

INFLUÊNCIA DA SALINIDADE SOBRE O CRESCIMENTO E A PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO DE *Burkholderia* spp. ENDOFÍTICAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

SALINITY INFLUENCE ON THE GROWTH AND PRODUCTION OF INDOLE ACETIC ACID BY ENDOPHYTIC *Burkholderia* spp. FROM SUGARCANE

Arthur Prudêncio de Araujo PEREIRA¹; Maria Camila de Barros SILVA²;
Jéssica Rafaella de Souza OLIVEIRA¹; Andresa Priscila de Souza RAMOS³;
Maria Betânia Galvão Santos FREIRE⁴; Fernando José FREIRE⁴;
Júlia KUKLINSKY-SOBRAL⁵

1. Acadêmicos do curso de Agronomia e Bolsistas do Grupo PET Biotecnologia, Unidade Acadêmica de Garanhuns - UAG, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Garanhuns, PE, Brasil. arthur.ufrpe_uag@yahoo.com.br; 2. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Produção Agrícola, UAG - UFRPE, Garanhuns, PE, Brasil; 3. Professora, Mestre, UAG - UFRPE, Garanhuns, PE, Brasil; 4. Professores, Doutores, Departamento de Agronomia - UFRPE, Recife, PE, Brasil; 5. Professora, Doutora, Tutora do Grupo PET Biotecnologia, UAG - UFRPE, Garanhuns, PE, Brasil.

RESUMO: A cana-de-açúcar é uma fonte importante de alimento e bioenergia. Assim, o estudo da interação com bactérias endofíticas que fixam o nitrogênio atmosférico (FBN) e produzem o ácido indol acético (AIA) vem sendo amplamente explorado. Porém, devido à sensibilidade bacteriana, tanto a produção de AIA, como a FBN, podem sofrer o impacto de fatores edafoclimáticos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes concentrações de NaCl sobre o crescimento bacteriano, a FBN e a produção de AIA *in vitro* de linhagens bacterianas do gênero *Burkholderia*, isoladas endofiticamente de plantas de cana-de-açúcar, cultivadas no estado de Pernambuco. Para tanto, duas linhagens bacterianas endofíticas das espécies *Burkholderia gladioli* e *B. heleaia* foram inoculadas em meio TSA (com L-triptofano) acrescido de cinco concentrações de NaCl: 0,1; 1; 10; 25 e 50 g.L⁻¹ e incubadas sob agitação. O crescimento bacteriano e a produção de AIA foram avaliados através de um espectrofotômetro por 48 horas. Para o teste de fixação de nitrogênio, as linhagens foram inoculadas em meio LGI-P semi-sólido acrescido de cinco concentrações de NaCl: 0,1; 1; 10; 25 e 50 g.L⁻¹ e incubadas a 28°C por 10 dias. Foi possível observar que altas concentrações de NaCl influenciaram negativamente o crescimento bacteriano e a produção do AIA *in vitro* por *B. gladioli* e *B. heleaia*. E que, concentrações de NaCl acima de 25 g.L⁻¹ inibiram a capacidade de fixar nitrogênio, de ambas as linhagens.

PALAVRAS-CHAVE: Ácido Indol Acético. *Burkholderia gladioli*. *Burkholderia heleaia*. Cloreto de sódio. Fixação Biológica de Nitrogênio.

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma fonte importante de alimento e bioenergia para diversos países nos trópicos e subtropicais, tornando-se um componente essencial para a economia dos mesmos (WACLAWOVSKY et al., 2010). Ela é considerada uma das principais culturas do Brasil, sendo produzida industrialmente nas mais diversas regiões do país (BALDANI et al., 2002). A cada ano agrícola, nota-se a expansão de suas áreas de cultivo, principalmente para a região semi-árida. Essa região é caracterizada por apresentar solos rasos, ricos em minerais primários de fácil intemperização, altas taxas de evaporação e baixos índices pluviométricos, favorecendo a evaporação da água salina presente na solução do solo e, conseqüentemente, a precipitação de sais na superfície do mesmo (WILLADINO et al., 2011), podendo causar déficit hídrico na planta (AYERS & WESTCOT, 1999), ou acúmulo de sais nos tecidos

internos do vegetal, ocasionando efeitos deletérios a micro-organismos associados e ao seu metabolismo (MUNNS; TESTER, 2008). Logo, estudos que avaliem os efeitos da salinidade na microbiota associada às plantas poderão auxiliar a melhoria do manejo desta cultura em solos salinos.

