



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DANIELLE CRISTINA FERREIRA

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS EM SOLOS:
EFEITO DA ADUBAÇÃO NITROGENADA E INOCULAÇÃO
COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO EM
CANA-DE-AÇÚCAR E TRIGO**

DANIELLE CRISTINA FERREIRA

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS EM SOLOS:
EFEITO DA ADUBAÇÃO NITROGENADA E INOCULAÇÃO
COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO EM
CANA-DE-AÇÚCAR E TRIGO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F383d Ferreira, Danielle Cristina.

Diversidade de bactérias cultiváveis em solos : efeito da adubação nitrogenada e inoculação com bactérias promotoras do crescimento em cana-de-açúcar e trigo / Danielle Cristina Ferreira. – Londrina, 2013.
108 f. : il.

Orientador: André Luiz Martinez de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2013. Inclui bibliografia.

1. Microbiologia do solo – Teses. 2. Microorganismos fixadores de nitrogênio – Teses. 3. Solos – Inoculação – Teses. 4. Genética microbiana – Teses. 5. Azospirillum – Teses. I. Oliveira, André Luiz Martinez de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 631.461

DANIELLE CRISTINA FERREIRA

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS EM SOLOS:
EFEITO DA ADUBAÇÃO NITROGENADA E INOCULAÇÃO COM
BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO EM CANA-DE-
AÇÚCAR E TRIGO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr André Luiz Martinez de
Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz
Universidade Federal do Paraná – UFPR

Prof. Dra. Mariangela Hungria
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária –
EMBRAPA

Londrina, 19 de julho de 2013.

Aos meus pais Acir e Odete pelo amor incondicional, pelo apoio e compreensão para que eu possa realizar mais uma etapa na minha vida. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela constante força que me motiva a busca dos meus sonhos, pela paciência de me fazer esperar e entender que tudo chega no seu momento certo.

Aos meus pais, por todos os ensinamentos sobre a vida, todo o amor dedicado e por nunca terem me deixado desistir.

Ao meu orientador Dr. André Luiz Martinez de Oliveira, pela confiança depositada no meu trabalho, pela oportunidade e suporte para minha aprendizagem e desenvolvimento acadêmico, assim como pela orientação neste trabalho.

Aos professores Dr. Emanuel Maltempi de Souza e Dr. Leonardo Magalhães Cruz por terem me recebido no laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio e Biologia Molecular da Universidade Federal de Curitiba para a realização de parte do trabalho.

Um agradecimento mais que especial, à Karita, minha amiga-irmã, pela cumplicidade, pelas palavras de incentivo e esperança frente às minhas incertezas e “mimimis”, sendo fundamental em todos os processos da minha vida acadêmica. Nada seria igual sem você. Também não seria sem minhas irmãs de coração Raniele e Juliana, que nunca mediram esforços para estarem presentes comigo independentemente da distância. Amo vocês incondicionalmente.

Aos meus amigos de coração Flávia e Thiago pela amizade, companheirismo e incentivos indispensáveis nos momentos difíceis e pela alegria que sempre me proporcionaram. Foi muito bom ter vocês do meu lado durante esse tempo.

Agradeço também aos meus amigos de laboratório e companheiros de história Karina, Vinícius, Jaque, Dani, Felipe, em especial ao Odair por toda a cooperação e tempo dedicado para me auxiliar nos meus trabalhos no campo.

Um agradecimento mais que especial para a técnica Silvia Borba que em todas as vezes que precisei, demonstrou todo seu carinho de mãe e doando-se em um exemplo de pessoa extraordinária que é. Também não pode faltar um agradecimento ao técnico Nelson pela paciência infinita e a Sandra pelos momentos de descontração e desabafos.

Ao todos os funcionários e professores do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, onde foi desenvolvido meu trabalho. Também aos professores do Programa de Pós-graduação em Microbiologia, por todos os ensinamentos.

A todos meus colegas de Mestrado, em especial às minhas amigas Jamile e Viviane pela amizade e bom humor diante de nossos traumas de mestrandos. Aos meus amigos Ariane, Pedro, Mitiko e Cinthia que convivem com meu dia a dia, me apoiando com palavras de força e incentivo, além de me proporcionar tantos momentos de descontração.

Aos meus irmãos Cris e Júlio e também a todos meus familiares e amigos que mesmo de longe contribuíram com incentivos e orações, estando sempre presentes em todas minhas conquistas.

E às instituições que contribuíram para execução desse projeto, UEL, CNPq, INCT-FBN e Capes.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação acadêmica e realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto.”

Albert Einstein

FERREIRA, Danielle Cristina. **Bactérias culturáveis em solos agrícolas: efeitos de práticas de manejo e proposta de uma metodologia de avaliação da diversidade autóctone.** 2013. 108 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

A população bacteriana no solo apresenta-se diversa, variável e possui um papel-chave na ciclagem de nutrientes e na manutenção da fertilidade do solo. Estas populações vêm sendo exploradas para identificar novos indivíduos com potencial de uso como bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) na forma de inoculantes. O registro de novos inoculantes no Brasil é regulamentado pelo MAPA que requer, dentre outras informações, a determinação da população de bactérias diazotróficas nativas nos solos utilizados para validação das novas formulações. Este trabalho objetivou desenvolver uma metodologia padronizada para avaliar a população nativa e isolar bactérias diazotróficas autóctones em solos agrícolas, identificando e caracterizando a diversidade bacteriana culturável de solos sob cultivo de trigo e cana-de-açúcar, submetidos a diferentes práticas de manejo: níveis de adubação nitrogenada e inoculação com BPCV. O isolamento das bactérias diazotróficas presentes nos solos estudados foi realizado através do uso de meios seletivos (LGI, LGI-P, JMV, JNFb, NFB) e também o meio mínimo. A diversidade genética dos isolados foi avaliada por técnicas moleculares de BOX-PCR, MALDI-TOF e sequenciamento do gene 16S rDNA. Os resultados obtidos revelaram presença de grande número de bactérias relacionadas aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* e *Burkholderia* como componentes das populações dos solos estudados. As maiores populações de bactérias diazotróficas foram identificadas no solo da Fazenda Escola da UEL (Londrina, $\text{Log}_{10} = 5,40, 2,5 \times 10^5$ cél/g solo), associadas ao cultivo de trigo conduzido com adição de 120 kg N/ha e na ausência de inoculação. As menores populações de diazotróficos ocorreram no solo da Estação Experimental Prof. Antônio Carlos dos Santos Pessoa (Marecha Cândido Rondon, $\text{Log}_{10} = 4,87, 7,5 \times 10^4$ cél/g solo), em solo sob cultivo de trigo inoculado com *Azospirillum brasilense* AbV5 10 mL/kg e conduzido com adição de 120 kg N/ha. Do total de 183 isolados obtidos nos três solos avaliados, foi possível identificar 15 filos bacterianos, com predominância do filo *Proteobacteria* com 43,5% dos isolados. Através das análises de BOX-PCR, foi possível verificar que os solos da Fazenda Escola UEL apresentaram grande diversidade genética entre os isolados obtidos, enquanto que no solo de Marechal Cândido Rondon não foi observada uma grande diversidade devido o baixo número de isolados obtidos. As análises de diversidade realizadas através da ferramenta de MALDI-TOF confirmaram os resultados de diversidade por BOX-PCR, indicando grande diversidade entre os isolados, com poucas ocorrências de isolados clonalmente relacionados. Apesar de uma tendência de agrupamento dos isolados com base no perfil de BOX-PCR ter sido observada, estes agrupamentos não estiveram relacionados ao uso da tecnologia de inoculação com BPCV. Em conjunto, os resultados indicam a viabilidade do uso de uma metodologia normalizada para o acesso da diversidade bacteriana culturável em solos agrícolas, em especial à diversidade de diazotróficos, podendo servir de referência para os levantamentos requeridos pelo MAPA para o registro de formulações inoculantes.

Palavras-chave: Diversidade bacteriana do solo. Adubação nitrogenada. *Azospirillum*. BOX-PCR. MALDI-TOF. 16S rDNA.

FERREIRA, Danielle Cristina. **Culturable bacteria in agricultural soils: effect of agricultural practices and proposal of a methodology to evaluate the autochthonous diversity.** 2013. 108 p. Dissertation (Master Degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

The bacterial population in the soil presents diverse, variable, and has a key role in nutrient cycling and soil fertility. Such population is increasingly being prospected in a search for new strains with potential to be used as plant growth-promoting bacteria (PGPB) inoculants. In Brazil, the registration of new PGPB inoculants is regulated by MAPA, the Brazilian Ministry of Agriculture, which requirement includes the population size of native diazotrophic bacteria in soils used to validate the inoculant formulations. This study aimed to develop a standardized methodology to evaluate the indigenous diazotrophic populations in agricultural soils, identifying and characterizing the culturable bacterial diversity of soils under wheat and sugar cane cultivation, cropped under different agricultural practices: nitrogen fertilizer levels and PGPB inoculation. Diazotrophic bacteria isolations were carried out from different soil samples, using semi-solid N-free selective media (LGI, LGI-P JMV, JNFb, NFB) and a non-selective medium (minimal medium). The genetic diversity of the bacterial isolates was studied using molecular techniques such as BOX-PCR, MALDI-TOF and 16S rDNA gene sequencing. The obtained results revealed the presence of the genera *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* and *Burkholderia* as the main components of soil diazotrophic populations. The higher bacterial populations were found in the soil of the Fazenda Escola UEL (Londrina $\text{Log}_{10} = 5.40$, 2.5×10^5 cells/g soil), under wheat cropped without PGPB inoculation and using 120 kg N/ha. The lowest population was identified on the soil of the Estação Experimental Prof. Antônio Carlos dos Santos Pessoa (Marechal Cândido Rondon, $\text{Log}_{10} = 4.87$, 7.5×10^4 cells/g soil) associated to wheat plots cropped under inoculation with the PGPB *Azospirillum brasilense* AbV5 10 mL/kg and 120 kg N/ha. From the total of 183 isolates obtained on the three soils, a total of 15 phyla could be identified as well as the predominance of the *Proteobacteria* phylum representing up to 43.5% of the isolates. The BOX-PCR analysis allowed the characterization of the genetic diversity of isolates, indicating great diversity among the isolates from the soil of the Fazenda Escola UEL/Londrina, while the soil from Estação Experimental Prof. Antônio Carlos dos Santos Pessoa/Marechal Cândido Rondon showed low diversity among the few isolates obtained. MALDI-TOF analysis corroborated the BOX-PCR results, reinforcing the low number of clonal-related isolates. A tendency of grouping of isolates could be perceived, based on BOX-PCR results, although such groups were not associated to the inoculation with PGPB. An analysis of the results indicates the viability of using a standardized methodology to assess the culturable bacterial diversity in agricultural soils, particularly the diazotrophic species, which in turn can be used as reference to complete the MAPA requirements needed to register new inoculant formulations.

Keywords: Soil bacterial diversity. Nitrogen fertilization. *Azospirillum*. BOX-PCR. MALDI-TOF. 16S rDNA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Logaritmo (Log_{10}) da comunidade de bactérias diazotróficas por g de solo sob cultivo com trigo (TRIGOUUEL - Fazenda Escola da UEL, Londrina, Paraná, Brasil).....52
- Figura 2** – Logaritmo (Log_{10}) da população de bactérias diazotróficas por g de solo sob cultivo com trigo (TRIGOMAR - Estação Experimental Prof. Antonio Carlos dos Santos Pessoa, UNIOESTE – Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil).....53
- Figura 3** – Logaritmo (Log_{10}) da comunidade de bactérias heterotróficas por g de solo sob cultivo com trigo em Londrina (solo TRIGOUUEL) e Marechal Cândido Rondon (solo TRIGOMAR) e submetido a diferentes tipos de manejo para o fornecimento de nitrogênio)57
- Figura 4** – Grupos filogenéticos identificados dentre os isolados obtidos em todos os tratamentos avaliados (solos TRIGOUUEL, CANAUUEL e TRIGOMAR).....61
- Figura 5** – Dendograma de similaridade formado a partir de marcadores BOX-PCR dos isolados obtidos do solo sob cultivo com cana-de-açúcar, identificando a formação de grupos filogenéticos a 75% de similaridade, Método de agrupamento por UPGMA e coeficiente de Jaccard.....68
- Figura 6** – Dendograma de similaridade formado a partir de marcadores BOX-PCR dos isolados obtidos do solo sob cultivo de trigo (UEL), identificando a formação de grupos filogenéticos a 75% de similaridade, Método de agrupamento por UPGMA e coeficiente de Jaccard.....70
- Figura 7** – Dendograma de similaridade formado a partir de marcadores BOX-PCR dos isolados obtidos do solo sob cultivo de trigo (Marechal Cândido Rondon – PR), identificando a formação de grupos filogenéticos a 60% de similaridade, Método de agrupamento por UPGMA e coeficiente de Jaccard72
- Figura 8** – Espectros de massa MALDI-TOF obtidos de isolados de solos sob cultivos de cana e trigo73

Figura 9 – Dendograma de 33 isolados do solo CANAUUEL baseado nos espectros de massa MALDI-TOF	74
Figura 10 – Dendograma de 54 isolados do solo TRIGOUUEL baseado nos espectros de massa MALDI-TOF	76
Figura 11 – Dendograma de 9 isolados do solo TRIGOMAR baseado nos espectros de massa MALDI-TOF	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Descrição dos tratamentos de manejo nutricional do N para as amostras de solo sob cultivo com cana-de-açúcar (genótipos RB855536 e RB72454) selecionados para avaliação da diversidade bacteriana diazotrófica.....	38
Tabela 2	– Bactérias diazotróficas presentes nos inoculantes utilizados neste trabalho	39
Tabela 3	– Descrição dos tratamentos de adubação e inoculação das amostras de trigo na Fazenda Escola UEL.....	41
Tabela 4	– Descrição dos tratamentos de adubação e inoculação das amostras de trigo em Marechal Cândido Rondon.....	41
Tabela 5	– Meios de cultivo semi-sólidos seletivos livres de nitrogênio utilizados neste estudo, e respectivos gêneros de bactérias diazotróficas potencialmente selecionados.....	43
Tabela 6	– Análise química das amostras de solo utilizadas neste estudo.....	51
Tabela 7	– Populações de diazotróficos totais em solo (Log_{10}/g solo) da Fazenda Escola UEL/Londrina, sob cultivo com trigo submetido a diferentes práticas de manejo	54
Tabela 8	– Populações de diazotróficos totais em solo (Log_{10}/g solo) da Estação Experimental Prof. Antonio Carlos dos Santos Pessoa, (UNIOESTE) – Marechal Cândido Rondon, sob cultivo com trigo submetido a diferentes práticas de manejo.....	55
Tabela 9	– Número de isolados obtidos dos solos TRIGOUEL, CANAUUEL e TRIGOMAR, e respectivos meios de cultivo semi-sólidos seletivos livres de nitrogênio utilizados para o isolamento.....	59
Tabela 10	– Índice de diversidade de Shannon- Wiener obtido a partir das análises de sequenciamento do gene 16S rDNA das populações de bactérias identificadas nos solos CANAUUEL, TRIGOUEL e TRIGOMAR.....	63
Tabela 11	– Índice de diversidade de Shannon- Wiener entre os tratamentos controle dos solos CANAUUEL, TRIGOUEL e TRIGOMAR.....	64

Tabela 12 – Identificação dos padrões utilizados para comparação das análises de BOX-PCR.....	65
Tabela 13 – Codificação dos meios semi-seletivos e meio mínimo utilizada para a identificação dos isolados caracterizados nos dendogramas	66
Tabela 14 – Codificação dos tratamentos utilizada para a identificação dos isolados caracterizados nos dendogramas	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BPCV	Bactérias promotoras do crescimento vegetal
CMC	Carboximetilcelulose
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EXO I	Exonuclease I
Fe-Mo	Ferro-molibdênio
FBN	Fixação biológica do nitrogênio
MM	Meio mínimo
MO	Matéria orgânica
NMP	Número mais provável
OTU	Unidade taxonômica operacional
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PVP	Polivinilpirolidona
PH	Peso hectolítrico
TBE	Tris-EDTA ácido bórico
arb	Unidade Arbitrária

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	19
3	REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1	DIVERSIDADE MICROBIANA DO SOLO	20
3.2	BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO (FBN)	23
3.3	INOCULANTES.....	25
3.4	CULTIVOS AGRÍCOLAS: CANA-DE-AÇÚCAR E TRIGO	27
3.4.1	Cana-de-Açúcar	27
3.4.2	Trigo	29
3.5	ANÁLISE DA DIVERSIDADE.....	31
3.5.1	Técnica de BOX-PCR	32
3.5.2	Gene 16s rRNA	33
3.5.3	Espectrometria de Massa – Técnica de MALDI-TOF	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	EXPERIMENTO EM CAMPO	36
4.1.1	Experimento de Campo – Cana-de-Açúcar.....	37
4.1.2	Experimento de Campo – Trigo (UEL e Marechal Cândido Rondon- PR)	39
4.2	PREPARO DE AMOSTRAS	42
4.3	ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS.....	42
4.3.1	Isolamento de Bactérias Diazotróficas	43
4.3.2	Isolamento de Bactérias Heterotróficas - Método da Gota (Drop Plate).....	44
4.4	EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DAS AMOSTRAS.....	44
4.4.1	Amplificação do DNA Genômico Pela Técnica de Rep-PCR Utilizando o Oligonucleotídeo Iniciador BOX.....	45
4.4.2	Amplificação Gene 16S rDNA por PCR.....	46
4.4.3	Purificação dos Produtos de Amplificação	47

4.5	SEQUENCIAMENTO	47
4.5.1	Quantificação do Produto de PCR rRNA 16S e Reação de Sequenciamento	47
4.6	ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI – TOF	48
4.6.1	Preparo da Amostra	49
4.6.2	Análise das Amostras.....	49
4.6.3	Análise e Agrupamento dos Espectros.....	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1	CONTAGEM DE DIAZOTRÓFICOS, ISOLAMENTO E ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS	51
5.1.1	Contagem.....	51
5.1.2	Isolamento e Identificação Taxonômica Análise das Sequências Ribossomais 16S rDNA.....	58
5.2	ANÁLISE DOS ISOLADOS POR BOX-PCR.....	65
5.3	ANÁLISE DOS ISOLADOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF	73
6	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS.....	80
	ANEXOS	96
	ANEXO A – Solução salina	97
	ANEXO B – Meio de cultura seletivos.....	98
	ANEXO C – Meio mínimo.....	101
	ANEXO D – Meio Dygs	102
	ANEXO E – Lista dos isolados obtidos dos solos sob cultivos de cana-de-açúcar e trigo (Fazenda Escola – UEL) e trigo (Marechal Cândido Rondon)	103

1 INTRODUÇÃO

O solo é um dos maiores reservatórios de diversidade biológica do nosso planeta. Muitos processos e interações que nele ocorrem contribuem para várias participações no ecossistema, como reciclagem de elementos minerais e de carbono. Populações microbianas do solo estão imersas em um quadro de interações conhecidas por influenciar a nutrição vegetal e a qualidade do mesmo. Essas populações estão envolvidas em atividades fundamentais que asseguram a estabilidade e a produtividade, tanto nos agrossistemas, como nos ecossistemas naturais.

O estabelecimento das plantas em seus respectivos habitats envolve a sua capacidade de interagir com diferentes espécies de seres vivos. O solo é um ambiente heterogêneo que permite o desenvolvimento de grande diversidade de organismos cujo equilíbrio é afetado por fatores ambientais bióticos e abióticos. Dentre os micro-organismos, destacam-se as bactérias diazotróficas que são capazes de realizar a conversão enzimática de N_2 a formas acessíveis aos demais eucariotos. A maior parte do nitrogênio no solo vem da fixação biológica, inclusive suprimindo a alta demanda de cultivos agrícolas comerciais. A fixação biológica oferece uma fonte não poluente de nitrogênio e pode melhorar a produção de culturas, favorecendo a sustentabilidade de agrossistemas, como por exemplo, diminuir o uso de fertilizantes sintéticos. Muitas bactérias fixadoras do nitrogênio com potencial aplicação no suprimento de nutrientes em cultivos comerciais têm sido isoladas e identificadas, incluindo as do gênero *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* e *Azoarcus*. Grande parte dessas bactérias foi isolada de regiões tropicais, especialmente no Brasil. É importante detectar novas espécies de bactérias fixadoras com potencial para uso como inoculantes em plantas, em especial, não leguminosas. Da mesma forma, é necessário que seja conhecido o impacto causado pela introdução de bactérias exógenas – introduzidas como inoculantes - sobre a microbiota nativa dos solos agrícolas. Vários gêneros de bactérias têm sido descritos em associação tanto com monocotiledôneas, quanto com dicotiledôneas. Essas bactérias impulsionam as pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de formulações inoculantes para

gramíneas, como trigo, arroz, milho e cana-de-açúcar, mesmo que apenas parte de suas necessidades de nitrogênio possa ser suprida pela inoculação.

Os micro-organismos do solo estão envolvidos em vários processos bioquímicos e têm papel vital na manutenção da fertilidade do solo e na produtividade das plantas. Mudanças na diversidade e atividade desses organismos podem refletir na qualidade do solo e, conseqüentemente, na produtividade dos sistemas agrícolas, que depende dos processos funcionais das comunidades microbianas. Qualidade e degradação dos solos são fatores particularmente preocupantes em regiões tropicais, onde o manejo pode resultar em altas taxas de decomposição de matéria orgânica. Dessa forma, práticas agrícolas que visam melhorar a qualidade do solo e a sustentabilidade agrícola passaram a receber maior atenção dos pesquisadores e agricultores.

O manejo desses solos pode trazer um grande impacto sobre os processos funcionais da comunidade microbiana, sendo a matéria orgânica presente considerada componente chave na biologia do solo, estimulando a atividade biológica pelas rotações de culturas, aplicações reduzidas de nutrientes, eliminação de pesticidas, etc. O uso de insumos biológicos em substituição aos adubos químicos relaciona-se intimamente à crescente demanda da sociedade pela produção de alimentos, associando-se também à manutenção da qualidade ambiental. Para um bom funcionamento dos inoculantes microbianos introduzidos e sua influência sobre a saúde do solo, grandes esforços têm sido feitos para explorar a ecologia microbiana, de modo a revelar a diversidade da comunidade nativa, a sua distribuição e comportamento em habitats terrestres. Entretanto, pouco se conhece sobre o efeito de práticas agrícolas como o uso de fertilizantes minerais ou a utilização de inoculantes bacterianos sobre grupos específicos da comunidade bacteriana nativa do solo, como as bactérias diazotróficas. Além disso, análises da diversidade bacteriana do solo realizadas exclusivamente por técnicas moleculares, muitas vezes não fornecem informações quantitativas ou relacionadas à capacidade competitiva dos grupos identificados. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), recomenda-se determinar a população de bactérias diazotróficas nativas no solo, entretanto, não existe uma metodologia padronizada para essa determinação. A população bacteriana apresenta-se diversa, variável e dependente de características físicas e químicas do solo,

como pH, matéria orgânica, micro e macronutrientes, influenciada também pelo tipo de manejo e adubação. Frente a isso, é importante se determinar a diversidade do solo de forma qualitativa e quantitativa. Análises microbiológicas e moleculares foram utilizadas neste trabalho a fim de caracterizar a diversidade da comunidade bacteriana cultivável presente no solo sob cultivo com cana-de-açúcar e trigo, bem como verificar a influência do uso de fertilizante nitrogenado e do uso de inoculante contendo a cepa AbV5 de *Azospirillum brasilense* sobre esta diversidade. Como resultado deste estudo, é proposta a determinação da composição e população de bactérias diazotróficas em solos agrícolas, baseando-se na recomendação do MAPA para avaliar a viabilidade e eficiência agrônômica de cepas, produtos e tecnologias relacionadas à bactérias associativas.

2 OBJETIVOS

Determinar o isolamento de bactérias diazotróficas autóctones em solos agrícolas, e identificar e caracterizar a diversidade bacteriana culturável de solos sob cultivo de trigo e de cana-de-açúcar submetidos a diferentes níveis de adubação nitrogenada e inoculação.

Avaliar e comparar a diversidade genética dos isolados a partir das técnicas moleculares de BOX-PCR, de MALDI-TOF e de sequenciamento do *gene 16S rRNA*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DIVERSIDADE MICROBIANA DO SOLO

O solo é parte essencial do ecossistema terrestre. É uma matriz viva, dinâmica e fonte crítica de recursos não apenas para a produção agrícola, mas também para a manutenção de muitos processos vitais (TILAK et al., 2005).

