



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS**

JOSÉ VINÍCIUS LEITE LIMA

**OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM CACTÁCEAS NATIVAS
DO SEMIÁRIDO E SEUS EFEITOS NO CRESCIMENTO DE MUDAS DE
MANDACARU**

FORTALEZA

2013

JOSÉ VINÍCIUS LEITE LIMA

OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM CACTÁCEAS NATIVAS
DO SEMIÁRIDO E SEUS EFEITOS NO CRESCIMENTO DE MUDAS DE
MANDACARU

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Ecologia e
Recursos Naturais da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Ecologia e
Recursos Naturais.

Área de Concentração: Ecologia Microbiana

Orientador: Dr. Olmar Baller Weber
Co-orientadora: Dra. Diva Correia

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- L698o Lima, José Vinícius Leite.
Ocorrência de bactérias diazotróficas em cactáceas nativas do semiárido e seus efeitos no crescimento de mudas de Mandacaru / José Vinícius Leite Lima. – 2013.
38 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Ecologia Microbiana.
Orientação: Prof. Dr. Olmar Baller Weber.
Coorientação: Profa.Dra. Diva Correia
1. Ecologia microbiana. 2. Plantas da caatinga. I. Título.

JOSÉ VINÍCIUS LEITE LIMA

OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM CACTÁCEAS NATIVAS DO SEMIÁRIDO E SEUS EFEITOS NO CRESCIMENTO DE MUDAS DE MANDACARU

Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais Área de concentração Ecologia Microbiana.

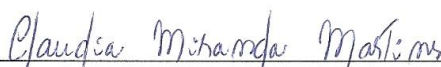
Aprovado em: 28/02/2013

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Olmar Baller Weber (Orientador)

Embrapa Agroindústria Tropical - CNPAT / Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof.^a. Dr.^a. Claudia Miranda Martins

Universidade Federal do Ceará – UFC



Dr. Francisco das Chagas Oliveira Freire

Embrapa Agroindústria Tropical - CNPAT

AGRADECIMENTOS

É com muita alegria que chego a esse momento final do desenvolvimento de minha pesquisa científica, divulgando-a de forma tão especial e onde muitas pessoas fizeram parte disso. Desenvolver um trabalho científico é uma tarefa muito árdua que necessita de uma união muito estreita entre mente e corpo que nos faz viajar num mundo muitas vezes desconhecido, mas fascinante e estimulante. A curiosidade de saber o porquê das coisas sempre me impulsionou desde pequeno e me fez gostar tanto da ciência. Acredito que a ciência deve ser divulgada a todos sem restrições, porque o conhecimento liberta.

Venho humildemente e de coração deixar meus sinceros agradecimentos:

Primeiramente a Deus por ter me proporcionado essa graça, me guiado, me protegido, me inspirado, me fortalecido e colocado tantas pessoas boas como instrumento divino para eu chegar até aqui. Porque para Deus nada é impossível e nunca estou só!

A meu orientador o Dr. Olmar Baller Weber pela paciência, pela disponibilidade e por nunca medir esforços para me dar seus ensinamentos que eu sempre levarei pela vida. Realmente fez um papel de pai como muitos já haviam me dito. Muito obrigado e que Deus lhe ilumine sempre!

A minha co-orientadora a Dra. Diva Correia pelos ensinamentos e pela sua preocupação em não me faltar nada na condução dos meus experimentos. Muito obrigado!

A FUNCAP e CAPES pela concessão das bolsas que foi essencial na nesta caminhada, e a Embrapa Agroindústria Tropical pela estrutura de primeira que me foi dada na condução deste trabalho.

A toda minha família, obrigado pelo amor de vocês, que mesmo longe torceram e rezaram por mim, em especial minha mãe Sílvia Leite por sempre acreditar no meu potencial e ser sempre meu porto seguro desde que nasci, e minha irmã Bárbara Leite. A Alana pelo apoio e afeto todos esses anos. Por fim, a Isis pelos gestos de carinho e força muito importantes na reta final, que me deixaram ainda mais motivado e feliz.

A todos os meus amigos da Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, a todos da Embrapa principalmente Nonato, Eva, Adervan, Daniely, Abelardo, Roni, Júnior e o Sr. Machado, e ao amigo Rogério Saraiva.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais pelos preciosos ensinamentos e aos membros da banca de defesa, a professora Dra. Cláudia Miranda Martins e o Dr. Francisco das Chagas Oliveira Freire.

As pessoas que fazem a Estação Ecológica de Aiuaba pela acolhida e apoio nas coletas, principalmente ao amigo, desde os tempos de estágio no IBAMA de Crato, Honório Arrais. Ao Banco do Nordeste do Brasil/FUNDECI, MCT/SEBRAE/FINEP e à Embrapa pelo financiamento da pesquisa; ao CNPq pela concessão de bolsas de fomento tecnológico.

Enfim, a todos que de alguma forma acompanharam e contribuíram na minha jornada para conclusão do mestrado e que por algum motivo não os lembrei no momento.

**“Só a força gerada para se
realizar o impossível levará à
lugares impossíveis”.**

(Miguel Nicolelis)

RESUMO

A presença de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico tem sido evidenciada em diferentes espécies, incluindo leguminosas, gramíneas, frutíferas, entre outras plantas. Tem-se por hipótese que as cactáceas estabelecem naturalmente associação com as bactérias diazotróficas endofíticas e podem se beneficiar da interação planta-bactéria na fase de crescimento inicial. Este estudo teve por objetivo isolar e caracterizar bactérias diazotróficas associadas às cactáceas do semiárido e avaliar sua contribuição no crescimento de mudas de Mandacaru. A análise da ocorrência de bactérias diazotróficas foi realizada em dezembro de 2011, coletando-se amostras de raízes de partes aéreas de *Cereus jamacaru* e *Melocactus zehntneri*, na Estação Ecológica (ESEC) de Aiuaba, Ceará, Brasil. A presença das bactérias endofíticas foi confirmada nas cactáceas nativas e as estirpes bacterianas caracterizadas pela fisiologia de crescimento em meios artificiais, sob condição de fixação biológica de nitrogênio. Representantes destes grupos bacterianos foram inoculados em mudas micropropagadas de Mandacaru. Após seis meses de cultivo em estufa, os Mandacarus apresentaram crescimento similar independente da inoculação com endófitos. Todas as bactérias isoladas apresentaram habilidade em solubilizar fosfato inorgânico no meio Pikoskaya. As bactérias endofíticas oriundas dos cactos nativos diferem na forma de crescimento sob condição de fixação biológica de nitrogênio e pelo uso de fontes de carbono. As sete estirpes bacterianas testadas não influenciaram o crescimento inicial de Mandacarus em substrato composto de casca de arroz parcialmente carbonizada, vermiculita e vermicomposto.

Palavras-chave: Recurso natural do semiárido. Relação planta-bactéria. Ecologia microbiana. Caatinga.

ABSTRACT

The presence of nitrogen-fixing bacteria has been observed in various plant species, including legumes, grasses, and fruit plants. It has been hypothesized that the cactus from semiarid region naturally establishes association with endophytic bacteria and take advantages from plant-bacteria interaction in the initial growth phase. This study aimed to isolate and characterize diazotrophic from cactus in semiarid and evaluate their contribution on the growth of Mandacaru seedlings. The survey of occurrence of diazotrophs was held in December 2011, collecting samples from roots and aerial parts of Mandacaru (*Cereus jamacaru*) and Coroa-de-frade (*Melocactus zehntneri*) at the Ecological Station of Aiuaba, state of Ceará, Brazil. The presence of endophytic bacteria was confirmed in native cacti and bacterial strains characterized by the physiology of growth on artificial medium, on condition of biological nitrogen fixation. Representative strains from homogeneous bacterial groups were used to inoculate Mandacaru seedlings. After six months of growing in greenhouse, the Mandacaru seedlings showed similar growth independently of bacterial inoculation. All bacteria obtained cacti showed ability to solubilize inorganic phosphate in medium Pikoskaya. The endophytes obtained differ in growth condition under nitrogen fixation and by using different carbon sources. The seven bacterial strains tested did not affect significantly the initial growth of Mandacaru in substrates with rice hulls partially burned, vermiculite and humus.