Devido à sua grande importância, o Brasil tem investido cada vez mais nos estudos da diversidade microbiana associada a plantas de cana-de-açúcar. Essa diversidade se apresenta como importante alternativa para melhorar as características econômicas da planta e a sustentabilidade da cultura, pela diminuição no uso de produtos provindos de fontes não renováveis, como o petróleo, largamente utilizado na fabricação de fertilizantes nitrogenados (TEJERA et al., 2005; PERIN et al., 2006; GOVINDARAJAN et al., 2007; LUVIZOTTO, 2008; LUVIZOTTO et al., 2010). A cultura da cana-de-açúcar é uma das gramíneas que apresenta interação com bactérias endofíticas que fixam o nitrogênio atmosférico (diazotróficas) e

produzem o ácido indol acético (AIA), mecanismos associados à promoção de crescimento vegetal (OLIVARES et al., 1996; BALDANI et al., 2002; KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004; HARDOIM et al., 2008).

A cana-de-açúcar é altamente extratora, retirando do solo quantidades maiores de nitrogênio do que aquelas que são adicionadas em adubações, podendo ser explicado pela fixação biológica de nitrogênio (FBN) (BODDEY et al., 2003). Boddey et al. (2001) relatam que a FBN tem se mostrado eficiente, pois por meio da técnica da diluição isotópica de ^{15}N estimaram que mais de 60% do nitrogênio acumulado em algumas variedades de cana-de-açúcar foram provenientes da FBN. Enquanto que Oliveira et al. (2002), em plantas de cana-de-açúcar micropropagadas, quando inoculadas com diferentes espécies de bactérias diazotróficas, apresentaram cerca de 30% do N total absorvido pela planta oriundo da FBN. Além disso, Reis et al. (2009) afirmam que essa contribuição pode chegar em torno de 70%, dependendo da variedade de cana-de-açúcar, da fertilidade do solo, das condições climáticas e do manejo da cultura. Portanto, há a necessidade de se estudar novas estirpes bacterianas que sejam mais efetivas e eficientes em prover o nitrogênio para a cultura, visando a futura inoculação de estirpes eficientes no manejo da cana.

O ácido indol acético é um regulador de crescimento vegetal da classe das auxinas, produzido no meristema apical das plantas, tendo a função de promover o crescimento de raízes e caules através do alongamento celular (CENTELLAS et al., 1999). A produção de auxinas também pode ser realizada por bactérias; que, quando em associação com as plantas, podem promover o crescimento vegetal (PATTEN E GLICK, 1996; RYU; PATTEN, 2008; KOCHAR et al., 2011; LÓPEZ-VALDEZ et al., 2011). Além das bactérias, fungos também podem produzir auxinas e atuarem como promotores de crescimento vegetal (SANTOS et al., 2010). Atualmente, já se tem conhecimento de algumas espécies de bactérias associadas a plantas de cana-de-açúcar, como as do gênero *Burkholderia* (ID 32008), que possuem a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, solubilizar fosfato inorgânico e promover o crescimento vegetal (PERIN et al., 2006; MENDES et al., 2007; LUVIZOTTO et al., 2010).

Tanto a produção de AIA, como a FBN, podem sofrer o impacto de fatores edafoclimáticos, pois assim como as plantas, as bactérias apresentam variações na tolerância a estresses que influenciam a expressão de suas características. Dentre os

principais fatores que podem afetar a promoção de crescimento vegetal por algumas bactérias, quando estas se encontram associadas às plantas, estão a temperatura, salinidade, umidade e pH do solo (RUMJANEK et al., 2005). Além disso, segundo Fareleira et al. (2007), o grau de tolerância pode apresentar grandes variações, quando se diz respeito, principalmente, à tolerância à salinidade.

Os sais, depositados na superfície do solo, têm efeitos tóxicos sobre as plantas, interferindo deste modo em todo seu desenvolvimento (NÓBREGA et al., 2004a). Além disso, também afetam o crescimento bacteriano dentro e fora da planta, assim, características de promoção de crescimento vegetal, podem ser afetadas negativamente pelo estresse salino. Estudos específicos demonstram que nos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, os efeitos prejudiciais em relação ao sal são mais explícitos, e o cloreto de sódio (NaCl) tem sido largamente utilizado como indicador da tolerância de bactérias à salinidade (ABDELMOUMEN et al., 1999).

Nesse cenário de expansão da cultura da cana-de-açúcar a regiões propícias ao acúmulo de sais, como o Sertão Pernambucano, e os efeitos que os sais podem causar sobre a comunidade microbiana benéfica associada à cana, é de fundamental importância a prospecção de estirpes bacterianas que apresentem a capacidade de colonizar os tecidos e promover o crescimento vegetal, ainda que submetidas a condições de elevadas concentrações de sais no solo. Essa busca constitui-se em alternativa viável e sustentável, visando a implantação da cultura em estudo em regiões de diferentes características edafoclimáticas, favorecendo sua expansão.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes concentrações de NaCl sobre o crescimento bacteriano, a fixação biológica de nitrogênio atmosférico e a produção de AIA *in vitro* de linhagens bacterianas do gênero *Burkholderia*, isoladas endofiticamente de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no estado de Pernambuco.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens bacterianas

Foram avaliadas duas linhagens bacterianas endofíticas das espécies *Burkholderia gladioli* (G18) e *B. heleaia* (G28), capazes de produzir AIA e fixar nitrogênio, pertencentes à coleção de culturas microbianas do Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana, da Unidade Acadêmica

de Garanhuns / Universidade Federal Rural de Pernambuco (UAG/UFRPE).