As funções da biota do solo estão centralizadas nos processos de decomposição e ciclagem de nutrientes, sendo considerado um celeiro de atividade microbiana, embora o espaço ocupado pelos micro-organismos vivos seja estimado em menos de 5% do espaço total (TILAK et al., 2005).

A complexidade do sistema do solo é determinada por diferentes interações entre suas características físicas, químicas e biológicas, como componentes modulados pelas condições prevalentes ambientais (BUSCOT, 2005). Em particular, diversas atividades genéticas e funcionais de extensas populações microbianas têm um crítico impacto nas funções do solo, baseando-se no fato de que os micro-organismos são forças motrizes nos processos metabólicos fundamentais que envolvem atividades enzimáticas específicas (NANNIPIERI et al., 2003). Muitas interações envolvem sinais, moléculas específicas que participam de processos ambientais de extrema importância, como ciclos biogeoquímicos de nutrientes e matéria para a manutenção da qualidade da saúde do solo e da planta (BAREA et al., 2004). Um desses processos é a fixação biológica do nitrogênio atmosférico, realizada por organismos procarióticos denominados diazotróficos (MOREIRA et al., 2010).

Bactérias diazotróficas são micro-organismos que transformam o nitrogênio atmosférico em formas acessíveis aos demais organismos vivos. Esses organismos diazotróficos podem ser classificados em três grupos: bactérias de vida livre, bactérias associativas e bactérias simbiotes, que podem estabelecer interações específicas com as plantas (EVANS; BURRIS, 1992). As bactérias diazotróficas associativas ainda podem se dividir em dois sub-grupos: endofíticas facultativas, que podem colonizar tanto a rizosfera

como o interior de raízes, e epifíticas, que colonizam a superfície de tecidos vegetais (FRANCHE et al., 2009).

A microbiota do solo sofre influência direta da cobertura vegetal, principalmente pelo chamado “efeito rizosfera” (BERENDSEN et al., 2012). A rizosfera é a zona do solo ao redor da raiz que se encontra sob imediata influência do sistema radicular, sendo uma região rica em nutrientes, devido ao acúmulo de grande quantidade de compostos orgânicos que são liberados pelas raízes e utilizados como fonte de energia e carbono, caracterizando intensa atividade e crescimento microbiano (DOBELLAERE et al., 2003). Portanto, pressupõe-se que a partir do reservatório de diversidade microbiana que o solo compreende, as raízes das plantas podem selecionar micro-organismos específicos que vão atuar na rizosfera a seu favor (BERENDSEN et al., 2012) dando à mesma uma população bacteriana distinta quando comparada a camadas mais profundas do solo (HEIN et al., 2008) . Muitas bactérias do solo, em especial da rizosfera, possuem a capacidade de estimular o crescimento das plantas, podendo suprimir agentes patogênicos, afetando diretamente o metabolismo da planta. São denominadas bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV). Estas bactérias pertencem a diversos gêneros, dentre os quais encontram-se *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Achromobacter*, *Anabaena*, *Arthrobacter*, *Azoarcos*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Frankia*, *Hydrogenophaga*, *Kluyvera*, *Microcoleus*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, e *Vibrio*, além dos micro-organismos simbióticos do gênero *Rhizobium* (BASHAN; DE-BASHAN, 2005).

As BPCVs representam uma parcela funcionalmente ativa da biota do solo rizosférico, no rizoplano e no interior da planta (OLIVARES, 2009). Os grupos mais estudados pertencem aos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, que não só promovem o crescimento da planta, mas também atuam como agentes no controle biológico de várias pragas e doenças (MISKO; GERMIDA, 2002; AHMAD et al., 2006).

Azotobacter, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Pseudomonas* e *Bacillus* são espécies que podem ser consideradas BPCVs, bem como as bactérias diazotróficas endofíticas *Gluconacetobacter diazotrophicus*,

Herbaspirillum spp. e *Burkholderia*, que constituem um grupo importante de diazotróficos conhecido pelos efeitos benéficos para o crescimento das plantas (TANG et al., 1994; AHMAD et al., 2006).

O uso de BPCV tem sido importante na produção de antibióticos e outras moléculas bioativas, na aplicação nos processos de biorremediação e técnicas de transgenia. Todos esses mecanismos são aplicáveis no campo, melhorando qualitativa e quantitativamente a produção agrícola, bem como sua efetiva participação como insumo biológico a favor da produção. A sua utilização depende do conhecimento da diversidade desses micro-organismos, dos mecanismos de interação bactéria-planta e da habilidade de manter, manipular e modificar populações benéficas sob condições de campo (OLIVARES, 2009).

A introdução de bactérias exógenas pode trazer resultados diferentes, como a perturbação da microbiota nativa, interrompendo o ecossistema local de forma permanente ou transitória e, dessa forma, alterando a comunidade microbiana presente, ou pode não exercer efeito sobre a comunidade residente. A utilização de micro-organismos na agricultura requer uma avaliação dos riscos ambientais associados à introdução de organismos nativos ou não nativos em diferentes propostas. Além disso, o sucesso do estabelecimento de micro-organismos introduzidos na rizosfera depende da capacidade da bactéria colonizar as raízes e competir com a microbiota nativa. Muitos estudos têm mostrado o lado positivo dos efeitos dos inoculantes no crescimento das plantas, mas há uma escassez de conhecimento sobre seu impacto sobre a microbiota nativa do solo (HERSCHKOVITZ et al., 2006; ISLAM et al., 2009; ISLAM et al., 2010).

O papel do solo como reservatório biológico já é bem estabelecido, juntamente com o seu papel na reciclagem de nutrientes (fertilidade do solo) e no armazenamento de carbono (como um imobilizador de CO₂ atmosférico), este último processo diretamente relacionado às mudanças climáticas e produtividade da planta (PIMENTEL et al., 1997). No entanto, estudos envolvendo a quantificação da biodiversidade do solo, e os estudos de seu papel no funcionamento biológico são muito menos comuns do que os estudos semelhantes para os organismos acima do solo, em plantas

específicas. Assim, o nosso conhecimento sobre o papel da biodiversidade do solo permanece limitado (MARON et al., 2011).

3.2 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO (FBN)

Componente de quase todas as biomoléculas, o nitrogênio é essencial para toda a vida do planeta. Na agricultura, o nitrogênio é um nutriente limitante para o rendimento dos cultivos. Embora exista um grande reservatório de nitrogênio na forma gasosa, constituindo aproximadamente 78% dos gases que compõem a atmosfera, cineticamente, o N_2 não é reativo, e a maioria dos organismos é incapaz de metabolizar diretamente dessa fonte de N. Por consequência, a aquisição de formas metabolicamente ativas de nitrogênio é essencial para o crescimento e sobrevivência dos organismos (HOWARD e REES, 1996; DOBERËINER, 1997; DALLA SANTA et al., 2004). Na natureza, a incorporação do nitrogênio ao ecossistema é feita, principalmente, pelas bactérias diazotróficas (YOUNG, 1992). Essas bactérias possuem um complexo enzimático, denominado nitrogenase, necessário para converter o nitrogênio em amônia, que subseqüentemente é assimilada em proteínas e aminoácidos. Para isso, é preciso que o nitrogênio se apresente disponível em uma forma reduzida, como amônio (NH_4^+) ou nitrito (NO_2^{-1}), para que possa ser utilizado na biossíntese de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hormônios e outros compostos nitrogenados (FIGUEIREDO et al, 2008).

O complexo enzimático nitrogenase é formado por duas proteínas distintas denominadas dinitrogenase e dinitrogenase redutase. Ambas as proteínas contêm ferro, sendo que a dinitrogenase apresenta também o molibdênio. O ferro e o molibdênio da dinitrogenase estão contidos em um cofator *FeMo-co*, e a redução do N_2 ocorre nesse centro de ferro-molibdênio. O dinitrogênio é inerte devido a grande estabilidade da tripla ligação do qual é formado e, portanto, sua ativação é um processo que requer grande quantidade de energia. Seis elétrons são transferidos para reduzir N_2 a NH_3 . As três etapas seguintes de redução ocorrem diretamente na nitrogenase, sem acúmulos de intermediários livres (MADINGAN, 2010).

O nitrogênio é absorvido em grandes proporções pelas plantas, necessitando estar em altas quantidades no solo (PÖTTKER, 2000). A quantidade de N utilizada nas culturas varia de acordo com o conteúdo de matéria orgânica no solo, a cultura prevista e o cultivar utilizado (DALLA SANTA et al., 2004).

Trabalhos de Dobereiner e colaboradores (1993) constataram o aumento do rendimento dos cereais pela incorporação de nitrogênio atmosférico via FBN. Estudos mais tarde evidenciaram a FBN em culturas bastante importantes economicamente, como milho, arroz e trigo. Por meio de técnicas de diluição do isótopo ^{15}N , James (2000) demonstrou a presença de nitrogênio marcado em baixas concentrações no interior dos tecidos das plantas. Outros estudos vieram comprovar que bactérias diazotróficas fixadoras de N_2 de vida livre podem estimular o crescimento de plantas não-leguminosas como o nabo (*Brassica rapa L.*) (ANTOUN et al., 1998) e arroz (*Oryza barthii*) (MIRZA et al., 2006), reduzindo a dependência de fertilizantes nitrogenados sintéticos (BHATTACHARJEE et al., 2008). Bactérias diazotróficas fixadoras de N pertencentes a diversos gêneros, incluindo *Azoarcus* (REINHOLD-HUREK et al., 1993), *Azospirillum* (BASHAN; DE-BASHAN, 2010), *Burkholderia* (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001), *Gluconacetobacter* (FUENTES-RAMIREZ; CABALLERO-MELLADO, 2001) e *Pseudomonas* (MIRZA et al., 2006) têm sido isoladas de diferentes solos. Muitas bactérias diazotróficas são utilizadas como bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCVs). (MIRASANI, 2011). Os efeitos da introdução dessas bactérias como inoculantes são bem documentados em culturas com importância agrônômica, como o *Azospirillum brasilense* cujos trabalhos reportam aumento na produtividade de cereais de até 30% (DOBELLAERE et al., 2001). Estes efeitos são principalmente derivados de alterações morfológicas e fisiológicas nas raízes das plantas inoculadas, levando a um aumento na absorção de água e nutrientes (HERSCHKOVITZ et al., 2005). Além da FBN e do aumento do rendimento da cultura, (SASAKI et al., 2010), essas bactérias podem oferecer outros benefícios para a planta como supressão de organismos patogênicos e aumento na disponibilidade e absorção de nutrientes minerais (BENEDUZI et al., 2013).

3.3 INOCULANTES

O avanço desordenado das fronteiras agrícolas, além do não uso de sistemas de rotação de culturas e a falta de aproveitamento dos resíduos dos plantios anteriores colaboram com a exaustão das reservas de nutrientes do solo (REIS, 2007). Além disso, a utilização de fertilizantes minerais sintéticos também contribui para prejuízos ambientais. O nitrogênio é um nutriente necessário em grandes quantidades, entretanto, sua disponibilidade é um dos fatores limitantes para o crescimento das plantas, tanto em ambientes agrícolas como em ambientes naturais. Para seu melhor aproveitamento, as plantas desenvolveram diferentes estratégias para se adaptarem à baixa disponibilidade e distribuição de nitrogênio nos solos, como modulação na expressão e função de genes para captar diferentes formas de N e em concentrações variáveis, ou estabilização de associações com diversos micro-organismos para assegurar uma nutrição adequada (KRAISER et al., 2011). No entanto, quando utilizado como fertilizante nas culturas, parte é perdida por volatilização, desnitrificação e lixiviação, o que contribui com a poluição de lençóis freáticos, ou ainda formando N_2O que colabora para o efeito estufa (BRONSON et al., 1997; BUCHER; REIS, 2008). Dessa maneira, é de grande interesse a pesquisa de práticas de manejo que visam melhorar a qualidade de insumos, aumentando a eficiência de uso nas áreas de produção agrícola (REIS, 2007). Uma alternativa ao uso de fertilizante nitrogenado sintético é a utilização das bactérias fixadoras de nitrogênio. Esses micro-organismos podem ser utilizados como inoculantes ou biofertilizantes (BUCHER; REIS, 2008).

A inoculação consiste na utilização de micro-organismos vivos capazes de promover o crescimento vegetal direta ou indiretamente, por meio de diferentes mecanismos, tais como aumento da fixação de nitrogênio (BASHAN, 1998; JAMES, 2000) e produção de fitormônios como auxinas e giberelinas (DOBELLAERE et al., 2001). Portanto, a utilização de inoculantes visa aumentar a produtividade das culturas, melhorar a qualidade dos solos reduzindo o impacto ambiental e custos de produção oriundos da adubação nitrogenada (BUCHER; REIS, 2008).

Duas formas de inoculantes são comumente utilizadas nos sistemas agrícolas: inoculantes turfosos e líquidos. De acordo com Smith (1992), a turfa, além de não ser tóxica ao micro-organismo, apresenta alta capacidade de retenção de água, é de fácil esterilização e capacidade de tamponamento do pH. Consiste de um tipo de material orgânico ácido, que passa pelos processos de moagem, peneiração e correção de pH para que possa ser utilizado como veículo para inoculantes. Além disso, deve apresentar 80% de matéria orgânica, baixo teor de cloretos e ausência de areia, a fim de evitar danos nas máquinas de semeadura (CÂMARA, 1998).

O inoculante líquido consiste de um substrato aquoso estéril onde se veiculam bactérias (SCHUH, 2005). Formulações líquidas podem ter vantagens em sistemas agrícolas em pequena escala nos trópicos e entre produtores de inoculantes locais. Primeiramente, porque a maioria dos produtores de inoculantes nos trópicos não tem fácil acesso a depósitos de turfas de boa qualidade. Além disso, a mineração, secagem, moagem e neutralização da turfa requer um considerável investimento em equipamentos para produções em pequenas operações. Uma formulação de inoculante líquido caracterizada com bom desempenho no campo utiliza materiais de baixo custo e é facilmente atingível aos pequenos produtores, podendo superar esses problemas associados aos veículos sólidos. Por outro lado, há uma dificuldade em manter a sobrevivência de bactérias nas sementes, já que as bactérias não ficam tão protegidas do estresse ambiental quanto os micro-organismos presentes no inoculante turfoso (SINGLETON et al., 2002; TITTABUTR et al., 2007). Visando superar o problema, alguns substratos e aditivos já vêm sendo testados, como por exemplo, argila, carvão, fosfato de rocha, alginato, CMC (carboximetilcelulose), goma xantana, goma arábica, glicerol e PVP (polivinilpirolidona), mostrando-se promissores em ampliar a sobrevivência dessas bactérias (STEPHENS e RASK, 2000).

A eficiência da produção de inoculantes depende, dentre outros fatores, da manutenção do número mínimo de células viáveis da bactéria no inoculante, desde a sua fabricação até o uso pelo agricultor (FERREIRA et al., 2010). As formulações são produzidas no Brasil de acordo com a Lei nº 6894, de 16 de novembro de 1980, regulamentada pelo Decreto nº 4954, de Janeiro de 2004 e a qualidade certificada conforme os protocolos estabelecidos pela

rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbiológicos de interesse agrícola (MAPA, 2012). Alguns requisitos mínimos são necessários para a obtenção do registro do produto quanto ao MAPA, tais como: avaliação do produto em laboratório de acordo com métodos oficiais quando existentes; avaliação da eficiência dos ensaios conduzidos em casas de vegetação, viveiros ou campo. Além disso, os tratamentos devem sempre ser comparados à testemunha absoluta (ausência de inoculante), testemunha positiva (com 100% de nitrogênio) e quando existente, com outro inoculante registrado para o mesmo fim para verificação quanto à viabilidade e eficiência agrônômica do inoculante (ANEXO à IN SDA 13, de 25/03/2011).

3.4 CULTIVOS AGRÍCOLAS: CANA-DE-AÇÚCAR E TRIGO

3.4.1 Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea perene pertencente ao gênero *Saccharum* e família *Poaceae*. É uma cultura que produz um alto rendimento de matéria verde em curto período de tempo, além de fibras e energia, sendo considerada uma planta com grande eficiência fotossintética (ENRÍQUEZ-OBREGÓN et al., 1998).

É cultivada em mais de 110 países, sendo que 50% da produção total está concentrada no Brasil e na Índia. É uma das mais importantes culturas utilizadas como fonte para biodiesel e energia renovável. No Brasil, a cana-de-açúcar possui um papel fundamental na produção do bioetanol, utilizado como substituto dos combustíveis fósseis (FISCHER et al., 2011). A implantação do programa PROALCOOL em 1973 visou substituir uma parcela do consumo de derivados de petróleo pelo etanol. Dessa forma, a produção canavieira aumentou significativamente com a expansão da fronteira agrícola em todo o país. Na última década, a produção de etanol passou a ser de interesse mundial como biocombustível para substituir, ao menos em parte,

a gasolina, contribuindo para a redução nas emissões de carbono (MENDES, 2007).

O Brasil também possui presença no mercado internacional com a produção de aguardente derivada da cana-de-açúcar, um dos destilados mais vendidos no mundo. Apesar do grande potencial de exportação, aproximadamente 2 bilhões de litros de aguardente produzidos por ano, somente 1% deste total é exportado (NASCIMENTO et al., 1998). O setor de produção de cachaça vem desenvolvendo programas de qualidades, objetivando ampliar o mercado interno e melhorar as exportações (OLIVEIRA et al., 2012).

A posição de destaque na economia mundial insere a cana-de-açúcar em programas de melhoramento de espécies cultivadas visando à introdução de características de interesse agrônomo, dentre os quais podem ser citados: resistência a pragas e patógenos, tolerância a herbicidas e aumento no teor de sacarose (CIDADE et al., 2006).

Características de crescimento, desenvolvimento, produção e maturação estão diretamente relacionadas com o desempenho produtivo de cada variedade. No entanto, é necessário levar em consideração fatores bióticos e abióticos que atuam no ciclo de crescimento e desenvolvimento da planta como solo, clima, intervenção antrópica além de pragas e doenças (SANTOS, 2008). Neste contexto, o genótipo da cana-de-açúcar RB 72454 oferece grande potencial de produção, especialmente quando em solos de textura arenosa, apresentando características de alta produtividade agrícola e industrial, ampla adaptabilidade e boa estabilidade, média exigência em relação ao ambiente e resistência a doenças como ferrugem e escaldadura. O genótipo RB 855536 é uma variedade com alta produtividade agroindustrial em ambientes de produção favoráveis, ótima brotação de soqueira com excelente colheitabilidade. Não ocorre florescimento e possui alta exigência em relação ao ambiente, sendo resistente a uma série de doenças como carvão, ferrugem, escaldadura, entres outras (COPLANA, 2012).

As pesquisas buscam aumentar a produtividade em paralelo ao estabelecimento de práticas sustentáveis de modo a proteger o meio ambiente. Dada a grande importância dessa cultura, fatores que reduzem os custos aumentando a produção são essenciais. Dentre esses fatores está o controle

ou erradicação de agentes que possam provocar doenças à planta, como vírus, fungos ou bactérias (MAGNANI, 2005).

Na produção de uma cultura sustentável, a FBN tem substituído a utilização de fertilizantes químicos. Além disso, a identificação de bactérias fixadoras de N₂ envolvidas na produção de cana tem sido objeto de estudos para muitos trabalhos em longo prazo (TAWEENUT et al., 2011).

A FBN na cana é um processo complexo que envolve fatores relacionados ao genótipo e às bactérias associadas à planta. De acordo com Lima et al (2011), uma hipótese é que a eficiência fotossintética, as exigências nutricionais e a resistência às condições desfavoráveis são características ligadas ao genótipo que podem apresentar influências relacionadas à eficiência da FBN. Além disso, a interação planta-bactéria pode apresentar-se variável entre os genótipos da planta.

Muitas das pesquisas com cana-de-açúcar e interações com bactérias têm focado em diazotróficos, cujos principais representantes são *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp e *Azospirillum amazonense* (BALDANI et al., 1986; CAVALCANTI e DÖBEREINER, 1988; REIS JÚNIOR et al., 2000). Outras espécies de bactérias diazotróficas foram encontradas na rizosfera e colonizando tecidos internos de plantas de cana-de-açúcar (PERIN et al., 2006). Análise de amostras de solos de canaviais de diferentes regiões no Brasil levou ao isolamento de várias espécies de bactérias diazotróficas como *Beijerinckia fluminensis* (DÖBEREINER e RUSCHEL, 1958), *Beijerinckia indica* (SOUTO e DÖBEREINER, 1967), *Klebsiella* (GRACIOLLI et al., 1983), *Enterobacter* (LADHA et al., 1983), *Bacillus azotofixans* (SELDIN et al., 1984), reclassificado para *Paenibacillus azotofixans* (ASH et al., 1994) e *Azospirillum amazonense* (BALDANI et al., 1997).

3.4.2 Trigo

O trigo (*Triticum aestivum*) dentre os cereais, é o segundo em área cultivada com peso significativo na economia agrícola global (FERNANDES, 2008).

O trigo é uma gramínea anual, pertencente à família *Poaceae* (TERUEL; SMIDERLE, 1999), utilizado como uma das principais fontes de alimentação de humanos e animais. É um cereal originalmente de inverno, cultivado em regiões de clima frio, normalmente em altas latitudes (acima dos paralelos 24 norte e sul). Possui grande importância econômica no Brasil, com áreas principalmente na região sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) com 90% da produção total do país. Entretanto, sua abrangência ainda inclui os estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, São Paulo e Minas Gerais (EMBRAPA TRIGO, 2009). A produção recebe reforço sistemático de órgãos governamentais, visto que as condições climáticas são desfavoráveis à cultura nessas regiões (MAPA, 2012).

Com uma área plantada de 2.166,2 milhões de hectares em 2012, a produção nacional foi estimada de 5.788,6 milhões de toneladas de trigo. O Paraná liderou em proporção e área cultivada nos últimos 10 anos, mas apresentou uma redução significativa de 26,6%, sendo ultrapassado pelo Rio Grande do Sul na safra de 2012. Porém, o Brasil não se destaca entre os maiores produtores de trigo, sendo que a participação brasileira no total da produção mundial costuma variar de 0,5 a 1% (CONAB, 2012).

São duas espécies de trigo que possuem interesse econômico: *Triticum aestivum* L., o trigo comum, e *Triticum turgidum* var. *durum*, o trigo duro. Na moagem do trigo obtém-se em média: 76% de farinha, 23% de farelo e 1% de perdas. No Brasil, o peso hectolítrico (PH) é a principal variável de medida que determina o rendimento industrial do trigo. O PH desse grão costuma variar entre 74 e 82 e, quanto maior o PH, maior o seu rendimento industrial em farinha. A qualidade da farinha é determinada por uma série de parâmetros técnicos que variam conforme sua destinação principal (PASINATO et al., 2009). Pomeranz (1987) definiu a qualidade do trigo como resultado da interação que a planta sofre no campo pelo efeito das condições do solo, clima, incidência de pragas e doenças, manejo da cultura e cultivar, bem como das formas de colheita, secagem, armazenamento, moagem e ao uso industrial a ser dado à farinha.

Quando corretamente manejadas, a adubação e a irrigação são práticas altamente recomendadas, pois influenciam de maneira direta a produtividade e qualidade dos grãos de trigo. A água e o nitrogênio merecem

destaque não somente pelo custo que representam, mas também, pela necessidade de se utilizar tais recursos eficientemente, garantindo a obtenção de produções mais sustentáveis (BOSCHINI, 2010).

Aproximadamente 60% do total de fertilizantes nitrogenados são consumidos somente nas culturas de trigo, arroz e milho em todo o mundo (LADHA et al., 2005). Devido à grande área ocupada pelos cereais, cinco vezes maior que a das leguminosas, pesquisas com bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a essa cultura são de fundamental importância. Várias bactérias diazotróficas podem se associar a diferentes variedades de trigo. Estudos relatam que a FBN pode contribuir para a necessidade total de N no trigo; além disso, essas bactérias podem contribuir no crescimento da planta pela produção de fitormônios, solubilização de minerais como fosfato, aumento da absorção de nutrientes, maior resistência ao estresse, bem como biocontrole de patógenos (ROESCH et al., 2007; VENIERAK et al., 2011).

