

Diversidade da microbiota endofítica na cultura da palma (*Opuntia* spp. e *Nopalea* spp.) no Semiárido de Pernambuco

Diversity of endophytic microflora on Cactus Pear (Opuntia spp. and Nopalea spp.) cultivation in the semi-arid region of Pernambuco state, Brazil

Maria Luiza Ribeiro Bastos da Silva^{1,3*}, Adália Cavalcanti do Espírito Santo Mergulhão¹, Carolina dos Santos Figueroa^{1,4}, Djalma dos Santos Cordeiro², Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra¹

¹Laboratório de Genômica, Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Avenida General San Martin, 1371, Bongi, CEP 50761-000, Recife, PE, Brasil

²Estação Experimental de Arcoverde, Instituto Agrônomo de Pernambuco, Arcoverde, PE, Brasil

³Bolsista de Pós-Doutorado – PNPD/CAPES/FINEP

⁴Bolsista de Apoio Técnico – CNPq

*autor correspondente

✉ maria.luiza@ipa.br

RESUMO: Esforços para a seleção de bactérias promotoras do crescimento vegetal têm sido feitos visando não apenas à Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN), mas à produção de fitormônios e outros mecanismos. O objetivo deste estudo foi isolar Bactérias Diazotróficas (BD) endofíticas de palma, determinar a identidade entre sequências do gene *recA*, avaliando o potencial destas quanto à produção de ácido indolacético (AIA) e melanina, e a resistência intrínseca a antibióticos. Os isolamentos foram realizados a partir dos cladódios, em meios semissólidos sem nitrogênio (N). A identificação taxonômica foi determinada pela identidade entre sequências do gene *recA* dos isolados quando comparados com os acessos encontrados no GenBank (*Banco de genes do National Center for Biotechnology Information – NCBI*), utilizando como ferramenta o algoritmo BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) para nucleotídeos. Foram isolados 12 micro-organismos provenientes do interior dos cladódios de palma forrageira de duas regiões do agreste e sertão de Pernambuco. A análise parcial do gene *recA* dos isolados possibilitou a identificação dos gêneros *Azospirillum*, *Bacillus* e *Methylobacterium*. Com o sequenciamento do gene *recA*, as espécies *Azospirillum lipoferum* e *Methylobacterium radiotolerans* formaram um grupo bem conciso (grupo II) e as espécies de *Bacillus pumillus* agruparam-se nos grupos IV e V, com identidades altas com os acessos encontrados no NCBI. No teste colorimétrico para detecção de produção do AIA, oito foram positivos. Para a produção de melanina, todos os isolados mostraram-se positivos. As técnicas bioquímicas e moleculares foram excelentes para observar a diversidade microbiana na cultura da palma.

PALAVRAS-CHAVE: Ácido indolacético, cladódios, gene *recA*, melanina, resistência intrínseca a antibióticos.

ABSTRACT: Efforts for selection of plant growth promoting bacteria have been made with a view not only to biological nitrogen fixation (BNF), but also the production of hormones and other mechanisms. The aim of this study was to isolate Cactus Pear endophytic diazotrophic bacteria (DB) and determine the identity of *recA* gene sequences evaluating the potential of producing indole-acetic acid (IAA), melanin and intrinsic resistance to antibiotics. The isolations were made from cladodes in semi-solid media without N (Nitrogen). The taxonomic identification was determined by the identity between the *recA* gene sequences of isolates compared with accesses found in the GenBank (NCBI - National Center for Biotechnology Information), using the algorithm as a tool for BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) nucleotides. Twelve microorganisms from inside the cladodes of Cactus Pear were isolated in two regions of wild lands and backlands of Pernambuco state. Partial analysis of the *recA* gene of isolates allowed the identification of genera *Azospirillum*, *Bacillus*, *Methylobacterium*. With the sequencing of the *recA* gene, species *Azospirillum lipoferum* and *Methylobacterium radiotolerans* formed a very concise group (group II) and species *Bacillus pumillus* formed clusters in groups IV and V, showing high identities with access found in the NCBI. There were eight positive results in the colorimetric test for detecting the production of IAA; while all isolates were positive for melanin production. Biochemical and molecular techniques were excellent for observing microbial diversity in the culture of Cactus Pear.

KEYWORDS: Indole-acetic acid, cladodes, *recA* gene, melanin, intrinsic resistance to antibiotics.

Introdução

A cultura da palma forrageira (*Opuntia* sp.) foi introduzida no Brasil no final do século XIX, sendo oriunda do México; pertence aos gêneros *Opuntia* e *Nopalea*, ambos da família Cactaceae (SANTOS et al., 2001, 2006). No Nordeste do Brasil, esta cultura tem uma grande importância econômica por ser o principal alimento para os animais na região semiárida. A necessidade de estudos que visem a melhorar a resistência desta cultura contra ataques de insetos e microrganismos faz com que este estudo de diversidade de endofíticos tenha uma grande importância, principalmente porque estes estão envolvidos em muitas rotas metabólicas e podem ajudar na proteção da planta quanto a ataques de patógenos e pragas. Atualmente, tem sido demonstrado que a interação planta-bactéria através do *Quorum sensing* (QS) é requerida para o sucesso da colonização das plantas pelas bactérias e que, em plantas associadas com bactérias Gram-negativas, uma molécula como AHLs (Acil Homoserina Lactona) é usada por micro-organismos simbióticos, patogênicos e estirpes de controle biológico para regular o amplo espectro de fenótipos, incluindo virulência, competência rizosférica, conjugação, secreção de enzimas hidrolíticas e produção de metabólitos secundários (LIU et al., 2011).