Keywords: Semiarid natural resource. Plant-bacteria relationship. Microbial Ecology. Caatinga.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Área da Estação Ecológica de Aiuaba	14
Figura 3.1 – Dendrograma de similaridade baseado na distância euclidiana entre os isolados, de acordo com o uso de fontes de carbono.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Coordenadas e elevação dos pontos de coleta das amostras	15
Tabela 2.2 – Análise física, química e físico/química de substrato.	19
Tabela 3.1 – Número mais provável (NMP) de bactérias endofíticas em cactos e o número de isolados obtidos.	22
Tabela 3.2 – Codificação e origem de bactérias endofíticas de cactáceas	23
Tabela 3.3 – Crescimento de isolados bacterianos obtidos dos cactos Mandacaru e Coroa-de-frade em meios contendo sais de JNFB e diferentes fontes de carbono (pH=5,8)	25
Tabela 3.4 – Atividade de bactérias em solubilizar fosfato em meios de cultura artificial.	27
Tabela 3.5 – Dados de crescimento (CRESC), acúmulo de biomassa seca (PS), no caule (PSC), nas raízes (PSR) e populações de bactérias no caule (BACC), e nas raízes (BACR) de mudas de Mandacaru em estufa	29
Tabela 3.6 – Teores de N, Ca e K com seus incrementos (<i>i</i>) na biomassa da parte aérea seca de mudas de Mandacaru após seis meses da inoculação.	30
Tabela 3.7 – Teores de Mg, P e S com seus incrementos (<i>i</i>) na biomassa da parte aérea seca de mudas de Mandacaru, após seis meses da inoculação	30

SUMÁRIO

1 Introdução	11
2 Material e Métodos	14
2.1 Área de coleta e plano de amostragem	14
2.2 Isolamento de bactérias endofíticas	16
2.3 Avaliação do crescimento de bactérias endofíticas em meios semi-sólidos	16
2.4 Avaliação das bactérias endofíticas pela solubilização de fosfato <i>in vitro</i>	17
2.5 Obtenção de mudas micropropagadas de Mandacaru	18
2.6 Contribuição de bactérias endofíticas de cactos em mudas	18
2.7 Análises estatística dos dados.....	20
3 Resultados e Discussão	22
3.1 Bactérias endofíticas cultiváveis em cactáceas	22
3.2 Habilidade de bactérias diazotróficas de cactos em usar fontes de carbono.....	23
3.3 Capacidade de bactérias diazotróficas em solubilizar fosfato em meio artificial.....	26
3.4 Contribuição de bactérias diazotróficas no crescimento de mudas	27
3.5 Teores de macronutrientes de mudas	29
4 Considerações Finais	31
5. Perspectivas Futuras.....	31
REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

A aquisição de nutrientes em plantas vasculares pode resultar de interações entre as suas raízes com fungos, bactérias ou outros organismos associativos. Algumas plantas como leguminosas obtêm nutrientes pela associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio. Em tal associação a planta fornece abrigo e fontes de carbono provenientes da fotossíntese, e a bactéria diazotrófica metaboliza nitrogênio, reduzindo a molécula de N_2 para a forma reduzida e utilizável pela planta. Essa interação é particularmente importante para as plantas em áreas de carência de nitrogênio (Stachowicz, 2001).

Os tipos de relações estabelecidas entre bactérias diazotróficas e as plantas é embasada na teoria da evolução por seleção natural, para a qual Charles Darwin propôs uma série de interações interespecíficas para o desenvolvimento e a sobrevivência de espécies. Dentre as interações destaca-se o mutualismo, onde os indivíduos de uma espécie exploram outra espécie, de forma a obter benefício e obter vantagens da interação (Futuyma, 1997). Nesta interação, de acordo com Ricklefs (1996) e Townsend *et al.* (2007), ambas as espécies podem ser beneficiadas. Entretanto, as interações entre organismos podem variar de difusas e indiretas à altamente integradas, permitindo uma coevolução das espécies (Herre *et al.*, 1999).

O mutualismo pode também ser aplicado à associação de plantas com bactérias diazotróficas. Dentre essas bactérias associativas, há um grupo que é capaz de colonizar tecidos e contribuir com o crescimento e a produção das plantas (Perin, 2007), e essa interação planta-bactéria pode ser vantajosa em relação às associações das plantas com bactérias da rizosfera.

Bactérias diazotróficas que fixam N_2 e colonizam tecidos de plantas, sem causar sintomas de doença são denominadas endofíticas (Döbereiner, 1992). Esse grupo se distingue de bactérias diazotróficas de vida livre, que segundo Evan e Burris (1992), fixam N_2 para o seu próprio uso. Ainda, o grupo das bactérias diazotróficas tem sido dividido em: endofíticas obrigatórias e endofíticas facultativas (Baldani *et al.*, 1997).

A colonização endofítica resulta numa vantagem competitiva das bactérias no que diz respeito à utilização de substratos, quando comparadas com outras bactérias de vida livre (Olivares; James; Baldani, 1997). Com as fontes de

carbono prontamente disponíveis, as bactérias endofíticas têm facilidade em ocupar nichos específicos na planta.

Dentre as bactérias diazotróficas que foram identificadas em plantas não leguminosas, citam-se as pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Acetobacter*, *Burkholderia* e *Azoarcus*. O gênero *Azospirillum*, por exemplo, é capaz de promover o crescimento de plantas, por mecanismos relacionados com aumento da massa radicular, nutrição nitrogenada ou aumento da eficiência da absorção de nutrientes no solo, entre outros (Bashan; Holguin; Bashan, 2004).

A diversidade dessas bactérias tem sido estudada no Brasil desde a década de 1950, principalmente em gramíneas, palmeiras e frutíferas. Contribuições das bactérias têm sido igualmente relatadas para diversas espécies e podem estar relacionadas com a fixação biológica de nitrogênio atmosférico e a produção de substâncias reguladoras de crescimento vegetal, como auxinas, giberelinas e citocininas (Bazzicalupo; Okon, 2000), entre outros compostos. Metabólitos sintetizados podem induzir resistência às plantas contra patógenos, ou tal associação proteger a planta via competição exclusiva com outros patógenos presentes na rizosfera, além da produção pelas bactérias de antibióticos (Lugtenberg; Kamilova, 2009).

Em ambientes do semiárido são raros os estudos envolvendo a ecologia dessas bactérias associativas, principalmente em espécies pouco ou não cultivadas como os cactos. Observa-se que a família Cactaceae compreende 125 gêneros e 1.900 espécies (Arecas, 2004, apud Arruda; Melo-de-Pinna; Alves, 2005) e ocorre numa ampla variedade de habitats, desde regiões áridas até florestas úmidas em regiões tropicais e temperadas (Hunt; Taylor, 1990). Os cactos são geralmente plantas xerofíticas, áfilas, com caules e ramos suculentos, espinhosos, flores solitárias e vistosas, e frutos suculentos (Rocha; Agra, 2002), e acredita-se que estabelecem associação com as bactérias endofíticas.

Os cactos têm grande importância para as regiões áridas e semiáridas, e seu uso é bastante comum pelas comunidades inseridas nestes ambientes. Dentre as espécies do semiárido brasileiros, destacam-se o Mandacaru (*Cereus jamacaru*) e a Coroa-de-frade (*Melocactus zehntneri*), que são usadas para fins medicinais (Albuquerque *et al.*, 2007), ornamentais, uso místico, alimentação humana (frutos) e forragem animal (Andrade, 2002). As espécies têm papel ecológico no processo de

sucessão ambiental (Fabricante; Andrade; Marques, 2010) e alguns cactos como Mandacaru são usadas como recurso madeireiro (Andrade-Lima, 1989).

Levantamentos de ocorrência de bactérias diazotróficas em cactáceas já foram realizados em outros países (Rao; Venkateswarlu, 1982; Mascarua-Esparza; Villa-Gonzalez; Caballero-Melado, 1988; Loera; Sánches-Yáñez; Penã-Cabriales, 1996; Costa; Melo, 2005; Puente; Li; Bashan, 2004a; 2009a; Lopez; Bashan; Bacilio, 2011), porém não há informações disponíveis sobre espécies nativas do semiárido brasileiro. Tem-se por hipótese que os cactos do semiárido brasileiro estabelecem associações com bactérias diazotróficas endofíticas e esta associação afeta o crescimento dos cactos. Devido à possibilidade das associações mutualísticas serem semelhantes, pela colonização de espécies e a característica cultura e fisiológica das bactérias, acredita-se que: (1) diferentes bactérias endofíticas estão presentes em tecidos de cactos oriundos de ambiente semiárido; (2) mudas de cactos suportam uma população de bactérias endofíticas, e (3) há estirpes bacterianas capazes de contribuir com o crescimento inicial das mudas.

O objetivo deste estudo foi conhecer a diversidade de bactérias endofíticas cultiváveis que se associam ao Mandacaru (*C. jamacaru*) e a Coroa-de-frade (*M. zehntneri*), e compreender se a associação interfere no crescimento de mudas de Mandacaru.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de coleta e plano de amostragem

O estudo sobre ocorrência e caracterização de bactérias endofíticas de cactos foi realizado com amostras provenientes da Estação Ecológica (ESEC) de Aiuaba e suas proximidades, no município de Aiuaba (Figura 2.1), em dezembro de 2011. Convém salientar que ESEC é uma unidade de conservação, criada pelo Decreto de 06/02/2001, que fica entre as coordenadas: 06°36'01" e 06°44'35" S e 40°07'15" e 40°19'19" W (Lemos, 2010) e cobre uma área de 11.525 ha (ICMBio, 2011), sendo considerada uma área de Alta Importância Biológica pelo Programa Nacional da Biodiversidade/PROBIO. A autorização desta pesquisa, no que tange à coleta de materiais e os ensaios em telado, foi obtida (autorização de nº 31746-1 de 28 de novembro de 2011) pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio).