Muitas das bactérias já isoladas da rizosfera do trigo são *Azospirillum brasilense* (BALDANI et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2002), mas outras espécies também já foram isoladas, tais como *Pantoea agglomerans* (KLEEBERGER et al., 1983), *Arthrobacter* sp. (UPADHYAY et al., 2009), *Achromobacter xylosoxidans* (JHA e KUMAR, 2009), *Herbaspirillum hiltneri* (ROTHBALLER et al., 2006), *Stenotrophomonas maltophilia* (PARK et al., 2005), *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. (KUNDU et al., 1986), entre outras identificadas.

3.5 ANÁLISE DA DIVERSIDADE

Os micro-organismos são de fundamental importância para sustentabilidade e funcionamento de todos os ecossistemas naturais (PROSSER, 2002). A diversidade microbiana no solo excede muito a dos organismos eucarióticos. Um grama de solo pode conter mais de 10 bilhões de micro-organismos e milhares de espécies (TORSVIK e ØVREÅS, 2002). Além disso, a alta diversidade microbiana pode ser crítica para a estabilidade dos ecossistemas, por fornecer uma diversidade funcional. Mudanças na vegetação bem como práticas agrícolas intensivas têm demonstrado afetar a composição

e atividade da comunidade microbiota do solo (DENG, 2012; DING et al., 2013). A introdução de técnicas de análise de DNA presentes no ecossistema possibilitou mudanças na compreensão da diversidade microbiana (BULL et al., 2000). Metodologias baseadas na biologia molecular aplicadas ao estudo do meio ambiente têm contribuído significativamente para o avanço no conhecimento sobre a diversidade microbiana em amostras ambientais (HUGENHOLTZ e PACE 1996).

3.5.1 Técnica de BOX-PCR

A aplicação de técnicas baseadas nos ácidos nucleicos tem auxiliado o estudo da variabilidade genética microbiana, pois não dependem do estado fisiológico do micro-organismo (TORRES, 2005). Uma técnica bastante utilizada na determinação da variabilidade microbiana consiste na metodologia de BOX-PCR, a qual é utilizada principalmente onde há uma diversidade bastante elevada (DE BRUIJIN, 1992; LAGUERRE et al., 1997). O BOX-PCR amplifica regiões altamente conservadas e repetitivas (CHAPAVAL et al., 2010) e permite a diferenciação das estirpes estudadas (TONON, 2008; STROSCHEIN et al., 2010). A técnica foi utilizada por Videira et al. (2012) para analisar a diversidade genética de bactérias diazotróficas isoladas a partir de dois genótipos de capim-elefante (*Penisetum purpureum* Schum.), permitindo a identificação taxonômica da maioria dos isolados a nível de gênero, podendo inferir também algumas espécies com base no tamanho do fragmento revelando predominância de diazotróficos pertencentes ao gênero *Gluconacetobacter*. Também com a técnica BOX-PCR, Boniek et al. (2010) caracterizaram estirpes capazes de dessulfurização em amostras de solo e sedimentos da Antártica. Posteriormente, o DNA foi sequenciado para obter um perfil genômico da diversidade de bactérias dessulfurizantes cultiváveis, revelando uma predominância de micro-organismos do gênero *Acinetobacter* e *Pseudomonas*. O BOX-PCR também foi utilizado por Becerra-Castro et al. (2010) para caracterizar bactérias endofíticas e do rizoplane associadas à giesta (*Cytisus striatus*) cultivada em solo contaminado com hexaclorociclohexano (HCH).

3.5.2 Gene 16s rRNA

A caracterização taxonômica considera genes conservados e pode ser classificada por meio de marcadores moleculares. O produto do *gene 16s rRNA* é o principal componente da subunidade ribossomal menor dos procariotos (BROSIUS et al., 1978) e constitui-se de ácido ribonucleico e proteínas, participantes do maquinário celular responsável pela síntese proteica. Assim, devido à presença desse gene em todas as formas de vida celular, a análise comparativa das sequências de DNA ribossomais (rDNA) pode ser aplicada universalmente para inferir relações filogenéticas entre organismos (HEAD et al., 1998; TOLEDO et al., 2009).

As sequências de rDNA são o ponto central no estudo da evolução e ecologia de micro-organismos (FAORO, 2006), tornando-se padrão na avaliação da diversidade em amostras ambientais, na detecção e quantificação de populações específicas e na determinação de relações filogenéticas (HEAD et al., 1998). O *16S rDNA* apresenta características necessárias para um bom marcador molecular, como por exemplo distribuição universal, com estrutura e função conservadas entre os *taxa* e um tamanho que permita o aparecimento de divergências na sequência (FAORO, 2006). A análise do gene *16s rDNA* permite a obtenção de ampla informação a respeito da diversidade do ambiente analisado e também da participação de bactérias específicas dentro de uma comunidade total (GOMEZ, 2012).

A disponibilidade de uma grande quantidade de sequências do gene *16S rRNA* depositadas em banco de dados, junto à possibilidade da utilização da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou reação em cadeia da polimerase) para amplificação do *16S rDNA* de eubactérias com taxonomia diversa com pequeno número de oligonucleotídeos, tem permitido que essa informação molecular seja amplamente utilizada para o agrupamento filogenético (LUDWIG e SCHLEIFER, 1994; FAORO, 2006).

3.5.3 Espectrometria de Massa – Técnica de MALDI-TOF

A espectrometria de massa (do inglês *mass spectrometry* - MS) é uma técnica que vem sendo desenvolvida recentemente para identificação de organismos. É uma ferramenta já utilizada dentro da biologia em estudos de proteômica, caracterização de biomoléculas, entre outras. Nesse contexto, a MS passou a ser aplicada na microbiologia e, como consequência, alguns trabalhos foram realizados na identificação e classificação dos micro-organismos (CLAYDON et al., 1996; CANTÚ e CARRILHO, 2008; ASSIS et al., 2011). A MS é uma técnica que determina a relação entre massa e carga (m/z) de moléculas na forma gasosa. Basicamente, o espectrômetro de massa é um equipamento constituído por uma fonte de íons, um analisador de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados (CANTÚ e CARRILHO, 2008). A aplicabilidade de MS para análise de biomoléculas complexas foi melhorada pela introdução de duas técnicas de dessorção/ionização leve: o MALDI-TOF MS (do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*) e ESI (do inglês *electrospray ionization*). Esses dois métodos de ionização leve ionizam grandes moléculas com pouca ou nenhuma fragmentação, além de aplicados também para analisar biomoléculas como carboidratos, proteínas e peptídeos, DNA, RNA e polímeros sintéticos. Ambas técnicas são efetivamente utilizadas para análises precisas de peptídeos e na determinação de sequências peptídicas para identificar e caracterizar proteínas em micro-organismos (CANTÚ e CARRILHO, 2008; HO e REDDY, 2011).

A técnica de MALDI-TOF é considerada revolucionária na identificação de micro-organismos e apresenta a vantagem de se utilizar células intactas, podendo ser retiradas diretamente de colônias crescidas em placas de cultivo. A técnica produz um espectro de proteínas típicas de cada espécie, funcionando como uma impressão digital (*fingerprinting*), que pode ser comparada a espectros previamente identificados e depositados em banco de dados (CLAYDON et al., 1996). Além disso, O MALDI-TOF é um método rápido, preciso e que possui baixo custo para identificação e caracterização precisa micro-organismos, utilizado como forma alternativa para análises convencionais de bioquímica, aplicado em várias áreas, tais como diagnósticos clínicos, biodefesa, monitoramento ambiental e controle de qualidade ambiental

(CLAYDON et al., 1996; DEMIREV et al., 1999; CROXATTO et al., 2012). Apesar de atualmente as espécies representadas nos bancos de dados serem em sua maioria de interesse clínico, a atenção tem se voltado ao monitoramento da comunidade microbiana ambiental, por conta do interesse agrícola e da proteção do meio ambiente (FERREIRA et al., 2011; KOUBEK et al., 2012), tendo a necessidade de se ampliar os bancos de dados com espécies bacterianas com importância ambiental.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos descritos foram realizados nos laboratórios de Biologia Molecular e de Bioquímica e Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL, Londrina-PR) e nos laboratórios de Fixação Biológica de Nitrogênio e Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná (UFPR, Curitiba-PR).

4.1 EXPERIMENTO EM CAMPO

As amostras de solo de plantações de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) e trigo (*Triticum aestivum*, L.) foram coletadas na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina (23°20'23.45"S; 51°12'32.28"O, com altitude média de 580 metros, no município de Londrina, região norte do Estado do Paraná, Brasil. O clima da região é do tipo Cfa (*Köppen*); clima subtropical úmido mesotérmico, com verões quentes e geadas pouco frequentes, com tendência de concentração de chuvas no verão e sem estação seca definida. O solo é classificado como Latossolo Vermelho Eutroférico, argiloso, com declividade de 9%. A temperatura média anual é de 20,2°C, a média da temperatura máxima é de 27,0°C e a média da temperatura mínima é de 14,8°C. A umidade relativa do ar média é de 75% (IAPAR, 2007).

As amostras do segundo experimento com trigo foram coletadas na Estação Experimental Prof. Antônio Carlos dos Santos Pessoa, pertencente ao Núcleo de Estações Experimentais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Marechal Cândido Rondon - PR. O município está localizado a uma longitude de 54° 02' W, latitude 24° 33' S e altitude média de 420 metros. O clima dessa região, classificado segundo Köppen, também é tipo Cfa. O solo possui textura argilosa devido à sua origem, sendo predominantemente do tipo Latossolo Vermelho Eutroférico (EMBRAPA, 2006).

As análises químicas dos solos foram realizadas no laboratório de solos do Departamento de Agronomia na Universidade Estadual de Londrina (UEL).

4.1.1 Experimento de Campo – Cana-de-Açúcar

Foram cultivados dois genótipos de cana-de-açúcar (RB855536 e RB72454), submetidos a diferentes tratamentos de inoculação com diferentes formulações e estratégias de inoculação, na presença e ausência de adubação nitrogenada, a fim de comparar os efeitos destes tratamentos sobre a diversidade microbiana.

Antes da implementação dos ensaios, toda a área experimental recebeu adubação com K_2O e P_2O_5 conforme recomendado pela análise do solo para a cana-de-açúcar. A inoculação dos toletes foi realizada no momento do plantio, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Descrição dos tratamentos de manejo nutricional do N para as amostras de solo sob cultivo com cana-de-açúcar (genótipos RB855536 e RB72454) selecionados para avaliação da diversidade bacteriana diazotrófica

Tratamentos		Descrição	Dose N-uréia (kg ha ⁻¹)
SI-N0	Sem inoculação		0
SI-N120	Sem inoculação		120
Emb-N0	Inoculante Embrapa ¹	Imersão dos toletes por 30 minutos imediatamente antes do plantio	0
Emb-N120	Inoculante Embrapa	Imersão dos toletes por 30 minutos imediatamente antes do plantio	120
Tur-N0	Inoculante Turfal ²	Imersão dos toletes por 5 minutos imediatamente antes do plantio	0
Tur-N120	Inoculante Turfal	Imersão dos toletes por 5 minutos imediatamente antes do plantio	120
Uel-N0	Inoculante UEL ³	Pulverização sobre toletes na dose de 20 mL por metro linear	0
Uel-N120	Inoculante UEL	Pulverização sobre toletes na dose de 20 mL por metro linear	120

Fonte: A autora (2013)

Estão descritas na Tabela 2 as bactérias diazotróficas utilizadas nos inoculantes cedidos pela empresa Novozymes BioAg (Quatro-Barras – PR) e no inoculante desenvolvido no Depto. de Bioquímica e Biotecnologia da UEL. A concentração de células de bactérias nos inoculantes foi de 10⁹ células por mL de inoculante líquido ou g no inoculado em forma de turfa. Todos inoculantes foram aplicados no momento do plantio da cana-de-açúcar. Todos os fertilizantes utilizados no ensaio foram aplicados manualmente no sulco de semeadura.

Tabela 2 – Bactérias diazotróficas presentes nos inoculantes utilizados neste trabalho

Espécies	Estirpes	Inoculantes
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	BR 11281	Turfal e Embrapa
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	BR 11335	Turfal e Embrapa
<i>Herbaspirillum rubrisubaldicans</i>	BR 11508	Turfal e Embrapa
<i>Azospirillum amazonense</i>	BR 11115	Turfal e Embrapa
<i>Burkholderia tropica</i>	BR 11366	Turfal e Embrapa
<i>Azospirillum brasilense</i>	AbV5	UEL

Fonte: A autora (2013)

*Os inoculantes Turfal (formulação líquida) e Embrapa (formulação sólida) foram produzidos e cedidos pela empresa Novozymes BioAg (Quatro-Barras – PR).

**O inoculante UEL foi produzido no Laboratório de Bioquímica Molecular, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina.

O delineamento experimental ocorreu em blocos casualizados, em esquema fatorial 4x2, com 4 repetições em parcelas de 30 m² (6 linhas de 5 m), sendo 4 tratamentos de inoculação e 2 doses de N-uréia, perfazendo um total de 32 parcelas para cada genótipo de cana-de-açúcar avaliada. Para as análises de diversidade, as amostras de solo foram coletadas nas entrelinhas a uma profundidade de 0-10 cm, com uma distância mínima de 20 cm da raiz da planta, 18 meses após o plantio.

4.1.2 Experimento de Campo – Trigo (UEL e Marechal Cândido Rondon- PR)

A variedade de trigo 150 (COODETEC) foi cultivada em duas regiões (Fazenda Escola UEL – Experimento 1 e na Estação Experimental Prof. Antônio Carlos dos Santos Pessoa, Marechal Cândido Rondon – Experimento 2) sob diferentes tratamentos de manejo, relacionados à aplicação de inoculantes e doses de nitrogênio. Foram colocados 20 kg ha⁻¹ de N na semeadura, de acordo com as recomendações da Embrapa e da COODETEC e 30 kg ha⁻¹ foram aplicados em cobertura aproximadamente 40 dias após a semeadura, a fim de se evitar a alta concentração salina no solo.

Nesse experimento foram testados inoculantes utilizando duas estirpes: *Azospirillum brasilense* AbV5 e *Methylobacterium* sp. ZM, esta última isolada a partir de girassol (GOES et al., 2011). Estas bactérias foram utilizadas para a produção de formulações inoculantes líquidas, desenvolvidas no laboratório de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina. A concentração de células de bactérias nos inoculantes foi de 10^9 células por mL. Os inoculantes foram aplicados em quantidades variáveis, de acordo com cada tratamento.

As parcelas também receberam adubação de K_2O e P_2O_5 , conforme recomendado pela análise do solo. As Tabelas 3 e 4 mostram os diferentes tratamentos e aplicações de inoculantes nas culturas de trigo na Fazenda Escola UEL e Marechal Cândido Rondon, respectivamente. Foram aplicados inoculantes com formulação líquida diluídos em água de abastecimento (1,25 L em 300 L de água) contendo as bactérias correspondentes aos tratamentos.

Tabela 3 – Descrição dos tratamentos de adubação e inoculação das amostras de trigo na Fazenda Escola UEL

Tratamentos	Descrição	Dose N-ureia (kg ha ⁻¹)
SI-N0	Não inoculado	0
SI-N120	Não inoculado	80
SI-N30	Não inoculado	30
AbV5410	Pulverização 4 dias após emergência das plantas com AbV5 com 10 mL kg ⁻¹	30
AbV5430	Pulverização 4 dias após emergência das plantas com AbV5 com 30 mL kg ⁻¹	30
AbV5450	Pulverização 4 dias após emergência das plantas com AbV5 com 50 mL kg ⁻¹	30
AbV51110	Pulverização 11 dias após emergência das plantas com AbV5 com 10 mL kg ⁻¹	30
AbV51130	Pulverização 11 dias após emergência das plantas com AbV5 com 30 mL kg ⁻¹	30
AbV51150	Pulverização 11 dias após emergência das plantas com AbV5 com 50 mL kg ⁻¹	30

Fonte: A autora (2013)

Tabela 4 – Descrição dos tratamentos de adubação e inoculação das amostras de trigo em Marechal Cândido Rondon

Tratamentos	Descrição	Dose N-ureia (kg ha ⁻¹)
SI-N0	Não inoculado	0
SI-N120	Não inoculado	120
SI-N30	Não inoculado	30
AbV55	Inoculação na semente com AbV5 com 5mL kg ⁻¹	30
AbV515	Inoculação na semente com AbV5 com 15mL kg ⁻¹	30
AbV525	Inoculação na semente com AbV5 com 25mL kg ⁻¹	30
AbV535	Inoculação na semente com AbV5 com 35mL kg ⁻¹	30
AbV5ZM35	Inoculação na semente com AbV5+ZM com 35mL kg ⁻¹	30
ZM35	Inoculação na semente com ZM com 35mL kg ⁻¹	30

Fonte: A autora (2013)

*Todas as sementes foram inoculadas 12-24hs antes do plantio.

Em ambos sítios experimentais foi adotado o delineamento em blocos casualizados, com nove tratamentos e quatro repetições, totalizando 36 parcelas. As amostras de solo foram coletadas a uma profundidade de 0-10 cm com uma distância mínima de 8 cm da raiz da planta, 4 meses após a semeadura.

4.2 PREPARO DE AMOSTRAS

Após a coleta, as amostras de solo foram expostas ao ar para secagem e, posteriormente, peneiradas e armazenadas como terra fina seca ao ar (TFSA) por sete dias, até o momento das avaliações microbiológicas. Para o isolamento de diazotróficos, foram pesados 10 g de TFSA de cada tratamento e acondicionados em placas de Petri esterilizadas, com 3 repetições para cada tratamento. Em seguida, foram adicionados 2 mL de água destilada esterilizada em cada placa, de modo a manter uma umidade uniforme em 20%. As placas foram mantidas por 48 h a 28 °C para estimular a atividade microbiana nas amostras, em seguida foram utilizadas para o isolamento como descrito abaixo.

4.3 ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS

Para o isolamento dos micro-organismos, foi realizada a diluição seriada das amostras de TFSA. Amostras de 1 g de TFSA foram diluídas em 9 mL de solução salina esterilizada (diluição 10^{-1} ; ANEXO 1), e seriadamente diluída adicionando-se 1 mL da diluição 10^{-1} a tubos de ensaios contendo 9 mL de solução salina até a diluição 10^{-7} . As diluições 10^{-4} a 10^{-7} foram utilizadas para o isolamento de bactérias diazotróficas e não diazotróficas, conforme descrito a seguir.

4.3.1 Isolamento de Bactérias Diazotróficas

Foram tomados 0,1 mL das diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} de TFSA obtidas e inoculadas em triplicata em frascos contendo 5 mL dos meios de cultura semi-sólidos seletivos livres de nitrogênio (ANEXO 2), descritos na Tabela 5. Os frascos inoculados foram incubados a 28 °C por até 10 dias, e aqueles que apresentaram o desenvolvimento de uma película na região superficial do meio foram utilizados para o isolamento de bactérias diazotróficas (adaptado de DÖBEREINER et al., 1995).

Tabela 5 – Meios de cultivo semi-sólidos seletivos livres de nitrogênio utilizados neste estudo, e respectivos gêneros de bactérias diazotróficas potencialmente selecionados

Grupo Taxonômico	Meio de cultivo Semi-sólido seletivo				
	JMV	LGI	LGI-P	JNFb	NFb
<i>Azospirillum</i> spp		X			X
<i>Burkholderia</i> spp	X	X			
<i>Gluconacetobacter</i> spp			X		
<i>Herbaspirillum</i> spp				X	
<i>Sphingomonas</i> spp		X		X	

Fonte: Baldani et al., 2007

Após o crescimento, os frascos que apresentaram crescimento positivo foram repicados para novos frascos contendo 5 mL dos respectivos meios de cultura semi-sólidos seletivos livres de nitrogênio (processo repetido por duas vezes) para eliminar as bactérias sem capacidade de realizar a fixação biológica do nitrogênio. As populações de diazotróficos obtidas pelo uso de cada meio de cultivo foram determinadas pela da técnica do número mais provável (NMP), por meio da tabela de *McCrary* (DÖBEREINER et al., 1995). Ao final do processo de repicagem, os isolados considerados diazotróficos foram purificados nos respectivos meios (JMV, LGI, LGI-P, JNFb, NFb) solidificados (DÖBEREINER et al., 1995). Após a purificação, os isolados foram crescidos em meio Dygs (ANEXO 4) líquido por 24 h a 180 rpm e 30 °C, diluídos em glicerol 50% (v/v) e armazenados a -20 °C.

A avaliação da influência dos diferentes tratamentos de manejo para o suprimento de nitrogênio (inoculação com bactérias diazotróficas e adição de fertilizante mineral) na população microbiana foi submetida ao teste de comparação de médias, a fim de se identificar diferenças entre os tratamentos por meio do teste t ($p > 0,05$), com auxílio do programa estatístico SASM-AGRI (CANTERI et al., 2001).

4.3.2 Isolamento de Bactérias Heterotróficas - Método da Gota (Drop Plate)

Utilizando-se as diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} , foram inoculados 10 μL em placas contendo meio mínimo sólido (SAIT et al., 2002; ANEXO 3), com 3 repetições para cada diluição. As placas foram incubadas a 28°C por 5 dias, sendo repicadas novamente no mesmo meio para verificação da pureza. Assim como os isolados obtidos nos meios seletivos, estes também foram crescidos em Dygs e armazenados em glicerol 50% (v/v) a -20°C .

4.4 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DAS AMOSTRAS

Cada uma das estirpes isoladas, além das estirpes inoculantes apresentadas na Tabela 2, foi cultivada em 5 mL de meio Dygs por 24 horas a 28°C em agitador orbital a 180 rpm. Após o crescimento, 1 mL da cultura bacteriana foi transferido para microtubos esterilizados e precipitados por centrifugação por 5 minutos a 3070 g e 4°C . As células precipitadas foram ressuspensas em solução salina esterilizada (NaCl 0,9 % p/v) e submetidas à nova centrifugação por 10 min a 6140 g e 4°C , descartando-se o sobrenadante. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 0,5 mL de tampão CTAB (CTAB 2 %, PVP 1 %, Tris-HCl 100 mM, EDTA 25 mM, e NaCl 1,4 mM), aquecidas a 80°C por 20 min e resfriadas em seguida em banho de gelo. Foi adicionado 1 μL de RNase (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Invitrogen) e as amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora. Adicionou-se 0,5 mL de solução de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v/v) seguido de homogeneização manual e

centrifugação por 10 min a 6140 g e 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados e transferidos para novos microtubos, acrescentando-se 0,6 volumes de isopropanol. As amostras foram incubadas por 1 hora a -20 °C e posteriormente foram centrifugadas por 30 min a 8596 g e 4 °C. Descartaram-se os sobrenadantes e ao pellet foram adicionados 100 µL de NaCl 5 M e 400 µL de etanol absoluto. Os tubos foram homogeneizados por inversão e, em seguida, foram centrifugados por 10 min a 8596 g e 4 °C. As suspensões obtidas foram lavadas com etanol 70 %, secas a 60 °C e ressuspensas com 50 µL de água ultrapura esterilizada. A presença e integridade do DNA foram analisadas em gel de agarose 0,9 % por eletroforese, corado com brometo de etídeo.

4.4.1 Amplificação do DNA Genômico Pela Técnica de Rep-PCR Utilizando o Oligonucleotídeo Iniciador BOX

Para a amplificação do DNA genômico, foi utilizada a técnica de PCR, utilizando o oligonucleotídeo iniciador BOX (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'), que amplifica regiões conservadas e repetitivas do DNA cromossômico (VERSALOVIC et al., 1994). As reações foram realizadas com volume final de 50 µL contendo: 2,0 µL dNTPs (estoque com 1,5 mM de cada base) (Invitrogen); 5 µL tampão 10X (10mM Tris-HCL pH 8,3); 6 µL MgCl₂ (20 mM); 3 µL oligonucleotídeo BOX (20 pmol µL⁻¹); 1 µL DNA molde (50 ng µL⁻¹); 0,3 µL Taq DNA polimerase (5 U/µL) e 32,7 µL de H₂O ultrapura estéril. A mistura da reação foi submetida ao termociclador Life Express, BIOER.