Os micro-organismos endofíticos que estão presentes na cultura da palma forrageira geralmente são fungos e bactérias, que interagem e vivem sistematicamente no interior dessas plantas, sem causar aparentemente danos aos seus hospedeiros. Existe uma série de razões para que se aprofundem os estudos com endofíticos, pois vários destes têm apresentado a capacidade de estimular o crescimento das plantas por mecanismos diretos (fixação de nitrogênio e/ou produção de fitormônios) e indiretos (antagonismo contra patógenos ou resistência a drogas) (DÖBEREINER, 1997).

Os fitormônios podem ser classificados como citocinina, giberelina, etileno e auxina, e estudos fisiológicos sugerem muitas ligações entre estes. Diversos outros hormônios modulam ou são modulados pelos níveis de auxina (DEMASON, 2005). O ácido indolacético (AIA) ou auxina é um fitormônio comumente produzido por bactérias promotoras de crescimento, como *Aeromonas veronae*, *Agrobacterium* sp., *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium* sp., *Rhizobium* sp. e *Enterobacter* sp., e é requerido em baixas concentrações, sendo conhecido por sua capacidade de atuar no desenvolvimento da raiz e na divisão celular (VESSEY, 2003).

Devido aos avanços nas pesquisas sobre o potencial de uso de bactérias diazotróficas como alternativa para a nutrição nitrogenada em diversas culturas de importância econômica, a biotecnologia ganhou um novo aliado para diversidade e classificações microbianas dos solos através de metodologias moleculares. O produto do gene *recA* é uma enzima multifuncional amplamente distribuída em procariotos (MILLER; KOKJOHN, 1990). Por ser um gene que está envolvido na recombinação e na reparação do DNA, possui várias funções, como atividade proteásica, que cliva vários repressores, incluindo o produto do gene *lexA* que inicia a cascata de reações e induz mais de 15 genes reparadores SOS. O gene *recA* também se liga ao DNA de cadeia simples

e desenrola o DNA de fita dupla antes do emparelhamento homólogo. Em razão disto, o papel desta molécula é crucial em todos os procariotos.

Estudos realizados por Scholz et al. (2008) demonstraram que a análise comparativa baseada em nucleotídeos do gene *recA* fornece maior resolução em nível de subespécies do que os genes *rrs* (genes ribossomais) e que as sequências geradas por genes *recA* podem ser usadas para determinar a posição taxonômica de novos isolados. O gene *recA* permite melhor discriminação do que o gene 16S rDNA. Entretanto, as análises obtidas do gene *recA* não são exatamente semelhantes às obtidas pela filogenia da sequência do gene 16S rRNA, indicando maior grau de resolução entre espécies relacionadas (PAYNE et al., 2006).

A falta de conhecimento sobre a ocorrência de bactérias endofíticas em palma forrageira quanto a sua identidade e diversidade, e sobre os níveis populacionais nos diferentes tecidos ainda constitui um enigma. Para entender a íntima relação que desenvolveram estes micro-organismos com a sua planta hospedeira, faz-se necessário estudar o papel dos endofíticos e suas interações na cultura da palma. Tal conhecimento poderá conferir grandes benefícios e melhorar a dinâmica dos ecossistemas, porque os endofíticos são capazes de promover o crescimento nas plantas e aumentar a capacidade destas para lidar com os estresses bióticos e abióticos. De acordo com Souza (2001), têm sido destacadas diversas alternativas envolvendo a aplicação de agentes microbianos para prevenção e controle de doenças e pragas na agricultura. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo isolar bactérias diazotróficas endofíticas de palma e identificar a sequência do gene *recA* nos isolados, avaliando o potencial destas quanto à produção de ácido indolacético (AIA) e melanina, e a resistência intrínseca a antibiótico.

Material e Métodos

Isolamento de bactérias diazotróficas

Foi coletado como amostra um cladódio de cada variedade de palma (Tabela 1); as amostras de cladódio foram cultivadas em meios de cultivo semissólidos, semisseletivos (NFb, JNFb, LGI e LG) e sem adição de nitrogênio, como descrito por Döbereiner, Baldani e Baldani (1995). Para o isolamento, foram utilizados 10 g de cada amostra do cladódio (massa fresca), os quais foram lavados com água corrente, triturados e misturados em 90 mL de solução salina (NaCl, 0,5%) e diluídos serialmente (10^{-1} - 10^{-7}). De cada diluição, foram retiradas alíquotas de 0,1 mL e inoculadas em frascos de vidro contendo os meios de cultura (NFb, JNFb, LGI e LG); estes foram incubados a 30°C e o crescimento bacteriano foi avaliado aos três, cinco e sete dias, verificando-se o aparecimento ou não da película característica para as bactérias diazotróficas endofíticas. Após o completo isolamento de uma cultura pura, estes isolados foram crescidos em meio DYGS (RODRIGUES NETO; MALAVOLTA JÚNIOR; VICTOR, 1986) e foi realizada a extração de DNA genômico.