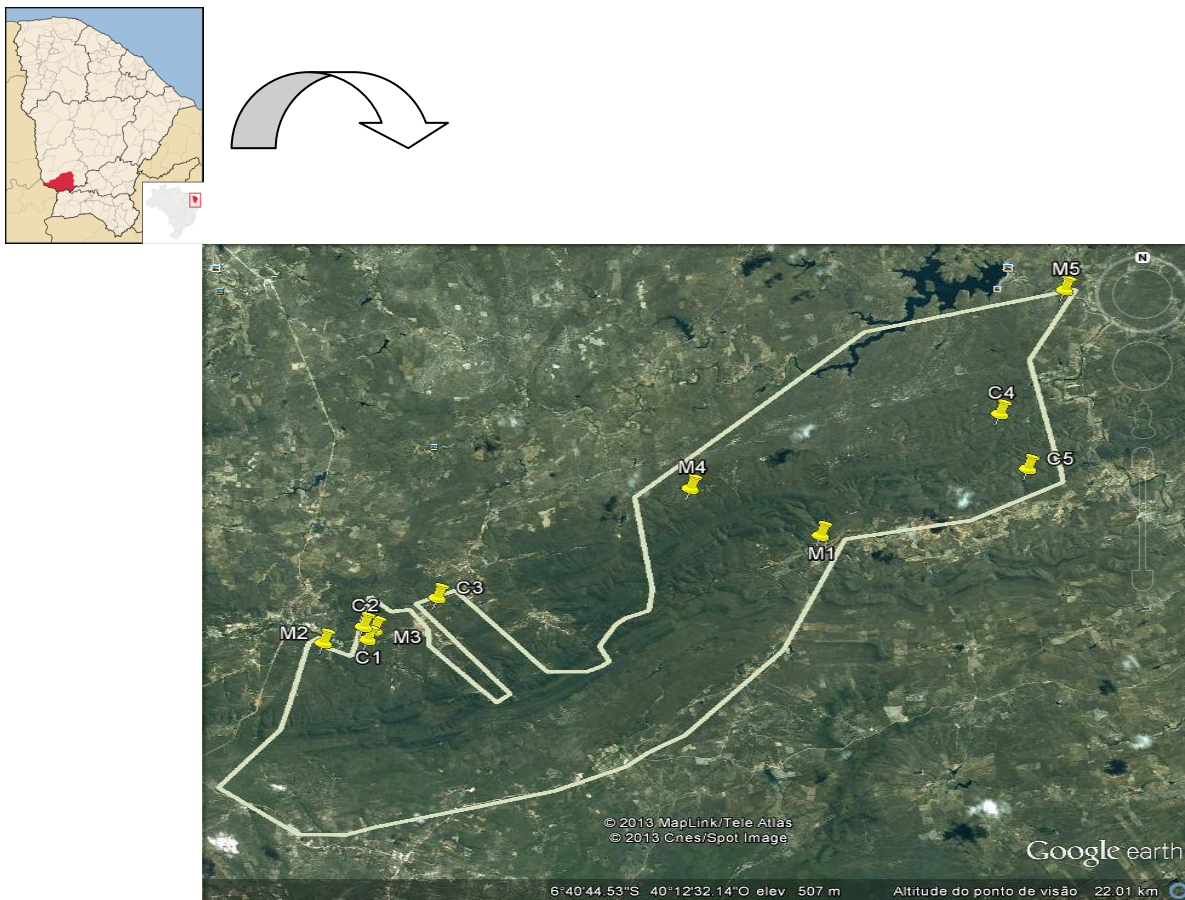


Figura 2.1. Área da Estação Ecológica de Aiuaba. (Fonte: Google Earth).

O clima da região onde está inserida a ESEC é quente e semiárido e apresenta temperatura média anual que varia em torno de 26°C (Jacomine *et al.*, 1973 *apud* Lemos, 2010) e a vegetação dominante é a Caatinga, mas com outras diferentes fisionomias, ocorrendo também o Carrasco (Oliveira; Cesar; Nunes, 1983). Na flora, há a presença de várias espécies do semiárido (Medeiros, 2004; Lemos, 2010), destacando-se aqui as da família Cactaceae. Segundo o mapeamento pedológico tem-se na ESEC presença de Latossolo Vermelho-amarelo, Latossolo Vermelho-Escuro Podzólico, Podzólico Vermelho-Amarelo, Bruno Não Cálcico, Planossolo, Vertissolo, Solos Litólicos, Regossolo e Areias Quartzosas, além de Aluviões, Formações Colúvio-Eluviais e Afloramentos de Rochas (Pereira, 1983), mostrando amplas variações de solo.

Foram coletados cinco exemplares de Mandacaru e de Coroa-de-frade em cinco locais e altitudes distintas (Tabela 2.1), onde se tinha as duas espécies presentes. O número de indivíduos coletados foi determinado em função da baixa ocorrência de coroa-de-frade no local. De cada exemplar de cacto retiraram-se frações de cerca de 10 g das raízes e 20 g da parte aérea, sendo esta última retirada numa posição de altura intermediária. Em seguida, as amostras foram etiquetadas (Tabela 2.1), acondicionadas em sacos plásticos e guardadas em caixas isopor para serem conduzidas ao Laboratório de Solos da Embrapa Agroindústria Tropical em Fortaleza/CE, para armazenamento em geladeira até a análise.

Tabela 2.1. Coordenadas e elevação dos pontos de coleta das amostras.

Códigos das amostras		Coordenadas	Elevação (m)	Espécies
Raiz	Caule			
R1M1	C1M1	S- 06°40'17,9"; W- 40°10'56,5"	455	Mandacaru
R2M1	C2M2	S- 06°41'46,5"; W- 40°17'39,7"	526	Mandacaru
R3M3	C3M3	S- 06°41'52,4"; W- 40°16'59,6"	514	Mandacaru
R4M4	C4M4	S- 06°39'32,5"; W- 40°07'29,7"	447	Mandacaru
R5M5	C5M5	S- 06°36'04,7"; W- 40°07'27,6"	448	Mandacaru
R1CF1	C1CF1	S- 06°41'49,3"; W- 40°17'08,4"	517	Coroa-de-frade
R2CF2	C2CF2	S- 06°41'49"; W- 40°17'08,3"	514	Coroa-de-frade
R3CF3	C3CF3	S- 06°41'23,5"; W- 40°16'17,8"	516	Coroa-de-frade
R4CF4	C4CF4	S- 06°36'00,2"; W- 40°0,7'24"	48	Coroa-de-frade
R5CF5	C5CF5	S- 06°36'00,3"; W- 40°0,7'25"	49	Coroa-de-frade

De cada espécie de cacto foi colhido ainda material suficiente para formar exsicatas, as quais foram depositadas em herbário (Herbário Prisco Bezerra, do Departamento de Biologia) da Universidade Federal do Ceará. Os números de registro são: 50528 - *Melocactus zehntneri* (Britton & Rose) Luetzelb e 50529 - *Cereus jamacaru* DC.

2.2 Isolamento de bactérias endofíticas

As amostras de Mandacaru e Coroa-de-frade foram avaliadas em relação a presença de bactérias diazotróficas endofíticas. Para isto, frações das raízes e das partes aéreas dos cactos foram separadas, lavadas em água corrente, esterilizadas em solução cloramina-T a 1% durante 5 minutos e equilibradas com água esterilizada (três vezes por cinco 5 min). Em seguida, retiraram-se frações de 1 g dessas amostras para maceração em gral, diluição em série (até 10^{-6}) numa solução salina esterilizada, para a inoculação de 100 μ L em frascos (triplicata), contendo meios semi-sólidos JNFb e LGI. Na formulação da solução salina e dos meios semi-sólidos seguiu-se os procedimentos descritos por Döbereiner; Baldani; Baldani (1995). Os frascos inoculados e não inoculados com suspensões diluídas de cactos foram incubados em estufa tipo BOD regulado para a 30°C, e após seis dias foram avaliados pelo crescimento e formação de película sub-superficial característica de bactérias diazotróficas. Os dados de crescimento bacteriano permitiram calcular o número mais provável de endófitos, usando valores da tabela McCrady para três repetições, e as populações foram expressas por grama de massa fresca.