A reação de amplificação procedeu-se com uma etapa de desnaturação inicial (94 °C, 2 min), seguida de 30 ciclos de desnaturação (94 °C, 1 min), anelamento do iniciador (50 °C, 1 min) e extensão (68 °C, 5 min). Após amplificação, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5 % (60 V por 5 h) em tampão TBE 1X (10,8 g de Tris-base, 5,5 g de ácido bórico, 4 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0, para um litro de solução). Em todas as reações foram utilizados controles positivo e negativo. Os produtos de

amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,5% em tampão TBE, sendo corados em solução de brometo de etídeo ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), visualizados e documentados em transiluminador sob luz ultravioleta com auxílio do equipamento Alphaimager MINI Cell Biosciences.

O polimorfismo do DNA dos isolados foi avaliado pela presença e ausência de bandas, utilizando o programa Sequentix Gelquest. Com base nesses dados foi construída uma matriz binária utilizada para análise de agrupamento e similaridade, avaliada pelo coeficiente de Jaccard utilizando o método UPGMA (Unweighted Pair – Group Method with Arithmetical Average). Os dados foram processados pelo programa NTSYS-pc e os perfis de DNA obtidos por BOX-PCR foram representados em um dendrograma de similaridade.

4.4.2 Amplificação Gene 16S rDNA por PCR

A amplificação das sequências *16S rDNA* dos isolados foi realizada com os iniciadores 27f (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') e 1492r (5' ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT 3') (SUZUKI & GIOVANNONI, 1996; ROSCH & BOTHE, 2005).

Para a PCR, foram utilizados 50 ng de DNA dos isolados, 1,5 μL de cada iniciador ($20 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$), 1 μL de dNTPs (10 mM) (Invitrogen), 5 μL de tampão 10X Rnx Buffer (Invitrogen), específico da enzima *Taq* DNA polimerase, 2,2 μL de MgCl_2 (50 mM) (Invitrogen), 0,2 μL de enzima *Taq* DNA polimerase ($5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) (Invitrogen) e água ultrapura estéril para um volume final de 50 μL . A reação de amplificação foi conduzida no termociclador Life Express, BIOER, programado em uma etapa de desnaturação inicial (94°C , 2 minutos), seguida de 35 ciclos de desnaturação (94°C , 1 min), anelamento (58°C , 1 min) e extensão (72°C , 2 min) e uma extensão final (72°C , 10 min).

Após amplificação, 8 μL de cada amostra foram adicionados a 2 μL de tampão de carregamento (azul de bromofenol 0,025% e glicerol 50%) e avaliados por eletroforese em gel de agarose 1,0 % em tampão TBE 1X e

corado com brometo de etídeo ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$). O marcador de peso molecular utilizado para comparação foi o 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen).

4.4.3 Purificação dos Produtos de Amplificação

A purificação dos produtos amplificados foi realizada utilizando 0,33 μL de enzimas Exonuclease I (EXO I) (Amersham Biosciences), 0,33 μL Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (Amersham Biosciences), 6 μL do produto de amplificação e água ultrapura estéril suficiente para completar 10 μL de solução. Para melhor atividade da enzima, os produtos foram mantidos a 37 °C por 1 h e posteriormente, a 80 °C por 15 min.

4.5 SEQUENCIAMENTO

4.5.1 Quantificação do Produto de PCR rRNA 16S e Reação de Sequenciamento

As reações de sequenciamento do gene *16S rRNA* foram realizadas no Laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio e Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná (UFPR, Curitiba-PR). Após a purificação, os fragmentos do gene *16S rRNA* foram quantificados em espectrofotômetro a 260 nm (NanoDrop 2000 Spectrofotometer, Thermo Scientific) para a reação de sequenciamento.

As reações de sequenciamento foram realizadas em termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems), em microplacas de 96 poços, utilizando o kit "DNA Sequencing-Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ABI Prism", de acordo com as instruções do fabricante. Em cada poço, foram utilizados 20 ng de DNA; 0,5 μM do oligonucleotídeo iniciador 27f (20 mM); 1 μL do terminador Big Dye; 2 μL de tampão Save Money [Tris-HCl 400 mM (pH 9) e MgCl_2 10 mM] e água ultrapura estéril para completar 10 μL de reação. As condições da PCR foram: 1 ciclo de 96 °C por 1 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação (96 °C por 15 s), anelamento (58 °C por 10 s) e extensão (60 °C por 4 min).

Após a reação de sequenciamento, o DNA foi precipitado adicionando-se 10 µL de água miliQ; 2 µL de acetato de amônio e 3x o volume de etanol absoluto a cada amostra. As amostras foram em seguida centrifugadas a 2149 g a 20 °C, por 45 min (Centrífuga 5810 R, Eppendorf). Descartou-se o sobrenadante e secou-se a placa sobre papel absorvente. O DNA sedimentado foi lavado com 150 µL de etanol 70%, centrifugando-se por mais 15 min a 2149 g a 20 °C. Descartou-se o sobrenadante, deixou-se a placa secar sob vácuo por 40 minutos e ressuspendeu-se o DNA com 10 µL de formamida.

A determinação das sequências foi realizada no sequenciador automático ABI-3500 (Applied Biosystems, German). As sequências obtidas foram submetidas à comparação com o coeficiente de similaridade do Ribosomal Database Project (RDP) (<http://www.rdp.cme.msu.edu>) pelo programa “Classifier” e “Sequence Match” (MAIDAK et al. 1997). Foi utilizado o programa DivEs (Diversidade des Espécie v 2.0) (RODRIGUES, 2005) para calcular o índice de Shannon-Wiener, a partir das Famílias encontradas nos três solos analisados. O índice de Shannon-Wiener é um índice de diversidade sensível à riqueza e à abundância relativa de espécies (ATLAS & BARTHA, 1998) e no presente trabalho foi aplicado para avaliar a diversidade da comunidade bacteriana dentre os solos.

4.6 ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI – TOF

Os isolados obtidos foram submetidos à análise por espectrometria de massa MALDI-TOF no Laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio e Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná (UFPR, Curitiba-PR), seguido o protocolo de Sauer et al. (2008).

4.6.1 Preparo da Amostra

As bactérias foram cultivadas em meio sólido Dygs por 24 a 36 h, em aerobiose a 30 °C. Colônias isoladas (~ 2 mm diâmetro) foram transferidas para microtubos, adicionando-se 1 mL de água ultrapura estéril. As células foram centrifugadas a 8289 g por 2 min, e descartou-se o sobrenadante. O processo foi repetido uma vez, retirando-se o máximo do sobrenadante com o auxílio de uma pipeta. Ao precipitado foram adicionados 20 µL de ácido fórmico 70% (v/v), homogeneizando bem a mistura. Posteriormente, adicionaram-se 20 µL de acetonitrila seguindo nova homogeneização das amostras. Centrifugou-se novamente a 8289 g por 2 min, transferindo 20 µL do sobrenadante a novos microtubos.

Sobre uma placa para análise em espectrômetro de massa, foi depositado 1 µL do sobrenadante obtido como descrito acima, deixando-se a placa secar ao ar em temperatura ambiente. Foram adicionados às amostras 1 µL da matriz de HCCA (3 mg/mL) preparada em solução de 50% (v/v) acetonitrila 2,5% (v/v) ácido trifluoracético (SAUER et al., 2008 modificado).

4.6.2 Análise das Amostras

As amostras foram analisadas em espectrômetro de massa MALDI-TOF-MS Autoflex II (Bruker Daltonics), equipado com um laser de nitrogênio, utilizando o software Flex Control v. 3.0 (Bruker Daltonics) operando em modo de detecção positivo, voltagem de aceleração de 20 kV, frequência do laser de 50 Hz e detecção de massa na faixa de 3.000 a 12.000 m/z. O equipamento foi primeiramente calibrado utilizando o kit Protein Calibration Standard I (Bruker Daltonics) contendo uma mistura de insulina (5.734,51 m/z), ubiquitina I (8.565,76 m/z) e citocromo C (12.360,97 m/z). Os parâmetros de aquisição foram ajustados considerando apenas sinais com resolução mínima de 600 arb. Os espectros são resultados da soma dos íons obtidos por 10 tiros do laser em 10 posições diferentes da amostra aplicada num mesmo *spot*. O processamento dos espectros foi realizado utilizando o software Flex Analysis v. 3.0 (Bruker Daltonics). Os extratos de cada estirpe foram aplicados em 3

pontos diferentes da placa de MALDI para avaliar a reprodutibilidade dos espectros.

4.6.3 Análise e Agrupamento dos Espectros

Os espectros gerados foram submetidos à análise de picos em comum utilizando o software Speclust disponível no portal: <http://bioinfo.thep.lu.se/speclust.html> (ALM et al., 2006) a fim de gerar um espectro médio para cada amostra; a variação tolerada foi de ± 5 m/z. O programa permite comparar entre si as listas de picos obtidos dos espectros de cada micro-organismo, criando matrizes de presença/ ausência de picos. A partir destas matrizes, são calculadas as distâncias entre cada micro-organismo. Estas distâncias foram utilizadas para agrupar os micro-organismos representados em um dendograma.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises químicas de solo estão apresentadas na Tabela 6. Todos os solos apresentaram-se com teor de matéria orgânica (MO) considerado baixo, com alguns contrastes quanto aos teores de Ca e Al no solo de Marechal Cândido Rondon (solo TRIGOMAR). Porém, os níveis de fertilidade observados para os três locais estiveram entre médio e alto para os parâmetros avaliados e adequados para o desenvolvimento das culturas ensaiadas.

Tabela 6 – Análise química das amostras de solo utilizadas neste estudo

Tratamentos	pH	K	Ca	Mg	Al	P	MO
	CaCl ₂		cmolc/dm ³			mg/dm ³	g/dm ³
Solo cana UEL	4,7	0,1	5,7	0,3	0,14	1,82	18,9
Solo trigo UEL	6,0	0,9	7,78	2,35	0,07	31,2	13,07
Solo trigo Marechal	4,4	0,53	2,35	2,78	0,26	47,1	12,9

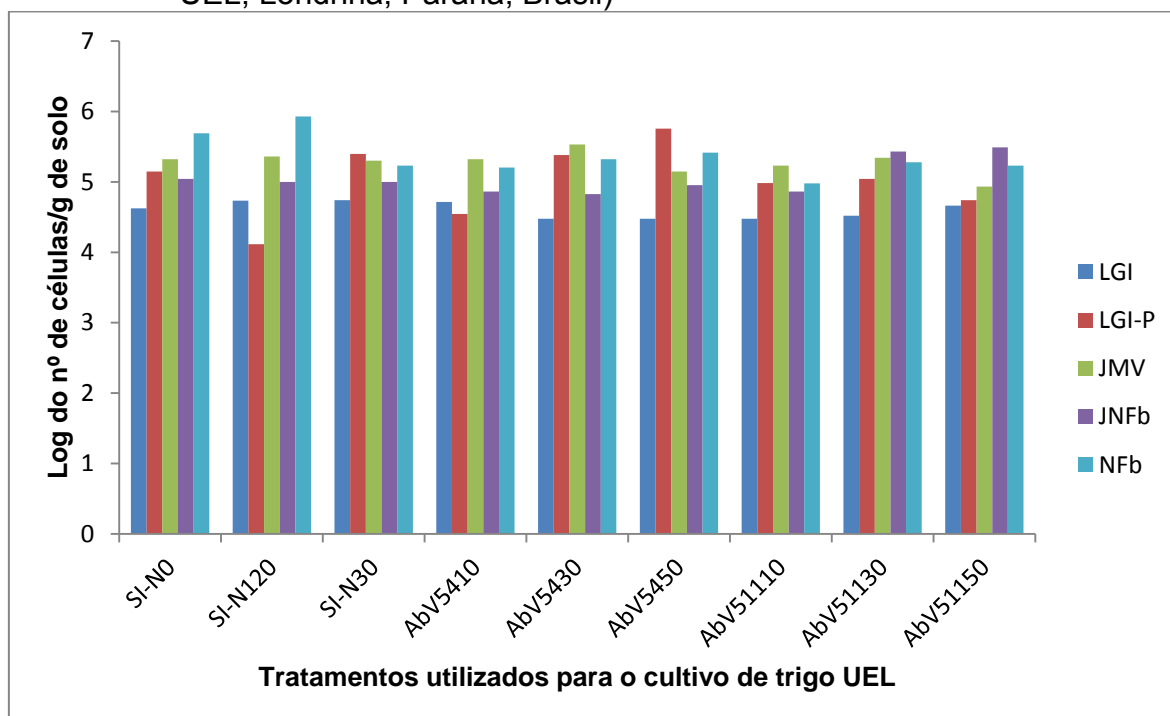
Fonte: A autora (2013)

5.1 CONTAGEM DE DIAZOTRÓFICOS, ISOLAMENTO E ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS

5.1.1 Contagem

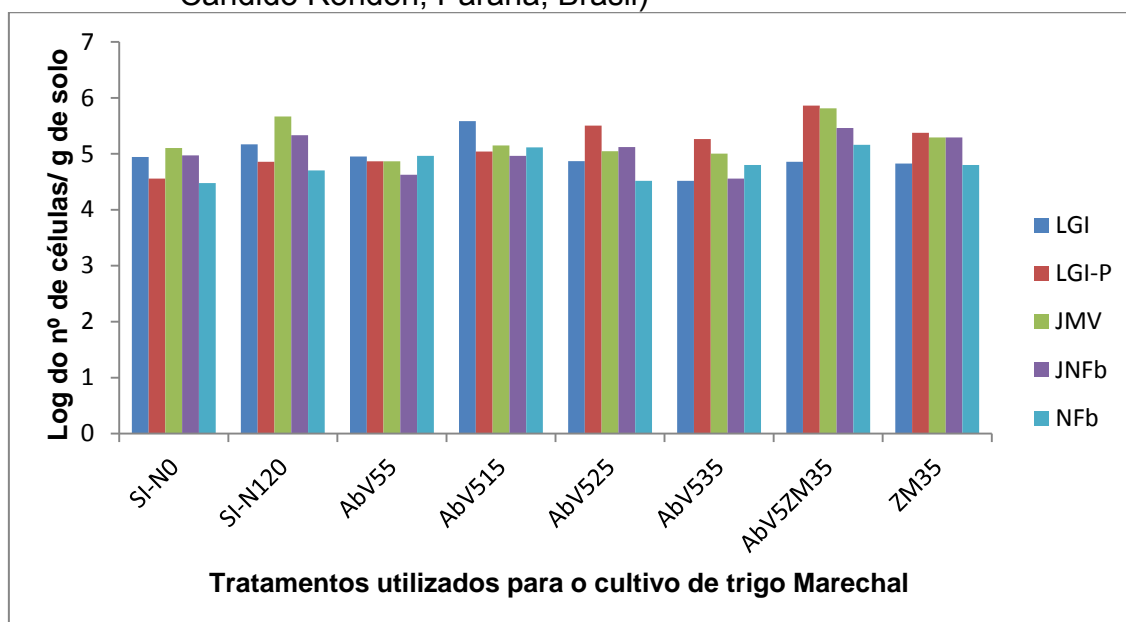
A contagem de bactérias foi realizada somente nos solos sob cultivo de trigo (Londrina e Marechal Cândido Rondon). Os resultados da ocorrência de bactérias diazotróficas nestes solos revelaram presença de bactérias relacionadas ao gênero *Azospirillum* (meios LGI e NFb), *Herbaspirillum* (meio JNFb), *Gluconacetobacter* (meio LGI-P) e *Burkholderia* (meios JMV e LGI). Os resultados foram convertidos em escala logarítmica e estão apresentados nas Figuras 1 e 2. De modo geral, foi observado um alto número de bactérias em ambos os solos analisados variando de, 4,51 a 5,92 (Log₁₀ do número de bactérias/g de solo).

Figura 1 – Logaritmo (Log_{10}) da comunidade de bactérias diazotróficas por g de solo sob cultivo com trigo (TRIGOUEL - Fazenda Escola da UEL, Londrina, Paraná, Brasil)



Fonte: A autora (2013)

Figura 2 – Logaritmo (Log_{10}) da população de bactérias diazotróficas por g de solo sob cultivo com trigo (TRIGOMAR - Estação Experimental Prof. Antonio Carlos dos Santos Pessoa, UNIOESTE – Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil)



Fonte: A autora (2013).

De acordo com as análises estatísticas em relação ao solo de cultivo de trigo – TRIGOUEL, considerando a média da contagem, os tratamentos SI-N120 (tratamento controle – com 100% de adubação nitrogenada) e AbV51130 (Pulverização 11 dias após a emergência das plantas com AbV5 - 30 mL kg^{-1}) diferiram entre si, caracterizando a maior e a menor população de bactérias ($\text{log}_{10} = 5,40$ ($2,5 \times 10^5$ células/g solo e $\text{log}_{10} = 4,97$, $9,3 \times 10^4$ células/g solo) respectivamente. Os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 7).

Tabela 7 – Populações de isolados em meio semi-sólido em solo (Log_{10}/g solo) da Fazenda Escola UEL/Londrina, sob cultivo com trigo submetido a diferentes práticas de manejo

Tratamento	Log_{10} células/g solo
SI-N0	5,30
SI-N120	5,40
SI-N30	5,19
AbV5410	5,02
AbV5430	5,25
AbV5450	5,34
AbV51110	4,97
AbV51130	5,22
AbV51150	5,12

Fonte: A autora (2013)

No solo do cultivo de trigo de Marechal Cândido Rondon (TRIGOMAR), as análises mostraram que o tratamento AbV5ZM35 (inoculação na semente com AbV5 + ZM - 35 mLkg^{-1}) obteve a maior população de bactérias diazotróficas com $\text{Log}_{10} = 5,57$ ($7,2 \times 10^5$ célula/g solo). Por outro lado, as menores populações foram encontradas nos tratamentos SI-N0 (controle – sem adubação nitrogenada), AbV55 (inoculação na semente com AbV5 - 5 mLkg^{-1}) e AbV535 (inoculação na semente com AbV5 - 35 m.g^{-1}) com $\text{Log}_{10} = 4,87$ e $4,92$ ($3,3 \times 10^4$ e $8,7 \times 10^4$ células g^{-1} solo respectivamente).

Tabela 8 – Populações de isolados em meio semi-sólido em solo (Log_{10}/g solo) da Estação Experimental Prof. Antonio Carlos dos Santos Pessoa, (UNIOESTE) – Marechal Cândido Rondon, sob cultivo com trigo submetido a diferentes práticas de manejo

Tratamento	Log_{10} células/g solo
SI-N0	4,87
SI-N120	5,28
AbV55	4,87
AbV515	5,23
AbV525	5,13
AbV535	4,92
AbV5ZM35	5,57
ZM35	5,18

Fonte: A autora (2013)

Doses de inoculantes e, conseqüentemente, o número de bactérias inoculadas podem afetar na produção e desenvolvimento da planta, como observados nos trabalhos de Oliveira et al. (2002), que verificaram efeitos benéficos em cana-de-açúcar utilizando 10^5 bactérias mL^{-1} e Baldani et al. (2000), com 10^8 bactérias mL^{-1} aplicadas em arroz. No entanto, relacionando os resultados da análise da diversidade bacteriana diazotrófica com as doses de inoculantes ou de fertilizante nitrogenado utilizadas nos tratamentos, é possível sugerir que provavelmente os organismos inoculados e a adição de N-ureia nas doses testadas não foram capazes de modificar a estrutura das comunidades bacterianas do solo de Londrina e de Marechal Cândido Rondon. A baixa capacidade de estabelecimento das estirpes de BPCV no solo é uma característica desejável para a recomendação como biofertilizante. O efeito da adição de N-mineral sobre a composição bacteriana diazotrófica observada para o solo de Londrina pode estar relacionada ao aumento do conteúdo de matéria orgânica depositado pelas plantas cultivadas nestas condições.

Analisando a comunidade bacteriana de cada meio semi-seletivo utilizado, no solo TRIGOUEL, LGI-P relacionado a *Gluconacetobacter*, foi o meio que apresentou maior variação entre os tratamentos. A maior população de diazotróficos foi encontrada no tratamento AbV5450. Por outro

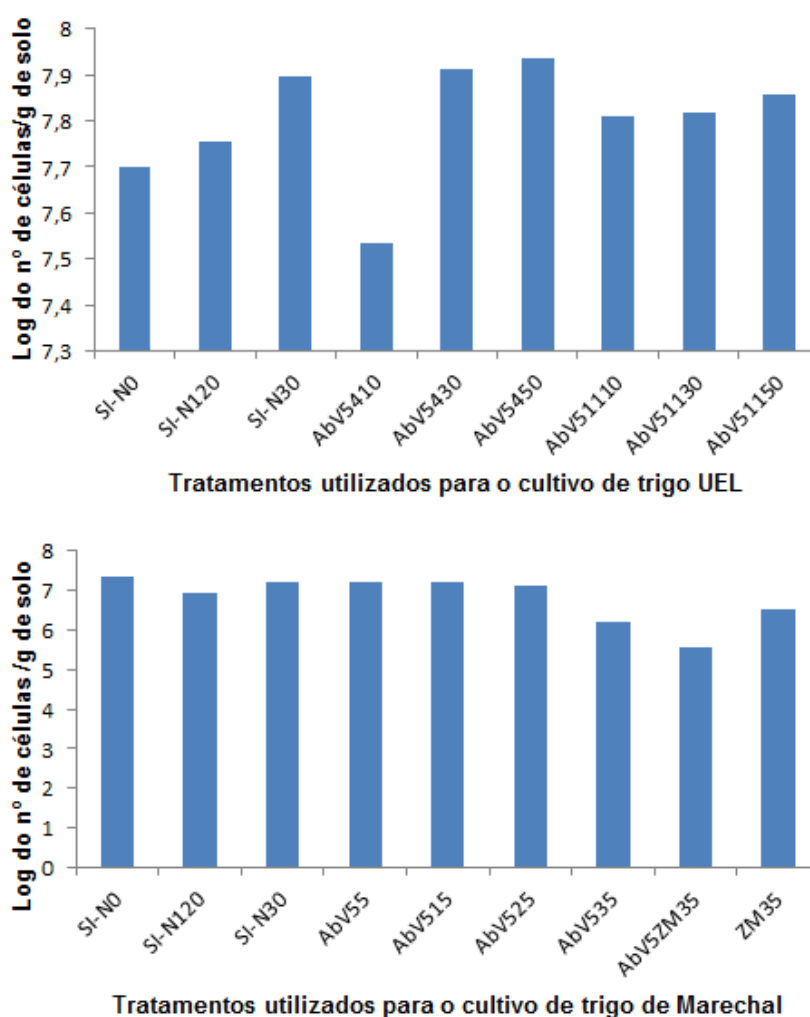
lado, o meio LGI foi o meio que apresentou menor variação entre os tratamentos, além do menor número de organismos diazotróficos observados. Não foram observadas diferenças nas populações relacionadas à *Azospirillum* e *Burkholderia* (meios LGI e JMV) e *Herbaspirillum* (meio JNFb) para os tratamentos com diferentes inoculações com *Azospirillum brasilense*. Já os tratamentos controle (sem a adição de inoculantes) apresentaram maior população relacionada à *Azospirillum* (meio NFb) frente aos tratamentos com inoculantes. Isso pode ser caracterizado como uma possível interação entre as bactérias inoculadas e a comunidade bacteriana nativa. Resultados semelhantes foram encontrados nos estudos de KUSS (2006) com organismos diazotróficos associados às raízes de arroz irrigado.

Já no solo TRIGOMAR foi observada uma maior variação na população bacteriana entre os tratamentos avaliados. Não foram obtidos isolados no SI- N30, não sendo representado na Figura. O meio LGI também apresentou a menor variação dentre os meios, com exceção do tratamento AbV515, onde foi quantificada uma população representativa em comparação aos demais tratamentos. O levantamento da ocorrência de bactérias diazotróficas nesse solo apresentou o menor número de bactérias relacionadas ao *Azospirillum* (meio NFb) em todos os tratamentos, incluindo os tratamentos controle, os quais, diferente do solo TRIGOUEL, não apresentaram diferenças em população aos demais tratamentos.

Comparativamente, o solo TRIGOUEL, em geral, apresentou maiores médias no número populacional em relação ao solo TRIGOMAR. As médias de populações por tratamento estão apresentadas na Tabela 8 em forma de Log_{10} . As análises químicas dos solos permitem observar diferenças nas concentrações de alguns parâmetros como Ca e Al, que podem afetar a abundância de bactérias. O solo TRIGOMAR apresenta baixa concentração de Ca e uma maior concentração de Al, este podendo causar toxicidade ao ambiente, comprometendo a comunidade rizosférica. A calagem e a adubação mineral podem favorecer a atividade microbiana direta (aumento de pH e a disponibilidade de nutrientes aos micro-organismos) e indiretamente (maior produção vegetal), entretanto, o uso de adubação nitrogenada pode provocar a acidificação do solo e, conseqüentemente afetar negativamente os micro-organismos presentes (BÜNEMANN et al., 2006).