Tabela 1. Resultados da busca por similaridade no NCBI GenBank dos isolados pelo sequenciamento parcial do gene *recA*.

Legenda	Genbank	Meio de isolamento	Variedade de Palma/Local de Coleta	Micro-organismo	Homologia no NCBI	Identidade (%)	E-value
isolAM01	KC312318	NFb	(1327) Marmillon Fodder/Caruaru	<i>Azospirillum lipoferum</i> 4B (NC_016622.1)	97%	100	5e-125
isolAM02	KC312319	LG	(1327) Marmillon Fodder/Caruaru	<i>Azospirillum lipoferum</i> 4B, (NC_016622.1)	97%	100	7e-125
isolAM04	KC312320	NFb	27(1294) Mexico Vegetable/Arcoverde	<i>Azospirillum lipoferum</i> 4B (NC_016622.1)	100%	100	2e-120
isolAM05	KC312321	NFb	27(1294) Mexico Vegetable/Arcoverde	<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 (NC_016617.1)	99%	100	7e-120
isolAM06	KC312322	JNFb	AM6 16-F21 (403) Forrageira México/Arcoverde	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> (NC_010505.1)	91%	100	1e-126
isolAM20	KC312323	LGI	IPA 90-92/Caruaru	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PA15 (NC_011365.1)	49%	100	4e-06
isolAM24	KC312324	NFb	422 CPTSA 1281 (2001800)/Caruaru	<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032 (NC_009848.1)	80%	89	6e-72
isolAM26	KC312325	NFb	F3 Rojo Vigor – Frutífera/Arcoverde	<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032 (NC_009848.1)	94%	93	0.0
isolAM28	KC312326	NFb	Palma de Espinho Frutífera	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 (NC_010505.1)	90%	95	6e-115
isolAM29	KC312327	NFb	/Arcoverde51-1317 Chile Fruit/Arcoverde	<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032 (NC_009848.1)	92%	94	0.0
isolAM30	KC312328	NFb	43- Miúda Tradicional/Arcoverde	<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032 (NC_009848.1)	91%	92	0.0
isolAM36	KC312329	JNFb	(438) F8 Forrageira/Caruaru	<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032	89%	91	0.0

Análise e sequenciamento baseados no gene *recA*

Para identificar o provável gênero bacteriano, foi realizada a extração de DNA usando o Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. A amplificação do gene *recA* foi realizada usando os *primers* *recA*-6F (5'-CGK CTS GTA GAG GAY AAA TCG GTG GA-3') e *recA*-555R (5'-CGR ATC TGG TTG ATG AAG ATC ACC AT-3') (GAUNT et al., 2001), e as condições de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo: 40 ng de DNA molde, 1µM de cada *primer* e 12,5 µL de GoTaq Colorless (Promega). Os ciclos de temperaturas foram realizados em um termociclador PCT-100™ (MJ Research, Inc, USA), com uma desnaturação inicial de 94°C por 4 min., 30 s a 94°C, 30 s de anelamento a 50°C e 1 min. de extensão a 72°C, seguidos de uma extensão final de 8 min. a 72°C por 30 ciclos. Os produtos amplificados foram visualizados em eletroforese a 1% em gel de agarose utilizando SybrGold (Invitrogen) em tampão TBE 0,5X a 100 Volts e fotodocumentados no LPIX-HE da Loccus do Brasil. Após a purificação, segundo Lyra (2001), os produtos amplificados foram sequenciados na MacroGen Inc. Korea.

As sequências obtidas foram alinhadas e comparadas pelo programa 'ClustalX V.4.0.' (LARKIN et al., 2007), com base no gene *recA*. Além disso, para esta comparação, foi realizada a busca de sequências depositadas no GenBank,

com o propósito de agrupar as bactérias nos respectivos gêneros. Para matriz de distância das árvores filogenéticas, foi utilizado o método fenético baseado em distância genética *neighbor-joining* (NJ) (SAITOU; NEI, 1987) e o algoritmo p-distance, respectivamente processado pelo programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis-MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007). Todas as sequências do gene *recA* obtidas neste estudo foram enviadas ao banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e receberam os números de acesso: KC312318 a KC312329.

Produção do ácido indolacético (AIA)

Para verificar a produção de ácido indolacético (AIA), os isolados foram inoculados em tubos contendo 50 mL de meio DYGS (RODRIGUES NETO; MALAVOLTA JÚNIOR; VICTOR, 1986) com triptofano (100 µg/mL⁻¹) como precursor (LOPER; SCROTH, 1986) e incubados no escuro, a 30°C e agitação constante a 140 rpm por 24 h.

