

BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIADAS A RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR: SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO INORGÂNICO E TOLERÂNCIA À SALINIDADE

DIAZOTROPHIC BACTERIA ASSOCIATED TO ROOTS OF SUGARCANE: INORGANIC PHOSPHATE SOLUBILIZATION AND THE SALINITY TOLERANCE

**Isanely Batista dos SANTOS¹; Danubia Ramos Moreira de LIMA²;
Jesimiel Gomes BARBOSA¹; João Tiago Correia OLIVEIRA³;
Fernando José FREIRE⁴; Júlia KUKLINSKY-SOBRAI⁵**

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. izanely@gmail.com; 2. Mestranda do curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo, UFRPE, Recife, PE, Brasil; 3. Mestrando do curso de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens, UAG - UFRPE, Recife, PE, Brasil; 4. Professor, Doutor, Departamento de Agronomia, UFRPE, Recife, PE, Brasil; 5. Professora, Doutora, Tutora do Grupo PET Biotecnologia, UAG -UFRPE, Garanhuns, PE, Brasil.

RESUMO: O uso de micro-organismos na agricultura é uma alternativa amplamente pesquisada e disseminada, que busca a diminuição no uso de fertilizantes químicos com conseqüente redução da degradação do meio ambiente. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de solubilização de fosfato inorgânico (SFI) e o crescimento bacteriano em meio de cultura livre de fonte nitrogenada sob diferentes concentrações de NaCl de isolados bacterianos diazotróficos, associados a raízes de plantas de cana-de-açúcar. Foram avaliados 30 isolados, 15 endofíticos de raiz e 15 da rizosfera. A seleção de bactérias SFI foi realizada em meio sólido contendo fosfato insolúvel, avaliando-se o índice de solubilização (IS). Para a avaliação da influência de sal sobre o crescimento bacteriano em meio livre de nitrogênio, as bactérias foram cultivadas em meio NFb semi-sólido, acrescido de 0; 2,5; e 5% de NaCl. Foi possível observar que 90% dos isolados diazotróficos foram capazes de solubilizar fosfato inorgânico e que os isolados da rizosfera apresentaram os maiores IS. Quanto ao crescimento em meio NFb, foi observado que na ausência do sal todas as bactérias foram capazes de crescer. Contudo, 60% dos isolados foram capazes de crescer em meio NFb acrescido de 2,5% de NaCl e 17% em 5% de NaCl. Quando considerado o nicho do qual as bactérias foram isoladas, observou-se que as bactérias diferiram quanto à capacidade de crescer em meio NFb sob diferentes concentrações de NaCl. Os resultados permitem inferir que esses isolados bacterianos têm aplicações tecnológicas como promotores de crescimento vegetal, inclusive em solos salinos.

PALAVRAS-CHAVE: Bactérias Endofíticas. *Saccharum* spp. Cloreto de sódio. Rizosfera.

INTRODUÇÃO

Dentre as principais culturas produzidas no Brasil, a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) destaca-se por apresentar diversas aplicações, tais como, a produção de álcool, açúcar e a utilização como forragem na alimentação de ruminantes (INUI, 2009). Para um bom desenvolvimento e produtividade da cultura, é necessária a aplicação de nutrientes minerais, como por exemplo, disponibilizar fósforo (P) e nitrogênio (N), cujas demandas são altas para o crescimento e desenvolvimento da cana. O P apresenta papel fundamental no vegetal, participando de compostos importantes nas células, dentre estes, fosfato-açúcares, intermediários da respiração e fotossíntese, bem como componentes de membranas (fosfolipídios), nucleotídeos (como o ATP) e no DNA e RNA (GYANESHWAR et al., 2002; TAIZ; ZIEGER, 2004; GOMES et al., 2010).

Os solos agricultáveis possuem grandes reservas de fósforo, entretanto, apesar da

abundância em solos ácidos, estes formam compostos insolúveis com o ferro, alumínio e matéria orgânica, e em solos alcalinos há formação de reserva solúvel após a sua ligação com o cálcio e o magnésio, levando a indisponibilidade de captação das plantas, devido a sua elevada reatividade (LÓPEZ-BUCIO et al., 2002). Alguns micro-organismos presentes nos solos possuem papel importante na ciclagem de P, hidrolisando formas orgânicas para as formas inorgânicas (PO₄), em decorrência da ação de enzimas hidrolíticas (principalmente fosfatases ácidas), sendo assim possível sua disponibilização para as plantas (BARROTI; NAHAS, 2000; GYANESHWAR et al., 2002).