Os resultados dos levantamentos da ocorrência de bactérias heterotróficas em meio mínimo em diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} , a fim de se obter as maiores populações também de não diazotróficas encontradas nos solos de trigo estão apresentadas na Figura 3. Os resultados revelaram que não houve grandes variações entre os tratamentos em ambos os solos.

Figura 3 – Logaritmo (Log_{10}) da comunidade de bactérias heterotróficas por g de solo sob cultivo com trigo em Londrina (solo TRIGOUEL) e Marechal Cândido Rondon (solo TRIGOMAR) e submetido a diferentes tipos de manejo para o fornecimento de nitrogênio)



Fonte: A autora (2013)

5.1.2 Isolamento e Identificação Taxonômica Análise das Sequências Ribossomais 16s 16S rDNA

Foram obtidos 183 isolados bacterianos (Tabela 9) dos quais, 125 sequências de qualidade puderam ser analisadas. Dentro dos tratamentos controle (com adubação fosfatada e potássica na dose recomendada para a respectiva cultura, sem inoculante, com e sem adubação nitrogenada), os três solos apresentaram grande quantidade de bactérias, totalizando 58 isolados. A Tabela com todos os isolados está apresentada no Anexo 5.

Tabela 9 – Número de isolados obtidos dos solos TRIGOUEL, CANAUUEL e TRIGOMAR, e respectivos meios de cultivo semi-sólidos seletivos livres de nitrogênio utilizados para o isolamento

Tratamentos	Isolados em Meios de Cultura Semi-Sólidos e Meio Mínimo							Total
	LGI	LGI-P	JMV	JNFb	NFb	MM		
SOLO CULTIVO CANA (Fazenda Escola CANAUUEL)	SI-N0	3			2	1	4	10
	SI-N120	4		1	6		3	14
	Emb-N0	2	1		1		4	8
	Emb-N120	2					4	6
	Tur-N0	1					2	3
	Tur-N120						1	1
	Tur-N120						2	2
	Uel-N0						1	1
	Uel-N0	3						3
	Uel-N120	2			3		4	9
Total	17	1	1	12	1	25	57	
SOLO CULTIVO TRIGO (Fazenda Escola TRIGOUUEL)	SI-N0		2	1	4	5	2	14
	SI-N120			2	5	1	2	10
	SI-N30		1	5	3	1	3	13
	AbV5410		1	1	2	3	3	10
	AbV5430			2	6	1	3	12
	AbV5450		1	3	2	2	2	10
	AbV51110		2	2	2	2	1	9
	AbV51130		4	5	7		2	18
	AbV51150			1	4	4	2	11
Total	0	11	22	35	19	20	107	
SOLO CULTIVO TRIGO (Marechal Cândido Rondon – TRIGOMAR)	SI-N0	1		1	4		1	7
	SI-N120				2		1	3
	SI-N30						1	1
	AbV55						1	1
	AbV515			1			1	2
	AbV525						1	1
	AbV535						1	1
	AbV5ZM35						1	1
ZM35		1				1	2	
Total	1	1	2	6	0	9	19	

Fonte: A autora (2013)

Os resultados de isolamento sugerem que para o solo de Londrina sob cultivo com cana-de-açúcar, houve predominância de bactérias

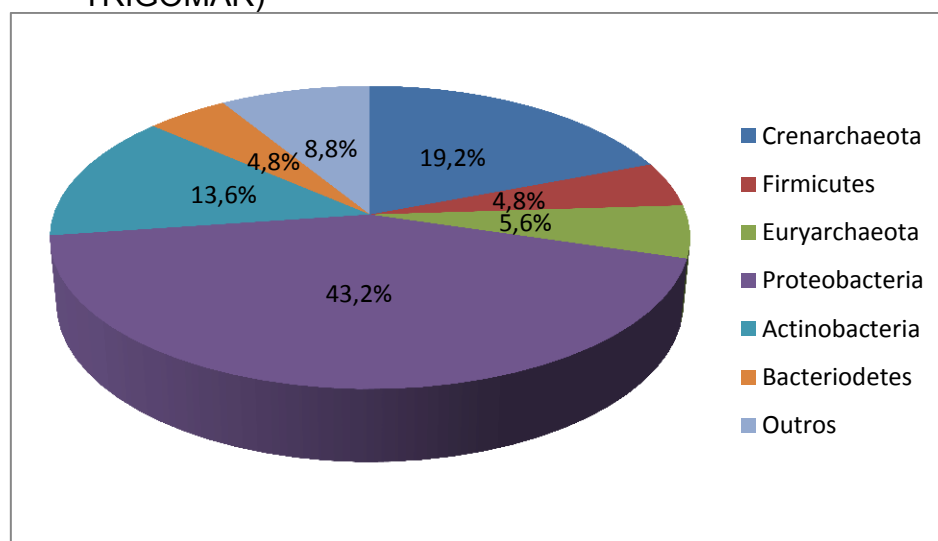
diazotróficas relacionadas aos gêneros *Herbaspirillum* e *Sphingomonas*, uma vez que a quantidade de isolados diazotróficos obtidos pelo uso dos meios JMV, NFb e LGI-P foi muito baixa. É possível também observar que a adubação com N-mineral tende a selecionar grupos específicos de diazotróficos, uma vez que 10 dentre os 14 isolados obtidos sob este manejo são relacionados aos gêneros *Herbaspirillum* e *Sphingomonas*. No solo TRIGOUEL, a maior frequência de isolamento foi observada nos meios JNFb e NFb, com 35 e 19 isolados respectivamente, relacionados aos gêneros *Herbaspirillum*, *Sphingomonas* e *Azospirillum*. Em relação aos tratamentos, a maior quantidade de isolados foi verificada no tratamento AbV51130, ainda que não apresente a maior diversidade, com predomínio de isolados relacionados aos gêneros *Herbaspirillum*, *Sphingomonas* e *Burkholderia*. O solo TRIGOMAR não apresentou muitos isolados em meios seletivos, predominando o isolamento apenas no meio mínimo, possivelmente caracterizando bactérias não diazotróficas.

A composição das comunidades bacterianas foi caracterizada pela classificação taxonômica das sequências do gene ribossomal 16S *rDNA*, a qual se obteve a partir de um total de 125 sequências, sendo 43 procedentes do solo CANAUUEL, 71 do solo TRIGOUEL e 11 sequências procedentes do solo TRIGOMAR.

Utilizando a classificação do RPD II (*Ribossomal Database Project*) pelo do programa *Classifier*, identificou-se um total de 15 filós entre todos isolados dos três solos analisados representados na Figura 4. Dentre todas as sequências analisadas, 75,8% são pertencentes ao Domínio *Bacteria*, sendo o filo de maior abundância o *Proteobacteria* em todos os experimentos realizados, com 43,2% das sequências, seguido pelo filo *Crenarchaeota*, pertencente ao Domínio *Archaea*, com 19,2%. Nos solos TRIGOUEL e CANAUUEL, o filo *Actinobacteria* também foi encontrado em abundância, apresentando 13,6% do total analisado, porém, não foi sequenciado nenhum representante desse filo no solo TRIGOMAR. Organismos desse filo são caracterizados como bactérias de cultivo lento, produtoras de antibiótico e são frequentemente encontradas em solos de pastagens (DUNBAR et al., 2002). Também é dominante em solos de cultivo e contaminado com metais pesados que possam apresentar pH mais elevado em relação ao solo de floresta (VAL

MORAES, 2008). O filo *Proteobacteria* foi representado por sequências das classes *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria*, bactérias tipicamente selecionadas nos meios semi-seletivos NFb, JNFb e LGI (BALDANI et al., 1997; BALDANI & BALDANI, 2005, MARRA et al., 2012) como observado na predominância dos isolados. Esses filos estão presentes nos maiores biomas terrestres (NUNES, 2006; BACHAR et al., 2010) e constituem principalmente a rizosfera e o rizoplane da cultura (RAWAT et al., 2011). As proteobactérias possuem um papel ativo e importante no ciclo do nitrogênio, o que pode justificar a grande quantidade desses organismos nos solos (VAL-MORAES, 2008). Também foram obtidos muitos representantes dos filos *Euryarchaeota* (Domínio Archaea) e *Firmicutes* (Domínio *Bacteria*) em todos os solos. Alguns filos encontrados nesse trabalho como *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes* são também considerados filos dominantes no solo, no entanto, são reportados como menos abundantes (JANSSEN, 2006; BRUCE, 2010).

Figura 4 – Grupos filogenéticos identificados dentre os isolados obtidos em todos os tratamentos avaliados (solos TRIGOUEL, CANAUUEL e TRIGOMAR)



Fonte: A autora (2013)

Dentre as famílias, *Pseudomonaceae* foi a mais representativa nas amostras do solo TRIGOUEL, com 8,57% das sequências analisadas. *Micrococcaceae* também apresentou uma quantidade relativamente expressiva dentre os analisados (11,4%), no entanto, foram isoladas exclusivamente em

meio mínimo. Isso ocorreu porque as bactérias pertencentes a essa família, embora sejam comuns na rizosfera, não apresentam características de fixação de nitrogênio e, portanto, não são isoladas pelos meios seletivos. Pertencentes ao Domínio *Archaea*, bactérias da família *Sulfolobaceae* também foram abundantes, com 10% das sequências analisadas.

Nas amostras do solo CANAUÉL, a família *Micrococcineae* foi a mais abundante com 13,9% dos isolados. *Burkholderiaceae* também foi representativa nesse solo, com 9,3% das sequências. Essa família é fenotípica, metabólica e ecologicamente diversa, sendo tais estirpes isoladas em uma grande quantidade de nichos, que variam desde solos contaminados ao trato digestivo humano. No entanto, a maioria das bactérias dessa família é conhecida como bactérias do solo, as quais exibem diferentes tipos de interações não patogênicas com as plantas (COENYE e VANDAMME, 2003).

Os maiores representantes no solo TRIGOMAR são pertencentes à família *Enterobacteriaceae* com 50% das sequências analisadas. No entanto, esses resultados representam os isolados obtidos predominantemente no meio mínimo. Vários gêneros da família *Enterobacteriaceae* incluem bactérias diazotróficas, muitas das quais pertencentes aos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e provavelmente vários outros que ainda não foram identificados (KENNEDY et al., 2004).

Foram utilizadas seis bactérias nos inoculantes avaliados em todos os experimentos: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense*, *Burkholderia tropica*, *Azospirillum brasilense* (AbV5) e *Methylobacterium komagatae*. Entretanto, estes micro-organismos não foram recuperados pela avaliação da diversidade, o que reforça o caráter de baixa capacidade de resiliência destes isolados BPCVs com a microbiota nativa dos solos estudados. Esse efeito garante o sucesso da inoculação, considerando não somente a qualidade do inoculante, mas também a capacidade das bactérias presentes no mesmo não deslocarem as estirpes naturalizadas do solo (VARGAS e HUNGRIA, 1997).

Foram analisados os índices de diversidade de Shannon-Wiener entre os solos e entre os tratamentos de manejo e do fornecimento de

N (Tabelas 10 e 11). O maior número de espécies foi encontrado nos solos de Londrina, independentemente da cultura agrícola, onde se observam os maiores índices de diversidade. Com um valor de 0,6169, o solo TRIGOMAR apresentou a menor diversidade. Esse baixo valor no índice pode ser atribuído ao baixo pH deste solo TRIGOMAR (4,2) em comparação ao solo TRIGOUEL (6,0). O pH constitui-se em um dos fatores mais limitantes à multiplicação e sobrevivência da comunidade rizosférica. As rizobactérias crescem em uma faixa de pH ideal entre 6,0 e 7,0 e poucas crescem em pH menor que 5,0 (RODRIGUES et al., 2006; ALI et al., 2009). Em geral, um solo com pH neutro fornece um ambiente mais adequado para a disponibilidade de nutrientes e crescimento microbiano. Solos com propriedades químicas e biológicas variáveis podem também afetar a associação entre plantas e bactérias (NAHER et al., 2009). Além disso, a comunidade microbiana também é afetada pelo sistema de manejo, devido à forma como os resíduos das culturas anteriores possam ser depositados e do grau de revolvimento do solo (VARGAS e SCHOLLES, 2000).

Tabela 10 – Índice de diversidade de Shannon- Wiener obtido a partir das análises de sequenciamento do *gene 16S rDNA* das populações de bactérias identificadas nos solos CANAUUEL, TRIGOUEL e TRIGOMAR

ÍNDICE DE DIVERSIDADE ENTRE SOLOS		
Cana (CANAUUEL)	Trigo (TRIGOUEL)	Trigo (TRIGOMAR)
1,374	1,416	0,617

Fonte: A autora (2013)

Tabela 11 – Índice de diversidade de Shannon- Wiener entre os tratamentos controle dos solos CANAUUEL, TRIGOUEL e TRIGOMAR

Solos	Tratamentos controle	
	SI-N0	SI-N120
CANAUUEL	0,673	0,887
TRIGOUEL	0,577	0,649
TRIGOMAR	0,217	0,276

Fonte: A autora (2013)

De acordo com os valores encontrados nos índices de Shannon-Wiener, não foi observada diferença entre a diversidade total do solo TRIGOUEL e solo CANAUUEL. Comparando-se os tratamentos controles (adubação normal recomendada, sem adubação nitrogenada – SI-N0 e adubação normal recomendada, com adubação nitrogenada – SI-N120), observou-se que o tratamento com a aplicação de nitrogênio apresentou maior diversidade em todos os solos. No solo CANAUUEL, obteve-se a maior quantidade de isolados e maior diversidade no SI-N120 também em relação a todos os outros tratamentos. Islam e colaboradores (2010), analisando comunidades diazotróficas sob diferentes tipos de manejos com doses diferentes de fertilizantes em solos sob cultivo de arroz, observaram que, independente dos meios utilizados, as maiores populações também foram obtidas nos tratamentos controles, quando comparados aos tratamentos. Esses resultados também corroboram os trabalhos de Baudoin e colaboradores. (2010), que analisaram a comparação dos efeitos de inoculantes com *Azospirillum brasilense* selvagem e geneticamente modificado para um aumento na produção do hormônio AIA (ácido-3-indol-acético). Não houve alteração da biota diazotrófica na utilização do inoculante com a estirpe selvagem. Os valores encontrados nos índices de diversidade de Shannon-Wienes em relação ao solo TRIGOMAR não foram expressivos, portanto, não foi possível sugerir possíveis diferenças entre os tratamentos.

5.2 ANÁLISE DOS ISOLADOS POR BOX-PCR

Os isolados dos solos TRIGOUEL, CANAUUEL e TRIGOMAR foram submetidos às análises de BOX-PCR, a fim de se determinar a diversidade bacteriana nos três solos e comparar os grupos formados junto aos padrões. Os padrões utilizados estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12 – Identificação dos padrões utilizados para comparação das análises de BOX-PCR

Identificação do padrão	Espécie
P2	<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>
P4	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>
P5	<i>Burkholderia tropica</i>
P6	<i>Azospirillum brasilense</i>

A análise de BOX-PCR foi realizada com 173 isolados dos três solos (TRIGOUEL, CANAUUEL e TRIGOMAR). A diversidade genética e a obtenção de OTUs (unidades taxonômicas operacionais) foram avaliadas através da análise comparativa entre os padrões gerados pela amplificação de regiões conservadas e repetitivas do DNA genômico. As análises foram obtidas a partir do programa NYTSYS-pc e encontram-se apresentadas na forma de dendogramas. Os isolados foram codificados usando-se números para identificar os tratamentos e letras para identificar os meios utilizados (Tabelas 13 e 14). No solo CANAUUEL, os genótipos também foram representados pelas letras minúsculas a (RB855536) e b (RB72454).

Tabela 13 – Codificação dos meios semi-seletivos e meio mínimo utilizada para a identificação dos isolados caracterizados nos dendogramas

Identificação	Meios
A	LGI
B	LGI-P
C	JMV
D	JNFb
E	NFb
F	MM

Fonte: A autora (2013)

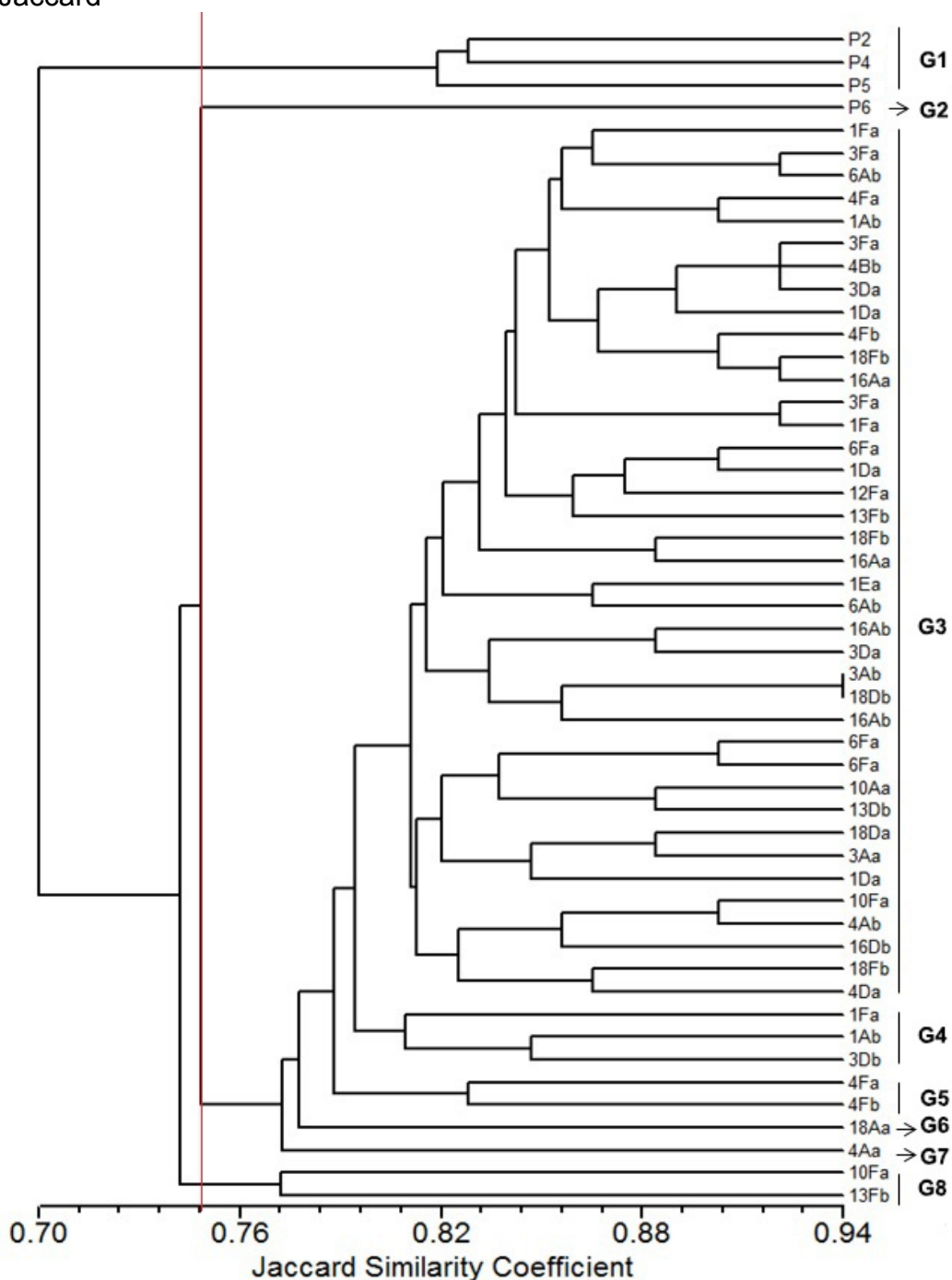
Tabela 14 – Codificação dos tratamentos utilizada para a identificação dos isolados caracterizados nos dendogramas

	Tratamento	Identificação	Tratamento	Identificação	Tratamento	Identificação
SOLO CANA UEL	SI-N0	1	SI-N0	1	SI-N0	1
	SI-N120	3	SI-N120	2	SI-N120	2
	Emb-N0	4	SI-N30	4	SI-N30	3
	Emb-N120	6	AbV5410	5	AbV55	4
	Tur-N0	10	AbV5430	6	AbV515	5
	Tur-N120	12/13	AbV5450	7	AbV525	6
	UEL-N0	15/16	AbV51110	8	AbV535	7
	UEL-N120	18	AbV51130	9	AbV5ZM35	8
			AbV51150	10	ZM35	9

Fonte: A autora (2013)

No solo CANAUUEL, os resultados de *fingerprinting* obtidos pela técnica de BOX-PCR revelaram uma grande diversidade entre os isolados. Considerando um coeficiente de similaridade de Jaccard superior de 75% para agrupamento dos perfis de DNA, foram obtidos 8 grupos filogenéticos, dos quais 3 são representados por sequências únicas – G2, G6 e G8 (Figura 5). Os padrões apresentaram alta similaridade entre si, com exceção do P6 que formou um perfil único (G2). Nenhum padrão apresentou similaridade com os isolados analisados. O grupo 3 foi formado pelo maior número de isolados (39 isolados), com predominância de bactérias provenientes do genótipo de cana RB72454. Considerando o efeito da inoculação, não foi possível observar a formação de grupos com base em tipos de tratamentos ou meios seletivos, sugerindo que os tratamentos de manejo de N adotados não tiveram forte influência sobre a diversidade da microbiota. Os dados sugerem grande diversidade no solo sob cultivo de cana com predominância de bactérias diazotróficas, não verificando presença de grupos clonais. Esses resultados corroboram o trabalho de Lira-Cadette e colaboradores (2012) que encontraram alta diversidade genética de bactérias no solo, por meio da técnica de BOX-PCR com coeficiente de similaridade superior a 80%, analisando a diversidade de bactérias diazotróficas associada à cana-de-açúcar capaz de solubilizar fosfato inorgânico.

Figura 5 – Dendograma de similaridade formado a partir de marcadores BOX-PCR dos isolados obtidos do solo sob cultivo com cana-de-açúcar, identificando a formação de grupos filogenéticos a 75% de similaridade, Método de agrupamento por UPGMA e coeficiente de Jaccard



Fonte: A autora (2013)

*Codificação dos tratamentos e meios utilizados descritos nas Tabelas 13 e 14.

Com um coeficiente de similaridade de Jaccard superior a 85%, também foi encontrada uma grande diversidade entre os isolados provenientes do solo. TRIGOUEL (Figura 6). Considerando um coeficiente de similaridade de

75%, foi possível distinguir 18 grupos filogenéticos, sendo 12 agrupamentos e 6 perfis únicos (G1 a G18). Os padrões P2, P4 e P5 foram distinguidos em um mesmo agrupamento. O padrão P6 mostrou menor similaridade dos demais, sendo agrupado no grupo filogenético 2, assim como ocorrido no solo CANAUUEL. Os isolados apresentaram uma similaridade inferior a 80% dos padrões. O grupo 4 foi formado pelo maior número de isolados (62 bactérias), a maioria isolada a partir do meio semi-seletivo JNFb. Três isolados dentro desse agrupamento (10D, 5E e 9B) apresentaram grande similaridade, apesar de serem bactérias isoladas de tratamentos e meios diferentes (AbV51150, AbV5430 e AbV51130, isoladas nos meios JNFb, NFb e LGI-P, respectivamente).

Considerando os tratamentos em geral, não foi observada a formação de grupos específicos relacionados aos tratamentos, demonstrando que, provavelmente, a inoculação não tenha influenciado na formação de grupos.

Todos os isolados demonstraram grande variação no padrão de *fingerprinting* devido ao seu elevado grau de variabilidade genética e distribuídos em diferentes grupos. Em conjunto, os resultados sugerem uma grande diversidade de bactérias (principalmente diazotróficas) no solo sob cultivo de trigo da Fazenda Escola UEL, uma vez que não foram identificados grupos clonais entre os isolados obtidos.