Depois de atingido o período de cultivo, uma alíquota de 1,5 mL foi retirada de cada amostra e centrifugada durante 10 minutos, a 7.000 rpm e temperatura de 15°C. A análise qualitativa de AIA foi determinada misturando 1 mL do sobrenadante de cada amostra com 2 mL do reagente de Salkowisk (FeCl₃·6H₂O 2% e HCl₃ 37%) (SARWAR; KREMER, 1995), e os tubos foram mantidos no escuro por

30 min. A presença do hormônio foi visualizada pela coloração rósea. As dosagens foram realizadas em triplicata. Como controle negativo, utilizou-se apenas o meio de cultura DYGS, permanecendo no escuro por 30 min. O desenvolvimento da cor rosa indica a produção qualitativa de AIA.

Produção de melanina

A produção de melanina (pigmento escuro) pelas colônias das bactérias endofíticas foi avaliada conforme procedimento adaptado (ANDRADE; MURPHY; GILLER, 2002) para estirpes de rizóbio, após dois dias de crescimento em meio de cultura DYGS. Para facilitar sua observação, 2 a 3 mL de uma solução de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10% foram adicionados sobre o crescimento nas placas de Petri e, após 2 a 6 h, a produção de pigmentos de coloração marrom escuro (melanina) nas colônias foi verificada e anotada. As estirpes que apresentaram a pigmentação escura foram classificadas como produtoras de melanina.

Resistência intrínseca aos antibióticos

Todos os isolados bacterianos foram avaliados quanto à susceptibilidade e à resistência intrínseca aos agentes antimicrobianos pelo método de difusão em placa, utilizando-se meio de cultura DYGS. Foram utilizados dez discos impregnados de antibióticos: gentamicina (GEN), vancomicina (VAN), ácido nilidíxico (NAL), ciprofloxacino (CIP), estreptomicina (EST), clorofenicol (CLO), cefotaxima (CTX), rifampicina (RIF), ampicilina (AMP) e tetraciclina (TET). As placas de Petri contendo meio DYGS foram inoculadas com 500 µL de cultura de cada micro-organismo e os discos de antibióticos foram depositados na superfície do meio, incubados a 37 + 0,5°C por 24 h. A susceptibilidade das bactérias isoladas ao antibiótico foi determinada pelo halo de inibição ao redor do disco, utilizando-se o critério descrito pelo fabricante para cada antibiótico.

Resultados e Discussão

Isolamento das bactérias diazotróficas

Foram isolados 12 micro-organismos provenientes do interior dos cladódios de palma forrageira das regiões do agreste (Caruaru) e do sertão (Arcoverde) de Pernambuco (Tabela 1). Rodríguez e Fraga (1999) relataram que os gêneros bacterianos que mais se destacam como promotores de crescimento são: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Azospirillum* e *Azotobacter*. Estes dados corroboram com os resultados encontrados neste estudo, em que foram isoladas bactérias diazotróficas endofíticas destes gêneros.

Do total de bactérias diazotróficas endofíticas, oito foram provenientes do meio NFb (*Azospirillum brasilense*; *A. lipoferum*; *Bacillus pumilus*; *Methylobacterium radiotolerans*). Magalhães e Döbereiner (1984) mostraram que, mesmo sendo as espécies de *Azospirillum* favorecidas nos meios NFb, outros micro-organismos diazotróficos podem crescer nestes meios, como ocorreu no presente estudo. No meio LG, cresceu apenas um isolado, que obteve homologia com *Azospirillum*

brasilense, e no meio LGI, o isolado teve uma homologia muito baixa com *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA15, de 49%. Foram encontrados dois isolados no meio JNFb (*Bacillus* e *Methylobacterium*) do total das bactérias diazotróficas isoladas. Apesar de descrito na literatura, segundo Döbereiner (1997), que o meio JNFb (Tabela 1) seja um meio para isolar *Herbaspirillum*, no nosso estudo, os isolados que cresceram neste meio foram: *Methylobacterium radiotolerans* e *Bacillus pumilus* (Figura 1). A falta de especificidade do meio JNFb, já considerada por Baldani et al. (1999), indica que o meio JNFb permite o crescimento de outras bactérias endofíticas, principalmente aquelas capazes de tolerar a maior acidez inicial deste meio.

A diversidade da comunidade endofítica ainda tem muito a ser elucidada. Algumas bactérias diazotróficas, como *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Azoarcus* spp. e *Azospirillum* spp. (CHARENTREUIL et al., 2000), antes descritas somente com localização na região de rizosfera, agora também são descritas em regiões endofíticas.

Análise e sequenciamento baseados no gene *recA*

A qualidade do DNA genômico isolado foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose. Foi utilizado o padrão 100 pb DNA ladder (Invitrogen) como padrão de tamanho molecular, sendo que o tamanho gerado pela amplificação do gene *recA* foi de 700 pb. As sequências do gene *recA* foram submetidas ao programa BLASTn do GenBank, pelo qual se realizou uma pesquisa: uma comparação entre os dados obtidos neste trabalho e os que já se encontram no banco de dados. A análise por clusterização baseada nas sequências do gene *recA* permitiu um agrupamento mais congruente entre todos os gêneros distribuídos no dendrograma, porque os isolados estudados neste trabalho ficaram agrupados de acordo com suas espécies, mostrando que este gene tem uma capacidade de determinar a posição taxonômica de novos isolados, segundo mostrado por Scholz et al. (2008) (Figura 1).

