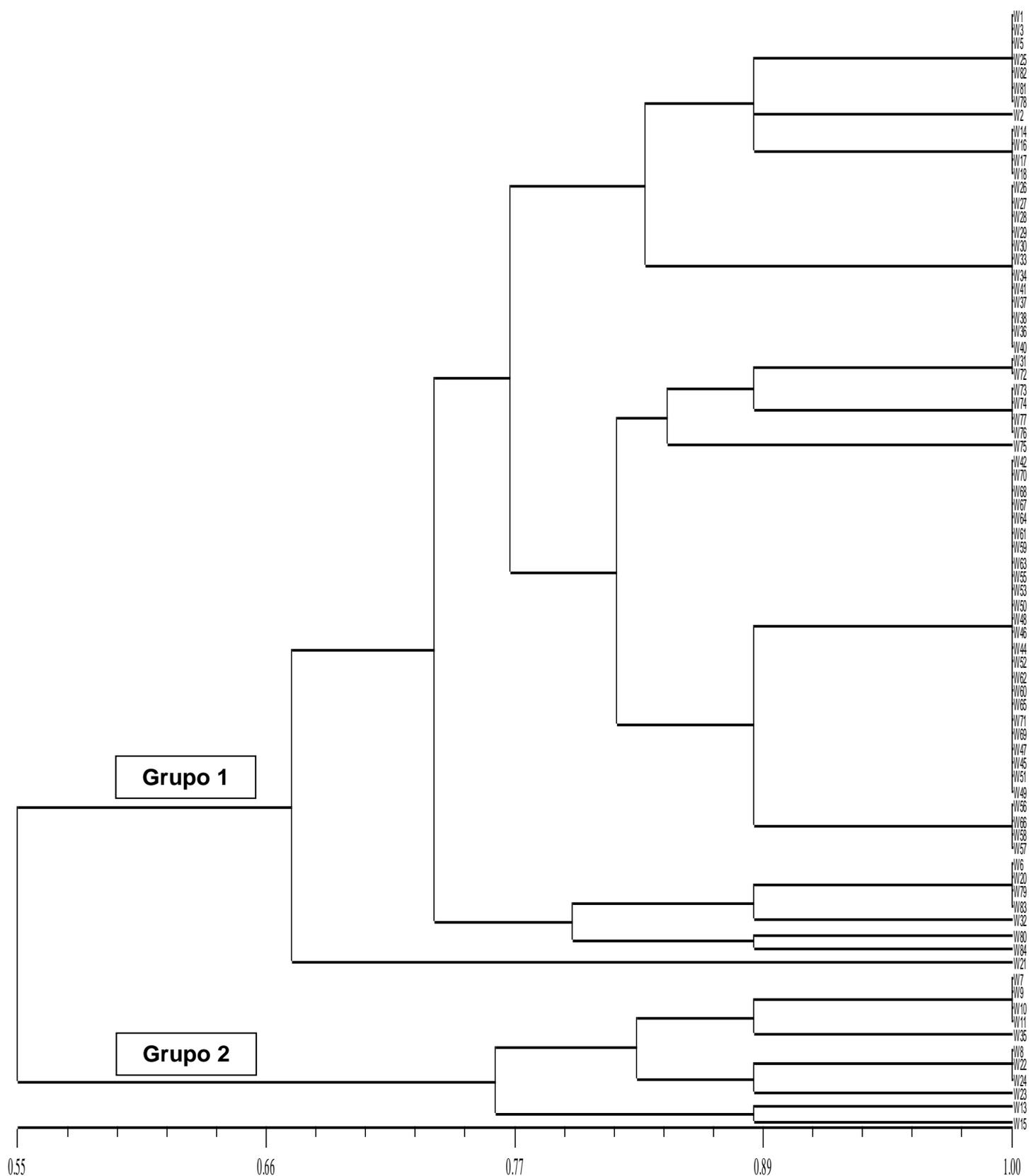


Figura 17 Dendrograma de similaridade entre isolados de nódulos de *Mimosa* spp, provenientes de solos ultramáficos de Barro Alto (GO), gerado pelo algoritmo UPGMA e matriz de similaridade calculada pelo índice *Simple matching*, a partir dos dados de morfologia de colônias em meio YMA

4.8 Caracterização fisiológica/bioquímica dos isolados bacterianos

4.8.1 Capacidade de solubilização de fosfatos

O fósforo (P) é um nutriente essencial para as plantas e com frequência se encontra no solo em forma insolúvel ou indisponível. Isso é especialmente problemático nos solos ultramáficos, caracterizados por apresentarem baixo nível de nutrientes (REEVES et al., 2007). Portanto, é importante que bactérias associadas às plantas desse ambiente sejam capazes de disponibilizar o P, que naturalmente não se encontra na forma assimilável pelos vegetais.

Dos 78 isolados avaliados, 11 foram capazes de solubilizar fosfato em meio NBRIP e 10 em meio YED-P, enquanto que nenhum deles apresentou essa característica em meio GL + AlPO_4 . Não foi possível observar diferenças entre os isolados solubilizadores, com base no diâmetro dos halos de solubilização (Figura 18). A maioria dos isolados solubilizadores de fosfato em meio NBRIP, também foram positivos em meio YED-P, com exceção do isolado W25 (Tabela 1 – Anexo 1).



Figura 18 Teste de solubilização de fosfato em meio NBRIP (esquerda) isolados W2 e W5 (positivo) e W1 (negativo) e em meio YED-P (direita) para os isolados W14 e W15 (positivo) e W16 (negativo). O surgimento de halo ao redor das colônias indica a solubilização da fonte de fosfato utilizada nos meios de cultivo.

Isolados bacterianos provenientes de nódulos de leguminosa *Mimosa* também foram avaliados por OLIVEIRA (2011) quanto à solubilização de fosfato. Nesse caso, os 303 isolados de rizóbios foram provenientes de nódulos de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth), coletados diretamente de um Argissolo Vermelho-Amarelo da estação experimental do IPA, em Itambé - PE e de nódulos de sabiá de amostras provenientes do mesmo solo sob Mata Nativa, Bosque de sabiá, pastagens de *Brachiaria humidicola* e *B. decumbens*. 47% desses isolados foram positivos para a solubilização de fosfato de cálcio.

No presente trabalho, dos isolados capazes de solubilizar fosfatos, com base na identificação pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, seis são *Pseudomonas* e três *Burkholderia*. Os dois isolados restantes não foram identificados, dentre eles o isolado W25, que só solubilizou em meio NBRIP.

Diferentemente dos resultados encontrados para os isolados pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, a maioria dos isolados de *Burkholderia* não foi capaz de solubilizar fosfatos. A ausência de solubilização de fosfatos por *Burkholderia* foi verificada em um estudo recente desenvolvido por MADHUSUDHAN et al. (2014), que avaliaram isolados bacterianos pertencentes a esse gênero, provenientes de solos tropicais. Por outro lado, diversos trabalhos têm mostrado solubilização de fosfatos por *Burkholderia* spp. Em uma área de solo ultramáfico, GONIN et al. (2013) caracterizaram 124 isolados bacterianos provenientes da rizosfera de *Costularia* spp., planta endêmica da Nova Caledônia, os autores observaram que 18% eram solubilizadores de fosfato. Dentre esses isolados, grande parte era pertencente ao gênero *Burkholderia*. INUI (2009) avaliou a solubilização de fosfato por rizobactérias oriundas de diferentes solos brasileiros cultivados com cana-de-açúcar. Dos 60 isolados avaliados, apenas 10 apresentaram capacidade de solubilização de fosfato e entre estes se encontravam *Burkholderia verschuerenni* (FJ890897), *Burkholderia* sp. (FJ890892), e *Burkholderia* sp. (FJ890895).

Como já discutido anteriormente, os isolados identificados nesse trabalho apresentam alta similaridade com *Burkholderia tuberum*. A solubilização de fosfato é uma característica conhecida para essa espécie, como foi demonstrado por ANGUS et al. (2013), para diferentes estirpes dessa espécie, provenientes de diversos locais, incluindo nódulos de leguminosas.

Diversos trabalhos na literatura apresentam bactérias do gênero *Pseudomonas* como capazes de solubilizar fosfatos. SILVA (2007) observou uma alta porcentagem de isolados solubilizadores de fosfato (85,7 %) presente na rizosfera de cacauzeiro. Diversos isolados positivos para essa característica eram pertencentes à *Pseudomonas* e se apresentaram como bons solubilizadores. Esse autor afirma que esse gênero está dentre os mais eficientes em solubilizar fosfatos.

Os resultados positivos para solubilização de fosfato de cálcio e negativos para fosfato de alumínio, como observado nesse estudo, também podem ser atribuídos às condições intrínsecas e necessidades fisiológicas das bactérias (DUFF et al., 1963; WENZEL et al., 1994;). DA COSTA (2013), também observou tal variação. Esse autor propõe que essas diferenças, podem estar relacionadas à origem das bactérias avaliadas nos diferentes estudos, ao gênero e/ou espécie a qual elas pertencem, bem como à composição do meio de cultura utilizado para a avaliação da solubilização, que diferem entre alguns dos estudos. Em seu trabalho, foram avaliados isolados de bactérias simbiotes e não simbiotes de feijão-caupi, no estado do Piauí. Dos 27 isolados, 81% foram capazes de solubilizar fosfatos de cálcio. Por outro lado, apenas um dos isolados foi capaz de solubilizar fosfato de alumínio, a estirpe UFPI B5-4. Uma das estirpes avaliadas (UFPI B5-8) era pertencente ao gênero *Pseudomonas*.

DA SILVA (2012) também mostrou que os 29 isolados avaliados no seu trabalho foram incapazes de solubilizar fosfato de alumínio, enquanto 10 isolados (34%) foram classificados como positivos para solubilização de fosfato de cálcio. Esses isolados de bactérias simbióticas e não simbióticas foram provenientes de nódulos de plantas iscas (*Macroptilium atropurpureum*) inoculadas com suspensões de solos da Amazônia Ocidental. Os isolados positivos pertenciam aos gêneros *Burkholderia* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Rhizobium* sp., *Massilia* sp. e *Sphingomonas* sp.

MOREIRA et al. (2010) relatam que ainda são poucos os experimentos realizados com diazotróficos solubilizadores de fosfato e os resultados obtidos são muitos diversos, variando de acordo com a planta ou a espécie bacteriana. Muitos micro-organismos têm a capacidade de solubilizar fosfatos precipitados com ferro, alumínio e cálcio e vários são os mecanismos utilizados nesse processo, que têm sido atribuídos à liberação de diversos ácidos orgânicos que agem diretamente

sobre o mineral de fosfato levando a acidificação do meio (SILVA FILHO et al., 2002; MOREIRA et al., 2010). Para o gênero *Burkholderia*, por exemplo, a solubilização de fosfato inorgânico já foi relacionada com a produção de compostos orgânicos. Como observado por LIN et al. (2006), em que a produção de ácido glucônico por *B. cepacia* foi a principal responsável pela solubilização de trifosfato de cálcio.

4.8.2 Avaliação de tolerância a níquel

Nenhum dos isolados avaliados nesse trabalho pode ser caracterizado como tolerante a Ni, ou seja, capaz de crescer em concentrações maiores que 5 mM desse metal (KLONOWSKA et al., 2012). Apenas um dos isolados (W10) apresentou algum crescimento em placas onde a concentração de Ni era de 0,5 mM (Figuras 19 A e B). Diferentemente do que era esperado, esse isolado foi obtido de nódulo de *M. clausenii*, oriundo do solo não ultramáfico, sob a área de cerrado utilizada como referência. Esse isolado foi identificado como pertencente ao gênero *Pseudomonas*. Relatos na literatura apontam que estirpes resistentes a Ni já foram descritas em espécies dos gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia* (STOPPEL; SHLEGEL, 1995; MENGONI et al., 2010).