2.3 Avaliação do crescimento de bactérias endofíticas em meios semi-sólidos

Os frascos com meios semi-sólidos JNFb e LGI que apresentaram crescimento típico de bactérias diazotróficas, em diluições mais altas, foram utilizadas para isolar e purificar bactérias endofíticas. Neste procedimento de purificação as culturas bacterianas foram transferidas para novos frascos com meios da mesma formulação e as películas dos meios estriadas por esgotamento com auxílio alça de platina em meios sólidos JNFb ou LGI (Döbereiner; Baldani; Baldani, 1995) e Dygs (Rodrigues Neto; Malavolta Junior; Victor, 1986). Nessa purificação, as culturas foram passadas várias vezes nos diferentes meios, e posteriormente foram estocadas no Laboratório de Solos da Embrapa Agroindústria Tropical. Os estoques

das culturas foram mantidos em temperatura ambiente, usando tubos com cultura sobre meio sólido inclinado de JNFb, LGI e Dygs coberto com óleo mineral, e em freezer, onde tubos crioscópicos com cultura em meio Dygs líquido foi acrescido de glicerol, a 50% de concentração final.

Posteriormente, realizou-se um ensaio com estirpes dos cactos em meios semi-sólidos com sais de JNFb e diferentes fontes de carbono (pH 5,8). As subculturas das bactérias foram ativadas e crescidas em meio líquido Dygs durante uma noite a 30°C, sob agitação a 125 rpm, e alíquotas destas (15 µL) foram inoculadas (triplicata) em meios semi-sólidos. As fontes escolhidas foram: L-tartarato, oxalato, sacarose, D-rafinose, succinato, alfa-cetoglutarato, citrato, meso-eritritol + NH₄, D-sorbitol, glicerol, D-manitol, L-arabinose, D-galactose, D-frutose, L-ramnose e D-glicose, e para a formulação dos meios seguiu-se o procedimento adotado por Weber *et al.* (1999). Os frascos inoculados e não inoculados com as culturas foram incubados em estufa tipo BOD a 30°C, e após 6 dias foram avaliados pelo crescimento e formação de película subsuperficial no meio. Na ocasião da avaliação adotaram-se escalas: nd (crescimento não detectado), 1 (pouco), 2 (médio) e 3 (crescimento ótimo).

As características de crescimento nos meios semi-sólidos visou identificar grupos de bactérias homogêneas de forma que estirpes com fisiologia diferente pudessem ser inseridas em testes de solubilização de fosfato e consideradas para a inoculação em mudas.

2.4 Avaliação das bactérias endofíticas pela solubilização de fosfato *in vitro*

Das diferentes estirpes bacterianas obtidas, 12 foram avaliadas pelo crescimento e formação de halos de solubilização de fosfato em meios GL (Katznelson; Bose, 1959) e Pikoskaya (Pikoskaya, 1948). A composição do meio GL é de 10 g de glicose, 2 g de extrato de levedura, 15 g de ágar bacteriológico; dissolvidos em 1 L de água destilada, sendo depois da autolavagem adicionado de 50 mL de K₂HPO₄ (10%) e 100 mL de CaCl₂ (10%), esterilizados separadamente. Isto possibilita um precipitado de fosfato inorgânico, CaHPO₄. Por sua vez, o meio Pikoskaya é composto de 0,5 g de extrato de levedura, 10 g de glicose, 5 g de Ca₃(PO₄)₂, 0,5 g de (NH₄)₂SO₄, 0,2 g KCl, 0,2 g de NaCl, 0,1 g de MgSO₄.7H₂O,

traços de $MnSO_4$, traços de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 15 g de ágar bacteriológico e 1 L de água destilada.

As culturas bacterianas foram ativadas e crescidas em meio líquido Dygs, durante uma noite a 30°C, sob agitação a 125 rpm, e alíquotas destas suspensões (5 µL) foram transferidas e aplicadas sobre os meios em placas de Petri (duas), divididas em quatro quadrantes. As placas inoculadas e sem inoculação foram incubadas em estufa tipo BOD a 30°C, e após 8 a 10 dias foram avaliadas pelo crescimento bacteriano e formação de halos. Adotaram-se as seguintes categorias: nd (sem crescimento e/ou halo não detectado), 1 (formação de halo < 1 mm de diâmetro), 2 (formação de halo entre 1 e 2 mm de diâmetro) e 3 (formação de halo > 2 mm de diâmetro).

2.5 Obtenção de mudas micropropagadas de Mandacaru

Mudas de Mandacaru já vinham sendo cultivadas no Laboratório de Cultura de tecidos da Embrapa Agroindústria Tropical. O fato de ter-se protocolo de proliferação *in vitro* facilitou a obtenção de mudas. Ademais, optou-se por este cacto colunar devido a sua característica de crescimento mais rápido e ser considerado para fins ornamentais, entre outros.

As mudas foram obtidas a partir de secções dos ápices caulinares (3 cm cada), no período de julho/2011 a fevereiro/2012. Os fragmentos eram cultivados em frascos contendo 30 mL de meio de cultura JADS (Correia *et al.*, 1995), com concentrações salinas pela metade, e depois acondicionados em sala climatizada (média de 27°C) e com fotoperíodo de 12h. Ao final do período de cultivo em laboratório, tinha-se cerca de mais de 200 explantes com comprimento variando de 4 a 8 cm o que permitiu a realização do ensaio.

2.6 Contribuição de bactérias endofíticas de cactos em mudas

Mudas de Mandacaru obtidas em laboratório foram selecionadas e submetidas à inoculação com sete culturas bacterianas, sendo quatro estirpes da raiz de Mandacaru e três de Coroa-de-frade, duas de raízes e uma da parte aérea, mais um controle sem inoculação bacteriana.

Para este ensaio as mudas foram acondicionadas (grupos de doze) em sacos plásticos hermeticamente fechados, onde se aplicaram suspensões líquidas

(12 mL) contendo de 10^6 a 10^8 células viáveis das bactérias isoladas dos cactos. Estes sacos com e sem bactérias e mudas foram incubados durante 48 h em geladeira, para que ocorresse uma colonização bacteriana dirigida, sem interferência de outros micro-organismos.

Decorridos os dois dias na geladeira, mudas de cada tratamento foram avaliadas pelo comprimento, biomassa fresca e seca e pela colonização por bactérias diazotróficas. Para avaliar a colonização bacteriana, as plantas foram separadamente lavadas em água corrente e água esterilizada, separadas frações de 1 g para maceração em gral, diluição em série até 10^{-8} e inoculação em meios semi-sólidos JNFb e LGI, conforme já descrito anteriormente.

As demais mudas foram transplantadas para células, com capacidade para 31 ml, de bandejas de polipropileno atóxico, preenchidas com a mistura de casca de arroz parcialmente carbonizada, vermiculita de textura média e vermicomposto (proporção volumétrica de 5:3:2), segundo recomendações de Silva (2007). As bandejas foram distribuídas de forma que os tratamentos formassem blocos em bancadas numa estufa coberta com plástico rígido e fechada nas laterais com tela anti-afídeo. Após três meses de cultivo nas bandejas, as mudas foram transferidas para vasos de plástico maiores, com capacidade para 280 mL, contendo o substrato da formulação anterior. Isto permitiu o cultivo dos cactos pelos três meses seguintes.

Ao final de seis meses de cultivo em estufa, os *Mandacarus* foram avaliados pela altura da parte aérea, biomassa e colonização por bactérias diazotróficas endofíticas. Das raízes e das partes aéreas foram separadas frações que foram submetidas à esterilização superficial, para avaliar as populações de bactérias diazotróficas endofíticas da mesma forma como foi feito com amostras de cactos coletadas em campo, e o procedimento foi similar ao descrito anteriormente.

As frações restantes das partes aéreas e das raízes foram secas em estufa até obter-se peso constante. Posteriormente, frações da parte aérea foram trituradas em moinho tipo Willey com peneira (20 Mesh). Frações de 0,2 g foram submetidas à digestão sulfúrica para determinar teor de N e de 0,5 g para digestão nitroperclórica para dosar teores de P, K, Ca, Mg e S, seguindo-se Silva (2009).

Amostras do substrato usado para o crescimento foram analisadas, e características químicas e físicas (Silva, 2009) podem ser observadas na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Análise física, química e físico/química.

Atributos	Resultado	Unidade
Frações granulares		
>16 mm	0,00	%
8 - 16 mm	0,00	%
4- 8 mm	3,70	%
2 - 4 mm	21,45	%
1 - 2 mm	18,55	%
0,5 - 1 mm	26,01	%
0,25 - 0,5 mm	16,92	%
0,125 - 0,25 mm	8,19	%
< 0,125 mm	5,19	%
Índice de grossura	43,70	%
Densidade Seca	152,55	kg/m ³
Densidade úmida	453,6	kg/m ³
Umidade atual	33,6	%
CRA-10	35,39	%
Carbono orgânico	106,9	g/kg
Nitrogênio total	6,3	g/kg
C/N	16,9	
pH	6,8	
CE	0,8	dS/m
Cálcio	34,8	mg/litro
Magnésio	189,6	mg/litro
Potássio	776,0	mg/litro
Sódio	544,0	mg/litro
Fósforo	44,0	mg/litro
Cloreto	1684,0	mg/litro
N-NO ₃	66,1	mg/litro
N-NH ₄	6,6	mg/litro
S-SO ₄	45,3	mg/litro
Boro	NA	mg/litro
Cobre	0,00	mg/litro
Ferro	0,00	mg/litro
Manganês	0,00	mg/litro
Zinco	0,00	mg/litro

2.7 Análise estatística dos dados

Os dados de ocorrência de bactérias endofíticas em Mandacaru e Coroa-de-frade foram submetidos à análise estatística, no delineamento inteiramente casualizados, com cinco repetições. Para essa análise, as densidades populacionais de bactérias diazotróficas foram transformadas em log x, sendo posteriormente as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Tukey (5%).