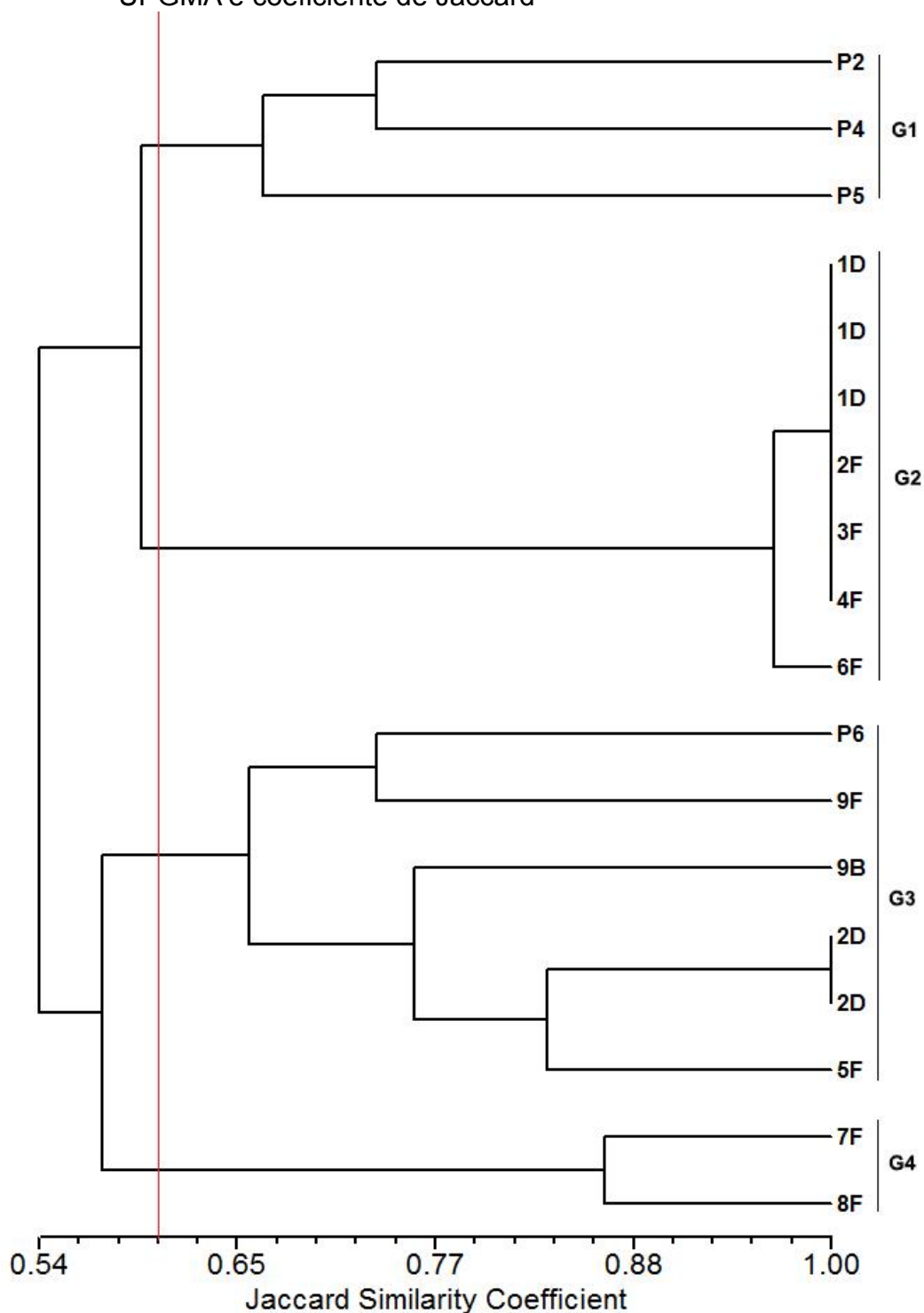
Esses resultados corroboram os trabalhos de Mittal e Johri (2007), que também encontraram uma grande diversidade de comunidade rizosférica em solos sob cultivo de trigo e mandua (capim-pé-de-galinha - *Eleusine indica*) com um coeficiente de similaridade de 80% entre os isolados na região nordeste da Índia. Tais resultados ainda possibilitaram a observação de populações com propriedades promotoras do crescimento vegetal, como produção de sideróforos e solubilização de fosfato, e outras propriedades funcionais como antagonismo a fungos fitopatogênicos.

Diferentemente do solo TRIGOUEL, o solo TRIGOMAR não apresentou grande diversidade na análise de BOX-PCR, mas isso é resultado dos poucos isolados obtidos, sendo a maioria proveniente do meio mínimo. A análise do dendograma (Figura 7) permitiu distinguir apenas 4 perfis, sendo todos apresentados na forma de agrupamentos e nenhum perfil único, considerando um nível de similaridade de 60%.

Os padrões apresentaram-se semelhantes quanto aos grupos formados em comparação ao solo TRIGOUEL. Não foi observado nenhum grupo formado com base nos tratamentos. O grupo 2 apresentou o maior número de isolados (sete), sendo 6 isolados com alta similaridade. Houve formação de um grupo clonal com os isolados 1D (SI-N0, isolado do meio JNFb) dentro desse grupo. Embora esses isolados apresentem características morfológicas diferenciadas, apresentaram grande similaridade. Foi formado um grupo clonal também dentro do grupo 6. A maioria das bactérias desse solo foi isolada em meio mínimo, não tendo dados suficiente para afirmar a formação de grupos a partir dos meios usados para isolamento.

Análises moleculares de *fingerprinting*, como BOX-PCR, que utilizam *primers* com oligonucleotídeos específicos que codificam regiões altamente conservadas e repetidas, têm sido cada vez mais empregadas para a determinação da diversidade genética (RADEMARKER et al., 1997). Essas informações podem ajudar a entender a evolução da funcionalidade dos micro-organismos em seu ambiente natural.

Figura 7 – Dendograma de similaridade formado a partir de marcadores BOX-PCR dos isolados obtidos do solo sob cultivo de trigo (Marechal Cândido Rondon – PR), identificando a formação de grupos filogenéticos a 60% de similaridade, Método de agrupamento por UPGMA e coeficiente de Jaccard



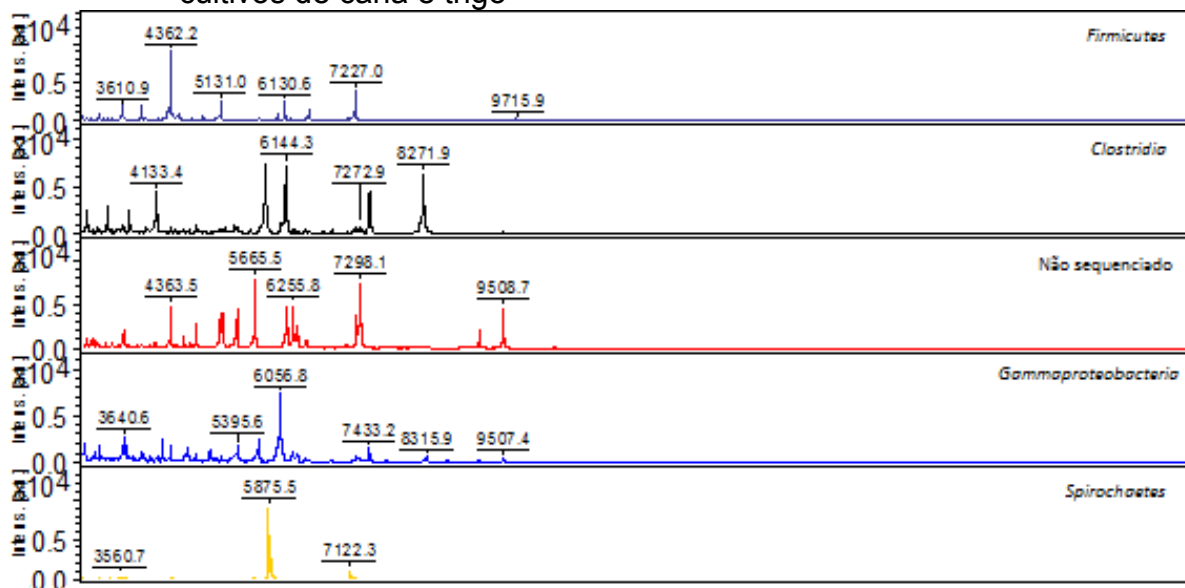
Fonte: A autora (2013)

*Codificação dos tratamentos e meios utilizados descritos nas Tabelas 13 e 14.

5.3 ANÁLISE DOS ISOLADOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF

Foram obtidas 96 análises dos isolados. A comparação e o *clustering* das listas de picos m/z de todas as estirpes foram realizados utilizando o programa SPECLUST, que gerou os dendogramas apresentados nas Figuras 9, 10 e 11. Os picos m/z estão distribuídos na faixa de, aproximadamente, 3000 a 10000 Da. Na Figura 8, estão apresentados os espectros de massa obtidos de alguns isolados dos solos analisados, identificados por sequenciamento parcial do *gene 16S rDNA*.

Figura 8 – Espectros de massa MALDI-TOF obtidos de isolados de solos sob cultivos de cana e trigo

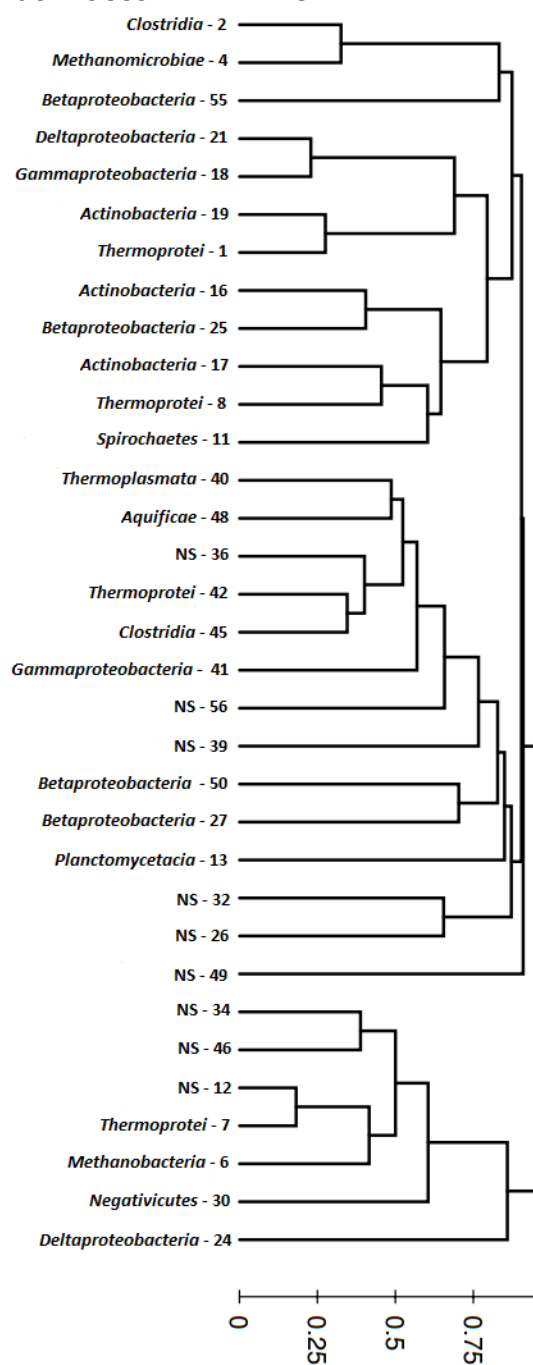


* Espectros identificados por sequenciamento parcial do *gene 16S rDNA*.

Fonte: A autora (2013)

Foram obtidas 33 amostras do solo CANAUÉL que foram agrupadas e identificadas no dendograma pelas análises dos espectros do MALDI-TOF, porém, 24 amostras puderam ser comparadas às análises de sequenciamento em nível de classe. Foram representadas as classes *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Clostridia*, *Methanomicrobia*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes*, *Thermoplasmata*, *Aquificae*, *Planctomycetacia*, *Methanobacteria* e *Negativicutes* pertencentes ao Domínio *Bacteria* e apenas a classe *Thermoprotei* representando o Domínio *Archaea* (Figura 9).

Figura 9 – Dendograma de 33 isolados do solo CANAUÉL baseado nos espectros de massa MALDI-TOF



Fonte: A autora (2013)

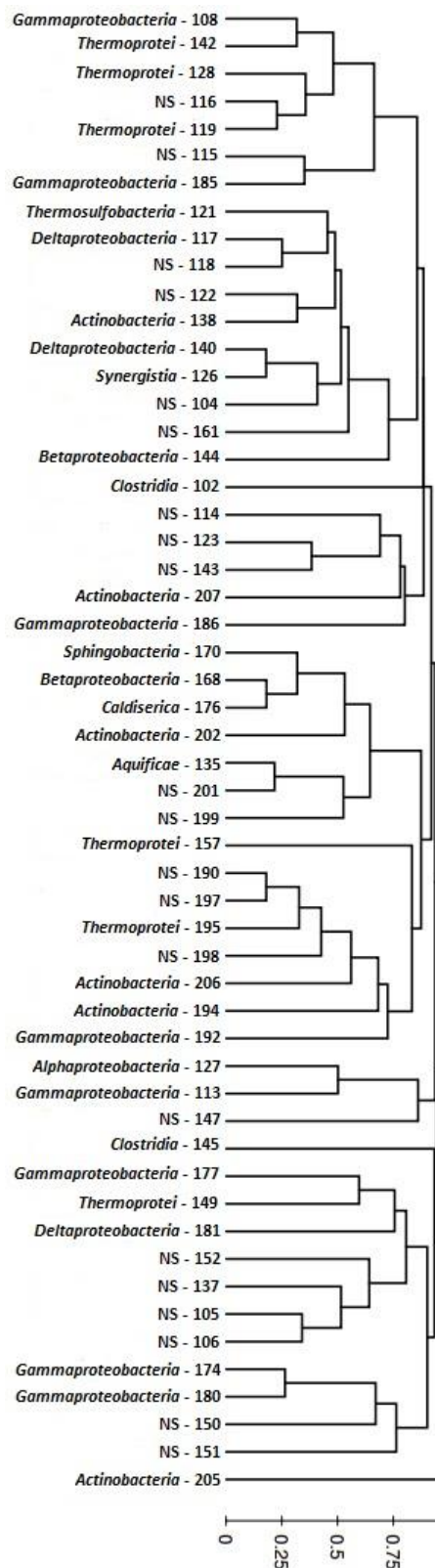
*Identificação dos isolados obtida pelo sequenciamento do *gene 16S rDNA*.

** NS – Não sequenciado.

Foi construído um dendograma a partir de 54 amostras agrupadas e identificadas do solo TRIGOUÉL. Dessas amostras, 30 puderam ser analisadas em nível de classe, o restante não foi possível comparar com as sequências do *gene ribossomal 16S rDNA*, predominando o domínio *Bacteria*, compreendidos nas classes *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*,

Deltaproteobacteria, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Thermodesulfobacteria*, *Synergistia*, *Clostridia*, *Sphingobacteria*, *Caldiserica* e *Aquificae*, e apenas 5 isolados do domínio *Archaea* representados pela classe *Thermoprotei* (Figura 10). A análise do dendograma mostra tendência ao agrupamento por base de classe, embora a quantidade de amostras não fosse o suficiente para identificar os grupos formados. Dois ramos apresentaram bactérias de domínios diferentes, entretanto, observando o índice de similaridade, verificou-se uma distância superior a 50% entre os isolados, sugerindo a baixa similaridade dos mesmos. Vários trabalhos têm demonstrado que a metodologia por espectrometria de massa pode ser utilizada para identificar bactérias ao nível de gênero, espécie ou subespécie (MANDRELL et al., 2005; MURRAY., 2010; SAUER & KLEIN, 2010). Entretanto, os resultados das análises do sequenciamento genético permitiram apenas a identificação parcial dos organismos, os quais puderam ser identificados ao nível de "Classe", exclusivamente. Tais análises serão refinadas para comparação de similaridade e publicação.

Figura 10 –Dendograma de 54 isolados do solo TRIGOUEL baseado nos espectros de massa MALDI-TOF



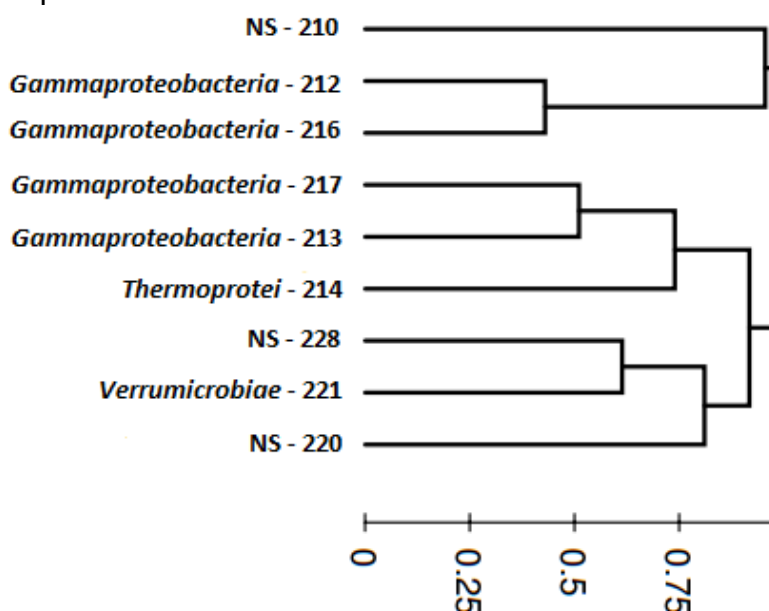
Fonte: A autora (2013)

*Identificação dos isolados obtida pelo sequenciamento do *gene 16S rDNA*.

** NS – Não sequenciado.

Em relação ao TRIGOMAR, foi obtido um dendograma com 9 isolados agrupados e identificados a partir da análise das sequências do *gene 16S rDNA*. Todas as amostras também foram identificadas ao nível de classe, com exceção de 3 amostras não identificadas no sequenciamento. Dos isolados identificados, 4 pertencentes à classe *Gammaproteobacteria* e apenas um pertencente à classe *Verrumicorbiae*, todos representantes do Domínio *Bacteria* e um isolado pertencente à classe *Thermoprotei* - Domínio *Archaea* (Figura 11).

Figura 11 – Dendograma de 9 isolados do solo TRIGOMAR baseado nos espectros de massa MALDI-TOF



Fonte: A autora (2013)

*Identificação dos isolados obtida pelo sequenciamento do *gene 16S rDNA*.

** NS – Não sequenciado.

A técnica de MALDI-TOF tem sido considerada uma técnica revolucionária na identificação de micro-organismos devido à possibilidade de se utilizar células intactas retiradas de colônias crescidas em meio de cultivo. A técnica produz espectros de proteínas de cada espécie, funcionando similarmente a um *fingerprinting*, semelhante ao agrupamento em sequenciamento do *gene 16S*, em que o perfil proteico pode ser submetido às análises de *cluster* que resultam em uma classificação taxonômica das diferentes espécies de acordo com cada espectro de massa (CLAYDON et al., 1996). Uma grande vantagem associada à técnica de MALDI-TOF é o tempo

de análise da amostra, após o crescimento do cultivo, cerca de 30 segundos para ser analisada, enquanto outras metodologias levam de horas a dias. Entretanto, umas das limitações da técnica é a baixa quantidade de informações nos bancos de dados depositadas, sendo as entradas atuais essencialmente de isolados clínicos, prejudicando os trabalhos relacionados às amostras ambientais (ASSIS et al., 2011). Frente a isso, os bancos estão em constantes atualizações com confiabilidade comprovada por publicações de alto impacto comparando-se a espectrometria de massa com outras ferramentas já utilizadas na identificação de micro-organismos (CHERKAOUI et al., 2010; SENG et al., 2009). Com o banco de dados de proteômica se tornando mais popular com organismos de interesse de modo geral, a espectrometria de massa poderá se tornar mais viável na identificação de bactérias, pelo menos em amostras relativamente puras (WUNSCHHEL et al., 2005).

6 CONCLUSÃO

- Foi encontrada uma grande diversidade na comunidade autóctone nos solos UEL frente aos efeitos da adubação nitrogenada e inoculação com bactérias promotoras do crescimento em culturas de cana-de-açúcar e trigo.
- A diversidade mostrou-se menor no solo sob cultivo de trigo, que pode ter sido caracterizado pela alta concentração de Al e baixo pH no solo.
- As bactérias inoculadas não foram recuperadas pela avaliação da diversidade, reforçando caráter de baixa capacidade de resiliência destas BPCVs nos solos estudados.
- Os índices de diversidade obtidos neste trabalho sugerem que as diferentes práticas de manejo induzem a modificação quali-quantitativa das comunidades de diazotróficos do solo, sem relação direta com a inoculação com BPCV.
- As maiores populações bacterianas foram encontradas nos solos que receberam alta adubação nitrogenada, independentemente da utilização de inoculação com BPCV. De acordo com as análises de MALDI-TOF, os dendogramas apresentaram baixa resolução, não confirmando a diferenciação dos isolados de maneira similar à obtida pela análise das sequências do *gene 16S rDNA*, entretanto, a técnica pode apresentar-se como alternativa para estudos de caracterização/identificação de estirpes bacterianas.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, F.; AHMAD, I.; AQIL, F. WANI, A. A.; SOUSCHE, Y. S. Plant growth promoting potential of free-living diazotrophs and other rhizobacteria isolated from Northern Indian soil. **Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 1112–1123, 2006.
- ALI, S.F.; RAWAT, L.S.; MEGHVANSI, M.K.; MAHNA, S.K. Selection of stress-tolerant rhizobial isolates of wild legumes growing in dry regions of rajasthan, india. **Journal of Agricultural and Biological Science**, v.4, p.13-18, 2009.
- ALM, R.; JOHANSSON, P.; HJERNØ, K.; EMANUELSSON, C.; RINGNÉR, M.; HÄKKINEN J.; Detection and identification of protein isoforms using cluster analysis of maldi-ms mass spectra. **Journal Proteome Research**, v.5, p.785-792, 2006.
- ALMEIDA, M.V.R.; OLIVEIRA, T. S.; & BEZERRA, A.M.E. Biodiversidade em sistemas agroecológicos no município de Choró, CE, Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1080-1087, 2009.
- ANEXO À IN SDA 13, DE 25/03/2011, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: www.agricultura.gov, acesso em: 12 de maio 2013.
- ASH, C., PRIEST, F. G.; COLLINS, M. D. *Paenibacillus* gen. nov. and *Paenibacillus polymyxa* comb. nov. In *Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB. International Journal Systematic Bacteriology*, v. 44, p. 852, 1994.
- ASSIS, D. M.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A. A espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de micro-organismos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 9, p. 344-355, 2011.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: Fundamentals and applications**. 4.ed. Menlo Park, Benjamin/Cummings, 694p.,1998.
- AUTOUN, H. BEAUCHAMP, C. J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LANDALE, R. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.) **Plant and Soil**, v. 204, p. 57-67, 1998.
- BACALTCHUK, B.; CHAVES, M.S.; LIMA, M.I.P.M.; COSTAMILAN, J.L.N.M.; SALVADORI, J.R.; GAMBATTO, A. **Características e cuidados com algumas doenças do trigo**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. 11p. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do64.htm>. Acesso em: 03 abr. de 2013.

BACHAR, A.; AL-ASHHAB, A.; SOARES, M. I. M.; SKLARZ, M. Y.; ANGEL, R.; UNGAR, E. D.; GILLOR, O. Soil microbial abundance diversity along a low precipitation gradient. **Microbial Ecology**, v. 60, p. 453-461, 2010.

BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 12, p. 433-439, 1980.

BALDANI, V. L. D.; ALVAREZ, M. A. B.; BALDANI, I. J. I.; DÖBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. In the rizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, v. 90, p. 35-46, 1986.

BALDANI, V. L. D. Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp no processo de colonização e infecção de plantas de arroz, e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ, 1996.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BFN with non-legume plants. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 19, p. 911-922, 1997.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, V. 30, p. 485-491, 2000.

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

BALDANI, V. L. D.; ARAÚJO, J. L. S.; VIDEIRA, S. S.; Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas. **Embrapa- Documento 234**. Seropédica- RJ, 2007.

BAREA, J. M.; AZCO´N, R.; AZCO´N-AGUILAR, C. Mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria. In: VARMA, A.; ABBOTT, L.; WERNER, D.; HAMPP, R. (Eds) **Plant Surface Microbiology**. Springer-Verlag, p. 351–371, 2005.

BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, vol. 16, p. 729-770, 1998.

BASHAN, Y.; DE - BASHAN, E. Bacteria. **Encyclopedia of Soils in the Environment**, v.1, p. 103-115, 2005.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L.E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, p. 77–136, 2010.