O nitrogênio está presente na composição de biomoléculas, como ATP, NADH, NADPH, clorofila e proteínas (MIFLIN; LEA, 1976; NANNIPIERI et al., 2003). Dada a importância deste nutriente, a cultura da cana-de-açúcar requer a aplicação de altas doses de fertilizante nitrogenado por hectare (BODDEY et al., 2003), onerando os

custos de produção, devido ao fato de ser um dos nutrientes mais caros (PRADO JUNIOR, 2008). Além do custo, apresenta baixo aproveitamento agrônomico, devido às perdas por lixiviação, causando impacto ao meio ambiente com a eutrofização de rios e lençóis freáticos (TROEH; THOMPSON, 2007). Neste contexto, o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio é uma alternativa que pode reduzir a utilização destes fertilizantes, já que a fixação biológica de nitrogênio (FBN) contribui com cerca de 90% do nitrogênio diretamente disponível para os organismos vivos (TAIZ; ZIEGER, 2004); e na cultura de cana-de-açúcar esta contribuição pode chegar a 60% do nitrogênio exigido pela cultura (POLIDORO et al., 2001).

As bactérias fixadoras de nitrogênio ou bactérias diazotróficas, podem colonizar a região rizosférica, o interior (endofíticas) ou superfície (epifíticas) de tecidos vegetais, inclusive plantas de cana-de-açúcar (BODDEY et al., 2003; FRANCHE et al., 2009). Algumas pesquisas em solos salinos indicam a diminuição das comunidades bacterianas, além do declínio da sua atividade (SARDINHA et al., 2003), pois o excesso de sais solúveis, além de provocar redução do potencial hídrico do solo (REBOUÇAS et al., 1989), resulta em menor capacidade de absorção de água pelas plantas, influenciando em alguns processos biológicos, como a FBN (SHEREEN et al., 1998). Entretanto, há bactérias que toleram baixas concentrações de sal (halotolerantes), caracterizando-se por se desenvolver em meios contendo de 2% a 5% de sais, e outras que requerem um mínimo de 9% e podendo tolerar até 23% de sais no meio, estas são conhecidas como halófitas (OETTERER, 2009).

Devido à funcionalidade fisiológica, benéfica e diversificada, realizada por bactérias rizosféricas e endofíticas no sistema bactéria/solo/planta, tais como, solubilização de fosfato inorgânico, FBN, resistência a elevada concentrações de sais, entre outras, busca-se selecionar e caracterizar isolados bacterianos expressando estas características, em diferentes ambientes. Essa bioprospecção é decorrente do enorme potencial desses micro-organismos que podem intervir positivamente no desenvolvimento das plantas, por isso, diversos trabalhos buscam avaliar a capacidade de bactérias que fixem nitrogênio e solubilizem fosfato inorgânico visando o possível uso da biotecnologia microbiana e aplicabilidade nos sistemas de produções agrícolas (JALILI et al., 2009; TAURIAN et al., 2010; COMPANT et al., 2010), inclusive com potencial aplicação em solos salinos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de solubilização de fosfato inorgânico e o crescimento bacteriano em meio de cultura livre de fonte nitrogenada sob diferentes concentrações de NaCl de isolados bacterianos diazotróficos, associados a raízes de plantas de cana-de-açúcar, cultivadas no Estado de Pernambuco.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados bacterianos

Foram analisados 30 isolados de bactérias diazotróficas, 15 endofíticas de raiz e 15 da rizosfera (região do solo localizada aproximadamente a uma distância de três a cinco milímetros ao redor da raiz), sendo isoladas de duas variedades de cana-de-açúcar (RB92579 e RB867515) com 4 meses após a primeiro corte, cultivadas na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Carpina/Pernambuco, (7°51'03''S e 35°15'17''O). Essas bactérias foram previamente isoladas em meio NFb, segundo metodologia proposta por Döbereiner et al. (1995) e fazem parte da coleção de culturas bacterianas do Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana, da Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG/UFRPE).

Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico *in vitro*

A avaliação da capacidade de bactérias em solubilizar fosfato inorgânico, *in vitro*, foi realizada segundo metodologia descrita por Verma et al. (2001), com algumas modificações. As bactérias foram inoculadas, a partir de colônias isoladas, em meio de cultura sólido contendo fosfato insolúvel, o fosfato de cálcio bibásico, (10g/L glicose; 5 g/L de NH₄Cl; 1 g/L de MgSO₄.7H₂O; 4 g/L de CaHPO₄; 15 g/L de Ágar; pH 7,2), incubadas a 28°C por 72h. A formação de área clara (halo translúcido), ao redor das colônias, indicou a solubilização do fosfato. O índice de solubilização (IS), que expressa à relação do diâmetro médio do halo de solubilização pelo diâmetro médio do halo da colônia foi calculado como método semi-quantitativo, segundo Berraquero et al. (1976). O experimento foi realizado em triplicata.