O delineamento experimental adotado em estufa foi o de blocos casualizados, com três repetições representadas por nove plantas cada. Para a análise de variância, densidades populacionais de bactérias foram igualmente transformadas em log x, e posteriormente as médias dos tratamentos comparadas pelo teste Tukey (5%), utilizando-se o programa SAS.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Bactérias endofíticas cultiváveis em cactáceas

A presença de bactérias endofíticas em Mandacaru e Coroa-de-frade foi evidenciada (Tabela 3.1) e feita sua codificação (Tabela 3.2), mas não se detectou diferenças nas populações das bactérias. Esta associação está sendo descrita pela primeira vez com as espécies do semiárido brasileiro. As populações detectadas variaram de até 15×10^2 células/g de raiz e até $0,9 \times 10^2$ células/g de caule fresco de Mandacaru, e de até 25×10^2 células/g de raiz e até $9,5 \times 10^2$ células/g de massa fresca da parte aérea de Coroa-de-frade.

Tabela 3.1. Número mais provável (NMP) de bactérias endofíticas em cactos e o número de isolados obtidos.

Espécie	Raiz		Parte aérea	
	Número x 10^2 /g MF*	Isolados	Número x 10^2 /g MF	Isolados
<i>Cereus jamacaru</i>	0,4-15	10	0,4-0,9	04
<i>Melocactus zehntneri</i>	0,3-25	09	0,4-9,5	05

*MF - massa fresca.

Tabela 3.2 Codificação e origem de bactérias endofíticas de cactáceas.

Estirpe	Planta	Local	Meio	Diluição
CAC 01	Mandacaru	Raiz	JNFb	10^2
CAC 02	Mandacaru	Raiz	JNFb	10^2
CAC 03	Mandacaru	Raiz	LGI	10^2
CAC 04	Mandacaru	Raiz	LGI	10^2
CAC 05	Coroa-de-frade	Raiz	LGI	10^2
CAC 06	Coroa-de-frade	Raiz	JNFb	10^{-3}
CAC 07	Coroa-de-frade	Raiz	LGI	10^2
CAC 08	Coroa-de-frade	Caule	JNFb	10^2
CAC 09	Coroa-de-frade	Caule	LGI	10^2
CAC 10	Mandacaru	Raiz	LGI	10^2
CAC 11	Coroa-de-frade	Raiz	JNFb	10^2
CAC 12	Coroa-de-frade	Caule	JNFb	10^2
CAC 13	Mandacaru	Raiz	JNFb	10^2

As densidades populacionais de bactérias foram baixas quando comparadas com populações de bactérias diazotróficas observadas em espécies diferentes, como *Stenocereus pruinosus* (7×10^4 /g raiz fresca), *Stenocereus stellatus* ($1,5 \times 10^4$ /g raiz fresca) e *Opuntia ficus-indica* ($1,1 \times 10^4$ /g raiz fresca) (Mascarua-Esparza; Villa-Gonzalez; Caballero-Melado, 1988); em nove cactáceas mexicanas ($40-325 \times 10^5$ /g raiz seca) (Loera; Sánchez-Yáñez; Penã-Cabriales, 1996) e até 10^6 células viáveis (unidades formadoras de colônias) por grama de raiz fresca de *Pachycereus pringlei* (Puente; Li; Bashan, 2009a).

A baixa densidade populacional de bactérias detectada em Mandacaru e Coroa-de-frade pode ser atribuída em parte à condição de ambiente prevalente na época da coleta de amostras, coincidindo com o período seco do ano, além do processo de esterilização superficial com cloramina-T dos materiais analisados. Neste ambiente seco do semiárido obtiveram-se estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas, o que era desejado neste estudo.

3.2 Habilidade de bactérias diazotróficas de cactos em usar fontes de carbono

Neste estudo foram obtidas 13 estirpes de bactérias endofíticas, sendo 06 oriundas de Mandacaru e 07 de Coroa-de-frade. O crescimento dessas estirpes bacterianas em meios com diferentes fontes de carbono, submetidas à condição de fixação biológica de nitrogênio (Tabela 3.2), possibilitou identificar grupos homogêneos sendo capazes de crescer em substratos diferentes (Figura 3.1). Destaca-se que um grupo homogêneo, obtido de Coroa-de-frade (CAC 07 e CAC 09), cresceu nas 16 fontes orgânicas (L-tartarato, oxalato, sacarose, D-rafinose, succinato, alfa-cetoglutarato, citrato, meso-eritritol + NH_4 , D-sorbitol, glicerol, D-manitol, L-arabinose, D-galactose, D-frutose, L-ramnose e D-glicose), o que mostra ampla versatilidade e possibilidade de colonizar vários nichos e utilizar vários substratos. Tal observação tem sido relatada para as bactérias diazotróficas pertencentes ao gênero *Burkholderia* (Weber *et al.*, 1999; Coenye; Vandamme, 2003).

De outro modo, um grupo formado pelas estirpes CAC 06 e CAC 2 apresentaram pouca habilidade de crescer com as fontes orgânicas testadas, indicando a possível especificidade, e talvez sua ocorrência seja restrita ao Mandacaru e à Coroa-de-frade. A habilidade de crescer com esses substratos tem

sido constatado com *Micrococcus luteus* (Wieser *et al.*, 2002) e espécie isolada do cacto *Coryphantha neglecta* (Loera; Sánches-Yáñez; Penã-Cabriales, 1996). Certa especificidade com cana-de-açúcar tem sido relatado para bactérias da rizosfera, como o gênero *Beijerinckia* (Moreira *et al.*, 2010), e a interação específica entre vegetais e bactérias endofíticas deverá ser considerado em trabalhos moleculares com bactérias diazotróficas.

As bactérias isoladas tiveram crescimento diferenciado nos meios semi-sólidos, sob condição de fixação biológica (Tabela 3.2 e Figura 3.2), e podem vir constituir novas espécies de bactérias endofíticas. As estirpes CAC 04, CAC 05, CAC 07, CAC 09, CAC 10, CAC 11, CAC 12 e CAC 13 assemelharam-se pelo uso de fontes de carbono no meio semi-sólido com a espécie *Azospirillum lipoferum* (Eckert *et al.*, 2001), exceto pelo uso de sacarose. Observa-se que tal espécie também foi isolada em cactos do gênero *Opuntia* (Rao; Venkateswarlu, 1982) e nas espécies *Stenocereus stellatus* e *Opuntia ficus-indica* (Mascarua-Esparza; Villa-Gonzalez; Caballero-Melado, 1988) e *Echinocereus horzonthalonius* (Loera; Sánches-Yáñez; Penã-Cabriales, 1996). Algumas estirpes tem semelhança com bactérias do gênero *Enterobacter* sp. (Fernandes; Fernandes; Rodrigues, 2001), identificado nos cactos pertencente a *Thelocactus bicolor* (Loera; Sánches-Yáñez; Penã-Cabriales, 1996), do gênero *Klebsiella* sp. (Izard *et al.*, 1981) encontrada em *Pachycereus pringlei* (Puente; Li; Bashan; 2009a) e da espécie *Sphingomonas paucimobilis* (Balkwill *et al.*, 1997).

Todas as demais estirpes cresceram com as fontes alcoólicas (glicerol, D-sorbitol e D-manitol). Ainda, as estirpes CAC 03 e CAC 09 cresceram bem com L-tartarato, oxalato, citrato e succinato, o que permite distingui-las pela fisiologia de crescimento nos meios semi-sólidos.

A formação de grupos homogêneos de bactérias endofíticas (Figura 3.1) deverá ser usada para realizar análises moleculares futuras e identificar espécies dessas bactérias endofíticas.

Tabela 3.3. Crescimento de isolados bacterianos obtidos dos cactos Mandacaru e Coroa-de-frade em meios contendo sais de JNFB e diferentes fontes de carbono (pH=5,8).