De acordo com a análise comparativa, foram formados cinco grupos: grupo I - formado apenas por sequências de bactérias retiradas do GenBank, dos gêneros *Gluconacetobacter* e *Azospirillum*; grupo II - formado pelas sequências dos isolados –isolAM01, isolAM02, isolAM04 e isolAM05 – que apresentaram elevada homologia ao gênero *Azospirillum*, mas separadas em ramos diferentes; grupos III e IV - formados pelos isolados isolAM20 e isolAM24, respectivamente; grupo V - representado pela sequência dos isolados – isolAM26, isolAM29, isolAM30 e isolAM36 – que apresentaram elevada homologia com o gênero *Bacillus*. O predomínio dos gêneros *Bacillus* e *Azospirillum* corrobora com os resultados obtidos por Lalande et al., 1989.

A partir desses resultados, verificou-se que as sequências obtidas, em relação às do banco de dados, apresentaram entre 80 e 100% de similaridade, o que indica confiabilidade para os resultados encontrados. Apenas o isolado isolAM20 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) apresentou uma baixa homologia, de 49%, com as sequências de bactérias diazotróficas endofíticas. Segundo Payne et al. (2006) e Scholz et al. (2008), o gene *recA* permite melhor discriminação

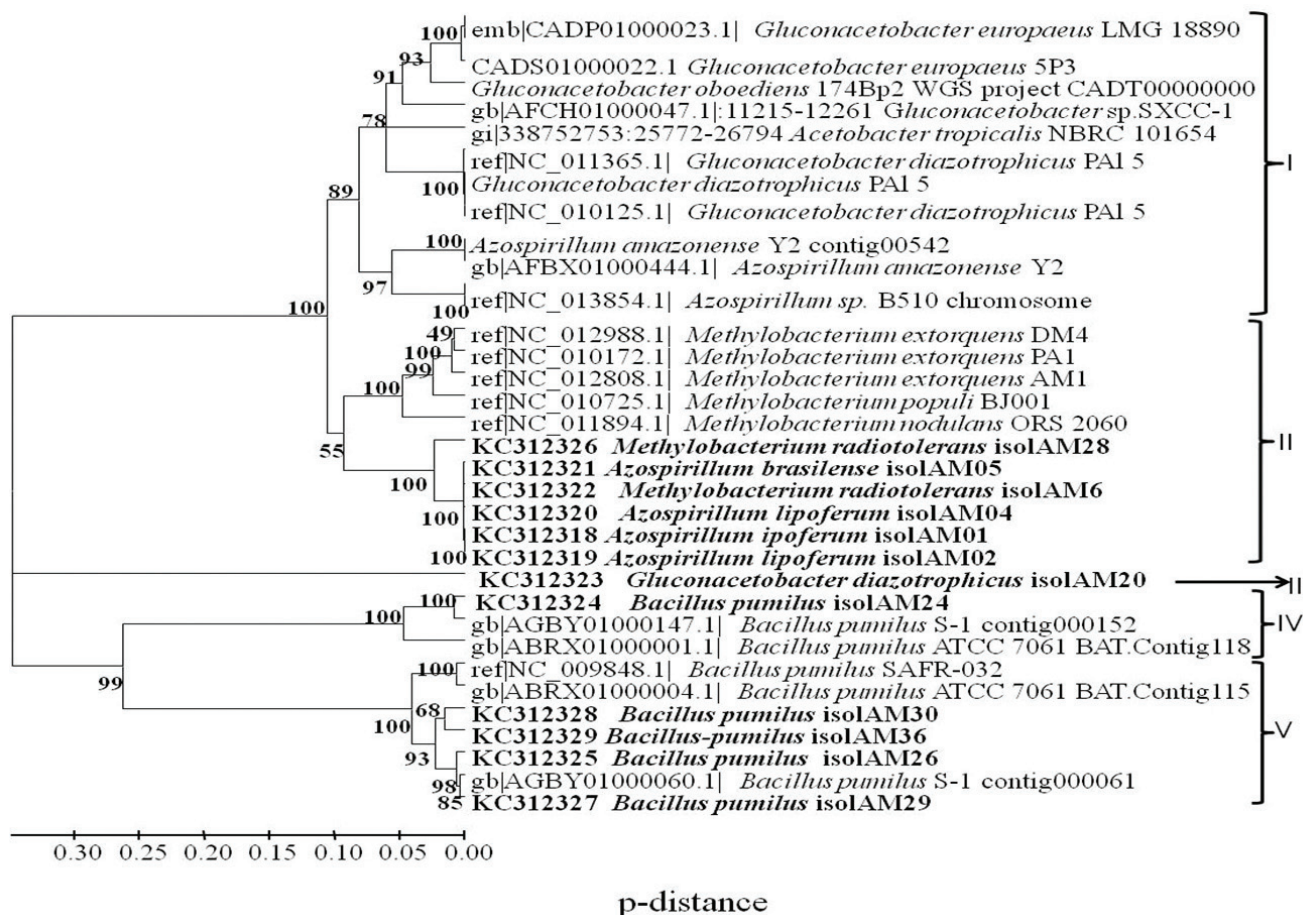


Figura 1. Dendrograma baseado na sequência do gene *recA*, mostrando as posições filogenéticas dos isolados em relação às sequências já depositadas em banco de dados. Os números internos representam a porcentagem de vezes em que foi possível reconstruir o agrupamento em questão. A régua é a distância de similaridade do agrupamento em questão.