As linhagens foram previamente isoladas em meio LGI-P (DÖBEREINER et al., 1995), sendo a linhagem G18 proveniente de colmo da variedade RB 867515 e a G28 de raiz da variedade RB 863129 de plantas de cana-de-açúcar cultivadas na Estação Experimental de Cana-de-açúcar de Carpina (EECAC/UFRPE), Carpina/Pernambuco, (7°51'03''S e 35°15'17''O).

Crescimento bacteriano

Cada linhagem foi inoculada, a partir de uma colônia isolada, em 5 mL de meio de cultura líquido *Trypcase Soy Agar* (TSA), e incubadas a 28°C por 24h sob agitação constante (120 rpm). Após esta etapa, um inóculo de 10⁶ unidade formadoras de colônia por mililitro de meio (UFC/mL) foram transferidos para 25 mL de meio líquido TSA acrescido de L-triptofano (5 mM) e sob os seguintes tratamentos: 0,1; 1; 10; 25 e 50 g.L⁻¹ de NaCl, limite de concentrações para caracterizar bactérias halotolerantes (OETTERER, 2009), sendo incubados a 28°C sob agitação constante (120 rpm). O crescimento bacteriano foi acompanhado por meio da densidade ótica (DO), em espectrofotômetro a 600 nm, segundo Kuklinsky-Sobral et al. (2005). Foram realizadas leituras após 24 e 48 horas da inoculação e os experimentos foram realizados em triplicata.

Produção bacteriana de ácido indol acético

Cada linhagem foi inoculada, a partir de uma colônia isolada, em 5 mL de meio de cultura líquido TSA, e incubadas a 28°C por 24h sob agitação constante (120 rpm). Após esta etapa, um inóculo de 10⁶ UFC/mL foram transferidos para 25 mL de meio líquido TSA acrescido de L-triptofano (5 mM) e sob os seguintes tratamentos: 0,1; 1; 10; 25 e 50 g.L⁻¹ de NaCl (RADWAN et al., 2005), sendo incubados a 28°C sob agitação constante (120 rpm) por 48 horas.

Dois mililitros da cultura bacteriana foram centrifugados a 12.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi tratado com o reagente de Salkowski (2% de FeCl₃ 0,5 M em 35% de ácido perclórico), na proporção de 1,5:0,5, e a reação foi incubada por 30 min na ausência de luz. Após esta etapa, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (530 nm). As leituras foram realizadas após 24 e 48 horas da inoculação e os experimentos foram realizados em triplicata. Para a estimativa da produção de AIA, foi utilizada uma curva padrão, previamente obtida, com

concentrações conhecidas de AIA (VETEC): 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 µg.L⁻¹.

Fixação de nitrogênio

Cada linhagem foi inoculada, a partir de uma colônia isolada, em 5 mL de meio de cultura líquido TSA, e incubadas a 28°C por 24h sob agitação constante (120 rpm). Após esta etapa, um inóculo de 10⁶ UFC/mL foram distribuídos em tubos de vidro de 13 mL contendo 8 mL de meio LGI-P semi-sólido (sem fonte nitrogenada) (DÖBEREINER et al., 1995) acrescido de cinco concentrações de NaCl: 0,1; 1; 10; 25 e 50 g.L⁻¹ (RADWAN et al., 2005). As linhagens foram incubadas a 28°C, por 10 dias. Após este período, houve a análise dos tratamentos. A avaliação das linhagens positivas foi efetuada qualitativamente, onde a presença de um halo claro de crescimento bacteriano caracterizou o potencial em fixar o nitrogênio atmosférico. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Análise estatística

Os dados de crescimento bacteriano e produção de AIA foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a análise de médias pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, pelo o software estatístico SISVAR® versão 5.3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Crescimento bacteriano

Observou-se que concentrações acima de 10 g.L⁻¹ influenciaram negativamente o desenvolvimento das bactérias. A linhagem G18 (*B. gladioli*) teve seu crescimento inibido na concentração de 50 g.L⁻¹ de NaCl e uma queda de desenvolvimento aos 25 g.L⁻¹. Contudo, apresentou bom desenvolvimento em até 10 g.L⁻¹ de NaCl (Figura 1A). A linhagem G28 (*B. heleaia*) apresentou taxa de crescimento menor que a G18, pois apresentou DO máxima de 0,4, nas condições utilizadas, enquanto que a G28 atingiu até 0,6 de DO. Além disso, a *B. heleaia* foi mais sensível ao sal, pois a concentração de 25 g.L⁻¹ já inibiu o desenvolvimento desta bactéria. Contudo, assim como a linhagem de *B. gladioli*, a linhagem G28 apresentou bom crescimento nas concentrações de até 10 g.L⁻¹ de NaCl (Figura 1B), podendo ser sugerido que as duas linhagens necessitem de certa quantidade de sal para se desenvolverem satisfatoriamente.