Isolado	L-Tartarato	Oxalato	Citrato	Succinato	N-acetilglucosamina	D-Manitol	Meso-Eritriol + NH ₄	D-Sorbitol	Glicerol	L-Arabinose	D-Galactose	D-Frutose	L-Ramnose	D-Rafinose	D-Glicose	Sacarose
CAC 01	nd	3	2	nd	3	3	3	nd	nd	3	3	3	3	3	3	3
CAC 02	nd	nd	nd	1	3	nd	nd	nd	nd	nd	1	2	2	2	2	2
CAC 03	3	2	3	3	nd	3	3	2	2	3	3	3	3	2	3	3
CAC 04	3	nd	3	3	3	3	1	1	1	3	2	3	3	3	3	3
CAC 05	3	nd	3	2	3	3	3	2	1	2	1	3	3	3	3	3
CAC 06	nd	nd	nd	nd	3	nd	nd	nd	nd	1	nd	2	1	2	nd	nd
CAC 07	3	1	3	3	3	3	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3
CAC 08	2	2	2	nd	nd	nd	nd	1	1	3	1	1	2	2	2	3
CAC 09	3	2	3	3	3	3	3	2	1	2	2	3	3	3	3	1
CAC 10	Nd	nd	3	3	3	3	3	2	1	3	2	3	3	3	1	2
CAC 11	1	nd	nd	2	3	2	nd	1	2	3	3	3	3	3	2	3
CAC 12	3	nd	1	2	3	1	1	1	2	3	3	3	3	2	2	3
CAC 13	2	nd	1	2	2	2	3	1	1	2	2	2	3	3	1	2

*Crescimento ótimo (3), médio (2), pouco (1) e não detectado (nd). Médias de três repetições.

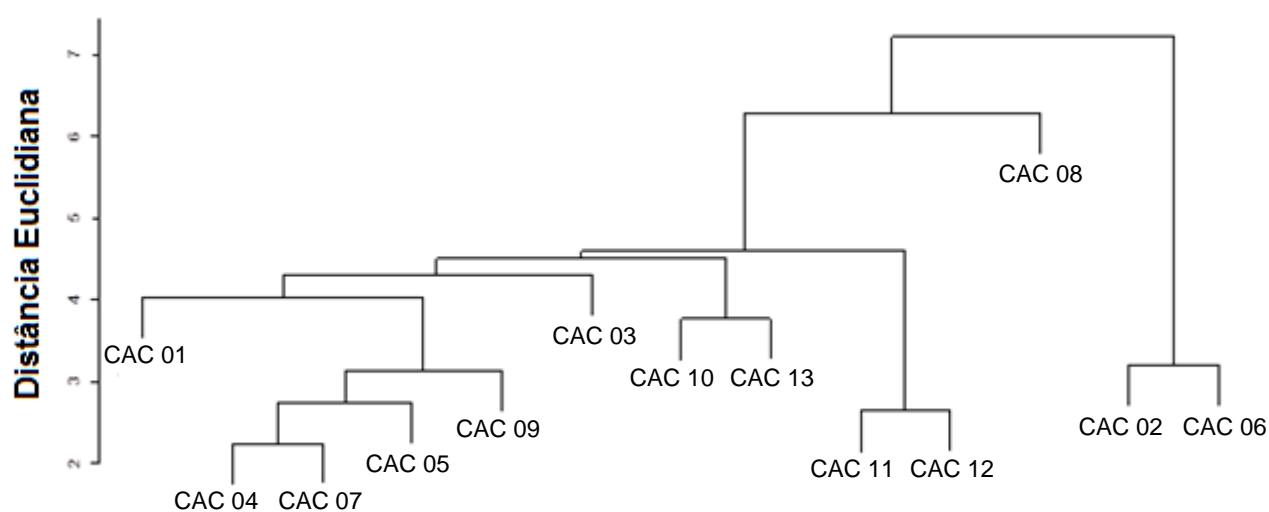


Figura 3.1 Dendrograma de similaridade baseado na distância euclidiana entre os isolados, de acordo com o uso de fontes de carbono.

3.3 Capacidade de bactérias diazotróficas em solubilizar fosfato em meio de cultura artificial

As diferentes estirpes de bactérias endofíticas foram avaliadas pela habilidade de formar halos em meios GL e Pikoskaya (Tabela 3.4), indicativo de solubilização de fosfato. O crescimento das bactérias em meio GL foi confirmado para oito estirpes, sendo que CAC 05 e CAC 11 apresentaram ótima formação de halo e para outras quatro não se detectou crescimento no meio. Por sua vez, todas as estirpes bacterianas cresceram no meio Pikoskaya, e os halos de solubilização de fosfato foram maiores para CAC 04, CAC 07, CAC 09 e CAC 11. As diferenças em crescimento e a consequente formação de halos transparentes podem ser devidas à forma e a capacidade de solubilizar o fosfato em meio artificial. Salienta-se que no meio GL tem-se fosfato na forma CaHPO_4 , enquanto o meio Pikoskaya contém $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Outros constituintes dos meios utilizados igualmente poderiam afetar o crescimento microbiano, sendo que somente GL tem sido usado tanto avaliar a atividade de solubilização de fosfato para fungos e bactérias do solo (Souchie *et al.*, 2005).

O fósforo é um elemento essencial para o desenvolvimento das plantas, mas o teor do elemento disponível é geralmente baixo nos solos tropicais (Souchie *et al.*, 2005). Algumas bactérias endofíticas poderiam auxiliar as plantas na aquisição de fósforo pela degradação da rocha e pela mobilização do elemento para a fração solúvel no solo, além de ajudar no estabelecimento de cactos em áreas rochosas (Puente; Li; Bashan; 2004a; Lopez *et al.*, 2009). O mecanismo para essa solubilização ocorre pela mudança do pH do ambiente com a secreção, pelas bactérias, de ácidos orgânicos ou prótons que dissolvem os minerais e aumentam a quelação (Gyaneshwar *et al.*, 2002; Carrillo; Li ; Bashan, 2002; Vessey, 2003).

O crescimento e formação de halos no meio Pikoskaya já foram observados para bactérias diazotróficas isoladas de *Opuntia ficus-indica* (Costa; Melo, 2005) e *Pachycereus pringlei* e *Opuntia cholla* (Puente *et al.*, 2004a), mas não se tem registro desses estudos com bactérias endofíticas de Mandacaru e Coroa-de-frade. Também, Lopez *et al.* (2011) observaram o uso de $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ com formação de halo para bactérias isoladas de *Mammillaria fraileana*.

Tabela 3.4. Atividade de bactérias em solubilizar fosfato em meios de cultura artificial.

Isolado	Formação de halo nos meios	
	GL	Pikoskaya
CAC 01	1	1
CAC 02	1	1
CAC 03	nd	2
CAC 04	nd	3
CAC 05	3	2
CAC 06	1	1
CAC 07	nd	3
CAC 08	1	2
CAC 09	2	3
CAC 10	nd	2
CAC 11	3	3
CAC 12	1	2

Sem crescimento e/ou halo não detectado (nd), 1 (formação de halo < 1 mm de diâmetro), 2 (formação de halo entre 1 e 2 mm de diâmetro) e 3 (formação de halo > 2 mm de diâmetro).

3.4 Contribuição de bactérias diazotróficas no crescimento de mudas

As mudas micropropagadas de Mandacaru foram avaliadas pelo grau de colonização, após serem submetidas à inoculação com bactérias diazotróficas em condições controladas de laboratório. A presença de bactérias selvagens foi constatada nesses materiais propagativos, porém isto não inviabilizou este trabalho (Tabela 3.5). Em mudas controle a população das bactérias endofíticas selvagens atingiu 2×10^3 g de massa fresca, sendo inferior ao observado nas plantas que receberam inoculante bacteriano, e dentre esses tratamentos inoculados não houve variação para a população de bactérias. Na ocasião, os cactos tinham altura similar, bem como a biomassa dos tratamentos, exceto o que recebeu a estirpe CAC 10. Este tratamento foi significativamente inferior ao que recebeu a estirpe CAC 01.

Aos seis meses de cultivo os cactos apresentaram o mesmo crescimento (diferença entre a altura inicial e final), e produção de biomassa seca nas raízes e partes aéreas (Tabela 3.5), dando ideia de que houve compensação em decorrência das diferentes inoculações com bactérias durante o período de cultivo na estufa.

Contudo, ao final de seis meses constatou-se maior densidade populacional de bactérias endofíticas nos caules das plantas inoculadas com CAC

02 e CAC 08, em comparação com o controle (Tabela 3.5). Embora estas estirpes sejam de espécies vegetais e partes distintas, sendo CAC 02 isolado de raízes de Mandacaru e CAC 08 de caule de Coroa-de-frade, elas apresentaram crescimento bastante similar nos meios semi-sólidos (Tabela 3.3), ficaram em posições próximas no dendrograma (Figura 3.1) e não diferiram na atividade de solubilizar fosfato em meio GL (Tabela 3.4).

Tabela 3.5. Dados de crescimento (CRESC), acúmulo de biomassa seca (PS), no caule (PSC), nas raízes (PSR) e populações de bactérias no caule (BACC), e nas raízes (BACR) de mudas de Mandacaru em estufa.