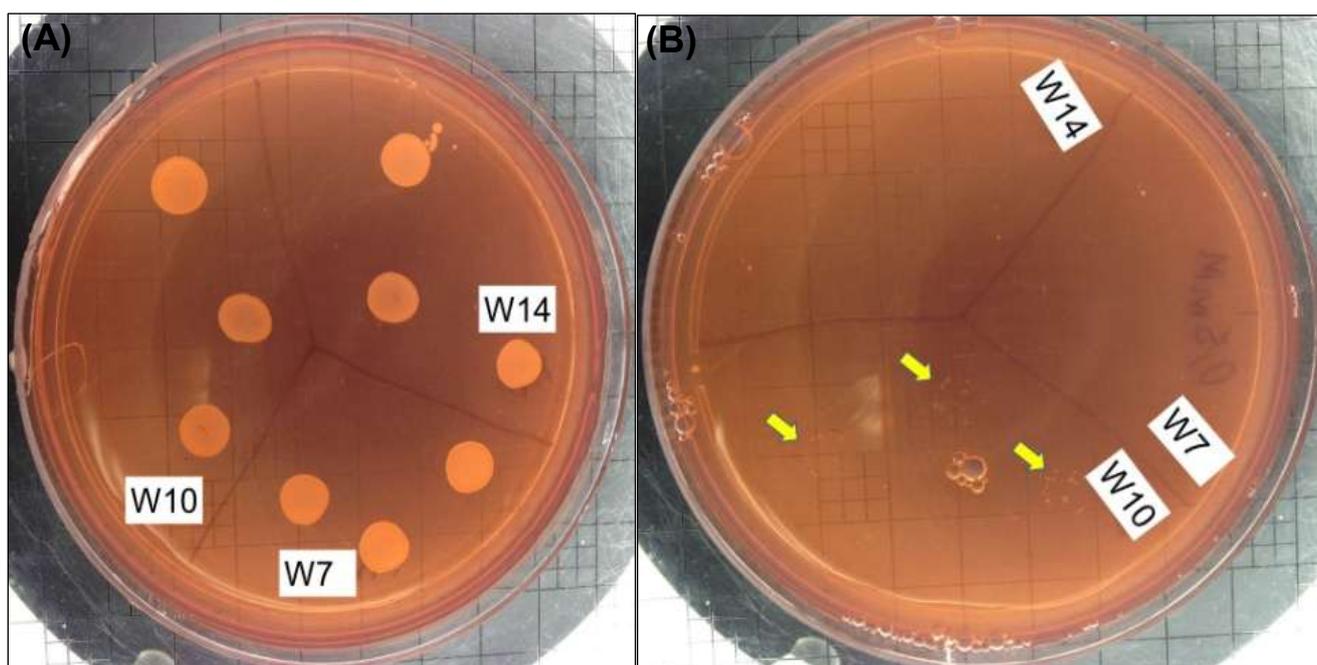


Figura 19 Teste de tolerância ao Ni em meio de cultivo YMA. São mostradas placas controle (A) e aquelas contendo 0,5 mM de Ni (B).

MENGONI; SCHAT e VANGRONSVELD (2001) avaliaram 138 isolados provenientes de áreas de solos ultramáficos, para o fenótipo resistência a metais, incluindo o Ni. Esses autores verificaram que entre os gêneros encontrados *Pseudomonas* representou 40,5 % dos isolados Ni-resistentes. Essas bactérias apresentaram tolerância de até 10 mM de Ni. Para esse gênero a tolerância a níquel é codificada em plasmídeos (LIESSEGANG et al., 1993), que são relacionados com capacidade de biotransformação e resistência a metais pesados (WASI; JEELANI; AHMAD, 2007). Bactérias resistentes a Ni advindas diretamente de solos ultramáficos vem sendo apontadas por outros trabalhos (PAL et al., 2004; ABOU-SHANAB, ANGLE; CHANEY, 2006; ABOU-SHANAB et al., 2009).

Em um trabalho na mesma área de estudo, desenvolvido por SENA (2012), foi feita a avaliação de microrganismos provenientes dos solos saprolíticos e lateríticos, utilizando os meios de cultura R2A e VL, esse autor obteve crescimento de bactérias em uma concentração de 5 mM de Ni²⁺ em todos os isolados avaliados, para ambos os solos e incluíam-se entre estes, bactérias identificadas como pertencentes ao filo proteobactérias.

De acordo com RAJKUMAR et al. (2009), um grande número de bactérias Ni-resistentes já foram encontradas associadas a plantas hiperacumuladoras, entretanto, um número baixo de bactérias tolerantes a Ni, foi encontrado associado a plantas não acumuladoras, em uma mesma área de solo ultramáfico. KLONOWSKA et al. (2012) avaliaram um total de 96 isolados de nódulos de *M. pudica*, oriundos de solos ultramáficos de Nova Caledônia. Esses isolados foram identificados como *Cupriavidus taiwanensis*, uma beta-proteobactéria assim como *Burkholderia*. No trabalho desses autores, apenas 16% dos isolados mostraram-se resistentes a teores de Ni de até 15 mM, enquanto o restante dos isolados não pôde crescer em meio que continha esse metal. Coincidentemente, essas bactérias tolerantes eram provenientes de áreas com baixo Ni biodisponível.

Essas observações em conjunto com os resultados obtidos no presente trabalho levantam dúvidas quanto às estratégias de sobrevivência desses simbiontes em solos com altos teores de metais pesados. Uma provável explicação seria a existência de diferentes micro-nichos no solo onde essas bactérias poderiam estar localizadas, evitando a toxicidade dos metais.

Até o momento, são inexistentes as informações sobre a comunidade bacteriana diazotrófica, pertencente a beta-proteobactérias, associadas às espécies de leguminosas *M. somnians* e *M. clausenii*, tolerantes a metais pesados, distribuídas em áreas de solo ultramáfico e também de solo não ultramáfico. Nesse trabalho, foi obtida uma primeira descrição do comportamento dessa associação frente a essas características e dentro das condições em que foram conduzidos os testes no presente trabalho, não foi possível identificar nenhum isolado Ni-resistente.

4.8.3 Produção de Sideróforos

Dos setenta e oito isolados avaliados, trinta e oito (48,7%), demonstraram a produção de sideróforos enquanto que quarenta (51,3%) apresentaram resultados negativos para essa característica (Figura 20 e Tabela I - Anexo I).

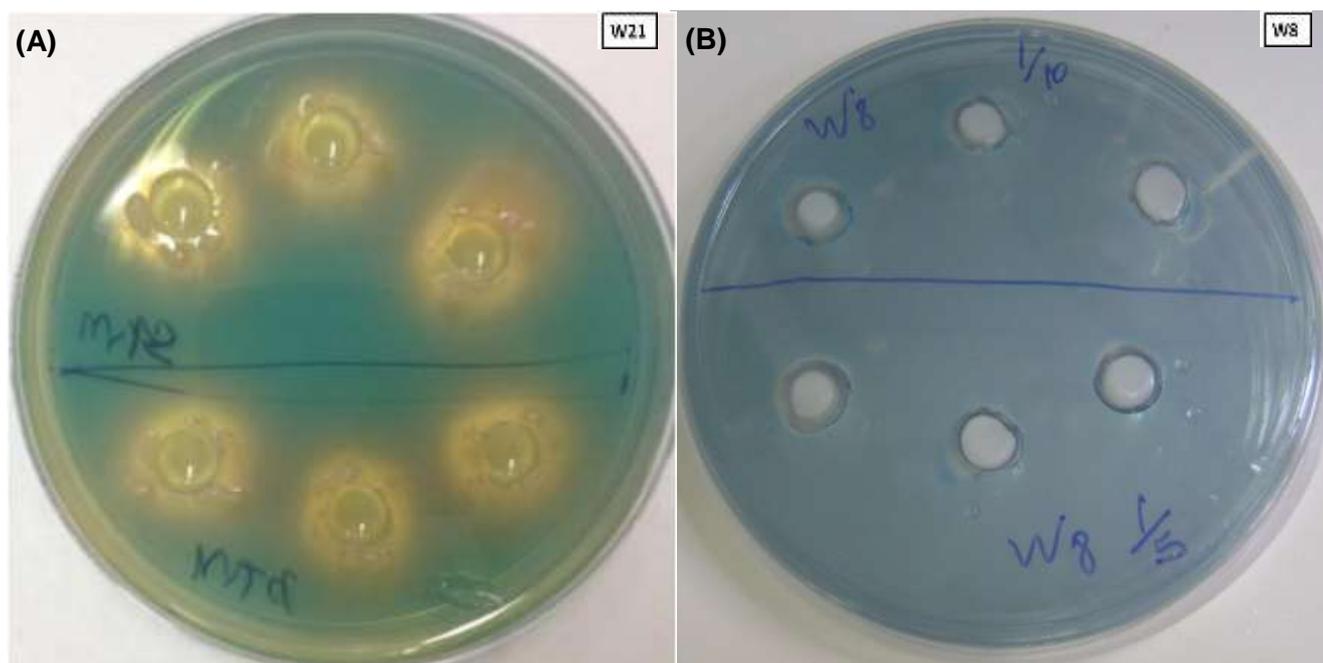


Figura 20 Teste de produção de sideróforos para os isolados W21 (A: positivo) e W8 (B: negativo). Após 72 horas de incubação a 28° C, o surgimento de halos ao redor dos poços indica produção de sideróforos.

Ao observar a produção positiva de sideróforos pelos isolados bacterianos, 19 (50%) eram pertencentes à *Burkholderia* e seis (16%) correspondiam aos que apresentaram alta similaridade com *Pseudomonas*, ou seja, todos os isolados desse gênero foram sideróforos-positivo. Os treze isolados restantes (34%)

corresponderam aqueles ainda não identificados.

Várias estirpes de *Burkholderia* associadas a plantas vêm sendo apontadas como produtoras de sideróforos, entre elas, *B. unamae* e *B. tropica* (CABALLERO-MELLADO et al., 2004; REIS et al., 2004), *B. Caribensis* e *B. vientamiensis* (CASTRO-GONZÁLEZ, 2011). ANGUS et al. (2013) mostraram que *B. tuberum*, capaz de formar nódulos efetivos em siratro (*Macroptilium atropurpureum*), também pode produzi-los. Esses autores encontraram três receptores de sideróforos no genoma dessa bactéria.

Alguns trabalhos mostram a presença e produção de sideróforos em solos com altos teores de metais pesados. Como observado por JIANG et al. (2008), trabalhando com isolados bacterianos provenientes de amostras de solos contaminados, com destaque para a estirpe J62 de *Burkholderia*. Variações na distribuição e proporção de produtores e não produtores de sideróforos por isolados de *Burkholderia* spp., também já foram evidenciadas por outros autores. Isolados bacterianos rizosféricos de *Costularia* spp., obtidos de áreas de solos ultramáficos, foram avaliados por GONIN et al. (2013) e dos 124 isolados 52% foram capazes de produzir sideróforos e 48 % não produziram.

LUVIZOTTO (2008) também avaliou isolados de *Burkholderia* spp. Nesse caso, associados às raízes de cana-de-açúcar, e dos 39 isolados obtidos (20 endofíticos de raízes e 19 rizosféricos), 35,9% eram produtores de sideróforos. Além disso, 42% dos 292 isolados de rizobactérias promotoras de crescimento de milho, avaliados por ARRUDA (2012), foram capazes de produzir sideróforos. Isto incluiu os isolados RG38 de *Burkholderia* sp. e AGR27 de *Pseudomonas* sp. SUN et al. (2011) avaliaram 189 estirpes de bactérias da rizosfera de *Cymbidium gaeringi* e apenas 17 (24,9%) apresentaram produção de sideróforos e dentre estes alguns pertencentes a classe beta-proteobactérias.

No presente estudo, todos os isolados identificados como *Pseudomonas* foram produtores de sideróforos, o que é atestado por diversos trabalhos. As *Pseudomonas* estão presentes em diversos ambientes e apresentam a produção de sideróforos e hormônio de crescimento vegetal (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; CORNELIS; DINGEMANS, 2013).

FEDRIZZI (2006) isolaram bactérias do solo de Terra Preta Antropogênica (TPA) da Amazônia Ocidental e verificaram a produção de sideróforos por 72 das

143 linhagens de *Pseudomonas putida* estudadas, sendo as linhagens TP11 e TP16 as maiores produtoras. TAILOR e JOSHI (2012) caracterizaram a produção de sideróforos de 63 isolados de *P. fluorescencens* advindos da rizosfera de cana-de-açúcar e verificaram que foram positivos.

Para VERNA; JOSHI e MAZUMDAR (2012) pode ser difícil o cultivo de micro-organismos em placa contendo meio CAS, haja vista que esse meio tem atividade antibacteriana inata. O HDTMA (um tipo de detergente) utilizado na preparação do meio CAS é tóxico para algumas bactérias. Sendo assim, os resultados negativos e as dificuldades encontradas para formulação ideal do meio podem ter sido devido a essa propriedade.