Em trabalho realizado por Nóbrega et al. (2004b), com bactérias diazotróficas, não houve nenhuma linhagem bacteriana que cresceu na concentração de 50 g.L⁻¹ de NaCl, como nos

resultados observados no presente trabalho. Contudo, Medeiros et al. (2007), avaliando linhagens fixadoras de nitrogênio quanto à tolerância à salinidade e a temperatura, constataram

que houve crescimento bacteriano em concentrações de 50 g.L⁻¹ de NaCl, indicando a variação nos níveis de tolerância à salinidade por diferentes bactérias.

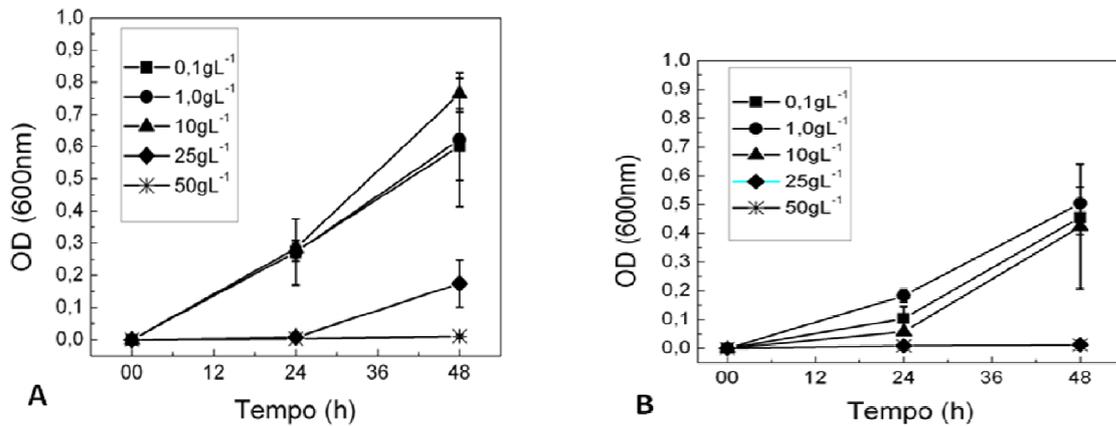


Figura 1. Curvas de crescimento (Densidade Óptica - DO) de linhagens endofíticas associadas a cana-de-açúcar, em meio líquido TSA acrescido de 0,1; 1; 10; 25 e 50 g.L⁻¹ de NaCl. A) Linhagem G18 de *B. gladioli*; B) Linhagem G28 de *B. heleia*. Os pontos que não apresentam sobreposição das barras indicam que as médias diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

A busca de genótipos bacterianos tolerantes à salinidade é uma solução eficaz para problemas que ocorrem com a fixação biológica de nitrogênio. Um exemplo disto, é demonstrado por Medeiros et al. (2008), que observaram que a nodulação do feijão-caupi, por *Bradyrhizobium sp.*, foi reduzida à medida que o teor de salinidade do solo aumentava, comprovando a inibição desta característica tão importante para o desenvolvimento vegetal. Logo, trabalhos que selecionem linhagens bacterianas tolerantes à salinidade, associadas a gramíneas como cana-de-açúcar, poderão contribuir para o desenvolvimento dessas plantas em solos salinos.

Produção bacteriana de ácido indol acético

Foi observado que as maiores concentrações de NaCl avaliadas, 25 e 50 g.L⁻¹, influenciaram negativamente a produção de AIA (Figura 2) pelas duas espécies de bactérias endofíticas, tanto a *B. gladioli* quanto a *B. heleia*, assim como no crescimento bacteriano (Figura 1). Contudo, a linhagem G18 apresentou declínio na sua produção de AIA a partir de 10 g.L⁻¹ (Figura 2A), enquanto que o seu desenvolvimento celular não foi afetado nessa concentração (Figura 1A). Logo, estes resultados demonstram que a capacidade de produzir AIA, mecanismo envolvido com a promoção de crescimento vegetal, foi mais influenciada negativamente do que o crescimento celular bacteriano.

A linhagem G28, diferentemente da G18, não apresentou influência de NaCl nas concentrações de 0,1; 1 e 10 g.L⁻¹ sobre a produção de AIA (Figura 2B), assim como no seu desenvolvimento celular.