do que o gene 16S rDNA e os genes *rrs* (Ribossomais). Entretanto, as análises obtidas do gene *recA* não são exatamente semelhantes às obtidas pela filogenia da sequência do gene 16S rDNA, indicando maior grau de resolução entre espécies relacionadas.

Produção de AIA pelos isolados

A produção do ácido indolacético (AIA) *in vitro* foi observada nos isolados *Azospirillum lipoferum* (isolAM01), *Azospirillum lipoferum* (isolAM04), *Azospirillum brasilense* (isolAM05), *Bacillus pumilus* (isolAM24), *Bacillus pumilus* (isolAM26), *Methylobacterium radiotolerans* (isolAM28), *Bacillus pumilus* (isolAM29), *Bacillus pumilus* (isolAM30) cultivados em meio DYGS suplementado com 100 µg/mL⁻¹ de triptofano (Tabela 2). É necessário conhecer o comportamento de cada isolado para realizar a leitura da síntese de auxina em diferentes tempos do desenvolvimento bacteriano, possibilitando a determinação do período em que ocorre a síntese máxima do hormônio. A utilização de bactérias produtoras de AIA é uma forma inicial de seleção de estirpes; entretanto, deve-se considerar que tal característica exige condições adequadas para se expressar (TEIXEIRA et al.,

2007). Este hormônio é comumente produzido por bactérias promotoras de crescimento, como *Aeromonas veronas*, *Agrobacterium* sp., *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium* sp., *Rhizobium* sp. e *Enterobacter* sp., entre outras (VESSEY, 2003). Tem-se verificado que o AIA excretado pelas bactérias que vivem em associação com a rizosfera é responsável pela estimulação do crescimento e pela proliferação das raízes secundárias, ou pela patogênese, em diversas plantas. Sabe-se que esse estímulo é dependente da dosagem do hormônio, pois o excesso deste pode retardar ou até inibir o crescimento do vegetal (BROEK, 1999). Muitos grupos microbianos, incluindo aqueles de vida livre ou que vivem em associação com o tecido das plantas, podem produzir AIA (PATTEN; GLICK, 1996).

Bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* são estudadas em razão de sua interação com gramíneas e por sintetizarem AIA por diferentes vias. No entanto, alguns autores sugerem que 80% do ácido indolacético sintetizado por este gênero é derivado de uma via independente da adição de triptofano ao meio de cultura, pois outros compostos podem ser metabolizados (ZAKHAROVA et al., 1999). De acordo com Ona et al. (2005), a produção de AIA só ocorre sob condições

de estresse, incluindo deficiência de carbono, e estresse por oxigênio, na fase final de crescimento das bactérias.

Produção de melanina pelos isolados

Todos os isolados testados neste estudo foram capazes de produzir melanina em placas com meio DYGS suplementado com L-tirosina e CuSO_4 (Tabela 2). A produção de melanina é uma característica que vem sendo estudada em bactérias diazotróficas. *Azospirillum* spp. apresenta ampla distribuição nos solos (DÖBEREINER; DE-POLLI, 1980); pouco se sabe, porém, sobre a sobrevivência das espécies de *Azospirillum* spp. no solo na ausência da planta hospedeira, mas tem sido demonstrado que a bactéria apresenta vários mecanismos fisiológicos de proteção (formação de cistos, produção de melanina e de poli-hidroxibutirato), que podem facilitar a sua sobrevivência em condições desfavoráveis.

A formação de melanina pode estar relacionada à proteção contra estresses ambientais, principalmente compostos fenólicos originados da degradação da matéria orgânica do solo (BORTHAKUR; BARUAH; BHAGAT, 1987). Giongo et al. (2006) observaram que os solos dos quais foram isolados rizóbios sem esta característica fenotípica apresentavam baixo teor de matéria orgânica.

Resistência intrínseca aos antibióticos pelos isolados

A resistência aos diferentes antibióticos foi uma característica comum dos isolados *Azospirillum lipoferum* (isolAM01), *Azospirillum lipoferum* (isolAM04), *Bacillus pumilus* (isolAM26), *Azospirillum* sp. (isolAM28), *Bacillus pumilus* (isolAM29), *Bacillus pumilus* (isolAM30) e *Bacillus pumilus* (isolAM36) (Tabela 3). Os antibióticos atuam como

Tabela 2. Produção do ácido indolacético (AIA) em meio DYGS suplementado com 100 µg/mL de triptofano e melanina dos isolados.