Influência da salinidade sobre o crescimento bacteriano em meio de cultura livre de fonte nitrogenada

A influência da salinidade sobre a capacidade de bactérias diazotróficas em se desenvolver em meio de cultura livre de fonte

nitrogenada foi avaliada por meio da inoculação de colônias isoladas em meio NFb semi-sólido (DÖBEREINER et al., 1995), acrescido dos seguintes tratamentos: 0% de NaCl; e as concentrações 2,5; e 5% de NaCl designadas para caracterizar bactérias halotolerantes (OETTERER, 2009). Os experimentos foram realizados em duplicata, incubados a 28°C por oito dias, sendo o experimento repetido mais uma vez. O crescimento bacteriano foi avaliado observando-se a presença ou ausência de uma película típica (halo) do crescimento bacteriano no interior do meio de cultura.

Análise estatística

Os índices de solubilização de fosfato 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

Diversos efeitos ocorrem durante a interação bactéria-planta, dentre estes estão a

fixação biológica de nitrogênio e a solubilização de fosfato inorgânico. As bactérias solubilizadoras de fosfato aumentam a disponibilidade de fosfato viável para a planta, promovendo o desenvolvimento vegetal em condições de campo (VERMA et al., 2001; GYANESHWAR et al., 2002, COMPANT et al., 2010). Considerando-se que a cana-de-açúcar é uma cultura que requer fertilizantes nitrogenados e fosfatados, este trabalho avaliou a capacidade de 30 isolados de bactérias diazotróficas associadas a plantas de cana soca, cultivadas em Pernambuco, quanto a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico, *in vitro*, com a perspectiva de selecionar bactérias para futuras aplicações como inoculantes. Neste aspecto, foi observado que das 30 bactérias diazotróficas, endofíticas de raiz e da rizosfera, 90% foram capazes de solubilizar fosfato inorgânico *in vitro*, apresentando a formação de halo claro ao redor das colônias, indicando a solubilização do fosfato (Figura 1). Entre os três isolados de bactérias diazotróficas incapazes de solubilizar fosfato inorgânico em meio sólido, duas foram isoladas da rizosfera e uma endofítica de raiz.

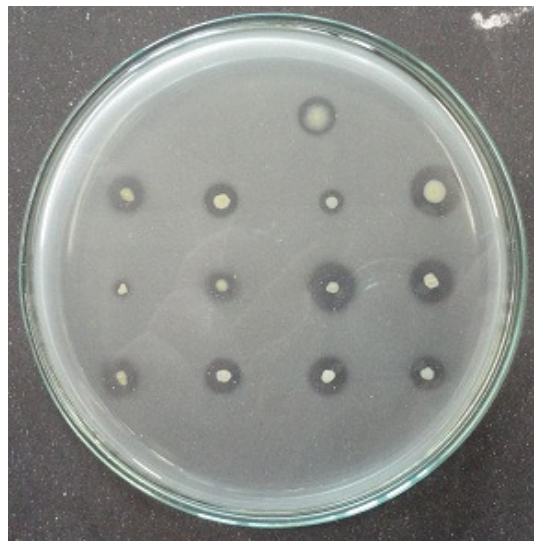


Figura 1. Teste de solubilização de fosfato inorgânico em meio de cultura sólido suplementado com fosfato insolúvel. Os halos claros ao redor das colônias indicam a capacidade de solubilização.

Quando avaliado o índice de solubilização (IS), foi observado que os 27 isolados bacterianos capazes de solubilizar fosfato inorgânico, *in vitro*, expressaram valores de IS variáveis, indicando variabilidade quanto à intensidade de solubilização em meio sólido. As 14 bactérias diazotróficas endofíticas de raiz apresentaram valores de IS entre 1,00 a 2,33 (Figura 2), enquanto que as 13 bactérias da rizosfera apresentaram IS de 1,21 a 3,48 (Figura

3). Portanto, observa-se que as bactérias da rizosfera apresentaram os maiores valores de IS. Neste aspecto, Barea et al. (2005) relatam que na rizosfera há maior concentração de micro-organismos solubilizadores de fosfato, sendo estes metabolicamente mais ativos que isolados de outros nichos. Essa região contém intensa atividade bacteriana devido à presença de secreções exsudadas pelo sistema radicular das plantas, e

assim, atuando como fonte de carbono prontamente disponível para a micro-organismos do solo

(GRAYSTON; JONES, 1996; ZILLI et al., 2003; TAURIAN et al., 2010).