Os resultados do presente trabalho encontram respaldo nos dados apontados pela literatura, que, em maior ou menor grau de variação, indicam a produção de sideróforos por *Burkholderia* spp., e diversas outras bactérias, incluindo *Pseudomonas* spp. Além disso, outros trabalhos também têm mostrado que dentro do gênero *Burkholderia* nem todos os isolados podem ser capazes de produzir essa molécula de baixo peso molecular (CABALLERO-MELLADO et al., 2007; SUÁREZ-MORENO et al., 2012; COMPANT et al., 2008). No presente trabalho, 13 isolados produtores de sideróforos foram caracterizados apenas com base em análises morfológicas e imunológicas, não sendo identificados através do sequenciamento do gene 16S RNAr de forma que estas podem ou não ser pertencentes ao gênero *Burkholderia*.

Os mecanismos envolvidos nos processos de produção pelos diversos gêneros bacterianos são bastante complexos, muitas vezes envolvendo genes específicos, relacionados à presença de receptores de membrana para produção de sideróforos, no entanto alguns trabalhos já apontaram também para a provável inexistência dessa relação (CABALLERO-MELLADO, 2004).

4.8.4 Produção de hormônio de crescimento vegetal do tipo Ácido-Indol-Acético

O ácido-indol-acético (AIA) afeta a morfologia das raízes, aumentando o comprimento e o número de pelos radiculares (BARBIERI et al., 1986), o que pode

umentar a eficiência das plantas em absorver água e nutrientes.

Nesse trabalho, todos os isolados avaliados foram capazes de produzir AIA. Dezoito apresentaram baixa produção ($< 8,7 \mu\text{g/mL} = < 50 \mu\text{M}$), quarenta e quatro apresentaram produção moderada ($8,8 - 17,9 \mu\text{g/mL} = 50 - 100 \mu\text{M}$) e dezesseis produziram alta quantidade ($> 17,9 \mu\text{g/mL} = > 100 \mu\text{M}$). A quantidade de AIA produzida variou de 0,5 até 54,1 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 1 - Anexo 1). Obviamente, a maior parte dos isolados que produziram alta quantidade é pertencente ao gênero *Burkholderia*. No entanto, três dos isolados pertencentes à *Pseudomonas* também apresentaram essa característica (W5, W15, W24), com destaque para o isolado W24, que produziu AIA em maior concentração com 54,1 $\mu\text{g/mL}$. Para *Burkholderia*, o maior valor encontrado foi para o isolado W23, com produção de 41,9 $\mu\text{g/mL}$. Apesar do número menor de isolados de *Pseudomonas* avaliados, estes apresentaram resultados similares a *Burkholderia*, e para ambos os gêneros a produção de AIA variou de baixo até alta produção (Quadro 1 A, B e C).

O AIA é um metabólito produzido na fase estacionária de crescimento (INUI-KISHI et al., 2012), as bactérias podem reagir de maneira distinta, podendo utilizar várias vias de biossíntese redundantes ou não na produção desse hormônio (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007; KHALID; ARSHAD; ZAHIR, 2004; MARCHIORO, 2005).

Fatores como: local de origem, estresse ambiental incluindo; pH ácido, estresse osmótico, limitação de fontes de carbono, podem alterar a produção de AIA por bactérias. Esses fatores também tem sido relacionados com a entrada da bactéria na fase estacionária de crescimento, e um fator bastante comum que vem sendo estudado é a expressão de genes envolvidos no processo de síntese desse fitormônio (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007).

Sugere-se então, que a variação de produção encontrada entre os isolados estudados nesse trabalho também pode ser resultado dessas diferenças. Com relação ao local de origem dos isolados, não foi encontrada correlação nesse estudo. As possíveis diferenças poderiam ser melhores avaliadas se fossem apontadas o potencial ótimo de produção para cada isolado estudado, ponderando cada fator que pode interferir no processo de produção de AIA.

RADWAN (1999) também mostrou grande variabilidade entre cepas, porém, trabalhando com *Azospirillum*. Esse autor observou que a produção de AIA de seus

isolados variou de 0,5 a 75 µg/mL. COATTI (2010) verificou variações na produção de AIA, que foram de 3,5 a 52 µg/mL, produzidas por diferentes estirpes de rizóbios.

PERIN (2007) avaliou a produção de AIA por diferentes estirpes de bactérias dentro do gênero *Burkholderia* e constatou que isolados de *B. silvatlantica* e estirpes padrões de *B. tropica*, *B. brasilensis*, *B. kururiensis*, *B. cepacia* Gen. I e *B. unamae* não foram capazes de produzir esse fitormônio. Esse autor observou a produção de AIA apenas pela estirpe padrão TVV75, de *B. vietnamiensis*. No entanto, diferentes estudos atestam que outras bactérias dentro desse gênero são capazes de produzir AIA, como observado por LUVIZOTTO (2008), ao avaliar isolados de *Burkholderia* oriundos de raízes e rizosfera de cana-de-açúcar. As quantidades de AIA produzidas pelos isolados de raízes (endofíticos) variaram de 3,43 a 9,97 µg/mL e pelos isolados da rizosfera de 4,47 a 19,47 µg/mL.

INUI-KISHI et al. (2012) verificaram a produção de AIA por rizobactérias isoladas de solos provenientes de Araxá - MG e Catalão - GO, cultivados com cana-de-açúcar. Entre as bactérias produtoras de AIA, a estirpe de *Burkholderia* sp. FJ890895 produziu 58,34 µg/mL após 72 horas de crescimento. Essa estirpe, juntamente com a FJ890892, também de *Burkholderia*, foi tida como promissora para a produção deste fitormônio, sendo considerada pelos autores desse trabalho como um dos melhores isolados avaliados para promoção do crescimento vegetal.

No presente estudo, também após 72 horas de crescimento, foram observados valores de produção de AIA de até 45 µg/mL pelo isolado W23 de *Burkholderia* e 54,1 µg/mL pelo W24 de *Pseudomonas*, bem próximos aos encontrados por INUI-KISHI et al. (2012), indicando que alguns desses isolados podem ser considerados bactérias promissoras para promoverem o crescimento de plantas. De maneira geral os isolados apresentaram boas produções deste fitormônio, mesmo em comparação com um organismo considerado padrão para a produção de AIA, como o *Azospirillum*.

Outras bactérias endofíticas, incluindo *Pseudomonas*, são capazes de produzir AIA, promovendo o crescimento vegetal (PATTEN; GLICK, 1996). Diversos estudos vêm avaliando essa capacidade, como observado por OLIVEIRA-FRANCESQUINI (2014) que aponta *Pseudomonas* spp. como promissoras para serem utilizadas na promoção de crescimento de feijoeiro.

Resultados similares ao presente trabalho foram assinalados por AHMAD; AHMAD e KAN (2005), que ao avaliarem isolados rizosféricos de *Pseudomonas fluorescens* encontraram isolados que produziram AIA de 5 µg/mL até 53,2 µg/mL, bastante similar ao isolado W24 (54,1 µg/mL). SHARMA e RAI (2015) avaliaram a produção de AIA por rizobactérias isoladas de *Lycopersicum esculentum* provenientes da região de Kashipur, na Índia. Dentre os isolados, três pertencentes à *Pseudomonas* spp. (P3, P9 e P19), produziram 15, 25, 28,3 e 50,2 µg/mL de AIA, respectivamente.

Apesar de poucos relatos, isolados de nódulos de leguminosas do gênero *Mimosa* já foram confirmados como capazes de produzir AIA. PANDEY;KANG e MAHESHWARI (2005), ao identificar uma nova estirpe de *Burkholderia* sp., oriunda de nódulos de *Mimosa pudica*, a caracterizou como positiva para produção deste hormônio vegetal. Além disso, nesse estudo, isolados de bactérias pertencentes à *Pseudomonas*, provenientes de nódulos de leguminosas, também já foram avaliados quanto à produção de AIA. ZHAO et al. (2013) caracterizaram e identificaram a estirpe Zong 1 de *Pseudomonas chlororaphis*, proveniente de nódulos da leguminosa *Sophora alopecuroides*. Esses isolados produziram AIA até 63 µg/mL.

O AIA pode agir como uma molécula de sinalização produzida pelos micro-organismos, mostrando seu papel no processo de interação com as plantas. Diferentes vias de produção de AIA por bactérias já foram identificadas (SPAEPEN; VANDERLEYEN; REMANS, 2007). Para SUN; CHENG e GLICK (2009), as vias de biossíntese do AIA, bem como os mecanismos envolvidos no crescimento da planta, ainda devem ser bem elucidados para cada espécie de *Burkholderia* estudada. As plantas necessitam para o seu estímulo de crescimento de quantidades específicas de AIA, para tanto, estirpes bacterianas que promovam um bom crescimento vegetal devem disponibilizar tal fitormônio em quantidades ideais para o seu processo metabólico (SPAEPEN; VANDERLEYEN; REMANS, 2007). Tais características poderão ser melhores evidenciadas e estudadas se feita não somente a avaliação da produção e AIA *in vitro* pela bactéria isolada, mas também na interação planta-bactéria, verificando as respostas da planta pela adição de tal hormônio, em diferentes tempos da fase estacionária de crescimento.

(A)		μM	$\mu\text{g/ml}$
W2		45,4	7,9
W10		48,3	8,4
W13		38,0	6,6
W17		45,4	7,9
W20		46,9	8,2
W21		41,3	7,2
W22		41,6	7,2
W25		46,5	8,1
W33		31,1	5,4
W37		31,1	5,4
W38		34,3	6,0
W40		28,9	5,0
W41		41,6	7,2
W49		46,1	8,0
W51		32,1	5,6
W52		41,1	7,1
W53		47,4	8,3
W58		37,9	6,6

(B)		μM	$\mu\text{g/ml}$
W1		51,6	9,0
W3		59,7	10,4
W6		72,8	12,8
W8		83,2	14,5
W9		86,6	15,1
W11		54,8	9,6
W14		50,4	8,8
W16		61,6	10,7
W18		67,8	11,8
W26		56,5	9,8
W27		85,9	15,0
W28		87,7	15,3
W29		64,6	11,3
W30		81,8	14,3
W31		56,0	9,8
W32		69,1	12,1
W34		62,8	11,0
W35		92,2	16,1
W42		69,1	12,1
W44		82,3	14,4
W45		53,3	9,3
W47		62,4	10,9
W48		75,7	13,2
W50		55,6	9,7
W55		73,2	12,8
W56		54,2	9,4
W57		76,8	13,4
W59		45,6	7,9
W60		65,5	11,4
W62		90,8	15,9
W63		99,9	17,4
W64		90,8	15,9
W65		82,3	14,4
W66		76,8	13,4
W67		82,7	14,4
W68		58,3	10,2
W69		77,3	13,5
W70		66,9	11,7
W71		70,9	12,4
W72		70,0	12,2
W73		82,7	14,4
W74		71,9	12,5
W77		99,4	17,4
W80		99,0	17,3

(C)		μM	$\mu\text{g/ml}$
W5		284,0	49,7
W7		257,5	45,1
W15		298,0	52,2
W23		239,6	41,9
W24		309,3	54,1
W36		107,1	18,7
W46		112,1	19,6
W61		117,1	20,5
W75		208,4	36,5
W76		108,9	19,0
W78		128,8	22,5
W79		120,7	21,1
W81		104,9	18,3
W82		103,5	18,1
W83		149,2	26,1
W84		137,4	24,0

Quadro 1 - Acido-indol-acético produzido pelos 78 isolados bacterianos caracterizados nesse estudo, provenientes de nódulos de *M. sommiensis* e *M. clausenii*, de acordo com as categorias: (A) - baixa produção ($< 8,7 \mu\text{g/mL} = < 50 \mu\text{M}$), (B)- produção moderada ($8,7 - 17,9 \mu\text{g/mL} = 50 - 100 \mu\text{M}$) e (C) - alta produção ($> 17,9 \mu\text{g/mL} = > 100 \mu\text{M}$).

4.8.5 Produção de enzimas: celulases, ureases, proteases, pectinases, xilanases e lipases.

As bactérias necessitam de fontes de carbono variadas para atender as suas necessidades nutricionais e para atuar no processo de obtenção dessas tais fontes são produzidas diversas biomoléculas, e as enzimas incluem-se nesse grupo podendo ser produzidas tanto intra, quanto extracelular (TORTORA, 2012). Nesse estudo, os isolados obtidos de nódulos de *M. somnians* e *M. clausenii* foram avaliados quanto à capacidade de produção de diferentes enzimas. Dentre os setenta e oito isolados avaliados, nenhum deles apresentou halos de degradação dos substratos para urease, protease e xilanases (Figuras 21 A e B; 22 A e B; 23).