Legenda	Micro-organismo	AIA	Melanina
isolAM01	<i>A. lipoferum</i>	+	+
isolAM02	<i>A. lipoferum</i>	–	+
isolAM04	<i>A. lipoferum</i>	+	+
isolAM05	<i>A. brasilense</i>	+	+
isolAM06	<i>M. radiotolerans</i>	–	+
isolAM20	<i>G. diazotrophicus</i>	–	+
isolAM24	<i>B. pumilus</i>	+	+
isolAM26	<i>B. pumilus</i>	+	+
isolAM28	<i>M. radiotolerans</i>	+	+
isolAM29	<i>B. pumilus</i>	+	+
isolAM30	<i>B. pumilus</i>	+	+
isolAM36	<i>B. pumilus</i>	–	+

A. lipoferum = *Azospirillum lipoferum*; *M. radiotolerans* = *Methylobacterium radiotolerans*; *G. diazotrophicus* = *Gluconacetobacter diazotrophicus*; *B. pumilus* = *Bacillus pumilus*.

Tabela 3. Resistência intrínseca aos antibióticos de bactérias diazotróficas endofíticas, isoladas de cladódios de palma.

Legenda	GEN	VAN	NAL	CIP	EST	CLO	CTX	RIF	AMP	TET
isolAM01	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
isolAM02	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
isolAM04	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
isolAM05	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
isolAM06	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
isolAM20	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R
isolAM24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
isolAM26	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
isolAM28	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
isolAM29	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
isolAM30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
isolAM36	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

S: Suscetível; R: Resistente; GEN: Gentamicina; VAN: Vancomicina; NAL: Ácido Nalidíxico; CIP: Ciprofloxacina; EST: Estreptomicina; CLO: Clorafenicol; CTX: Cefotaxina; RIF: Rifapicina; AMP: Ampicilina; TET: Tetraciclina.

um fator ecológico que pode afetar comunidades bacterianas, selecionando populações que exibem mecanismos de resistência intrínseca ou adquirida, que podem ser mediados por elementos genéticos, como plasmídeos e/ou integrons.

Considerando-se a sensibilidade dos isolados testados frente aos antibióticos, verifica-se uma sensibilidade do isolado de *Azospirillum lipoferum* (isolAM02) à estreptomicina (EST), do isolado de *Methylobacterium radiotolerans* (isolAM06) ao clorafenicol (CLO), do isolado de *Bacillus pumilus* (isolAM24) à tetraciclina (TET) e do *Bacillus pumilus* (isolAM29) à ciprofloxacina (CIP). Já o isolado *Gluconacetobacter diazotrophicus* (isolAM20) apresentou sensibilidade para quatro dos antibióticos estudados: clorafenicol (CLO), cefotaxima (CTX), rifampicina (RIF) e ampicilina (AMP).

A resistência da maioria dos isolados à tetraciclina é uma fator positivo. Uma vez que este antibiótico compromete a síntese de proteínas por interferir com a subunidade 30S ribossomal, as bactérias resistentes a este antibiótico possuem um gene, que codifica uma enzima capaz de interferir na membrana plasmática e comprometer o transporte do antibiótico para o interior da célula (ARAÚJO, 1994; TORTORA; FUNKE; CASE, 2000). Trabalhos prévios envolvendo estirpes de bactérias diazotróficas mostraram sua sensibilidade/resistência a antibióticos diversos (MAGALHÃES et al., 1983, BALDANI et al., 1986; URETA et al., 1995; MOWADE; BHATTACHARYYA, 2000). A resistência/sensibilidade de uma bactéria a um antibiótico depende da natureza do micro-organismo-teste utilizado (estirpe) e das condições de cultivo.

Conclusões

Os isolados de bactérias diazotróficas endofíticas encontradas na cultura da palma têm grande eficiência na promoção de crescimento vegetal, com a produção de AIA e melanina, e resistência intrínseca a antibióticos, tornando-se, desta forma, possível a identificação de isolados com potencial para fins biotecnológicos.

Agradecimentos

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA, pela estrutura física; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (PNPD – n.º 02714/09-4 Linha MCT/FINEP) e à Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), pelo suporte financeiro concedido.

Referências

ANDRADE, D. S.; MURPHY, P. J.; GILLER, K. E. The diversity of *Phaseolus* nodulating rhizobial population is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 8, p. 4025-4034, 2002. PMID:PMC124050. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.8.4025-4034.2002>

ARAÚJO, R. S. Caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica do rizóbio. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. (Eds.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Goiânia: EMBRAPA-CNPAP, 1994. p. 157-170.

BALDANI, J. I. et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a new root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, England, v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986.

BALDANI, J. I. et al. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J. O. et al. (Orgs.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS, 1999. p. 621-666.

BALDANI, J. I. et al. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas endofíticas. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Orgs.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EdUCS, 2002. p. 433.

BORTHAKUR, N.; BARUAH, A. K. S.; BHAGAT, S. D. Search for precocenes in *Ageratum conyzoides* Linn of northeast Índia. **Journal Indian Chemistry Society**, India, v. 64, p. 580-581, 1987.