Isolados	Parâmetros das Plantas Inoculadas						
	Período Inicial		Após seis meses de cultivo				
	BACC (log.g ⁻¹)	PSC (g)	PSC (g)	PSR (g)	CRESC* (cm)	BACC (log.g ⁻¹)	BACR (log.g ⁻¹)
CAC 01	5,097b	0,124a	1,340a	0,191a	16,07a	1,68ab	2,737a
CAC 02	4,487c	0,117ab	1,379a	0,171a	14,29a	2,29a	2,960a
CAC 03	4,767bc	0,106ab	1,454a	0,183a	16,69a	1,69ab	2,650a
CAC 07	7,110a	0,087ab	1,318 a	0,181a	16,34a	1,46b	3,257a
CAC 08	4,707bc	0,083ab	1,394a	0,159a	14,55a	2,16a	3,347a
CAC 10	7,080a	0,081b	1,368a	0,173a	15,43a	1,90ab	2,220a
CAC 11	4,493c	0,097ab	1,350a	0,183a	15,70a	1,80ab	2,657a
Controle	3,640d	0,099ab	1,437a	0,162a	15,96a	1,44b	2,813a
Média	5,17	0,10	1,38	0,175	15,63	1,44	2,83
CV (%)	6,08	21,50	14,62	24,37	14,23	16,15	32,24

Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

* Altura final menos a altura inicial.

Os resultados permitem inferir que os tratamentos com bactérias isoladas de cactos do semiárido não influenciaram o crescimento inicial das mudas Mandacaru quando comparados com cactos controles (sem inoculação bacteriana) em substrato formado pela mistura de casca de arroz parcialmente carbonizada, vermiculita de textura média e vermicomposto (5:3:2, v:v). Isto pode ter relação com o período de condução deste ensaio. Mudas de *Pachycereus pringlei* inoculadas com duas estirpes de *Azopirillum brasiliense* (Cd-USA e Sp-245-Brasil) apresentaram melhor crescimento em tamanho do caule, diâmetro e volume, após 11 meses de condução do experimento (Puente; Bashan, 1993). Puente *et al.* (2004b) testando seis bactérias em *Pachycereus pringlei* em dois substratos diferentes (lava rochosa com Perlite e somente Perlite) observou promoção do

crescimento do cacto, após 12 meses. Semelhante período de condução e cultivo foi adotado por Puente *et al.* (2009b) ao inocular bactérias endofíticas em *Pachycereus pringlei*. Lopez *et al.* (2012) inoculando bactérias em mudas de *Mammillaria fraileana* que foram cultivadas três substratos diferentes (riodacito pulverizado, solução de nutrientes com perlita e mínima quantidade de nutrientes com perlita) observaram crescimento e efeito das bactérias após oito meses de cultivo do cacto em substrato com perlita que tinha baixa disponibilidade de nutrientes. Os benefícios dessa associação poderiam resultar da secreção de reguladores de crescimento como auxinas, giberelinas e citosina que estimulam atividades metabólicas nas raízes (Cocking, 2003), e também não deve ser descartada a possibilidade de haver fixação biológica de N₂ em cactáceas.

3.5 Teores de macronutrientes de mudas

Os teores de macronutrientes de caules de Mandacaru podem ser observados nas Tabelas 3.6 e 3.7. Não ocorreram variações significativas os tratamentos para o teste de Tukey ($P < 0,05$), exceto para magnésio. Em presença da estirpe CAC 01 os cactos apresentaram maior teor deste elemento, comparado aos tratamentos com as estirpes CAC 10 e CAC 11. Pelo conteúdo de Mg na parte aérea do tratamento que recebeu CAC 01 verificou-se incremento de 36% em relação ao controle. As contribuições no acúmulo de outros nutrientes foram sempre inferiores, sendo os teores dos elementos indiferentes nas mudas de Mandacaru. Germano *et al.* (1999) observaram teores mais baixos para P, K, Ca e Mg, e Salem *et al.* (2002) observaram teores mais altos de Ca e Mg em *O. ficus-indica*, do que observado no presente trabalho. Isto dá ideia de que a composição dos cactos é variada, podendo ser influenciadas na absorção de nutrientes e pela interação com bactérias diazotróficas endofíticas. Ainda, Lopez *et al.* (2012) testando o efeito de bactérias diazotróficas em *Mammillaria fraileana* em três substratos diferentes, observaram efeitos de bactérias na absorção e no acúmulo de Ca, K, Mg, N e P na cactácea.

As contribuições de bactérias endofíticas sobre acúmulo de nutrientes em Mandacaru (Tabelas 3.5 e 3.6) não diferem muito do que é observado com outras plantas cultivadas. Weber *et al.* (2000) observaram diferenças de contribuição das bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* e consórcio das

duas nos teores de N da parte aérea em mudas de banana. Em genótipos de trigo, Sala *et al.* (2005) testaram o efeito de isolados das bactérias diazotróficas *Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum lipoferum* para teores de N da parte aérea, obtendo valores abaixo dos que encontramos e significância entre o efeito dos isolados na abundância deste elemento.

Tabela 3.6. Teores de N, Ca e K com seus incrementos (*i*) na biomassa da parte aérea seca de mudas de Mandacaru após seis meses da inoculação.

Isolados	Teor de Nutrientes					
	N (g/Kg)	<i>i_N</i> (%)	Ca (g/Kg)	<i>i_{Ca}</i> (%)	K (g/Kg)	<i>i_K</i> (%)
CAC 01	17,83a	7,45	11,99a	2,39	43,70a	3,0
CAC 02	18,34a	10,55	12,88a	10,02	44,67a	5,3
CAC 03	17,55a	5,81	12,98a	10,85	43,67a	2,9
CAC 07	17,28a	4,17	13,28a	13,41	43,63a	2,8
CAC 08	18,32a	10,42	11,38a	-2,79	44,13a	4,0
CAC 10	16,95a	2,15	11,56a	-1,25	43,16a	1,7
CAC 11	17,07a	2,90	12,44a	6,29	42,77a	0,8
Controle	16,59a		11,71a		42,43a	
Média	17,49		12,27		43,52	
CV (%)	12,60		12,30		10,70	

Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

Tabela 3.7. Teores de Mg, P e S com seus incrementos (*i*) na biomassa da parte aérea seca de mudas de Mandacaru, após seis meses da inoculação.

Isolados	Teor de Nutrientes					
	Mg (g/Kg)	<i>i_{Mg}</i> (%)	P (g/Kg)	<i>i_P</i> (%)	S (g/Kg)	<i>i_S</i> (%)
CAC 01	20,33a	36,5	5,79a	3,4	2,61a	17,2
CAC 02	15,86ab	6,4	6,06a	8,3	2,20a	-1,1
CAC 03	14,28ab	-4,2	6,55a	17,0	2,21a	-1,1
CAC 07	15,08ab	1,2	5,53a	-1,3	2,51a	12,6
CAC 08	14,98ab	0,5	5,69a	1,7	2,10a	-5,7
CAC 10	11,54b	-22,6	5,23a	-6,6	1,87a	-16,1
CAC 11	12,55b	-15,8	6,69a	19,5	2,10a	-5,7
Controle	14,90ab		5,60a		2,23a	
Média	14,94		5,89		2,23	
CV (%)	24,15		12,57		21,23	

Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As bactérias diazotróficas endofíticas colonizam cactos pertencentes às espécies *Cereus jamacaru* e *Melocactus zehntneri* no semiárido, e elas diferem pelas características de crescimento sob condição de fixação biológica de N₂ e uso de fontes de carbono. Algumas dessas bactérias são capazes de solubilizar fosfato inorgânico em meio artificial.

As sete estirpes de bactérias endofíticas de cactos do semiárido brasileiro não expressaram efeito de crescimento durante seis meses de cultivo de mudas de Mandacaru em substrato formado pela mistura de casca de arroz parcialmente carbonizada, vermiculita de textura média e vermicomposto (5:3:2, v:v).

5 PERSPECTIVAS FUTURAS

O trabalho permite sugerir investigação mais aprofundada para a identificação das espécies e avaliar suas contribuições por mais tempo de cultivo de cactáceas. A identificação deve envolver ferramentas moleculares e possivelmente o sequenciamento de genes. As contribuições devem ser avaliadas com cactos sendo cultivados em substratos diversos por um período de tempo entre seis meses a um ano. Estes novos estudos devem permitir o entendimento da relação evolutiva e da relação planta-bactéria.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P., 2007. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 114:325–354.
- ANDRADE, C. T. S. 2002. Um estudo etnobotânico da conexão Homem/Cactaceae no Semiárido baiano. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.
- ANDRADE-LIMA, D. 1989. *Plantas da Caatinga*. Rio de Janeiro. Academia Brasileira de Ciências, p. 110-115.
- ARRUDA, E.; MELO-DE-PINNA, G. F.; ALVES, M., 2005. Anatomia dos órgãos vegetativos de Cactaceae da caatinga pernambucana. *Revista Brasileira de Botânica*, 28:589-601.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S.; DÖBEREINER, J., 1997. Recent advances in BFN with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 29:911-922.
- BALKWILL, D. L.; DRAKE, G. R.; REEVES, R. H.; FREDRICKSON, J. K.; WHITE, D. C.; RINGELBERG, D. B.; CHANDLER, D. P.; ROMINE, M. F.; KENNEDY, D. W.; SPADON, C. M., 1997. Taxonomic Study of Aromatic-Degrading Bacteria from Deep-Terrestrial-Subsurface Sediments and Description of *Sphingomonas aromaticivorans* sp. nov., *Sphingomonas subterranea* sp. nov., and *Sphingomonas stygia* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47:191-201.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; BASHAN, L.E., 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). *Canadian Journal of Microbiology*, 50:521-577.
- BAZZICALUPO, M.; OKON, Y. Associative and endophytic symbiosis., 2000 In: PEDROSA, F.; HUNGRIA, M.; YATES, M. G. & NEWTON, W. E. (Ed.). Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. *Kluwer Academic Publishers*, p. 409-410.
- CARRILLO, A. E.; LI, C. Y.; BASHAN, Y., 2002. Increased acidification in the rhizosphere of cactus seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Naturwissenschaften*, 89:428-432.