O ácido indol acético estimula o aumento da elongação celular e atua na divisão e diferenciação celular, tornando-se um fitormônio de extrema importância para as plantas (RAVEN et al., 2001). Dessa maneira, a produção de AIA por bactérias pode auxiliar o desenvolvimento vegetal. Porém, as características ambientais podem interferir nesta produção. Existem evidências de que os microorganismos podem selecionar uma via metabólica diferenciada, dependendo do ambiente (PATTEN; GLICK, 1996).

De acordo com Radwan et al. (2005), a adição de NaCl ao meio de cultura inibiu a produção de auxina nas linhagens de *Azospirillum sp.* e *Herbaspirillum seropedicae*, em concentrações superiores a 5 g.L⁻¹. No presente trabalho, as linhagens foram capazes de produzir AIA em concentrações de até 50 g.L⁻¹, mesmo diminuindo a produção à medida que a concentração de sal aumentava. Logo, os resultados demonstram que as linhagens de *Burkholderia gladioli* e *B. heleia* avaliadas apresentaram maior tolerância à salinidade quanto à expressão da característica de produzir AIA *in vitro*.

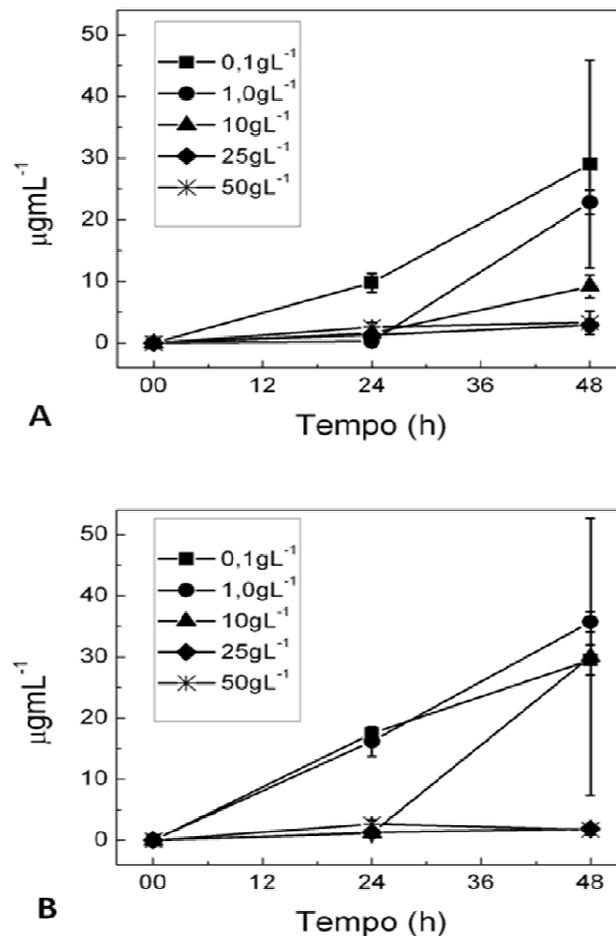


Figura 2. Curvas de produção ácido indol acético por linhagens endofíticas associadas a cana-de-açúcar, em meio líquido TSA acrescido de L-triptofano e de 0,1; 1; 10; 25 e 50 g L⁻¹ de NaCl. A) Linhagem G18 de *B. gladioli*; B) Linhagem G28 de *B. heleia*. Os pontos que não apresentam sobreposição das barras indicam que as médias diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Fixação de nitrogênio

As linhagens endofíticas diazotróficas de *B. gladioli* (G18) e *B. heleia* (G28), isoladas de cana-de-açúcar, foram capazes de fixar nitrogênio *in vitro* em meio de cultura LGI-P, apenas nas concentrações de 0,1; 1 e 10 g.L⁻¹ de NaCl, apresentando a formação do halo característico de crescimento bacteriano em meio de cultura semi-sólido sem fonte nitrogenada (Figura 3).

Não ocorreu formação do halo quando as linhagens foram submetidas a concentrações de 25 e 50 g.L⁻¹ de NaCl. Logo, a FBN dessas linhagens foi inibida nessas concentrações. A avaliação da FBN por linhagens bacterianas endofíticas, quando submetidas a diferentes concentrações de cloreto de sódio, foi útil, já que foi possível diferenciar o comportamento dessa característica quanto à tolerância à salinidade. Embora seja uma

metodologia que possibilite apenas qualificar as bactérias quanto a FBN *in vitro*, é um teste rápido e eficiente de avaliação utilizado nos laboratórios, pois em um meio livre de fonte nitrogenada e sob a condição semi-sólida, há um ambiente ideal para o desenvolvimento dos micro-organismos e para a fixação biológica do nitrogênio atmosférico. (SILVEIRA, 2008).

É importante ressaltar que as duas linhagens são de espécies diferentes, isoladas de nichos e genótipos de cana diferentes, mas apresentaram o mesmo comportamento quanto à influência da salinidade sobre a expressão fenotípica da fixação de nitrogênio *in vitro*.