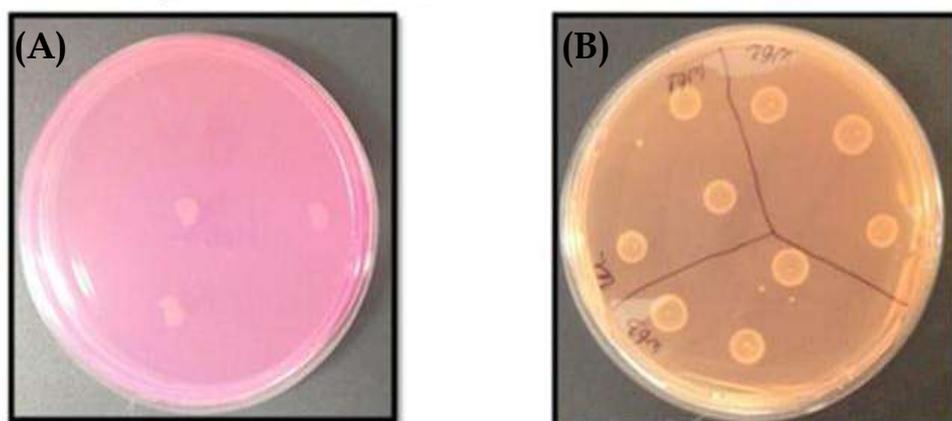


Figura 21 Produção da enzima urease por isolado utilizado como controle positivo (A); isolados testados nesse trabalho, apresentando resultado negativo para produção dessa enzima.

A ausência de produção de urease também já foi observada em outros membros do gênero *Burkholderia* formadores de nódulos em *Mimosa*. CHEN et al. (2007) caracterizou estirpes de *Burkholderia* provenientes de nódulos de *M. bimucronata* e *M. scrabella*, ocorrentes no Brasil. Enquanto a espécie *Burkholderia nodosa* apresentou produção de urease, *B. tropica*, *B. unamae* e *B. mimosarum* não produziram essa enzima. KUMAR et al. (2014) também verificaram a ausência de produção de urease por *Pseudomonas spp.* Nesse caso, foram isolados de solos contaminados por petróleo.

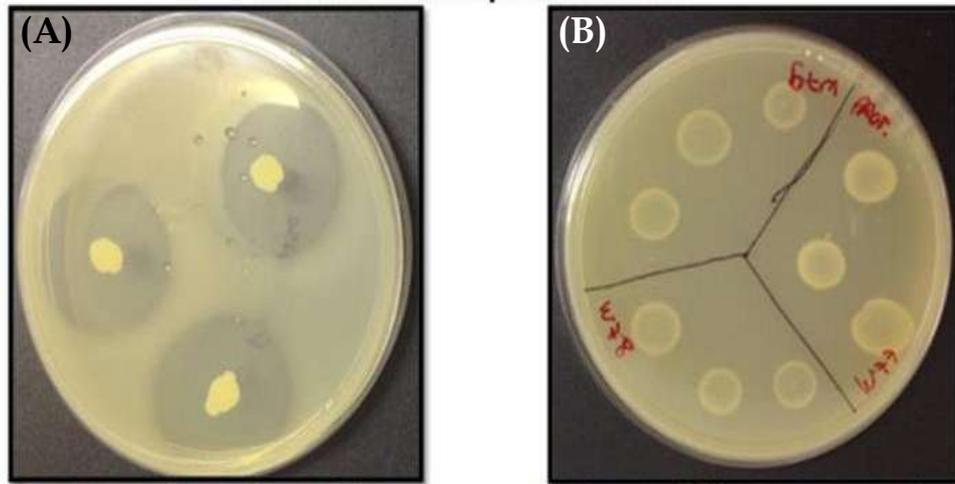


Figura 22 Produção da enzima protease por isolado utilizado como controle positivo, com formação de halo indicando atividade proteolítica (A); isolados testados nesse trabalho, apresentando resultado negativo para produção dessa enzima (B).

Bactérias do gênero *Burkholderia* já foram relatadas como capazes de produzir proteases, como demonstrado por IKEDA; TOYOTA e KIMURA (1998), trabalhando com a espécie *B. picketti*. Segundo NORNBORG (2009), essa característica é comum para a espécie patogênica *B. cepacia*. MARTINS (2007) também mostrou que *Pseudomonas* spp. produzem proteases. Outros trabalhos apontam que para a produção de protease microbiana a composição do meio de cultura e a concentração de seus componentes têm que ser otimizadas de acordo com o micro-organismo utilizado (LADEIRA, 2010). É possível que as condições utilizadas nesse trabalho não tenham sido as ideais para evidenciar a produção desta enzima.

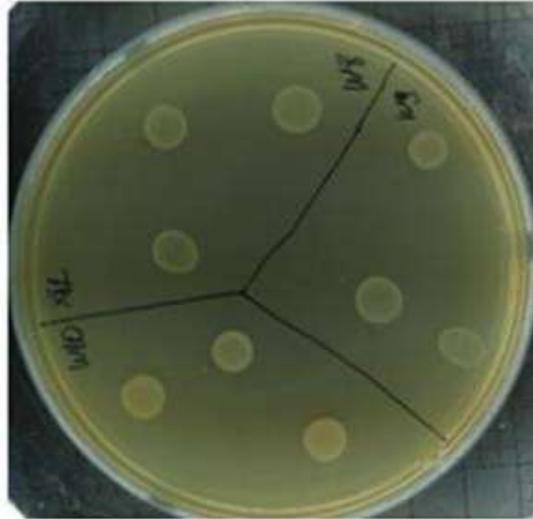


Figura 23 Isolados testados nesse trabalho apresentando resultado negativo para produção da enzima xilanase, com ausência de halos de degradação.

MOHANA et al. (2008) estudaram a produção da enzima xilanase em estado sólido, durante fermentação, por isolados de *Burkholderia* sp. Estes autores verificam que a xilanase pode ser produzida por essas bactérias na presença de substâncias indutoras. HONG XU et al. (2005) também evidenciam a produção dessa enzima por *Pseudomonas* spp. Esses exemplos são interessantes, e o primeiro pode indicar que, apesar de nossos dados apresentarem resultados negativos, com a alteração do meio e utilização de indutores como fontes de carbono provenientes de resíduos, incluindo os agroindustriais, é possível chegar a resultados contrastantes para essas enzimas.

Em relação à enzima celulase, foi possível a visualização de formação de halos de degradação produzidos por todos os isolados estudados, não havendo variação no seu tamanho, sugerindo que há uma capacidade similar de produção desta enzima entre os isolados (Figura 24).



Figura 24 Produção da enzima celulase. 100% dos isolados apresentaram resultado positivo, com a formação de halo de degradação amarelo ao redor da colônia.

LIANG et al. (2014) mostraram a produção de enzimas celulases por diferentes isolados bacterianos provenientes de solos na China, entre estes encontrava-se *Burkholderia sp.* Além disso, isolados de *Pseudomonas sp.* obtidos de solos de diferentes áreas, também já foram caracterizadas como capazes de produzir essas enzimas (ABDUL-KADHIM ; JARALLAH, 2013).

Todos os isolados também produziram pectinase, porém, 13% deles apresentaram um halo de degradação maior que o restante (Figuras 25 A e B). A origem desses isolados, não se correlacionou com a produção dessa enzima. Como nesse trabalho o objetivo é apenas o de caracterização desses isolados, as diferenças de produção observadas para essa enzima não serão discutidas.

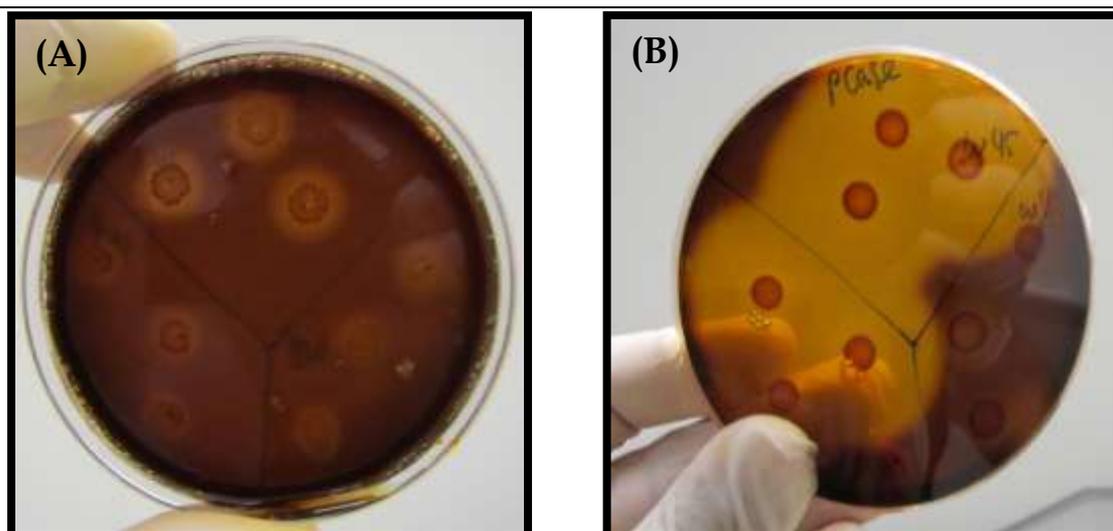


Figura 25 Produção de pectinases. Halo de degradação característico para 87% dos isolados avaliados (A); 13% dos isolados apresentaram maior produção de pectinases, com a formação de maiores halos de degradação ao redor das colônias (B).

IKEDA (2014), ao caracterizar bactérias com ação de promoção de crescimento em plantas de milho, obteve resultados positivos para a produção da enzima pectinase por diversos isolados, incluindo *Burkholderia* spp. Com relação à *Pseudomonas*, BERNARDES et al. (2010) avaliaram isolados do grupo fluorescente e somente um apresentou tal capacidade. No estudo de PANDYA; NARESHKUMAR e RAJKUMAR (2013), os isolados de nódulos da leguminosa *Vigna radiata*, pertencentes à *Pseudomonas fluorescens*, não foram capazes de produzir pectinase e celulase *in vitro*. Esses autores informam que a incapacidade dessas bactérias de colonizar endofiticamente as raízes das plantas por eles estudadas pode ser devido a ausência da produção dessas enzimas. Tal relação não foi verificada no presente estudo, onde todos os isolados identificados como *Pseudomonas* foram capazes de produzir pectinases.

Assim como para as enzimas celulase e pectinase, foi possível visualizar halos de degradação formados por todos os isolados em meio com substrato para lipase (Figura 26). Para essa enzima, não houve variação no tamanho dos halos, indicando que os isolados, provavelmente, produzem quantidade de lipase similar entre eles.



Figura 26 Produção de lipase. 100% dos isolados apresentaram resultado positivo, com a formação de um halo de degradação ao redor da colônia.

Assim como no presente estudo, a produção de lipases também foi verificada por BUENO et al. (2014). Esses autores obtiveram resultados positivos para *Burkholderia* sp., *Bacillus* sp., *Penicillium lanosum* e *Corynebacterium glutamyl* e chamam atenção para a espécie identificada como *Burkholderia cepacia*, tida como promissora para a produção dessas enzimas. Outras espécies pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, também são apontadas como produtoras de lipases (CARVALHO et al., 2003; MARTINS, 2007).

São inúmeros os exemplos de aplicações biotecnológicas dessas enzimas, entres estes, é possível citar a utilização das celulases pela indústria têxtil, para amaciamento e renovação de tecidos. Essas enzimas atuam degradando as fibras da superfície do tecido, compostas basicamente por celulose. As celulases são utilizadas também na indústria de bebidas para a produção de sucos de frutas e nos processos de vinificação. Também facilitam a extração de sucos e a maceração para produção de néctares de frutas, por romperem a rede de celulose que ajuda reter o líquido nas células vegetais (MENGUER, 2002).

As pectinases, por sua vez, são enzimas muito utilizadas nas indústrias de sucos de frutas para reduzir viscosidade, melhorar e aumentar a eficiência de

filtração e de clarificação; no tratamento preliminar da uva em indústrias vinícolas; na maceração, liquefação e extração de tecidos vegetais; na fermentação de chá, café e cacau; para melhorar a extração de óleos vegetais; na extração de polpa de tomate e no tratamento e de gomagem de fibras naturais para as indústrias têxteis e de papel (RIBEIRO et al., 2010; UENOJO; PASTORE 2006).