COCKING, E. C., 2003. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant and Soil*, 252:169-175.

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

CORREIA, D.; GONÇALVES, A. N.; COUTO, H. Y. Z.; RIBEIRO, M. C., 1995. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. *IPEF*, 48/49:107-116.

COSTA, F. E. C.; MELO, I. S., 2005. Isolamento de bactérias associadas à palma e prospecção do potencial de solubilizar fosfato e fixar nitrogênio. *Agrotrópica*, 17:23-26.

DÖBEREINER, J., 1992. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N₂ fixing bacteria. *Ciência e Cultura*, 44:310-313.

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

ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A., 2001. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C₄-grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51:17–26.

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*. , 1992. New York: Chapman and Hall, 1-42p..

FABRICANTE, J. R.; ANDRADE, L. A.; MARQUES, F. J., 2010. Caracterização populacional de *Melocactus zehntneri* (Britton & Rose) Luetzelburg (Cactaceae) ocorrente em um inselbergue da Caatinga paraibana. *Revista Biotemas*, 23:61-67.

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

FUTUYMA, D. J. *Biologia evolutiva*. 1997. Ribeirão Preto: SBG, 646p..

GERMANO, R. H.; BARBOSA, H. P.; COSTA, R. G.; MEDEIROS, A. N.; CARVALHO, F. F. R., 1999. Avaliação da composição química e mineral de cactáceas no semi-árido paraibano. *Agropecuária Técnica*, 20:51-57.

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

HERRE, E. A.; KNOWLTON, N.; MUELLER, U. G.; REHNER, S.A., 1999. The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation. *Trends in Ecology & Evolution*, 14:49-53.

HUNT, D.; TAYLOR, N., 1990. The genera of Cactaceae: Progress toward consensus. *Bradleya*, 8:85-107.

IZARD, D.; FERRAGUT, C.; GAVINI, F.; KERSTERS, K.; LEY, J.; LECLERC, H., 1981. *Klebsiella terrigena*, a New Species from Soil and Water. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 31:116-127.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO A BIODIVERSIDADE. ESEC DE AIUABA. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/biodiversidade/unidades-de-conservacao/biomas-brasileiros/caatinga/unidades-de-conservacao-caatinga/636-esec-de-aiuaba>>. Acesso em: 10/09/2011.

KATZNELSON, H.; BOSE, B., 1959. Metabolic activity and phosphate-dissolving capability by of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere and non rizosphere soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 5:79-85.

LEMOS, J. R., 2010. Florística e fitogeografia da vegetação decidual da Estação Ecológica de Aiuaba, Ceará, Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira Biociências*, 8:34-43.

LOERA, T. M. L; SÁNCHEZ-YÁÑEZ, J. M.; PENÑ-CABRIALES, J. J., 1996. Activity on the root of cactaceous plants. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 38:7-15.

LOPEZ, B. R.; BASHAN, Y.; BACILIO, M.; CRUZ-AGÜERO, G., 2009. Rock-colonizing plants: abundance of the endemic cactus *Mammillaria fraileana* related to rock type in the southern Sonoran Desert. *Plant Ecology*, 201:575–588.
LOPEZ, B. R.; BASHAN, Y.; BACILIO, M., 2011. Endophytic bacteria of *Mammillaria fraileana*, an endemic rock-colonizing cactus of the southern Sonoran Desert. *Archives Microbiology*, 193:527-541.

LOPEZ, B. R.; TINOCO-OJANGUREN, C.; BACILIO, M.; MENDOZA, A.; BASHAN, Y., 2012. Endophytic bacteria of the rock-dwelling cactus *Mammillaria fraileana* affect plant growth and mobilization of elements from rocks. *Environmental and Experimental Botany*, 81:26-36.

LUGTENBERG, B., KAMILOVA, F., 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63:541-556.

MASCARUA-ESPARZA, M.A.; VILLA-GONZALEZ, R.; CABALLERO-MELADO, J., 1988. Acetylene reduction and indolacetic acid production by *Azospirillum* isolates from Cactaceous plants. *Plant and Soil*, 106:91-95.

MEDEIROS, J. B. L. P. 2004. Zoneamento fito-ecológico da estação ecológica de aiuaba – uma contribuição à educação ambiental e à pesquisa científica. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F., 2010. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, 1:74-99.

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I., 1997. Infection of mottled stripe disease susceptible and resistant varieties of sugar cane by endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. *New Phytologist*, 135:723-737.

OLIVEIRA, J. G. B.; CESAR, H. L.; NUNES, E. P. Vegetação. 1983, pp. 117-130 In: OLIVEIRA, J. G. B. (Coord.) Projeto Aiuaba: relatório técnico (maio/1982-outubro/1983). Fortaleza: FCPC/UFC/NECO.

PEREIRA, R. C. M. 1983. Solos, PP p.72-90 In: OLIVEIRA, J. G. B. (coord.) Projeto Aiuaba – relatório técnico. Fortaleza.

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

PIKOSKAYA, R.I., 1948. Mobilization of phosphates in soil in relation with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17:362–370.

PUENTE, M. E.; BASHAN, Y., 1993. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strains on the germination and seedlings growth of the giant columnar cardon cactus (*Pachycereus pringlei*), *Symbiosis*, 15:49-60.

PUENTE, M. E.; BASHAN, Y.; LI, C. Y.; LEBSKY, V. K., 2004a. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biology*, 6:629-642.

PUENTE, M. E.; LI, C. Y.; BASHAN, Y., 2004b. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. II. Growth promotion of cactus seedlings. *Plant Biology*, 6:643-650.

PUENTE, M. E.; LI, C. Y.; BASHAN, Y., 2009a. Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. *Environmental and Experimental Botany*, 66:389-401.

PUENTE, M. E.; LI, C. Y.; BASHAN, Y., 2009b. Endophytic bacteria in cacti seeds can improve the development of cactus seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 66:402-408.

RAO, A. V.; VENKATESWARLU, B., 1982. Associative symbiosis of *Azospirillum lipoferum* with dicotyledonous succulent plants of the Indian desert. *Canadian Journal of Microbiology*, 28:778-782.

RICKLEFS, R. E. 1996. *A economia da natureza*. Rio de Janeiro: Guanabara, 470p..

ROCHA, E. A.; AGRA, M. F., 2002. Flora do pico do jabre, Paraíba, Brasil: Cactaceae juss. *Acta Botanica Brasilica*, 16:15-21.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JUNIOR, V. A.; VICTOR, O., 1986. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa Phytopathologia*, 12:16.

SALA, V. M. R.; FREITAS, S. S.; DONZELI, V. P.; FREITAS, J. G.; GALLO, P. B.; SILVEIRA, A. P. D., 2005. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 29:345-352.

SALEM, H. B.; NEFZAQUI, A.; SALEM, L. B., 2002. Supplementation of *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage-based diets with barley or shrubs from arid areas (*Opuntia ficus-indica*, *F. inermis* and *Atriplex nummularia* L.) on growth and digestibility in lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 96:15-30.

SILVA, C. I. 2007. Crescimento de plantas de mandacaru (*Cereus* sp.) em diferentes substratos. Monografia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SILVA, F.C. *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes*. 2009. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 627p..

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R., 2005. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40:1149-1152.

STACHOWICZ, J. J., 2001. Mutualism, facilitation, and the structure of ecological communities. *BioScience*, 51:235-246.

TOWNSEND, C. R.; BEGON, M.; HARPER, J. L. 2007. *Fundamentos em ecologia*. Porto Alegre: Artmed, 2007. 576p..

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

WEBER, O. B.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J., 1999. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant and Soil*, 210:103-113.

WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J., 2000. Bactérias diazotróficas em mudas de bananeira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35:2277-2285.

WIESER, M.; DENNER, E. B. M.; KÄMPFER, P.; SCHUMANN, P.; TINDALL, B.; STEINER, U.; VYBIRAL, D.; LUBITZ, W.; MASZENAN, A. M.; PATEL, B. K. C.; SEVIOUR, R. J.; RADAX, C.; BUSSE, H., 2002. Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos *et al.* 1974). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52:629–637.