Existem vários relatos na literatura em relação à tolerância de bactérias a salinidade, variando desde 0 a 60 g L⁻¹. Porém, ainda pouco se sabe sobre a influência do sal em bactérias associadas a plantas de gramíneas, e em particular

sobre fixação de nitrogênio (HUNGRIA et al., 2001; NÓBREGA et al., 2004a). Os objetivos desse tipo de avaliação não se limitam em avaliar o potencial

de determinada linhagem, mas, também, podem influenciar na caracterização das espécies em estudo (CHEN et al., 2000; FRIONI et al., 2001).

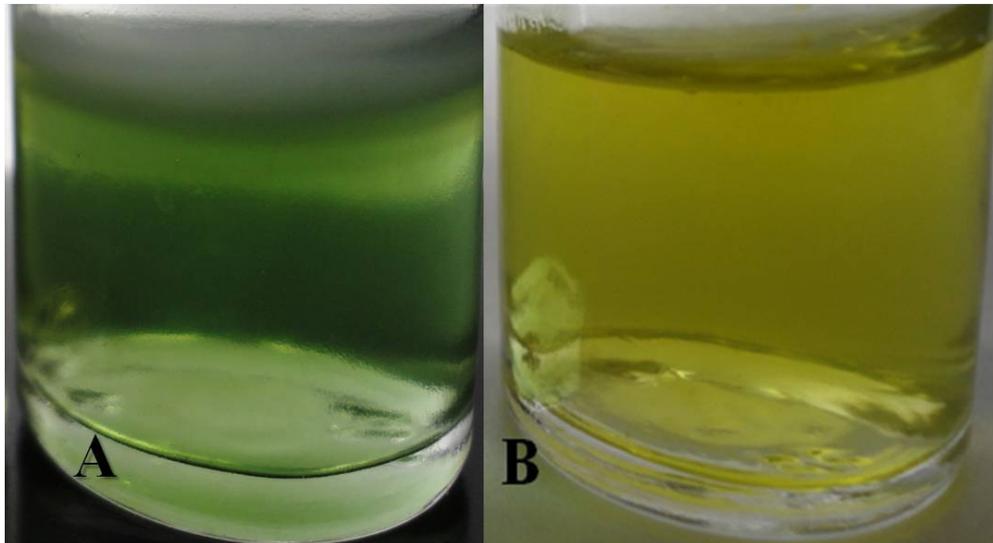


Figura 3. Teste de fixação de nitrogênio em meio LGI-P, livre de fonte nitrogenada. A) Linhagem positiva, apresentando um halo de crescimento (a cor esverdeada representa a alcalinização do meio, após a fixação biológica de nitrogênio, para alguns tratamentos); B) Linhagem negativa, ausência de halo de crescimento.

Segundo Elsheikh (1998), algumas espécies bacterianas que possuem o crescimento rápido, apresentam maior tolerância a elevadas concentrações de NaCl em meio de cultura, quando comparadas com algumas espécies de desenvolvimento lento. Isso ocorre devido a maior produção de polissacarídeos que recobrem as células bacterianas, reduzindo assim a superfície de contato entre a célula e o meio que contém sal, dessa forma, as bactérias desse tipo possuem maior resistência ao efeito osmótico.

Desse modo, pesquisas realizadas *in vitro*, podem auxiliar na escolha de isolados para serem testados em casa de vegetação e, posteriormente, em campo, na forma de inoculantes. Um exemplo de avaliação preliminar foi realizada por Zou et al. (1995), que avaliaram o desenvolvimento de *Acacia ampliceps* inoculada com a estirpe *Rhizobium* PMA63/1, onde a mesma conseguiu ser tolerante até 30,5 g.L⁻¹ de NaCl, e com uma estirpe de *Bradyrhizobium* PMA37, que se apresentou bastante sensível, tolerando apenas 2,93 g L⁻¹. Portanto, o estudo de linhagens diazotróficas tolerantes à salinidade é de extrema importância, já que estas linhagens podem vir a diminuir ou substituir, nos canaviais implantados em solos salinos, a adubação nitrogenada.

CONCLUSÕES

Altas concentrações de NaCl, acima de 10g.L⁻¹, influenciam negativamente o crescimento bacteriano de *B. gladioli* e *B. heleia* associadas a plantas de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco, com a linhagem de *B. gladioli* apresentando-se mais tolerante à salinidade que a linhagem de *B. heleia*.

Altas concentrações de NaCl influenciam negativamente a produção do ácido indol acético *in vitro*. No entanto, a linhagem *B. heleia* foi mais tolerante que *B. gladioli* para a expressão dessa característica.

Concentrações de NaCl acima de 25 g.L⁻¹ inibem a capacidade de fixar nitrogênio, *in vitro*, tanto da linhagem de *B. gladioli* e quanto da *B. heleia*.