As lipases, por serem enzimas que atuam sobre óleos e gorduras, ou seja, lipídios têm atualmente grande aplicação na indústria de detergentes, que formulam cada vez mais combinações de produtos com outras enzimas, como as proteases, para remoção de manchas de gordura diversas (DE CASTRO, 2004). As lipases ainda podem ser utilizadas na indústria alimentícia e têxtil, na produção de papel, no tratamento de efluentes entre outras aplicações (JAEGER; REETZ, 1998).

Com as informações citadas acima, pode-se considerar que, caso haja interesse, os resultados desse trabalho podem ser utilizados como um ponto de partida para estudos visando aplicações biotecnológicas dos organismos aqui caracterizados.

Os isolados avaliados apresentaram comportamento idêntico quanto à capacidade para a produção das enzimas verificadas nesse estudo. Portanto, para fins de avaliação de diversidade, de maneira geral, essas observações não agregaram informações significativas. Para se avaliar possíveis diferenças entre os isolados, foi construído um segundo dendograma, com os resultados das caracterizações dos isolados para seis enzimas, celulase, urease, protease, pectinase, xilanase e lipase. Como a capacidade de produção de enzimas não foi diferenciada entre os isolados, não houve modificação significativa (Figura 27). Observou-se um aumento de similaridade entre os grupos 1 e 2, que agora passaram a ser separados ao nível de 67%, sem alterações na topologia do dendrograma.

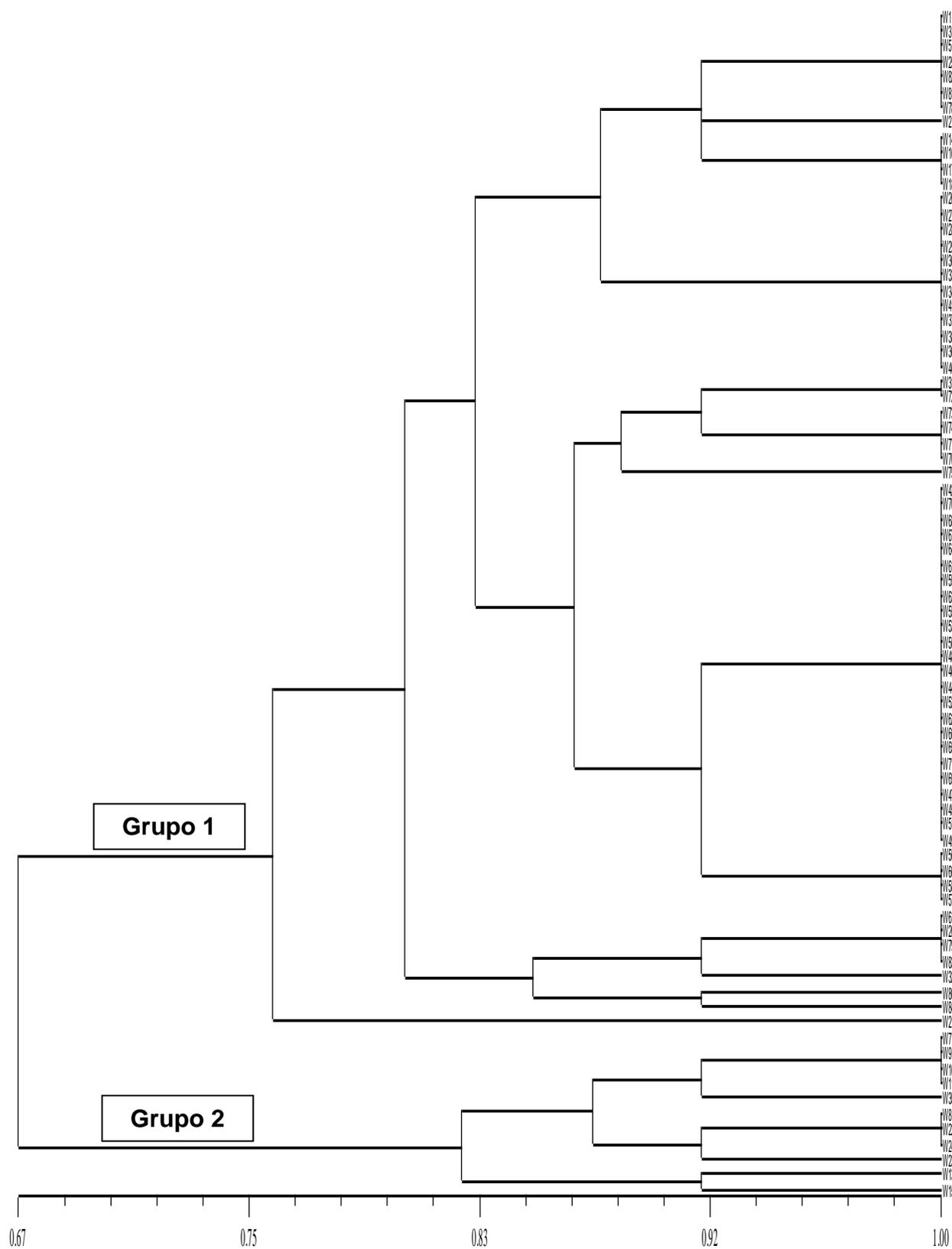


Figura 27 Dendrograma de similaridade entre isolados de nódulos de *Mimoso* spp, provenientes de solos ultramáficos de Barro Alto (GO), gerado pelo algoritmo UPGMA e matriz de similaridade calculada pelo índice *Simple matching*, a partir dos dados de morfologia de colônias em meio YMA e produção de enzimas.

5 CONCLUSÕES

- a) A nodulação é um caráter comum nas espécies de *Mimosa somnians* e *Mimosa clausenii* em solos ultramáficos de Barro Alto – GO.
 - b) *Burkholderia* spp. é o simbionte principal de *M. somnians* e *M. clausenii* em solos ultramáficos de Barro Alto – GO.
 - c) Bactérias do gênero *Pseudomonas* podem ser isoladas de nódulos de *M. somnians* e *M. clausenii* de solos ultramáficos de Barro Alto - GO, embora seu caráter simbiótico ainda não tenha sido comprovado.
 - d) Isolados de *Burkholderia* spp. e *Pseudomonas* spp., provenientes de nódulos de *M. somnians* e *M. clausenii* de solos ultramáficos de Barro Alto – GO, são capazes de produzir AIA em quantidades variáveis. A solubilização de fosfato é característica comum aos isolados pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, porém, poucos isolados de *Burkholderia* spp. apresentaram essa capacidade. A produção de sideróforos também é comum para *Pseudomonas*, enquanto é estirpe dependente em *Burkholderia*. Nenhum isolado de nódulos de *M. somnians* e *M. clausenii* pode ser considerado Ni tolerante.
 - e) Os isolados de nódulos de *M. somnians* e *M. clausenii* de solos ultramáficos de Barro Alto - GO são capazes de produzir enzimas lipases, pectinases e celulasas. No entanto, não produzem proteases, urease e xilanase.
 - f) A maioria dos isolados de nódulos de *M. somnians* e *M. clausenii* de solos ultramáficos de Barro Alto – GO, identificados como *Burkholderia* spp., apresentam capacidade de nodular *M. pudica* e todos os isolados testados nodularam com *Phaseolus vulgaris*, embora sem mostrar eficiência. Por outro lado, *Pseudomonas* spp. não apresentam essa capacidade.
-

-
- g) Todos os isolados de nódulos de *M. somnians* e *M. clausenii* de solos ultramáficos de Barro Alto – GO, identificados como *Burkholderia* spp., apresentam os genes simbióticos *nifH* e *nodC*. Apesar desses genes terem sido encontrados também em alguns isolados de *Pseudomonas*, esse não é um caráter comum dentro desse gênero.
-

6 REFERÊNCIAS

ABDUL-KADHIM, A.A; JARALLAH, E.M. Screening of cellulase activity produced from *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Babylon University/Pure and Applied Sciences**, v.21, n.3, 2013.

ABOU-SHANAB, R.A.I; ANGLE, J; CHANEY, R. Bacterial inoculants affecting nickel uptake by *Alyssum murale* from low, moderate and high Ni soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.38, p.2882-2889, 2006.

ABOU-SHANAB, R. A. I. et al. Characterization of Ni-resistant bacteria in the rhizosphere of the hyperaccumulator *Alyssum murale* by 16S rRNA gene sequence analysis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.26, p.101-108, 2009.

AHMAD, F; AHMAD, I; KAN, M.S. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and Fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. **Turkish Journal of Biology**, v.29, p.29-34, 2005.

AMANN, R. I; LUDWIG, W; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 143–169, 1995.

AMANN, R; LUDWING, W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **Microbiology Reviews**, v. 24, p. 555-565, 2000.

ANDAM, C.P. et al. Monophyly of nodA and nifH genes across Texan and Costa Rican populations of *Cupriavidus* nodule symbionts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p. 4686–4690, 2007.

ANDRADE, L.F. **Bactérias endofíticas de bananeira “Prata-Anã: fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato de cálcio e produção de ácido indol-3-acético**. 2012. 67 f. Dissertação (Mestrado em Produção vegetal no semi-árido). Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais, 2012.

ANDRADE, L.R.M. Diversidade vegetal, disponibilidade de metais e organismos do solo: Ferramentas para a recuperação de áreas sob mineração de níquel nos

complexos ultramáficos de Barro alto, GO. **Relatório Técnico Parcial**, Planaltina, Embrapa Cerrados, p.61, 2011.

ANGUS, A.A. et al. Nodulation and effective nitrogen fixation of *Macroptilium atropurpureum* (siratiro) by *Burkholderia tuberum*, a nodulating and plant growth promoting beta-proteobacterium, are influenced by environmental factors. **Plant Soils**, v.369, p.543-562, 2013.

ANTIĆ-MLADENOVIĆ, S. et al. Impact of controlled redox conditions on nickel in a serpentine soil. **Journal of Soils and Sediments**, v.11, p.406-415, 2011. ANUPA, N; ASHA, A. J; SANJEEV, K. S. Production and characterization of siderophores and its application in arsenic removal from contaminated soil. **Water Air & Soil Pollution**, v.180, p.199–212, 2007.

ARRUDA , L.M. **Seleção e caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de milho cultivadas no Rio Grande do Sul**. 2012. 58f. Dissertação (Mestrado em genética e biologia molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2012.

BACH, H.J.; MUNCH, J.C. Identification of bacterial sources of soil peptidases. **Biology and Fertility of Soils**, v.31, p. 219–224, 2000.

BAKER, A.J.M; BROOKS, R.R. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metal elements: A review of their distribution, ecology, and phytochemistry. **Biorecovery**, v.1, p.81-126, 1989.

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

BARBOSA, O.I. et al. Geology, airborne geophysics, geomorphology and soils in the individualization of the Niquelândia mafic-ultramafic complex, Goiás State, Brazil. **Revista Brasileira de Geofísica**, v.31, p.463-481, 2013.

BARRAQUIO, W. L; LADHA, J. K; WATANABE, I. Isolation and identification of N₂-fixing *Pseudomonas* associated with wetland Rice. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29, n.8, p.867-873, 1983.

BARRET, C. F; PARKER, M.A. Prevalence of *Burkholderia sp.* nodulesymbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama. **Systematic and Applied Microbiology**, v.28,p. 57–65, 2005.

BARRET, C. F; PARKER, M.A. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium sp.* nodule bacteria on two *Mimosa spp.* in Costa Rica. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.1198–1206, 2006.

BARRY, S.M; CHALLIS, G.L. Recent advances in siderophore biosynthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.13, p.205-215, 2009.

BENHIZIA, Y. et al. Gamma Proteobacteria Can Nodulate Legumes of the Genus *Hedysarum*. **Systematic Applied Microbiology**, v.27, p.462–468, 2004.

BENITE, C.M.A; MACHADO,SÉRGIO DE PAULA. Sideróforos: “Uma resposta dos micro-organismos”. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1155-1164, 2002.

BERGAMASCHI, V. et al. Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de sorgo forrageiro. **Ciências Rural**, Santa Maria, v. 37, n.3, p.727-733, 2007.

BERNARDES, F.S. et al. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias em cultivos hidropônicos. **Summa Phytopathologica**, v.36, p.115-121, 2010.

BLANCO, A; PASTOR, F. I. J. Characterization of cellulase-free xylanases from the newly isolated *Bacillus sp.* strain BP-23. **Canadian Journal of Microbiology**, v.39, p.1162–1166,1993.