BROEK, A. V. Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, n. 4, p. 1338-1342, 1999.

CHARENTREUIL, C. et al. Photosynthetic Bradyrhizobia are natural endophytes of the African Wild Rice *Oryza breviligulata*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 12, p. 5437-5447, 2000. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.12.5437-5447.2000>

DEMASON, D. A. Auxin-cytokinin and auxin-gibberellin interactions during morphogenesis of the compound leaves of pea (*Pisum sativum*). **Planta**, Berlin, v. 32, p. 1432-2048, 2005.

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Biology & Biochemistry**, Missouri, v. 29, n. 5/6, p. 771-774, 1997. [http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00226-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00226-X)

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

DÖBEREINER, J.; DE-POLLI, H. Diazotrophic rhizocoenoses. In: STEWART, D. P.; GALLON, J. R. (Ed.). **Nitrogen fixation**. London: Academic Press, 1980. p. 301-334.

GAUNT, M. W. et al. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, England, v. 51, n. 6, p. 2037-2048, 2001. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-51-6-2037>

GIONGO, A. et al. Genetic diversity and symbiotic efficiency of population of rhizobia of *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 43, n. 5, p. 593-598, 2006. <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-006-0128-z>

LALANDE, R. et al. Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potential. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 115, n. 1, p. 7-11, 1989. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02220688>

LARKIN, M. A. et al. I Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007. PMID:17846036. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>

- LIU X. et al. Characterisation of two quorum sensing systems in the endophytic *Serratia plymuthica* strain G3: differential control of motility and biofilm formation according to life-style. **BMC Microbiology**, Heidelberg, v. 11, n. 26, p. 1471-1480, 2011. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-11-26>
- LOPER, J. E.; SCROTH, M. N. Influence of bacterial sources on indole-3 acetic acid on root elongation of sugar beet. **Phytopathology**, Mineausota, v. 76, n. 4, p. 386-389, 1986.
- LYRA, M. C. C. P. **Estudios genéticos y fisiológicos del gen *nolT* de la región específica de cultivar, *nolXWBTUV*, de la bacteria de amplio rango de nodulación HH103 y sus implicaciones en el Sistema de Secreción de Tipo III (TTSS)**. 2001. 159 f. Tese (Doutorado em Biologia)-Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Sevilla, 2001.
- MAGALHÃES, F. M. M. et al. A new acid tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 417-430, 1983.
- MAGALHÃES, F. M. M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 246-252, 1984.
- MILLER, R. V.; KOKJOHN, T. A. General microbiology of *recA* environmental and evolutionary significance. **Annual Review of Microbiology**, United States, v. 44, n. 1, p. 365-394, 1990. PMID:2252387. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.44.100190.002053>
- MOWADE, S.; BHATTACHARYYA, P. Resistance of *P-solubilizing Acetobacter diazotrophicus* to antibiotics. **Current Science**, Bangalore, v. 79, n. 11, p. 1591-1594, 2000.
- ONA, O. et al. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 246, n. 1, p. 125-132, 2005. PMID:15869971. <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsle.2005.03.048>
- PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, n. 3, p. 207-220, 1996. <http://dx.doi.org/10.1139/m96-032>
- PAYNE, G. W. et al. Application of a *recA* gene-based identification approach to the maize rhizosphere reveals novel diversity in *Burkholderia* species. **FEMS Microbiology Letters**, Holanda, v. 259, n. 1, p. 126-132, 2006.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xantomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.
- RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, England, v. 17, n. 4-5, p. 319-339, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2)
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, n. 4, p. 406-25, 1987.
- SANTOS, D. C. et al. Desempenho produtivo de vacas 5/8 Holando/Zebu alimentadas com diferentes cultivares de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 1, p. 12-17, 2001.
- SANTOS, D. C. et al. **Manejo e utilização da Palma Forrageira (Opuntia e Nopalea) em Pernambuco**. Recife: IPA, 2006. (Documentos, n. 30).
- SARWAR, M.; KREMER, R. J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 172, n. 2, p. 261-269, 1995. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00011328>
- SCHOLZ, H. C. et al. Genetic diversity and phylogenetic relationships of bacteria belonging to the *Ochrobactrum-Brucella* group by *recA* and 16S rRNA gene-based comparative sequence analysis. **Systematic Applied Microbiology**, Germany, v. 31, n. 1, p. 1-16, 2008. PMID:18222618. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2007.10.004>
- SOUZA, M. L. Utilização de microrganismos na agricultura. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 21, p. 28-31, 2001.
- TAMURA, K. et al. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007. PMID:17488738. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msm092>
- TEIXEIRA, M. A. et al. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovaidades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 1 p. 43-49, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2007000100006>
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827 p.
- URETA, A. et al. Identification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* using biochemical and genetic criteria. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 172, n. 2, p. 271-277, 1995. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00011329>
- VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1026037216893>
- ZAKHAROVA, E. A. et al. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*: insights from quantum chemistry. **European Journal of Biochemistry**, England, v. 259, n. 3, p. 572-576, 1999. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00033.x>

Recebido: 08/01/2013
Aprovado: 17/12/2013