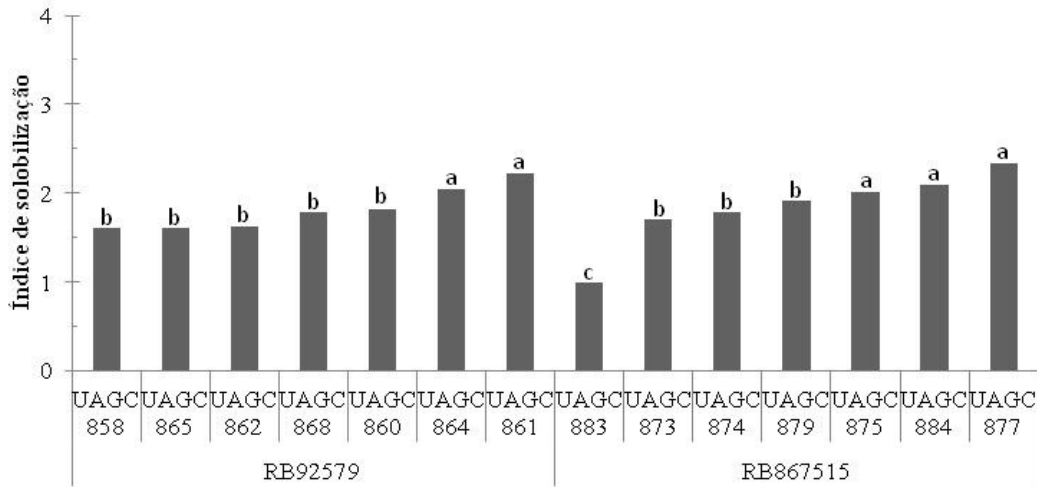


Figura 2. Índice de solubilização de fosfato inorgânico de bactérias endofíticas de raízes das variedades RB92579 e RB867515 de plantas de cana-de-açúcar. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

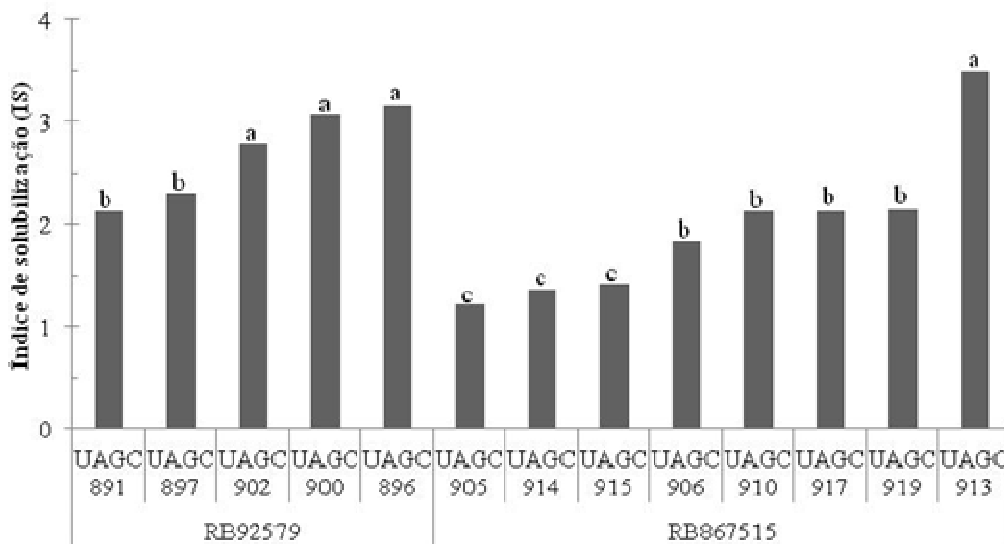


Figura 3. Índice de solubilização de fosfato inorgânico de bactérias da rizosfera das variedades RB92579 e RB867515 de plantas de cana-de-açúcar. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Além a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico, as bactérias diazotróficas associadas às raízes de cana soca foram avaliadas quanto ao crescimento em meio livre de nitrogênio sob diferentes concentrações de NaCl, visando conhecer o potencial de aplicação dessas bactérias, como promotoras de crescimento vegetal, em solos salinos. Dentre as bactérias diazotróficas avaliadas, 100% formaram película de crescimento bacteriano no meio de cultura no tratamento de 0% de NaCl, 60% em 2,5% e apenas 17% em 5% de NaCl.