BONTEMPS, C. et al. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes: **Molecular Ecology**, v.19, p. 44-52, 2010.

BOURNAUD, C. et al. *Burkholderia* Species Are the Most Common and Preferred Nodulating Symbionts of the Piptadenia Group (Tribe Mimoseae). **Plos One**, v.8, p.1-13, 2013.

BRASILAGRO. 2008. **Inoculante reduz uso de nitrogênio no canavial**. Disponível em: <<http://www.brasilagro.com.br/index.php?noticias/detalhes/12/5283>> Acesso em: 03/04/2014.

BROOKS, R. R; REEVES, R. D; BAKER, A. J. M. The serpentine vegetation of Goias state, Brazil. In: A. J. M. Baker, J. Proctor and R. D. Reeves (eds). **The vegetation of ultramafic (serpentine) soils**, Andover, U.K.: Intercept, p. 67-81, 1992.

BRUNO, W.J. et al. Weighted Neighbor Joining: A Likelihood-Based Approach to Distance-Based Phylogeny Reconstruction. **Molecular Biology Evolution**, v.17, p.189-197, 2000.

BUENO, M.R.P. et al. Selection and optimization of extracellular lipase production using agro-industrial waste. **African Journal of Biotechnology**, v.13, n.4, p.566-573, 2014.

BURITY, A.H. et al. Efetividade da inoculação com rizóbios e fungos micorrízicos arbusculares em mudas de sabiá submetidas a diferentes níveis de fósforo. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 4, p. 801-807, 2000.

BUTTE, A.J; DZAU, V. J; GLUECK, S.B. Further defining housekeeping, or “maintenance”, genes focus on “A compendium of gene expression”. **Physiological genomics**, v.7, p.95-96, 2001.

CABALLERO-MELLADO, J. et al. *Burkholderia unamae* sp. nov., na N₂- fixing rhizospheric and endophytic espécies. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.1165-1172, 2004.

CAO, J; ZHENG, L; CHEN, S. Screening of pectinase producer from alkalophilic bacteria and study on its potential application in degumming of ramie. **Enzyme and Microbial Technology**, v.14, p.1013–1016,1992.

CARDER, J.H. Detection and quantification of cellulase by congo red staining of sunstrates in a cup-plate difussion assay. **Analytical Biochemistry**, v.153, p. 75-79, 1986.

CARNEIRO, A.F.G.C. **Estabilização de enzimas para modificação de fibras sintéticas**. 2003. 85p. Dissertação (Mestrado em Tecnologias de Fabricação). Universidade do Minho, Portugal, 2003.

CARVALHO, A.L.V. et al. Application of ^{15}N natural abundance technique for evaluating biological nitrogen fixation in oil palm ecotypes at nursery stage in pot experiments and at mature plantation sites. **Plant Soil**, v.302, p.71-78, 2008.

CARVALHO, P. O. et al. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados. **Química Nova**, v.26, p.75-80, 2003.

CASTRO-GONZÁLEZ, R. et al. High diversity of culturable *Burkholderia* species associated with sugarcane. **Plant Soil**, v.345, p.155-169, 2011.

CHAGAS, Jr. et al. Produção de ácido indolacético por rizóbios isolados de Caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, n.6, p. 812-817, 2009.

CHEN, W. M. et al. Beta-Rhizobia from *Mimosa pigra*, a newly discovered invasive plant in Taiwan. **New Phytologist**, v.168, p. 661–675, 2005b.

CHEN, W. M. et al. Nodulation of *Mimosa spp.* by the beta-proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, p. 1051-1061, 2003.

CHEN, W. M. et al. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 5, p. 1729-1735, 2001.

CHEN, W. M. et al. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa*-nodulating strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p. 7461-7471, 2005a.

CHEN, W.M. et al. *Burkholderia nodosa* sp. Nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.1055–1059, 2007.

COATTI, G.C. et al. Produção de AIA e diversidade fenotípica de estirpes elite de Rizóbio isoladas de feijoeiro. **UNOPAR Científica, Ciências Biológicas e da Saúde**, Matos-MA. v.12, p. 49-53. 2010.

COLE, J.R. et al. Ribosomal Database Project: Data and Tools for High Through put rRNA Analysis. **Nucleic Acids Research**, v.4, p.33-42, 2014.

COLLINS, C.H.; LYNE, P.M. **Microbiological methods**, 5th ed. London, Butterworths, 1985.

COLLINS, T; GERDAY, C; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 3-23, 2005.

COMPANT, S. et al. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. In the natural environment. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Review**, v.32, p.607-626, 2008.

CORNELIS, P; DINGEMANS, J. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. **Celular and Infection Microbiology**, v.3, 2013.

CORRÊA, V.F. 2010. 39f. **Estudo do comportamento do Ni em rochas ultramáficas de corpos portadores de garnierita, Liberdade, MG**. Monografia apresentada como pré-requisito para conclusão de curso de graduação em Geologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2010.

COSTA, E. M. **Potencial de promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi em solos do sudoeste piauiense**. 2013. 150f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo). Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2013.

DA SILVA, K. et al. Diazotrophic *Burkholderia species* isolated from the Amazon region exhibit phenotypical, functional and genetic diversity. **Systematic Applied Microbiology**, v. 35, p. 253-62, 2012.

DE CASTRO, H.F. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v.27, n.1, p.146-156, 2004.

DENTON, B. Advances in phytoremediation of heavy metals using plant growth promoting bacteria and fungi MMG 445. **Basic Biotechnology**, v.3, p.1–5, 2007.

DE FARIA, S. M; DE LIMA, H.C. Additional studies of the nodulation status of legume species in Brazil. **Plant and Soil**, v. 200, p. 185-192, 1998.

DE FARIA, S.M, E.F. CAMPELLO, D.F. XAVIER e RM. BODDEY. **Multi-purpose fast-growing legume trees for smallholders in the tropics and sub-tropics: firewood, fencing and fodder.** In Comunicado Técnico. Embrapa Agrobiologia, Seropédica, 2010. Disponível em: <http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/cot127.pdf>. Acesso em: 03/04/2014.

DENTON, B. Advances in phytoremediation of heavy metals using plant growth promoting bacteria and fungi MMG 445. **Basic Biotechnology**, v.3, p.1–5, 2007.

DÖBEREINER, J. Efeito da inoculação de sementeiras de sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia*) no estabelecimento e desenvolvimento das mudas no campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.2, p.301–305, 1967.

DUFF, R.B; WEBLEY, D.M; SCOTT, R.O. Solubilization of minerals and related materials by 2-ketogluconic acidproducing bacteria. **Soil Science**, v.95, p.105-114, 1963.

FEDRIZZI, S.M.G. **Potencial de metabólitos antimicrobianos e sideróforos de isolados provenientes de terra preta antropogênica da Amazônia Ocidental.** 2006. 117f. Tese (doutorado em Ciências), Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba-Sp, 2006.

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

FERREIRA, A.D.P. et al. Eficiência simbiótica de estirpes de *Cupriavidus necator* tolerantes a zinco, cádmio, cobre e chumbo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 85-95, 2012.

FRANCO, A.A; DE FARIA, S.M. The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 29, p. 897-903, 1997.

GALVÃO. P.G. et al. **Interação entre plantas e bactérias promotoras do crescimento vegetal.** Embrapa Agrobiologia. Documentos, 270,2010.

GAO, T. et al. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2: **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 116-121, 2010.

GIRAUD, E. et al. Legumes symbioses : absence of Nod genes in photosynthetic *Bradyrhizobia*. **Science**, v.316, p.1307-1312, 2007.

GOMES, S.A. et al. A nova ciência da metagenômica: revelando os segredos do planeta microbiano. **Boletim Informativo da SBCS**, p.20-22, 2009.

GONIN, M. et al. Rhizosphere bacteria os *Costularia* spp. from ultramafic soils in New Caledonia: diversity, tolerance to extreme edaphic conditions, and role in plant growth and mineral nutrition. **Canadian Journal of Microbiology**, v.59, p.164-174, 2013.

GUIMARÃES, A.A. et al. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the Western Amazon by using Cowpea as the trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, p.6726-6733, 2012.

GURUNG, N. et al. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. **Biomed Research International**, p.18. 2013.

GYANESHWAR, P. et al. Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects: **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, p. 1276-1288, 2011.

HARRIS, A.D; RAMALINGAM,C. Xylanases and its application in food industry; a review. **Journal of Experimental Sciences**, v. 1, p. 01-11, 2010.

HEAD, I.M; SAUNDER, J.R; PICKUP,R.W. Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Molecular Microbial Ecology**, v. 35, p.1–21, 1998.

HONG-XU, Z. et al. Production of alkali-tolerant cellulose-free xylanase by *Pseudomonas* sp. WLUN024 with wheat bran as the main substrate. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.575–581, 2005.

HOUDE, A; KADEMI, A; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications: on overview. **Applied Biochemistry and biotechnology**, v. 118, p. 155-170. 2004.

HUNGRIA, M; ARAÚJO, R.S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa, 1994.

IKEDA, A.C. **Bioprospecção e identificação de bactérias isoladas de raízes de milho (*Zea mays* L.) para promoção de crescimento vegetal e controle biológico**. 2014. 94 f. Tese (doutorado em genética), Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR, 2014.

IKEDA, K; TOYOTA, K; KIMURA, M. Role of extracellular pectinases in the rhizoplane competence of a rhizobacterium *Burkholderia pickettii* MSP3RIF. **Soil Biology Biochemistry**, v.30, p.323- 329, 1998.

ILLMER, P; BARBATO, A; SCHINNER, F. Solubilization of hardly-soluble AIPO₄ with P-solubilizing microorganisms. **Soil Biology and Biochemistry**, v.27, p.265-270, 1995.

INUI, N. R. **Isolamento e identificação de bactérias solubilizadoras de fósforo e produtoras de auxinas em solo com cana-de-açúcar**. 2009. 90 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2009.

INUI-KISHI, R.N. et al. Phosphorus solubilizing and AIA production activities in plant growth promoting rhizobacteria from Brazilian soils under sugarcane cultivation. **Asian Research Publishing Network- Journal of Engineering and Applied Sciences**. v.7, n.11, p.1446-1454, 2012.

JAEGER, K.E; REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v.16, p.396-403, 1998.

JARAMILLO, P.M.D. **Produção, caracterização e aplicação biotecnológica de pectinase produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* cultivado em casa de maracujá-amarelo**. 2014. 165 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular). Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2014.

JENSEN, M.H; COLLINS, W.L. Hydroponic vegetable production. In: JANICK, J., ed. **Horticultural Reviews**, Westport, Connecticut, USA, The AVI Publishing Company, v. 7, cap. 10, p.483-558, 1985.

JIANG, Chu-yu. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. **Chemosphere**, v.72, p.157-164, 2008.

JIANPING XU. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. **Molecular Ecology**, v.15, n.7, p.1713–1731, 2006.

KASHYAP, D.R; VOHRA, P.K; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77.p. 215-227, 2001.

KHALID, A; ARSHAD, M; ZAHIR, ZA. Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, n.3, p.473-480, 2004.

KIRK, J.L. et al. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v.58, p.169–188, 2004.

KLONOWSKA, A. et al. Biodiversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts (*Cupriavidus taiwanensis*, *Rhizobium mesoamericanum*) in New Caledonia and their adaptation to heavy metal-rich soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v.81, p.18-635, 2012.

KUMAR, V. et al. Bioremediation of petroleum hydrocarbon by using *Pseudomonas* species isolated from petroleum contaminated soil. **Oriental Journal of Chemistry**, v.30, p.1771-1776, 2014.

KUSS, A. V. et al. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.10, p.1459-1465, 2007.

LADEIRA, S.A. et al. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* SP. em fermentação submersa, otimização do

meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. **Química Nova**, v. 33, p. 324-328, 2010.

LAMMEL, D.R. et al. Diversity and symbiotic effectiveness of beta-rhizobia isolated from sub-tropical legumes of a Brazilian Araucaria Forest, **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 29, n.12, p.2335-2342, 2013.

LEHNINGER, A; COX, M; NELSON, D.L. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5.ed. Artmed, 2010.

LEWIS, G. et al. **Legumes of the world**. Kew: Royal Botanic Gardens, p. 577, 2005.

LIANG, Y.L. et al. Isolation, screening, and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of China and optimization of cellulase production by *Paenibacillus terra* ME27-1. **BioMed Research International**, p.1-14, 2014.

LIESEGANG, H. et al. Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.3, p.767-778, 1993.