- BAUDOIN, E.; LERNER, A.; MIRZA, M. S.; ZEMRANY, E.; PRIGENT-COMBARET, C.; JURKEVICH, E.; SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; NAZARET, S.; OKON, Y.; MOËNE-LOCCOZ, Y. Effects of *Azospirillum brasilense* with genetically modified auzin biosynthesis gene *ipdC* upon the diversity of the indigenous microbiota of the rhizosphere. **Research in Microbiology**, v.161, p. 219 – 226, 2010.
- BECERRA-CASTRO, C.; KIDD, P. S.; PRIETO-FERNÁNDEZ, A.; WEYGENS, N.; ACEA, M. J.; VANGRONSVELD, J. Endophytic and rizoplane bacteria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: isolation and characterization. **Plant Soil**, v. 340, p. 413-433, 2011.
- BENEVUZI, A., MOREIRA, F.; COSTA, P. B.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; FAVRETO, R.; BALDANI, J. I.; PASSAGLIA, L. M. P. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 94 – 104, 2013.
- BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M. J.; BAKKER, P. A. H. M. The rizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, v. 17, p. 478 – 486, 2012.
- BHATTACHARJEE, R.B.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S.N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertilizer for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.80, p. 199–209, 2008.
- BONIEK, D.; FIGUEIREDO, D.; PULRO, V.S.; DUARTE, G. F. Characterization of bacterial strains capable of desulphurization in soil and sediment samples from Antarctica. **Extremophiles**, v.14, p. 475-481, 2010.
- BOSCHINI, A. P. M. **Produtividade e qualidade de grãos de trigo influenciados por nitrogênio e lâminas de água no Distrito Federal.** Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Agronomia). Universidade de Brasília, Brasília, 2010.
- BRONSON, K. F.; NEUE, H. U.; SINGH, U.; ABAO, E. B. Automated chamber measurements of methane and nitrous oxide flux in a flooded rice soil. 1. Residue nitrogen and water management. **Soil Science Society of America Journal**, v. 61, p. 981-987, 1997.
- BROSIUS, J.; PALMER, M.L.; KENNEDY, P.J.; NOLLER, H.F. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, v.75, p.4801-4805, 1978.
- BRUCE, T.; MARTINEZ, I. B.; MAIA NETO, O.; VICENTE, A. C. P.; KRUGER, R.H.; THOMPSON, F. L. Bacterial community diversity in the Brazilian Atlantic Forest soils. **Microbial Ecology**, v. 60,p. 840-849, 2010.

- BUCHER, C. A.; REIS, V. M. **Biofertilizante contendo bactérias diazotróficas**. *Seropédica*, RJ. Embrapa Agrobiologia – Documentos 247, 2008.
- BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p. 573-606, 2000.
- BÜNEMANN, E. K.; SCHWENKE, G.D.; VAN ZWIETEN, L. Impact of agricultural inputs on soil organisms – A review. **Australian Journal of Soil Research**, v. 44, p. 379-406, 2006.
- BUSCOT, F. What are soils? In: BUSCOT, F.; VARMA, S. (Eds) **Micro-organisms in soils: roles in genesis and functions**. Springer-Verlag, p. 3–18, 2005.
- CÂMARA, G. M. S. Inoculação das sementes de soja. In: CÂMARA, G. M. S. Soja: **Tecnologia de produção**. Piracicaba: [s.n.], p. 278-293, 1998.
- CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. SAMS-AGRI – Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos SCOTT-KNOTT, TUKEY e DUNCAN. **Revista Brasileira de Agrocomputação** v. 1, p. 18-24, 2001.
- CANTÚ, M.D; CARRILHO, E.; WULFF, N.A; PALMA, M.S. Sequenciamento de Peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v. 31, p. 669-675, 2008.
- CAVALCANTI, V. A. & DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 108, p. 23-31, 1988.
- CHAPAVAL, L.; OLIVINDO, C. S.; SOUZA, F.G.C.; ALVES, F. S. F.; FROTA, I. M. A. Detecção de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra em sala de ordenha. **Comunicata Scientiae**, v.1, p. 49-56, 2010.
- CHERKAOUI, A.; HIBBS, J.; EMONET, S. Comparison of two matrix assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine bacterial speciation. **Journal Clinical Microbiology**, v. 48, p.1169–1175, 2010.
- CIDADE, D. A. P.; GARCIA, R. O.; DUARTE, A. C.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSEUR, E. Morfogênese *in vitro* de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 385-391, 2006.
- CLAYDON, M. A.; DAVEY, S. N.; EDWARDS-JONES, V.; GORDON, D. B. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 1584–1586, 1996.

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

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_09_19_09_49_47_boletim_setembro-2011..pdf>. Acesso em: 20 ago 2012.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) **1º Levantamento cana-de-açúcar - Maio/2013**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2>>. Acesso em: 25 abr 2013.

COPLANA – Associação dos Fornecedores de Cana de Guariba. Disponível em: <http://www.coplana.com/gxpsites/hgxpp001.aspx?1,5,313,O,P,0,MNU;E;32;2;MNU;> Acesso 28 maio 2012.

COLWELL, R. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.18, p.302-307, 1997.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Review**, v. 36, p. 380–407, 2012.

DALLA SANTA, O. R.; HERNÁNDEZ, R. F.; ALVAREZ, G. L. M.; RONZELLI JUNIOR, P.; SOCCOL, C. R. *Azospirillum* sp. Inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 843 – 850, 2004.

DANIEL, R. The metagenomics of soil. **Nature**, v.3, p.470-478, 2005.

DE BRUIJIN, F.J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacterial. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2180-2187, 1992.

DEMIREV, P.A.; HO, Y.P.; RYZHOV, V.; FENSELAU, C. Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. **Analytical Chemistry**, v. 71, p. 2732–2738, 1999.

DENG, H. A review of diversity stability relationship of soil microbial community: What do we do not Know? **Journal of Environmental Sciences**, v. 24, p. 1027-1035, 2012.

DING, G. C.; PICENO, Y. M.; HEUER, H.; WEINERT, N.; DORHMANN, A. B.; CARRILLO, A.; ANDERSEN, G. L.; CASTELLANOS, T.; TEBBE, C. C.; SMALLA, K. Change of soil bacterial diversity as a consequence of agricultural land use in a semi-arid ecosystem. **Plos One**, v.8, p.1-10, 2013.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; AMBER, T.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, P.; LABANDERA-GONZALEZ, C.; CABALLERO-MELLADO J. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 1–9, 2001.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, p. 107–149, 2003.

DOBEREINER, J.; RUSCHEL, A.P. Uma nova especie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**, Lisboa, v.1, p.261-272, 1958.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; REIS, V. M. Endophytic diazotrophs: The key to BNF in non-leguminous plants. In: The International Symposium on Nitrogen Fixation with Non- legumes, Ismalia, v: 6, p. 52, 1993.

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

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

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 771-774, 1997.

DUNBAR, J.; BARNS, S. M.; TICKNOR, L. O.; KUSKE, C. R. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3035-3045, 2002.

EMBRAPA. Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos. Brasília, DF: Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Serviço de Produção e Informação, 2006.

EMBRAPA TRIGO. **Cultivo de Trigo**, 2009. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Trigo/CultivodeTrigo/index.htm>> Acesso em 20 out 2012.

ENRIQUEZ-OBREGÓN, G. A.; VÁZQUEZ-PADRÓN, R. I.; PRIETO SAMSONOV, D. L.; DE LA RIVA, G. A.; SELMAN-HOUSSEIN, G. Herbicide - resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium* – mediated transformation. **Planta**, v. 206, p. 20-27, 1998.

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

EVANS, H. J.; BURRIS, R. H. Highlights in biological nitrogen fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (Eds) **Biological nitrogen fixation**. Chapman and Hall, p. 192, 1992.

FAORO, H. **Determinação da diversidade de Archaea e Bacteria da Mata Atlântica Paranaense**. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2006.

FERREIRA, L.; SÁNCHEZ-JUANES, F.; GARCÍA-FRAILE, P.; RIVAS, R.; MATEOS, P.F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; GONZÁLEZ-BUITRAGO, J. M.; VELÁZQUEZ, E. MALDI-TOF mass spectrometry is a fast and reliable platform for identification and ecological studies of species from family *Rhizobiaceae*. **PLoS ONE**, v. 6, 2011.

FERREIRA, J. S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, p. 179-185, 2010.

FERNANDES, M. I. B. M. **Embrapa Trigo**. Disponível em: www.embrapa.br/biblio/p_do04_1.htm. Acesso em: 19 ago 2012.

FIGUEIREDO, M. V. B; BURITY, H. A; STAMFORD, N. P; SANTOS, C. E. R. S. **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Ed. Agrolivros. Guaíba, RS, 2008.

FISCHER, D.; PFITZNER, B.; SCHIMD, M.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; REIS, V. M.; PEREIRA, W.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; HAI, B.; HOFMANN, A.; SCHLOTTER, M.; MARTINEZ-ROMERO, E.; BALDANI, J. I.; HARTMANN, A. Molecular characterization of the diazotrophic bacterial community in uninoculated field-grow sugarcane (*Saccharum sp.*). **Plant and Soil**, 2011.

FRANCHE, C.; LINDSTROM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant and Soil**, v. 321, p. 35-59, 2009.

FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; CABALLERO-MELLADO, J. Bacterial biofertilizers. In: Z.A. Siddiqui (Ed). *PGPR: Biocontrol and Biofertilization.*, Netherlands, p. 143–172, 2001.

GIRVAN, M. S.; BULLMORE, J.; PRETTY, J. N.; OSBORN, A. M.; BALL, A. S. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in Arabic soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v 69, p. 1800 – 1809, 2003.

- GOES, K. C. G. P. **Caracterização bioquímica e molecular de bactérias promotoras do crescimento vegetal associadas ao girassol (*Helianthus annuus*)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2011.
- GOMEZ, S. P. M. **Diversidade de bactérias diazotróficas e fixação biológica do nitrogênio na Mata Atlântica**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. 2012.
- GRACIOLLI, L. A.; FREITAS, J. R.; RUSCHEL, A. P. Bactérias fixadoras de nitrogênio nas raízes, caules e folhas de cana-de-acúcar (*Saccharum* sp.). **Revista de Microbiologia**, v.14, p. 191–196, 1983.
- HEAD, I., J. R. SAUNDERS, AND R. W. PICKUP. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**. v. 35, p.1–21, 1998.
- HEIN, J. W.; WOLFEE, G. V.; BLEE, K. A. Comparison of rhizosphere bacterial communities in *Arabidopsis thaliana* mutants for systemic acquired resistance. **Microbial Ecology**, V. 55, p. 333 – 343, 2008.
- HERSCHKOVITZ, Y.; LERNER, A. DAVIDOV, ROTHBALLER, M.; HARTMANN, A.; OKON, Y.; JURKEVITCH, E. Inoculation with the plant-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* causes little disturbance in the rhizosphere and rhizoplane of Maize (*zea mays*). **Microbiology Ecology**, v.50, p. 277 – 288, 2005.
- HO, Y. P.; REDDY, P. M. Advances in mass spectrometry for the identification of pathogens. **Mass Espectrometry Reviews**, v. 30, p. 1203-1224, 2011.
- HOWARD, B. J.; REES, D. C. Structural basis of biological nitrogen fixation. **Chemical Reviews**, v. 96, p. 2965-2982, 1996.
- HUGENHOLTZ, P; PACE, N. R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **Trend in Biotechnology**, v. 14, p. 190-197, 1996.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of mayze and wheat in Brazil. **Plant Soil**, v. 331, p. 413 – 425, 2010.
- HUNTER-CEVERA, J.C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, v.1, p.278-285, 1998.
- IAPAR. **Monitoramento Agroclimático do Paraná**. Londrina, 2007. Disponível em: <http://200.201.27.14/Site/Sma/Index.html> Acesso em: 11 out 2011.

ISLAM, R.; TRIVEDI, P.; PALANIAPPAN, P.; REDDY, M. S.; SA, T. Evaluating the effect of fertilizer application on soil based cropping system using fatty acid methyl esters (FAME) analysis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1115 – 1117, 2009.

ISLAM, R.; TRIVEDI, P.; MADHAIYAB, M.; SESHADRI, S.; LEE, G.; YANG, J.; KIM, Y.; HAN, G.; CHAUHAN, P. S.; SA, T. Isolation, enumeration, and characterization of diazotrophic bacteria from paddy soil sample under long-term fertilizer management experiment, **Biology and Fertility Soils**, v.46, p. 261-269, 2010.

JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic associative symbiosis. **Field Crops Research**, v. 65, p. 1997 – 1209, 2000.

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

JHA P, KUMAR A. Characterization of novel plant growth promoting endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from wheat plants. **Microbial Ecology**, v. 58, p.179–188, 2009.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKES, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: Can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biochemistry**, v. 36, p. 1229-1244, 2004.

KLEEBERGER A.; CASTORPH H.; KLINMULLER W. The rhizosphere microflora of wheat and barley with special reference to gram negative bacteria. **Archive of Microbiology**, v. 136:p. 306–311, 2011.

KOUBEK, J.; UHLIK, O.; JECNA, K.; JUNKOVA, P.; VRKOSLAVOVA, J.; LIPOV, J.; KURZAWOVA, V.; MACEK, T.; MACKOVA, M. Whole-cell MALDI-TOF: Rapid screening method in environmental microbiology. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 69, p. 82-86, 2012.

KRAISER T.; GRAS, D. E.; GUITÉRREZ, A. G.; GONZÁLEZ, B.; GUITÉRREZ, R. A. A holistic view of nitrogen acquisition in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 1455 – 1466, 2011.

KUNDU BS, BATRA R, KHARB P, TAURO P. Dinitrogen fixation in wheat and characterization of associated diazotrophs. **Proceedings of the Indian National Science Academy (Plant Sci)**, v. 96, p.9–15, 1986.

KUSS, A. V. **Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, 2006.

LADHA, J.K.; PATHAK, H.; KRUPNIK, T.J.; SIX, J.; KESSEL, C.V. Efficiency of fertilizer nitrogen in cereal production: retrospect and prospects. **Advances in Agronomy**, v.87, p. 85-156, 2005.

LADHA, J. K.; BARRAQUIO, W. L.; WATANABE, I. Isolation and identification of nitrogen-fixing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella planticola* associated with rice plants. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 1301 – 1308, 1983.

LAGUERRE, G., VAN BERKUM, P., AMARGER, N. AND PREVOST, D. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.4748-4758, 1997.

LIMA, R. C.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; ANDREANI JUNIOR, R.; FONSECA, L. Caracterização fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de cana-de-açúcar. **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, Medellín, v. 64, 5803 – 5813, 2011.

LIRA-CADETE, L.; FARIAS, A. R. B.; RAMOS, A. P. S.; COSTA, D. P.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Variabilidade genética de bactérias diazotróficas associadas a plantas de cana-de-açúcar capazes de solubilizar fosfato inorgânico. **Bioscience Journal**, v. 28, p. 122-129, 2012.

LUDWIG, W.; K. H. SCHLEIFER. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, p. 155–173, 1994.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1128 p.

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M. KUYKENDALL, J. R. DÖBEREINER, J. A. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 417-430, 1983.

MAGNANI, G. S. **Diversidade de bactérias endofíticas em cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-graduação em Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2005.

MAIDAK, B. L.; OLSEN, G. J.; LARSEN, N.; OVERBEEK, R.; McCAUGHEY, M. J.; WOESE, C. R.; The RDP (Ribosomal Database Project). **Nucleic Acids Research**, v. 25, 1997.

MANDRELL, R. E.; HARDEN, L. A.; BATES, A.; MILLER, W. G.; WILLIAM F. HADDON, W. F.; FAGERQUIST C. K. Speciation of *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, *C. helveticus*, *C. lari*, *C. sputorum*, and *C. upsaliensis* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization –time of flight mass spectrometry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 6292–6307, 2005.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/trigo. Acesso em: 19 ago 2012.

- MARRA, L. M.; GRAZZIOTI, P. H.; NUNES, V. R.; MOREIRA, F. M. S. Diazotrophic bacteria on star flowers. **Bioscience Journal**, v. 28, p. 17-24, 2012.
- MARON, P. A.; MONGEL, C.; RANJARD, L. Soil microbial diversity: methodological strategy spatial overview and functional interest. **Complete Rendus Biologies**, v. 334, p. 403-411, 2011.
- MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; ARAÚJO, W. L.; RAAIJMAKERS, J. M. Diversity of cultivated endophytic bacteria characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 7259 – 7267, 2007.
- MIRASANI, M. Soil microbes and plant fertilization. **Applied Microbiology and Biothechnology**, v. 92, p. 875 – 885, 2011.
- MIRZA, M. S.; MEHNAZ, S.; NORMAND, P.; PRIGENT-COMBARET, C.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; BALLY, R.; MALIK, K. A. Molecular characterization and PCR detection of a nitrogen-fixing *Pseudomonas* strain promoting rice growth. **Biology and Fertility of Soils**, v. 43, p. 163–170, 2006.
- MISKO, A.L.; GERMIDA, J.J. Taxonomic and functional diversity of *Pseudomonas* isolated from the roots of field-grown canola. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 42, p. 399-407, 2002.
- MITTAL, S.; JOHRI, B. N. Assessment of rhizobacterial diversity of *Triticum aestivum* and *Eleusine coracana* from Northern region of India. **OSEAN Centre of Biodiversity**, v. 93, p. 1530-1539, 2007.
- MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: Diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, p. 74-99, 2010.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras, Editora UFLA – Universidade Federal de Lavras, cap. 9 p. 449- 541, 2006.
- MURRAY, P.R. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.16, p. 1626-1630, 2010.
- NAHER, V. A.; RADZIAH, O.; SHAMSUDDIN, Z. M.; HALIMI, M. S.; RAZI, M. I. Isolation of diazotrophs from different soils of Tanjong Karang rice growing area in Malaysia. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 11, p. 547-552, 2009.
- NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v.54, p. 655–670, 2003.

NASCIMENTO, R. F.; CARDOSO, D. R.; LIMA NETO, B.S.; FRANCO, D. W. Influência do material do alambique na composição química das aguardentes de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v.21, p. 735 – 739, 1998.

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

OLIVARES, F. Bactérias promotoras do crescimento vegetal. **Boletim Informativo da SBCS**, p. 33-34, 2009.

OLIVEIRA, A.L.M., URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, n. 242, p. 205-215, 2002.

OLIVEIRA, R. E. S.; SILVA, M. J.; COUTINHO, E. P.; MOREIRA, R. T.; CRUZ, G. R. B. Perfil e hábitos dos consumidores de cachaça no Estado da Paraíba. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, p. 259 – 270, 2012.

PARK, M.; KIM C.; YANG, J.; LEE, H.; SHIN, W.; KIM, S.; SA, T. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. **Research in Microbiology**, v. 160, p. 127–133, 2005.

PASINATO, A.; MEZIAT, A.; GUARIENTI, E. M.; DALMAGO, G. A.; CUNHA, G. R.; PIRES, J. L. F.; ANJOS, J. M.; CANZIANI, J. R.; FAYET, L. A.; JACOBSEN, L. A.; VIEIRA, R. C. M. T.; GUIMARÃES, V. A. **Oficina sobre o trigo no Brasil**. 1 ed. Passo Fundo: EmbrapaTrigo, p.192, 2009.

PERIN, L.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; CASTRO-GONZALEZ, R.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; CABELLO-AVELLAR, T. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 3103-3110, 2006.

PIMENTEL, D.; WILSON, C.; McCULLUM, C.; HUANG, R.; DWEN, P.; FLACK, J.; TRAN, Q.; SALTMAN, T.; CLIFF, B. Economic and environmental benefits of biodiversity. **JSTOR**, v. 47, p. 747-757, 1997.

POMERANZ, Y. **Modern cereal science and technology**. New York: VHC, p. 469, 1987.

PÖTTKER, D. Recentes avanços no manejo químico do solo para a cultura do milho. In: SANDINI, I. E. and FANCELLI, A. L. (Eds.). **Milho: Estratégias de manejo para a região sul**. Guarapuava; Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária. p. 63-87, 2000.

PROSSER, J. I. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms, **Plant and Soil**, v. 244, pg. 9-17, 2002.

- RADEMAKER, J. L. W.; HOSTE, B.; LOUWS, F. J.; KERSTERS, K. SWWINGS, J.; VAUTERIN, L.; VAUTERIN, P.; BRIUJIN, F. J. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic *fingerprinting* with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 665-677, 2000.
- RAWAT, S.; IZHARI, A.; KHAN, A. Bacterial diversity in wheat rhizosphere and their characterization. **Pelagia Research Library**, v.2, p. 351-356, 2011.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T.; GILLIS, M.; HOSTE, B.; VANCANNEYT, M.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. *Azoarcus gen. nov.*, nitrogen-fixing Proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenus sp. nov.* and *zoarcus communis sp. nov.* **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, p. 574–584, 1993.
- REIS JÚNIOR, F. B.; SILVA, L. G.; REIS, V. M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 985-994, 2000.
- REIS, V. M. **Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas**. Seropédica, RJ. Embrapa Agrobiologia – Documentos 232, 2007.
- ROESCH, L. F. W.. Diversidade de bactérias diazotróficas associadas a plantas de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 1367-1380, 2007.
- RODRIGUES, C.S.; LARANJO, M.; OLIVEIRA, S. Effect of heat and pH stress in the growth of chickpea mesorhizobia. **Current Microbiology**, v.53, p.1-7, 2006.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopathologica**, v.12, p.16, 1986.
- RODRIGUES, W.C. **DivEs - Diversidade de espécies. Versão 2.0. Software e Guia do Usuário**, 2005. Disponível em: <<http://www.ebras.bio.br/dives>>. Acesso em: 05 de abril de 2013.
- ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I.; GATTINGER, A.; GRUNDMANN, S.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum hiltneri sp. nov.*, isolated from surfaced-sterilized wheat roots. **Int Journal of Systematic Evolutive Microbiology**, v. 56, p.1341–1348, 2006.
- RÖSCH, C; BOTHE, H. 2005. Improved assessment of denitrifying, N₂-fixing, and total-community bacteria by terminal restriction fragment length polymorphism analysis using multiple restriction enzymes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p.2026-2035. 2005

SAIT, M.; HUGENHOLTZ, P.; JANSSEN, P. H. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-dependent surveys. **Environmental Microbiology**, v. 4, p. 654-666, 2002.

SANTOS, A. C. A. **Avaliação de genótipos de cana-de-açúcar para as condições edafoclimáticas de Aparecida do Taboado – MS**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Ilha Solteira – SP, 2008.

SASAKI, K.; IKEDA, S.; EDA, S.; MITSUI, H.; HANZAWA, E.; KISARA, C.; KAZAMA, Y.; KUSHIDA, A.; SHINANO, T.; MINAMISAWA, K.; SATO, T. Impacto of plant genotype and nitrogen level on rice growth response to inoculation with *Azospirillum sp.* strain B510 under paddy field conditions. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.56, p. 636 – 644, 2010.

SAUER, S., FREIWALD, A., MAIER, T., KUBE, M., REINHARDT, R., KOSTRZEWA, M.; GEIDER, K.. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. **PLoS ONE**, v. 3, e2843, 2008.

SAUER, S.; KLIEM, M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. **Nature Reviews**, v.8, p.75-82, 2010.

SCHUH, C. A. Biopolímeros como suporte para inoculantes. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2005.

SELDIN L.; VAN ELSAS, J. D.; PENIDO, E. G. C. *Bacillus azotofixans* sp. nov., a nitrogen fixing species from Brazilian soils and grass roots. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 34, p. 451–456, 1984.

SENG, P.; DRANCOURT, M.; GOURIET, F. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 543 – 551, 2009.

SINGLETON, P.; KEYSER, H.; SANDE, E. Development and evaluation of liquid inoculants. In: HERRIDGE, D. (Ed.), Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam. **ACIAR Proceedings**, p. 52-66, 2002.

SMITH, R S. 1992. Legume inoculant formulation and application. **Canadian Journal of Microbiology**. 1992, V. 38, pp. 485-492.

SOUTO, S. M.; DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio atmosférico por *Beijerinckia* na rizosfera do capim elefante (*Pennisetum purpureum*) "elefante de pinda". In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO**, 11, Brasília, DF, Brasil, p. 32-34, 1967.