O sal pode ser um fator limitante para as linhagens bacterianas avaliadas, podendo afetar negativamente o seu potencial biotecnológico.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq, a FACEPE e ao MEC/SESu – Programa de Educação Tutorial (PET) pelas bolsas e apoio financeiro; e, ao grupo do Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana da UAG/UFRPE.

ABSTRACT: The sugarcane is an important source of food and bioenergy. So, the study of its interaction with endophytic bacteria that fix atmospheric nitrogen (BNF) and produce indole acetic acid (IAA) has been widely explored. However, due to bacterial sensitivity, both the production of IAA as the BNF may suffer the impact of soil and climatic factors. The goal of this study was to evaluate the influence of the NaCl different concentrations on the bacterial growth, on the BNF and on the IAA production *in vitro* by endophytic bacterial strains of the genus *Burkholderia* isolated from sugarcane plants grown in the Pernambuco State. In this study, two endophytic bacterial strains of *Burkholderia gladioli* and *B. heleaia* species were inoculated in TSA (with L-tryptophan) added of five NaCl concentrations: 0.1, 1, 10, 25 and 50 g.L⁻¹ and incubated under agitation. Bacterial growth and IAA production were assessed using a spectrophotometer for 48 hours. The nitrogen fixation test was carried out by the inoculation of the bacteria in semi-solid LGP-I added of five NaCl concentrations: 0.1, 1, 10, 25 and 50 g.L⁻¹ and incubated at 28°C during 10 days. It was observed that high concentrations of NaCl influenced negatively the bacterial growth and indole acetic acid production *in vitro* by *B. gladioli* and *B. heleaia*. Nevertheless, NaCl concentrations above 25 g.L⁻¹ inhibited the ability to fix nitrogen in both strains.

KEYWORDS: Indole Acetic Acid. Fixation Biological Nitrogen. *Burkholderia gladioli*. *Burkholderia heleaia*. Sodium chloride.

REFERÊNCIAS

- ABDELMOUMEN, H.; FILALI-MALTOUF, A.; NEYRA, M.; BELABED, A.; IDRISSEI, M. M. Effect of high salts concentration on the growth of rhizobia and responses to added osmotic. **Journal of Applied Microbiology**, London, v. 86, n. 6, p. 889-898, jan. 1999.
- AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. **A qualidade da água na agricultura**, Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba. Estudos FAO: **Irrigação e Drenagem**, 29. rev.1, p. 1-53, 1999.
- BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane – reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 29, p. 417-423, jan. 2002.
- BODDEY, R. M.; POLIDORO, J. C.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R. & URQUIAGA, S. Use of ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to sugar cane and others grasses. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 28, p. 889-895, dec. 2001.
- BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, Crawley, v. 252, p. 139-149, aug. 2003.
- CENTELLAS, A. Q.; FORTES, G. R. L.; MÜLLER, N. T. G.; ZANOL, G. C.; FLORES, R.; GOTTINARI, R. A. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 181-186, fev. 1999.
- CHEN, W.; LEE, T. M.; LAN, C. C.; CHENG, C. P. Characterization of halotolerant rhizobia isolated from root nodules of *Canavalia rosea* from seaside areas. **Microbiology Ecology**, New York, v. 34 n. 1, p. 9-16, jul. 2000.
- 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. 60p.
- ELSHEIKH, E. A. E. Effects of salt on rhizobia and bradyrhizobia: a review. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v. 132, n. 3, p. 507-524, jun. 1998.
- FARELEIRA, P.; MATOSI, N.; FERREIRA, E.; MARQUES, J. F. Tolerância ao sal e às altas temperaturas de estirpes de *Sinorhizobium meliloti* provenientes de zonas secas do Alentejo. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, João Pessoa, 2º semestre de 2007. Disponível em: <<http://eduep.uepb.edu.br/rbct/sumarios/pdf/tolerancia.pdf>>. Acesso em: 02 mai. 2011.