LIN, T.F. et al. 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, n.7, p.957-960, 2006.

LOIRET, F.G. et al. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.504-511, 2004.

LUVIZOTTO, D.M. **Caracterização fisiológica e molecular de *Burkholderia* spp. associadas as raízes de cana-de-açúcar**. 2008. 94 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo 2008.

MADHUSUDHAN, K.N. et al. Screening of rhizobacterium, *Burkholderia* for biocontrol of bacterial pathogens of tropical tasar silkworm, *Antheraea Mylitta* D. induction of growth in silkworm host plant, *Terminalia Arjuna*. **Journal of Chemical, Biological and physical Sciences**, v.5, p.450-456, 2014-2015.

MADIGAN, M. T. et al. **Brock biology of Microorganisms**, 13 th ed, 2011.

MARCHETTI.M. et al. *Cupriavidus taiwanensis* bacteroids in *Mimosa pudica* Indeterminate nodules are not terminally differentiated: **Applied Environmental Microbiology**, v.77, p. 2161-2164, 2011.

MARCHIORO, L.E.T. **Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio**. 2005. 74 f. Dissertação (Mestrado em microbiologia parasitologia e patologia), Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR, 2005.

MARCONDES, J. et al. Efetividade na fixação biológica do nitrogênio de bactérias nativas isoladas de plantas de amendoim. **Ciência e Tecnologia: FATEC-JB**. Jaboticabal-SP. v.1, p. 21-32, 2010.

MARRA, L.M. **Solubilização de fosfatos por bactérias e sua contribuição no crescimento de leguminosas e gramíneas**. 2012. 142 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo). Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2012.

MARTINS, M.L. **Caracterização de protease e lipase de Pseudomonas fluorescens e quórum sensing em bactérias psicotróficas isoladas de leite**. 2007. 183 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola (Universidade Federal de Viçosa-MG, 2007.

MAURER, K.H. Detergent proteases. **Current Opinion in Biotechnology**, v.15, n.4, p.330-334, 2004.

MAYER, A.M. Determination of indole acetic acid by the Salkowsky reaction. **Nature**, v.162, p.1670-1671, 1958.

MECHI, A; SANCHES, D.L. Impactos ambientais da mineração no Estado de São Paulo. **Estudos Avançados** [online]. v.24, n.68, p. 209-220, 2010.

MENDONÇA, R.C. et al. Flora Vascular do Cerrado. In: SANO, S.M. ALMEIDA, S.P. (Eds.), **Cerrado: Ambiente e Flora**. Embrapa, p.286-556, 1998.

MENGONI, A; SCHAT, H; VANGRONSVELD, J. Plants as extreme environments? Ni-resistant bacteria and ni-hyperaccumulators of serpentine flora. **Plant Soil**, v.33, p.5-16, 2010.

MENGUER, P. K. et al. Produção e caracterização de celulase para formulação de detergentes biodegradáveis. In: XIV Salão de Iniciação Científica, 14., 2002, Porto Alegre. **Livro de resumos**. Porto Alegre: UFRGS, 2002. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/65500>> Acesso em 16/02/2015.

MERCANTE, F; RUMJANEK, N; FRANCO, A. Aplicação de genes marcadores em estudos de ecologia microbiana com ênfase no sistema GUS. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.3, p.533-539, 2000.

MOBLEY, H.L; HAUSINGER, R.P. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. **Microbiological Reviews**, v. 53, n.1, p.85–108, 1989.

MOHANA, S. et al. Xylanase production by Burkholderia sp. DMAX strain under solid state fermentation using distillery spent wash. **Bioresource Technology**, v.99, p.7553–7564, 2008.

MOREIRA, F.M.S. et al. Bacterias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, p.74-99, 2010.

MOREIRA, F. S; SIQUEIRA, J. O. “**Microbiologia Bioquímica do Solo**,” 2 Ed. Editora UFLA, Lavras, MG, Brasil, 2006.

MOTA, F.L; ANDRADE, C.C.P; SANTANA, M.H.A. A review of xylanase production by fermentation of xylan: classification, characterization and applications. **InTechOpen**, v.10, p.251-275, 2013.

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

MURAD, H. A; AZZAZ, H. H. Microbial pectinases and ruminant nutrition. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 246–269, 2011.

NAJAFI, M.F; DEOBAGKAR, D. Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.8, n.2, 2005.

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

NAVES, R.L; CAMPOS, V.P; SOUZA, R.M. Filtrados de culturas bacterianas endofíticas na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis no segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.4, p.384-388, 2004.

NEILANDS, J. B. Siderophores – structure and function of microbial iron transport compounds. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p. 26723-26726, 1995.

NORNBERG, M.F.B.L. **Atividade proteolítica e produção de biofilmes por microrganismos psicotófilos em leite bovino**. 2009. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS, 2009.

OLIVEIRA, A.N. et al. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.4, p.853-860, 2006.

OLIVEIRA, C.S. **Diversidade fenotípica de rizóbios isolados de sabiá nativos de um argissolo sob diferentes coberturas vegetais**. 2011. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011.

OLIVEIRA-FRANCESQUINI, J.P. **Caracterização morfofisiológica, molecular e simbiótica de rizóbios e bactérias presentes em nódulos de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em diferentes sistemas de cultivo**. 2014. 94 f. Tese (Doutorado em genética), Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2014.

OSAKI, T. et al. Urease-positive bacteria in the stomach induce a false-positive reaction in a urea breath test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Journal of Medical Microbiology**, v.57, p.814-819, 2008.

PAES, G; BERRIN, J.G; BEAUGRAND, J. GH11 xylanases: structure/function/properties relationships and applications. **Biotechnology Advances**, v.30, p.564-592, 2012.

PAL, A. et al. Isolation and characterization of nickel-resistant microflora from serpentine soils of Andaman. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.881-886, 2004.

PALEKAR, A.A. VASUDEVAN, P.T; YAN, S. "Purification of lipase: a review," **Biocatalysis and Biotransformation**, v.18, n.3, p.177–200, 2000.

PANDEY, P; KANG, S.C; MAHESHWARI. Isolation of endophytic plant growth promoting *Burkholderia* sp. MSSP from root nodules of *Mimosa pudica*. **Current Science**, v. 89, n.1, 2005.

PANDYA, M; NARESHKUMAR, G; RAJKUMAR, S. Invasion of rhizobial infection thread by non rhizobia for colonization of *V. radiata* root nodules. **FEMS Microbiology Letters**, v.348, p.58-65, 2013.

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

PEIX, A. et al. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v.33, p.103–110, 2001.

PEREIRA, A.P.A. et al. Influência da salinidade sobre o crescimento e a produção de ácido indol acético de *Burkholderia* spp. endofíticas de cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, v.28, n.1, p.112-121, 2012.

PEREIRA, M. D. et al. Geochemical characterization of serpentinites at Cabo Ortegal, northwestern Spain. **Can Mineral**, v.46, p.317-27, 2008.

PEREIRA, P.M. **Taxonomia e diversidade genética de rizóbios microssimbiontes de distintas leguminosas com base na análise polifásica (BOX-PCR e 16S RNAr) e na metodologia de MLSA**. 2008. 100 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

PERIN, L. **Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em associação com cana-de-açúcar e descrição de *Burkholderia silvatlantica***. 2007. 105 f. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica-RJ. 2007.

PESSOA FILHO, P.C.A.M. **Metagenômica e sua aplicação no estudo de diversidade e função de microrganismos de solos do Cerrado**. p. 29, Planaltina,

DF: Embrapa Cerrados, (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111,ISSN online 2176-5081; 284). 2010.

PILLON, Y. et al. Ultramafic soils and species sorting in the flora of New Caledonia. **Journal of Ecology**, v.98, p.1108-16, 2010.

PIRES, T.C.R; FIRNADI-FILHO, F. Extraction and assay of pectic enzymes from Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). **Food Chemistry**, v. 89, p.85-92, 2005.

POLIZELI, M.L.T. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.67, p.577-591, 2005.

POOLE, R.K; GADD, G.M. **Metal-Microbe Interactions**. eds, IRL Press, Oxford, 133p, 1989.

PROSSER, J.L. et al. The role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews – Microbiology**, v. 5, p.384-392, 2007.

RADWAN, T; EL-SAYED EL-DESOK. **Improvement of quality of some crop plants by applying new concepts in biotechnology with *Azospirillum* and *Herbaspirillum spp.*** Tese (Doutorado) – Cairo University, 1999.

RAJA, E. C; SELVAM, S.G; OMINE, K. **Isolation, identification and characterization of heavy metal resistant bacteria from sewage**. In: International Joint Symposium on Geodisaster Prevention and Geoenvironment in Asia, JS - Fusoka, 2009.

RAJKUMAR, M. et al. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. **Trends in Biotechnology**, v.28, n.3, p.142- 149, 2010.

RAO, M.B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p.597-635, 1998.

REEVES, R.D. et al. Nickel hyperaccumulation in the serpentine flora of Cuba. **Annals of Botany**, v.83, p.29-38, 1999.

REEVES, R. D. et al. The flora and biogeochemistry of the ultramafics of Goiás State, Brazil. **Plant and Soil**, v. 293, p.107-119, 2007.

REINHOLD-HUREK, B; HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends in Microbiology**, v.6, p139-144, 1998.

REIS JR, F. B. et al. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria spp.* em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, n.1, p.103-113, 2004.

REIS JR, F.B. et al. “**Beta-Rizóbios**”: os novos simbiossitos encontrados em espécies de **Mimosa**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/570271/1/doc153.pdf>. Acesso em: 03/04/2014.

REIS JR, F.B. et al. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa spp.* in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. **New Phytologist**, v.186, p.934-946, 2010.

REIS, M.R. et al. Ação de herbicidas sobre micro-organismos solubilizadores de fosfato inorgânico em solo rizosférico de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v.26, n.2, p.333-341, 2008.

REIS, V.M; BALDANI, V.I.D; BALDANI, J.S. **Capítulo 10: Ecologia, Isolamento e identificação de bactérias diazotróficas**. p.260, 2006. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/biotacap10IDRgZGnAKxOz.pdf>>. Acesso em: 26/02/ 2015.

RIBEIRO, C.M. **Isolamento, seleção e caracterização de rizobactérias com potencial para promoção do crescimento em Araucaria angustifolia**. 2010. 101 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade de São Paulo. Piracicaba-SP, 2010.

RIBEIRO, D. S. et al. Enzymes in juice processing: a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v.45, p.635–641, 2010.

RIVAS, R; GARCIA-FRAILE, P; VELÁZQUEZ, E. Taxonomy of Bacteria Nodulating Legumes: **Microbiology Insights**, v.2, p.51-69, 2009.

ROCHA, G.P. **Bactérias associativas e simbiontes dos nódulos de Arachis Pintoí (Leguminosae)**. 2007. 112 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana-BA. 2007.

RODRIGUES, C.A. 2013. 51 f. **Riqueza de bactérias associadas a solos ultrmáficos em áreas do cerrado**. Monografia apresentada como pré-requisito para conclusão de curso de bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Católica de Brasília, 2013.

RODRIGUES, L.S, BALDANI, V.L.D, BALDANI,J.I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.275–284, 2006.

RODRÍGUEZ, H; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, n. 4-5, p. 319-339, 1999.

ROESCH, W.F.L. **Diversidade de bactérias diazotróficas associadas a plantas de milho cultivadas no Estado do Rio Grande do Sul**. 2007. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências do Solo). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2007.

SAAD, M. M. et al. The type 3 protein secretion system of *Cupriavidus taiwanensis* strain LMG19424 compromises symbiosis with *Leucaena leucocephala*. **Applied Environmental Microbiology**, v.78, p.7476-7479, 2012.

SANZ, L.R. **Análisis molecular de sistemas génicos implicados en la homeostasis de níquel y eficiência simbiótica em *Rhizobium leguminosarum***. 2014. 177 f. Tese (Doutorado), Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, 2014.

SARITA, Sarita. et al. Direct amplification of rhizobial nodC sequences from soil total DNA and comparison to nodC diversity of root nodule isolates. **FEMS Microbiology Ecology**, v.54, p.1-11, 2005.

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

SCHMIDT, T.M. The Maturing Of Microbial Ecology. **International Microbiology**, v.9, n.3, p. 217-223, 2006..

SCHWYN, B; NEILANDS, J.B. Universal assay for the determination of siderophores. **Analitical Biochemistry**, v.16, p.47-56, 1987.