STEPHENS, J. H.G.; RASK, H. 2000. Inoculant production and formulation. **Field Crops Research**, v. 65, p. 249-258, 2000.

STROSCHEIN, M. R. D.; ELTZ, F. L. F.; ANTONIOLLI, Z. I.; LUPATINI, M.; VARGAS, L. K.; GIONGO, A.; PONTELLI, M. P. Symbiotic efficiency and genetic characteristics of *Bradyrhizobium* sp., strain UFSM LA 1.3. **Scientia Agricola**, v.67, p. 702-706, 2010.

SUZUKI, M., GIOVANNONI, S.J. Bias caused by template annealing in the amplification of 16S rRNA genes by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.625-630, 1996.

TANG, W.; PASTERNAK, J.J.; GLICK, B.R. Stimulation of canola root growth by *Pseudomonas putida* GR12-2 and its genetically engineered derivatives. **Plant and Cell Physiology**, v. 13, p.89–95, 1994.

TERUEL, D. A.; SMIDERLE, O. J.. Trigo (*Triticum aestivum* L.). In: CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A. **Ecofisiologia de cultivos anuais: trigo, milho, soja, arroz, mandioca**. São Paulo: Nobel, p.13-37, 1999.

THAWEENUT, N.; HACHISUKA, Y.; ANDO, S.; YANAGISAWA, S.; YONEYAMA, T. Two reasons' study on *nifH* gene expression and nitrogen fixation by diazotrophic endophytes in sugarcane (*Saccharum* spp. Hybrids): expression of *nifH* genes similar to those of rhizobia. **Plant and Soil**, v. 338, 0. 435 – 449, 2011.

TILAK, K. V. B. R.; RANGANAYAKI, N.; PAL, K. K.; DE, R.; SAXENA, A. K.; NAUTIYAL, C. S.; MITTAL, S.; TRIPATHI, A. K.; JOHRI, B. N. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. **Current Science**, v. 89, p. 136-150, 2005.

TITTABUTR, P.; PAYAKAPONG, W.; TEAUMROONG, N.; SINGLETON, P. W.; BOONKERD, N. Growth, survival and field performance of bradyrhizobial liquid inoculant formulations with polymeric additives. **Science Asia**. v. 33, p. 69-77, 2007.

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

TONON, B. C. **Compatibilidade simbiótica e caracterização de rizóbios de *Lotus* spp. isolados do Rio Grande do Sul**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 2008.

TORRES, A. R. **Diversidade genética de enterobactérias endofíticas de diferentes hospedeiros e colonização de *Catharantus roseus* por endófitos expressando o gene *gfp***. Tese de Doutorado (Pós-graduação em Agronomia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba – SP, 2005.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 240-245, 2002.

TYSON, G.W.; CHAPMAN, J.; HUGENHOLTZ P.; ALLEN, E.E.; RAM, R.J.; RICHARDSON, P.M.; SOLOVYEV, V.V.; RUBIN, E.M.; ROKHSAR, D.S.; BANFIELD, J.F. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. **Nature**, v.428, p.37-43, 2004.

UPADHYAY, S. K.; SINGH, D. P.; SAIKIA, R. Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from rhizospheric soil of wheat under saline conditions. **Current Microbiology**, v. 59, p.489–496, 2009.

VAL-MORAES, S. P. **Impacto do lodo de esgoto na comunidade bacteriana do solo: Avaliação por microarranjo de DNA**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal- SP, 2008.

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina - DF: EMBRAPA – CPAC, 594p. 1997.

VARGAS, L.K.; SCHOLLES, D. Biomassa microbiana e produção de C-CO₂ e N-mineral de um solo Podzólico Vermelho - Escuro submetido a diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p.35-42, 2000.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; BRUIJN, F. J. D.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods Molecular Cellular Biology**, v. 5, p. 25-10, 1994.

VIDEIRA, S. S.; OLIVEIRA, D. M.; MORAIS, R. F.; BORGES, W. L.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. **Plant Soil**, v. 356, p. 51-56, 2012.

VENIERAKI, A.; DIMOU, M.; PERGALIS, P.; KEFALOGIANNI, I.; CHATZIPAVLIDIS, I.; KATINAKIS, P. The genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat. **Microbial Ecology**, v. 61, p. 277 – 285, 2011.

WUNSCHER, S. C.; JARMAN, K. H.; PETERSEN, C. E.; SCHAUKI, D.; JAKMAN, J.; NELSON, C.P.; WHITE, V. E. Bacterial analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. An inter-laboratory comparison. **Journal American Society for Mass Spectrometry**, v. 16, p. 456 – 462, 2005.

YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R.M.; EVANS, H. J. **Biological nitrogen fixation**, Chapman e Hall, 1992.

ANEXOS

ANEXO A

Solução salina (Baldani & Döbereiner, 1980)

1 mL de K_2HPO_4 solução 10%

0,5 mL de $MgSO_4 \cdot H_2O$ solução 10%

0,2 mL de NaCl a solução 10%

0,5 mL de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ solução 1%

1 mL de FeEDTA a solução 1,64%

- Completar para 1L com água destilada;

- Autoclavar por 20 min a 121 °C.

ANEXO B

Meio de cultura seletivos

Meio LGI (Magalhães et al., 1983)

5 g de sacarose

2 mL de K_2HPO_4 solução 10%

6 mL de KH_2PO_4 solução 10%

2 mL de $MgSO_4 \cdot H_2O$ solução 10%

2 mL de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ solução 1%

2 mL de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ solução 0,1%

1 mL de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ solução 1%

5 mL de Azul de Bromotimol solução 0,5% em 0,2N de KOH

4 mL de FeEDTA solução 1,64%

- Ajustar o pH para 6,0-6,2 com solução H_2SO_4 a 5%;
- Completar para 1L com água destilada;
- Adicionar $1,4 \text{ g.L}^{-1}$ de ágar para meios semi-sólidos;
- Autoclavar por 20 min a $121 \text{ }^\circ\text{C}$.

Meio LGI-P (Döbereiner et al., 1995) adaptado.

40 g de sacarose

2 mL de K_2HPO_4 solução 10%

6 mL de KH_2PO_4 solução 10%

2 mL de $MgSO_4 \cdot H_2O$ solução 10%

2 mL de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ solução 1%

2 mL de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ solução 0,1%

1 mL de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ solução 1%

5 mL de Azul de Bromotimol solução 0,5% em 0,2N de KOH

- Ajustar o pH para 5,5 com solução ácido acético a 1%;
- Completar para 1L com água destilada;
- Adicionar $1,3 \text{ g.L}^{-1}$ de ágar para meios semi-sólidos;
- Autoclavar por 20 min a $121 \text{ }^\circ\text{C}$.

Meio JNFb (Baldani, 1996)

5 g de ácido málico

- 6 mL de K_2HPO_4 solução 10%
- 18 mL de KH_2PO_4 solução 10%
- 2 mL de $MgSO_4 \cdot H_2O$ solução 10%
- 1 mL de NaCl solução 10%
- 2 mL de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ solução 1%
- 2 mL de Azul de Bromotimol solução 0,5% em 0,2N de KOH
- 4 mL de FeEDTA solução 1,64%
- 2 mL de solução de micronutrientes
- 4,5 g de KOH
- Ajustar o pH para 5,8 com solução de KOH a 1%;
- Completar para 1L com água destilada;
- Adicionar $1,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de ágar para meios semi-sólidos;
- Autoclavar por 20 min a $121 \text{ }^\circ\text{C}$.

Meio NFb (Baldani & Döbereiner, 1980)

- 5 g de ácido málico
- 5 mL de K_2HPO_4 solução 10%
- 2 mL de $MgSO_4 \cdot H_2O$ solução 10%
- 1 mL de NaCl solução 10%
- 2 mL de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ solução 1%
- 2 mL de Azul de Bromotimol solução 0,5% em 0,2N de KOH
- 4 mL de FeEDTA solução 1,64%
- 2 mL de solução de micronutrientes
- 4,5 g de KOH
- Ajustar o pH para 6,5 com solução de KOH a 1%;
- Completar para 1L com água destilada;
- Adicionar $1,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de ágar para meios semi-sólidos;
- Autoclavar por 20 min a $121 \text{ }^\circ\text{C}$.

Meio JMV (Baldani, 1996)

- 5 g de manitol
- 6 mL de K_2HPO_4 solução 10%
- 18 mL de KH_2PO_4 solução 10%
- 2 mL de $MgSO_4 \cdot H_2O$ solução 10%

1 mL de NaCl solução 10%

2 mL de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ solução 1%

2 mL de Azul de Bromotimol solução 0,5% em 0,2N de KOH

4 mL de FeEDTA solução 1,64%

2 mL de solução de micronutrientes

- Ajustar o pH para 5,0-5,4;

- Completar para 1L com água destilada;

- Adicionar $1,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de ágar para meios semi-sólidos;

- Autoclavar por 20 min a $121 \text{ }^\circ\text{C}$.

Obs. Nos meios sólidos foi adicionado 100 g de extrato de levedura.

Solução de micronutrientes para meios de cultura (Döbereiner et al., 1995)

1 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

1,175 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

1,4 g de H_3BO_3

0,04 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

0,12 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

- Completar o volume para 1L com água destilada;

- Autoclavar por 20 min a $121 \text{ }^\circ\text{C}$.

ANEXO C

Meio mínimo (SAIT et al., 2002)

- Solução com concentração 100x

0,52 g de extrato de levedura

0,65 g de triptona

6,5 g de glicose

0,0715 g de K_3HPO_4

0,0552 g de KCl

0,016 g de $CaCl_2$

0,016 g de $MgSO_4$

- Completar o volume para 1L com água destilada.

- Solução com concentração 10000x

0,033 g de $FeCl_3$

0,033 g de $MnSO_4$

0,286 g de Bromocresol

- Completar o volume para 1L com água destilada.

PREPARO:

Em 1L de meio mínimo:

- 10 mL de solução 100x;

- 0,1 mL da solução 10000x;

- 15 g de ágar.

- Autoclavar por 20 min a 121 °C.

ANEXO D

Meio Dygs (RODRIGUES NETO, et al., 1986)

2 g de glicose,

1,5 g de peptona,

2 g extrato de levedura,

0,5 g de K_2HPO_4

0,5 de $MgSO_4$

- Ajustar o pH 6,0;
- Completar para 1L com água destilada;
- Autoclavar por 20 min a 121 °C.

ANEXO E

Lista dos isolados obtidos dos solos sob cultivos de cana-de-açúcar e trigo
(Fazenda Escola – UEL) e trigo (Marechal Cândido Rondon)

TABELA A – Identificação dos isolados obtidos do solo sob cultivo de cana-de-açúcar – Fazenda Escola – UEL

Identificação	Tratamento	Meio	Diluição	Variedade da Cana	Classificação (Classe)
1	SI-N0	M.M	-5	RB855536	<i>Thermoprotei</i>
2	SI-N0	M.M	-4	RB855536	<i>Clostridia</i>
3	SI-N120	M.M	-5	RB855536	<i>Thermoprotei</i>
4	SI-N120	M.M	-5	RB855536	<i>Methanomicrobia</i>
5	SI-N120	M.M	-5	RB855536	<i>Alphaproteobacteria</i>
6	Emb-N0	M.M	-5	RB855536	<i>Methanobacteria</i>
7	Emb-N0	M.M	-4	RB855536	<i>Thermoprotei</i>
8	Emb-120	M.M	-6	RB855536	<i>Thermoprotei</i>
9	Emb-120	M.M	-5	RB855536	<i>Methanomicrobia</i>
10	Emb-120	M.M	-4	RB855536	<i>Betaproteobacteria</i>
11	Emb-120	M.M	-5	RB855536	<i>Spirochaetes</i>
12	Tur-N0	M.M	-4	RB855536	Não sequenciado
13	Tur-N0	M.M	-4	RB855536	<i>Planctomycetacia</i>
14	Tur-N120	M.M	-6	RB855536	Não sequenciado
15	Uel-N120	M.M	-4	RB855536	<i>Actinobacteria</i>
16	SI-N0	M.M	-5	RB72454	<i>Actinobacteria</i>
17	SI-N0	M.M	-4	RB72454	<i>Actinobacteria</i>
18	Emb-N0	M.M	-5	RB72454	<i>Gammaproteobacteria</i>
19	Emb-N0	M.M	-6	RB72454	<i>Actinobacteria</i>
20	Tur-N0	M.M	-4	RB72454	<i>Thermoprotei</i>
21	Tur-N0	M.M	-4	RB72454	<i>Deltaproteobacteria</i>
22	Tur-N120	M.M	-5	RB72454	<i>Thermoprotei</i>
23	Uel-N120	M.M	-5	RB72454	<i>Actinobacteria</i>
24	Uel-N120	M.M	-4	RB72454	<i>Deltaproteobacteria</i>
25	Uel-N120	M.M	-5	RB72454	<i>Betaproteobacteria</i>
26	SI-N0	LGI	-4	RB72454	Não sequenciado
27	Uel-N120	LGI	-5	RB855536	<i>Betaproteobacteria</i>
28	Uel-N0	LGI	-6	RB72454	<i>Betaproteobacteria</i>
29	Emb-N0	LGI	-6	RB72454	<i>Betaproteobacteria</i>

30	Uel-N120	JNFB	-5	RB855536	<i>Negativicutes</i>
31	Tur-N0	LGI	-5	RB855536	<i>Betaproteobacteria</i>
32	SI-N120	LGI	-5	RB72454	Não sequenciado
33	Tur-N0	JNFb	-4	RB72454	Não sequenciado
34	Emb-N0	JNFb	-4	RB855536	Não sequenciado
35	SI-N120	JNFb	-6	RB855536	<i>Actinobacteria</i>
36	SI-N120	LGI	-4	RB855536	Não sequenciado
37	Uel-N120	JNFb	-4	RB72454	<i>Gammaproteobacteria</i>
38	Uel-N0	JNFb	-4	RB72454	Não sequenciado
39	SI-N120	JNFb	-4	RB72454	Não sequenciado
40	SI-N120	LGI	-4	RB855536	<i>Thermoplasmata</i>
41	SI-N0	JNFb	-4	RB855536	<i>Gammaproteobacteria</i>
42	Uel-N0	JNFb	-4	RB72454	<i>Thermoprotei</i>
43	SI-N0	LGI	-5	RB72454	<i>Betaproteobacteria</i>
44	Uel-N0	LGI	-4	RB855536	Não sequenciado
45	SI-N0	LGI	-4	RB72454	<i>Clostridia</i>
46	Uel-N120	LGI	-5	RB72454	Não sequenciado
47	SI-N120	JMV	-5	RB855536	<i>Gammaproteobacteria</i>
48	Uel-N0	LGI	-5	RB855536	<i>Aquificae</i>
49	SI-N0	NFb	-4	RB855536	Não sequenciado
50	Emb-N120	LGI	-4	RB72454	<i>Betaproteobacteria</i>
51	Uel-N120	JNFb	-4	RB72454	<i>Actinobacteria</i>
52	Uel-N0	LGI	-5	RB72454	<i>Clostridia</i>
53	Emb-N0	LGI	-5	RB72454	Não sequenciado
54	Emb-N0	LGI- P	-4	RB72454	<i>Alphaproteobacteria</i>
55	Emb-120	LGI	-5	RB72454	<i>Betaproteobacteria</i>
56	SI-N0	JNFb	-4	RB855536	Não sequenciado
57	SI-N120	JNFb	-5	RB855536	<i>Gammaproteobacteria</i>

Fonte: A autora (2013).

TABELA B – Isolados obtidos do solo sob cultivo de trigo – Fazenda Escola – UEL

Identificação	Tratamento	Meio	Diluição	Classificação (Classe)
101	AbV51130	LGI-P	-4	<i>Gammaproteobacteria</i>
102	AbV51130	JNFb	-4	<i>Clostridia</i>
103	AbV5450	LGI-P	-4	Não sequenciado
104	SI-N120	JNFb	-4	Não sequenciado
105	SI-N0	JNFb	-4	Não sequenciado
106	AbV5410	JNFb	-4	Não sequenciado
107	AbV51110	JMV	-4	Não sequenciado
108	SI-N0	NFb	-5	<i>Gammaproteobacteria</i>
109	AbV5430	JNFb	-4	Não sequenciado
110	AbV51150	JNFb	-4	<i>Betaproteobacteria</i>
111	AbV5410	NFb	-4	Não sequenciado
112	AbV51130	LGI-P	-4	<i>Betaproteobacteria</i>
113	AbV51150	JNFb	-4	<i>Gammaproteobacteria</i>
114	AbV5410	JMV	-4	Não sequenciado
115	AbV51110	NFb	-5	Não sequenciado
116	AbV5410	NFb	-4	Não sequenciado
117	SI-N0	NFb	-4	<i>Deltaproteobacteria</i>
118	AbV5450	JNFb	-4	Não sequenciado
119	AbV51130	LGI-P	-4	<i>Thermoprotei</i>
120	AbV51130	JNFb	-4	<i>Gammaproteobacteria</i>
121	AbV51130	JNFb	-4	<i>Thermodesulfobacteria</i>
122	AbV5430	NFb	-4	Não sequenciado
123	SI-N0	JNFb	-5	Não sequenciado
124	AbV51150	NFb	-4	<i>Thermotogae</i>
125	AbV5410	JNFb	-4	<i>Thermoprotei</i>
126	SI-N0	JNFb	-4	<i>Synergistia</i>
127	AbV5450	JNFb	-4	<i>Alphaproteobacteria</i>
128	AbV5410	JNFb	-4	<i>Thermoprotei</i>
129	AbV5410	JMV	-5	Não sequenciado
130	AbV51110	LGI-P	-4	Não sequenciado
131	AbV51110	LGI-P	-5	Não sequenciado
132	AbV5450	NFb	-4	Não sequenciado
133	SI-N0	NFb	-4	<i>Thermoprotei</i>
134	SI-N120	JNFb	-4	<i>Gammaproteobacteria</i>
135	AbV5430	JMV	-4	<i>Aquificae</i>
136	AbV51130	JMV	-4	<i>Gammaproteobacteria</i>

137	AbV51130	NFb	-4	Não sequenciado
138	AbV5450	JMV	-4	<i>Actinobacteria</i>
139	SI-N0	JMV	-4	<i>Thermotogae</i>
140	SI-N120	JMV	-4	<i>Deltaproteobacteria</i>
141	AbV5410	JMV	-4	<i>Sphingobacteria</i>
142	AbV5450	NFb	-4	<i>Thermoprotei</i>
143	AbV51130	JMV	-4	Não sequenciado
144	AbV5430	JMV	-4	<i>Betaproteobacteria</i>
145	AbV5410	JMV	-4	<i>Clostridia</i>
146	AbV5430	JNFb	-4	<i>Deltaproteobacteria</i>
147	AbV51110	JNFb	-5	Não sequenciado
148	AbV5410	JNFb	-4	<i>Halobacteria</i>
149	SI-N0	JNFb	-4	<i>Thermoprotei</i>
150	AbV5410	LGI-P	-4	Não sequenciado
151	AbV5430	JNFb	-4	Não sequenciado
152	SI-N120	JNFb	-5	Não sequenciado
153	AbV5430	JNFb	-4	<i>Thermoprotei</i>
154	AbV5410	LGI-P	-5	<i>Thermoprotei</i>
155	AbV5430	JNFb	-4	<i>Thermoprotei</i>
156	AbV51130	JMV	-5	<i>Betaproteobacteria</i>
157	SI-N120	JNFb	-4	<i>Thermoprotei</i>
158	AbV51130	NFb	-5	<i>Betaproteobacteria</i>
159	SI-N120	NFb	-4	<i>Sphingobacteria</i>
160	AbV51110	NFb	-4	<i>Methanopyri</i>
161	AbV51130	JNFb	-4	Não sequenciado
162	AbV5410	NFb	-4	<i>Betaproteobacteria</i>
163	SI-N0	NFb	-4	Não sequenciado
164	AbV5410	JMV	-5	Não sequenciado
165	AbV5410	JNFb	-4	<i>Sphingobacteria</i>
166	AbV51130	JMV	-4	<i>Clamydiae</i>
167	SI-N120	JMV	-4	<i>Thermoprotei</i>
168	AbV5450	JMV	-4	<i>Betaproteobacteria</i>
169	AbV5450	JMV	-4	<i>Thermoprotei</i>
170	AbV51110	JMV	-4	<i>Sphingobacteria</i>
171	AbV5410	NFb	-4	<i>Betaproteobacteria</i>
172	AbV51150	NFb	-5	<i>Betaproteobacteria</i>
173	AbV51150	JMV	-5	<i>Thermoplasmata</i>
174	AbV51130	JNFb	-4	<i>Gammaproteobacteria</i>

175	SI-N0	NFb	-5	Não sequenciado
176	AbV51130	JNFb	-5	<i>Caldiserica</i>
177	AbV51150	JNFb	-4	<i>Gammaproteobacteria</i>
178	AbV5430	JNFb	-5	<i>Deltaproteobacteria</i>
179	SI-N0	LGI-P	-5	Não sequenciado
180	AbV51130	LGI-P	-5	<i>Gammaproteobacteria</i>
181	AbV51150	NFb	-4	<i>Deltaproteobacteria</i>
182	AbV5410	JMV	-4	<i>Betaproteobacteria</i>
183	AbV51130	JMV	-5	<i>Flavobacteria</i>
184	AbV51150	NFb	-4	<i>Thermoprotei</i>
185	AbV51110	JNFb	-4	<i>Gammaproteobacteria</i>
186	SI-N120	NFb	-4	<i>Gammaproteobacteria</i>
187	AbV5410	LGI-P	-5	Não sequenciado
188	AbV51110	JNFb	-4	<i>Betaproteobacteria</i>
190	SI-N0	M.M	-5	Não sequenciado
191	SI-N0	M.M	-5	<i>Gammaproteobacteria</i>
192	SI-N120	M.M	-5	<i>Gammaproteobacteria</i>
193	SI-N120	M.M	-6	<i>Actinobacteria</i>
194	AbV5410	M.M	-6	<i>Actinobacteria</i>
195	AbV5410	M.M	-6	<i>Thermoprotei</i>
196	AbV5410	M.M	-6	Não sequenciado
197	AbV5410	M.M	-5	Não sequenciado
198	AbV5410	M.M	-6	Não sequenciado
199	AbV5410	M.M	-6	Não sequenciado
200	AbV5430	M.M	-6	Não sequenciado
201	AbV5430	M.M	-6	Não sequenciado
202	AbV5430	M.M	-6	<i>Actinobacteria</i>
203	AbV5450	M.M	-6	<i>Actinobacteria</i>
204	AbV5450	M.M	-6	Não sequenciado
205	AbV51110	M.M	-6	<i>Actinobacteria</i>
206	AbV51130	M.M	-6	<i>Actinobacteria</i>
207	AbV51130	M.M	-6	<i>Actinobacteria</i>
208	AbV51150	M.M	-6	<i>Actinobacteria</i>
209	AbV51150	M.M	-6	Não sequenciado

Fonte: A autora (2013)

TABELA C – Isolados obtidos do solo sob cultivo de trigo – Marechal Cândido Rondon (PR)

Identificação	Tratamento	Meio	Diluição	Classificação (Classe)
210	ZM35	LGI-P	-5	Não sequenciado
211	SI-120	JNFb	-7	<i>Gammaproteobacteria</i>
212	SI-N0	JNFb	-6	<i>Gammaproteobacteria</i>
213	SI-N0	JNFb	-6	<i>Gammaproteobacteria</i>
214	SI-N0	JNFb	-6	<i>Thermoprotei</i>
215	SI-N0	JMV	-6	<i>Gammaproteobacteria</i>
216	SI-N0	LGI-P	-6	<i>Gammaproteobacteria</i>
217	SI-N120	JNFb	-5	<i>Gammaproteobacteria</i>
218	AbV515	JMV	-5	<i>Betaproteobacteria</i>
219	SI-N0	JNFb	-6	Não sequenciado
220	SI-N0	MM	-6	Não sequenciado
221	SI-N120	MM	-4	<i>Verrumicrobiae</i>
222	SI-N30	MM	-4	Não sequenciado
223	AbV55	MM	-4	<i>Sphingobacteria</i>
224	AbV515	MM	-4	Não sequenciado
225	AbV525	MM	-4	Não sequenciado
226	AbV535	MM	-4	<i>Thermoprotei</i>
227	AbV5ZM35	MM	-4	<i>Thermoprotei</i>
228	ZM35	MM	-4	Não sequenciado

Fonte: A autora (2013)