- FRIONI, L.; RODRIGUEZ, M.; MEERHOFF, M. Differentiation of rhizobia isolated from native legume trees in Uruguay. **Applied Soil Ecology**, Vancouver, v. 16, n. 3, p. 275-282, sep. 2001.
- GOVINDARAJAN, M.; KWON, S.; WEON, H. Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella* sp. GR9. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, n. 23, p. 997-1006, dec. 2007.
- HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S. V.; ELSAS, J. D. V. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, Vancouver, v. 16, n. 10, p. 463-471, oct. 2008.
- HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; RAQUEL, G. C.; MANUEL, M. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soyabean nodules in Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, Brisbane, v. 33, n. 10, p. 1349-1361, sep. 2001.
- KOCHAR, M.; UPADHYAY, A.; SRIVASTAVA, S. Indole-3-acetic acid biosynthesis in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Psd and plant growth regulation by hormone overexpression. **Research in Microbiology**, Granada, v. 162, p. 426-435, mar. 2011.
- KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, London, v. 6, p. 1244-1251, apr. 2004.
- KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. **Plant and Soil**, Crawley, v. 273, p. 91-99, jun. 2005.
- LÓPEZ-VALDEZ, F.; FERNÁNDEZ-LUQUEÑO, F.; CEBALLOS-RAMÍREZ, J. M.; MARSCH, R.; OLALDE-PORTUGAL, V.; DENDOOVEN, L. A strain of *Bacillus subtilis* stimulates sunflower growth (*Helianthus annuus* L.) temporarily. **Scientia Horticulturae**, Mission, v. 128, p. 499-505, fev. 2011.
- LUVIZOTTO, D. M.; MARCON, J.; ANDREOTE, F. D.; DINI-ANDREOTE, F.; NEVES, A. A. C.; ARAÚJO, W. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Genetic diversity and plant-growth related features of *Burkholderia* spp. from sugarcane roots. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 26, p.1829-1836, mar. 2010.
- LUVIZOTTO, D. M. **Caracterização fisiológica e molecular de *Burkholderia* spp. associadas as raízes de cana-de-açúcar**. 2008. 94 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.
- MEDEIROS, E. V.; SILVA, K. J. P.; MARTINS, C. M.; BORGES, W. L. Tolerância de bactérias fixadoras de nitrogênio provenientes de municípios do Rio Grande do Norte à temperatura e a salinidade. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, João Pessoa, v. 7, n. 2, p. 159-168, 2º semestre. 2007.
- MEDEIROS, R.; SANTOS, V.; ARAÚJO, A.; FILHO, C. O. Estresse salino sobre a nodulação em feijão-caupi. **Caatinga**, Mossoró, v. 21, n. 5 (Número Especial), p. 202-206, Dez. 2008.
- MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; ARAUJO, W. L.; RAAIJMAKERS, J. M. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: Genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 7259-7267, sep. 2007.
- MUNNS, R.; TESTER M. Mechanisms of Salinity Tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 651-681, jun. 2008.

NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; LIMA, A. S. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, n. 2, p. 269-279, mar./apr. 2004a.

NÓBREGA, R. S. A.; MOTTA, J. S.; LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. S. Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade in vitro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 899-905, jul./ago. 2004b.

OETTERER, M. **O processo de fermentação do pescado (Anchovamento)**. USP/ ESALQ, São Paulo, 662p. mai. 2009. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/Fermentação%20%20pescado.pdf>>. Acessado em: 12 de junho. 2011.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Occurrence of endophytic diazotroph *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly in gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, Firenze, v. 21, p. 197-200, set. 1996.

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

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

PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; CASTRO-GONZÁLEZ, R.; SANTOS, P. E.; CABELLOS-AVELAR, T.; GUEDES, H. V.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n.5, p. 3103 – 3110, fev. 2006.

RADWAN, T. E. E.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 10, p. 997-1004, oct. 2005.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906p.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; URQUIAGA, S. Fixação biológica de nitrogênio associativa: um futuro promissor para cana-de-açúcar e outras gramíneas. **Boletim informativo da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 1, p. 28 - 29, jan. 2009.

RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P.; FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; SILVA, P. H. S.; VIANA, F. M. P. Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, p. 281-335, abr. 2005.

RYU, R. J.; PATTEN, C. L. Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by tyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 190, n. 21 p. 7200–7208, aug. 2008.

SANTOS, H. A.; MELLO, S. C. M.; PEIXOTO, J. R. Associação de isolados de *Trichoderma* spp. e ácido indol-3-butírico (AIB) na promoção de enraizamento de estacas e crescimento de maracujazeiro. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 6, p. 966-972, nov./dec. 2010.

SILVEIRA, E. L. **Inoculações de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva**. 2008. 83 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, fev. 2008.

TEJERA, N.; LLUCH, C.; MARTÍNEZ-TOLEDO, M.V.; GONZÁLES-LÓPEZ, J. Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. **Plant and Soil**, Crawley, n. 270, p. 223-232, jul. 2005.

WACLAWOVSKY, A. J.; SATO, P. M.; LEMBKE, C. G.; MOORE, P. H.; SOUZA, G. M. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal**, London, v. 8, p. 263-276, apr. 2010.

WILLANDINO, L., ALVES, R. O. F., ARCANJO, E. S. J., GOUVEIA, A. N., RANGEL, T. C. Estresse salino em duas variedades de cana-de-açúcar: enzimas do sistema antioxidativo e fluorescência da clorofila. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 2, p. 417-422, abr-jun, 2011.

ZOU, N.; DART, P. J.; MARCAR, N. E. Interaction of salinity and rhizobial strain on growth and N₂- fixation by *Acacia ampliceps*. **Soil Biological and Biochemistry**, Brisbane, v. 27, n. 4/5, p. 409-413, abr./mai. 1995.