SENA, M.W.F. 2012. 50f. **Identificação de bactérias com tolerância ao níquel em solos serpentínicos do cerrado**. Monografia apresentada como pré-requisito para conclusão de curso de bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Católica de Brasília, 2012.

SENTHIL, S; FAZILA, F; JAYALAKSHMI, S. Characterizations of urease enzyme from marine bacterium *Klebsiella* species. **African Journal of Microbiology Research**, v.6, n.30, p. 5914-5923, 2012.

SETTEN, L et al. Engineering *Pseudomonas protegens* pf-5 for nitrogen fixation and its application to improve plant growth under nitrogen-deficient conditions. **Plos one**, v.8, p.1-14, 2013.

SHARMA, R; CHISTI, Y; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipase. **Biotechnology Advances**, v.19, p.627-662, 2001.

SHARMA, T; RAI, N. Isolation of plant hormone (Indole-3-aceti-acid) producing rhizobacteria and study on their effects on tomato (*Lycopersicum esculentum*) seedling. **International Journal of PharmaTech Research**, v.7, p. 099-107, 2015.

SHEU, S. Y. et al. *Burkholderia diazotrophica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, v.63, p.435-441, 2013.

SHIRAISHI, A. et al. Nodulation in Black Locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. **Systematic Applied Microbiology**, v.33, p.269–274, 2010.

SILVA, A.C.M. **Diversidade genética, densidade populacional e potencial de promoção de crescimento de rizobactérias associadas ao cacauero**. 2007. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas-BA, 2007.

SIMON, M. F. et al. The evolutionary history of *Mimosa* (Leguminosae): toward a phylogeny of the sensitive plants. **American Journal of Botany**, v. 98, p. 1201- 21, 2011.

SIMON, M.F; AMARAL, M.F. *Mimosa splendida* Barneby (Mimosoideae, Leguminosae) rediscovered in Central Brazil: preliminary studies for conservation of a rare species. **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, p.93–96, 2003.

SIMON, M.F; HAY, J.D. Comparison of a common and rare species of *Mimosa* (Mimosaceae) in central Brazil. **Austral Ecology**, v.28, p.315–326, 2003.

SIMON, M.F; PROENÇA, C. Phytogeographic patterns of *Mimosa* (Mimosoideae, Leguminosae) in the Cerrado biome of Brazil: an indicator genus of high-altitude centers of endemism? **Biological Conservation**, v.96, p.279-296, 2000.

SIRKO, A; BRODZIK, R. Plant ureases: roles and regulation. **Acta Biochimica Polonica**, v.47, n.4, p.1189-1195, 2000.

SOMASEGARAN, P; HOBEN, H.J. **Handbook for rhizobia: methods in legume Rhizobium technology**. New York: Springer-Verlag, 1994.

SOUCHIE, E.L. et al. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.1149-1152, 2005.

SOUZA, A.F.C; ESPÓSITO, E. **Identificação de rizobactérias produtoras de sideróforos para Biorremediação da área contaminada por metais pesados na região de Santo Amaro, Bahia**, 2010. Trabalho apresentado ao XV Seminário de Iniciação Científica, Feira de Santana, Bahia, 2010.

SPAEPEN, S; VANDERLEYDEN, J; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Review**, v.31, p.425-448, 2007.

STOPPEL, R; SCHLEGEL, H.G. Nickel-resistant bacteria from anthropogenically Nickel-polluted and naturally Nickel-percolated ecosystems. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.2276–2285, 1995.

STUCKY, B.J. SeqTrace: A Graphical Tool for Rapidly Processing DNA Sequencing Chromatograms. **Journal Biomolecular Techniques**, v.23, p.90-93, 2012.

SUÁREZ-MORENO, Z.R. et al. Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated *Burkholderia*. **Microbiology Ecology**, v.63, p.249-266, 2012.

SUKUMARAN, R.K; SINGHANIA, R.R; PANDEY, A. Microbial cellulases- production, applications and challengs. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v.64, p.832-844, 2005.

SUN, L. et al. **Diversity of siderophore-producing endophytic bacteria of *Cymbidium goeringii* roots.** v.51, p.189-195, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21574379>> Acesso em: 14/02/ 2015.

SUN, Y; CHENG, Z; GLICK, B.R. The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 296, p.131–136, 2009.

TAILOR, A.J; JOSHI, B. Characterization and optimization of siderophore production from *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from sugarcane rhizosphere. **Journal of Environmental Research and Development**, v.6, n.3A, 2012.

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Ed Artmed, 5ª ed. 2013.

TALBI, C. et al. *Burkholderia phymatum* strains capable of nodulating *Phaseolus vulgaris* are present in Moroccan soils. **Applied and Enviromental Microbiology**, v.76, p.4587-4591, 2010.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology Evolution**, v.30, p.2725-2729, 2013.

TANK, N; SARAF, M. Enhancement of plant growth and decontamination of nickel-spiked soil using PGPR. **Journal of Basic Microbiology**, v.49, n.2, p.195–204, 2009.

TAULÉ, C. et al. New *betaproteobacterial Rhizobium* strains able to efficiently nodulate *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan. **Applied Environmental Microbiology**, v. 78, n.06, p.1692-700, 2012.

TEIXEIRA, M.V. et al. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnov variedades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n.1, p.43-49, 2007.

TORTORA, G. J; BERDELL R. F; CHRISTINE L. C. **Microbiologia**. 10 ed. Artmed. Porto Alegre, 2012.

TOTTEY, S. et al. **Understanding how cells allocate metal**. Microbiology Monography, ed. 6, 2007.

UENOJO, M; PASTORE, G.M. Isolamento e seleção de microrganismos pectinolíticos a partir de resíduos provenientes de agroindústrias para produção de aromas frutais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n.3, p. 509-515, 2006.

UPADHYAY, L.S.B. Urease inhibitors: A review. **Indian Journal of Biotechnology**, v.11, p. 381-388, 2012.

U.S. Geological Survey, 2015. **Mineral commodity summaries 2015: U.S. Geological Survey**, p.196. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3133/70140094>.> Acesso em: 16/02/2015.

VAN, T.V. et al. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphateacid soils of Vietnam. **Plant and Soil**, v.218, p.237-284, 2000.

VANDAME, P; COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.54, p.2285–2289, 2004.

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

VANDAMME, P; DAWYNDDT, P. Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: Past, present and future. **Systematic Applied Microbiology**, v.34, p.87-95, 2011.

VERNA, V; JOSHI, K; NAZUMDAR, B. Study of siderophore formation in nodule-forming bacterial species. **Research Journal of Chemical Sciences**, v.2, p.26-29, 2012.

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

VIDAL TORRADO, V.P. et al. Gênese de solos derivados de rochas ultramáficas serpentinizadas no sudoeste de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.30, p.523-541, 2006.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific (International Biological programme Handbook, 15), 1970.

WASI, S; JEELANI, G; AHMAD,M. Biochemical characterization of a multiple heavy metal, pesticides and phenol resistant *Pseudomonas fluorescens* strain. **Chemosphere**, v.71, p.1348–1355, 2008.

WEI, H.N; WU, B. Screening and immobilization *Burkholderia* sp. GXU% lipase for enantioselective resolution of (R, S) - Methyl Mandelate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.149, p.79-88, 2008.

WENZEL, C.L; ASHFORD, A.E; SUMMERELL, B.A. Phosphate-solubilizing bacteria associated with proteoid roots of seedlings of waratah. [*Telopea speciosissima* (Sm.) R. Br.] **New Phytologist**, v.28, p.487-496, 1994.

XAVIER, R.G. et al. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de Feijão-Caupi de diferentes nacionalidades. **Caatinga**, v.19, p.25-33, 2006.

XIE, Z. et al. Interaction between NifL and NifA in the nitrogen-fixing *Pseudomonas stutzeri* A1501. **Microbiology**, v.152, p.3535-3542, 2006.

YABUUCHI, E. et al. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the

type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov: **Microbiology Immunology**, v. 36, p. 1251-1275, 1992.

YOUNG, J.P.W; DOWNER, H.L; EARDLY, B.D. Phylogeny of the Phototrophic Rhizobium Strain BTail by Polymerase Chain Reaction-Based Sequencing of a 16S rRNA Gene Segment. **Journal of Bacteriology**, v.173, n.7, p.2271-2277, 1991.

ZAGO, V.C.P; DE-POLLI, H; RUMJANEK, N.G. *Pseudomonas fluorescentes* associadas a olerícolas sob sistema de produção orgânico. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.6, p.123-133, 2011.

ZHAO, L.F. et al. Colonization and plant growth promoting characterization of endophytic *Pseudomonas chlororaphis* strain Zong1 isolated from *Sophora alopecuroides* root nodules. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, p.629-637, 2013.

7. ANEXOS

ANEXO I-TABELA 1: Quadro geral de resultados de caracterização de isolados de *Mimosa* spp. utilizadas no trabalho. Produção de enzimas; Sideróforos; Solubilização de fosfato em diferentes meios; Tolerância a Ni; Produção de Ácido-Indol-Acético; Capacidade de nodulação; Amplificação dos genes simbióticos *nodC* e *nifH*.

Isolados	Produção Enzimas						Sideróforos	Solubilização de Fosfato			Tolerância-Ni 0,5 mM	Prod. Fitormônio AIA	Nodulação		Amplificação-genes simbióticos	
	Li	Pe	Cl	Ur	Pr	Xi		Sideróforos	YED-P	NBRIP			GL + AIPO ₄	Meio Jensein - <i>Mimosa pudica</i>	Feijão	<i>nodC</i>
W1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	N/V	+	+
W2	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+
W3	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	++	+	+	+	+
W5	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+++	-	-	-	-
W6	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	++	+	N/V	+	+
W7	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+++	+	N/V	+	+
W8	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	++	+	N/V	+	+
W9	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	++	+	N/V	+	+
W10	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
W11	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	++	-	N/V	-	-
W13	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	N/V	-	+
W14	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	++	-	N/V	+	+
W15	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+++	-	-	-	+
W16	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	++	+	N/V	+	+
W17	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	N/V	+	+
W18	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	++	+	N/V	+	+
W20	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	N/V	+	+
W21	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	N/V	+	+

Continuação...

W22	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	N/V	+	+
W23	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+++	+	N/V	+	+
W24	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+++	-	-	+	+
W25	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	N/V	+	+
W26	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	++	+	+	+	+
W27	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	++	+	N/V	+	+
W28	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	++	+	N/V	+	+
W29	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	++	-	N/V	+	+
W30	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	++	-	N/V	+	+
W31	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	++	+	+	+	+
W32	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	++	+	+	+	+
W33	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
W34	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	N/V	+	+
W35	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	++	+	N/V	+	+
W36	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+++	+	N/V	+	+
W37	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	N/V	+	+
W38	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
W40	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	N/V	+	+
W41	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
W42	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	N/V	+	+
W44	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	N/V	+	+
W45	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	+	+	+
W46	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	N/V	+	+
W47	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	++	+	+	+	+
W48	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	++	+	+	+	+
W49	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	N/V	+	+
W50	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	N/V	+	+
W51	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	N/V	+	+
W52	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	N/V	+	+
W53	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	N/V	+	+
W55	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	N/V	+	+
W56	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	N/V	+	+
W57	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	N/V	+	+
W58	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	N/V	+	+
W59	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	N/V	+	+
W60	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	N/V	+	+
W61	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	N/V	+	+
W62	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	N/V	+	+

Continuação...

W63	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	N/V	+	+
W64	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	N/V	+	+
W65	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	N/V	+	+
W66	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	N/V	+	+
W67	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	N/V	+	+
W68	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	N/V	+	+
W69	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	N/V	+	+
W70	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	N/V	+	+
W71	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	N/V	+	+
W72	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	+	+	+
W73	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	N/V	+	+
W74	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	N/V	+	+
W75	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+	N/V	+	+
W76	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+	N/V	+	+
W77	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	N/V	+	+
W78	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+	N/V	+	+
W79	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+	N/V	+	+
W80	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	+	+	+
W81	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	N/V	+	+
W82	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+	N/V	+	+
W83	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+	N/V	+	+
W84	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	+	+	+

Descrição: + (positivo para característica analisada), - (negativo para característica analisada) e N/V (não verificado). Produção de enzimas Li = lipase; Pe = Pectinase; Cl = Celulases; Pr = Protease; Xi = Xilanase).

OBS 1: Exceção para o teste de produção de auxina do tipo Ácido-Indol-Acético, onde + < 50 µM; ++ 51- 100 µM; +++ > 100 µM.