Contudo, houve variação em relação aos nichos dos quais as bactérias foram isoladas, endofíticas de raiz ou da rizosfera, como apresentado na figura 4. As bactérias endofíticas de raiz apresentaram maior frequência de linhagens capazes de fixar nitrogênio na presença de 2,5% de NaCl em relação a concentração de 5% do sal, comportamento contrário observado pelas bactérias isoladas da rizosfera de cana-de-açúcar (Figura 4), demonstrando que as bactérias de rizosfera podem ser mais adaptáveis a solos salinos e que as bactérias

endofíticas sofrem menos interferência dos sais do solo por estarem no tecido da raiz da planta, sendo menos adaptáveis a altas concentrações de sais. Estes micro-organismos halotolerantes, utilizam, em geral, estratégias de osmo adaptação flexíveis que lhes permitem responder rapidamente a flutuações de salinidade do meio exterior, como a acumulação de íons inorgânicos em concentrações elevadas, mantendo dessa forma a integridade celular

(KYAW, 2009), possibilitando a sobrevivência destes em solos salinos e sódicos (STAMFORD et al., 2005). Esta diversidade de tolerância à salinidade pode ser observada na literatura para diferentes bactérias associadas a diferentes ambientes, como solos e plantas (ELSHEIKH, 1998; SANTOS et al., 2001; NÓBREGA et al., 2004)

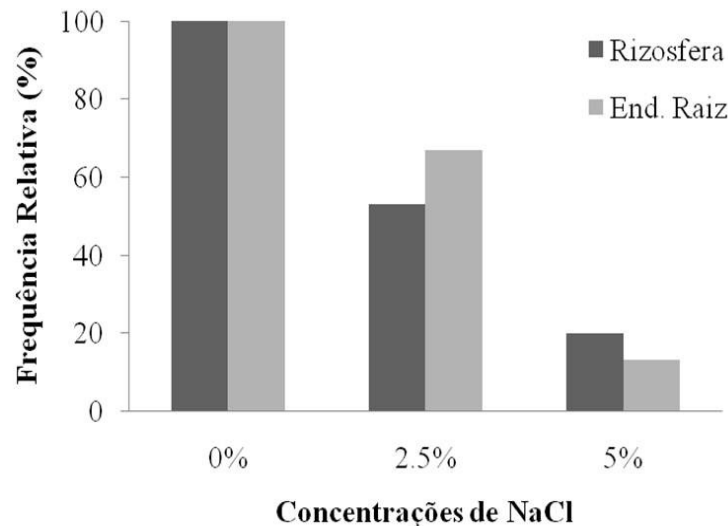


Figura 4. Frequência relativa de bactérias diazotróficas endofíticas de raiz e de rizosfera, de cana-de-açúcar, capazes de crescer em meio de cultura NFb, livre de fonte nitrogenada, sob diferentes concentrações de NaCl: 0; 2,5; e 5%.

As bactérias diazotróficas da cana-de-açúcar demonstraram ser influenciadas no seu desempenho em fixar nitrogênio, relacionado ao aumento da concentração de sal, tornando esse um dos fatores limitantes para o desenvolvimento de sua função. Portanto, as bactérias com melhor adaptação a diferentes concentrações de sal são potenciais candidatas à aplicação em experimentos de promoção de crescimento vegetal e inoculação na cultura da cana-de-açúcar em solos salinizados, visando o uso de tecnologias sustentáveis, que possibilitem a conservação do ambiente e propiciem sustentabilidade na produção da cultura (MEDEIROS et al., 2007).

CONCLUSÕES

Bactérias diazotróficas associadas a plantas de cana-de-açúcar, cultivadas em Pernambuco, apresentaram a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico e crescer em meio de cultura livre de

fonte nitrogenada sob concentrações de 2,5% e 5% de NaCl, tornando-se candidatas a promoção de desenvolvimento vegetal em solos salinos.

Bactérias diazotróficas da rizosfera de cana-de-açúcar apresentam os maiores valores do índice de solubilização de fosfato inorgânico em meio sólido em relação às endofíticas.

Bactérias diazotróficas endofíticas de raiz e da rizosfera de cana soca apresentam diferentes níveis de tolerância em relação à capacidade de crescer em meio de cultura livre de fonte nitrogenada sob diferentes concentrações de NaCl.

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 application of microorganisms in agriculture is an alternative widely researched and disseminated that aimed at reducing the use of chemical fertilizers with consequent reduction of environmental

degradation. The goal of this study was to evaluate the ability to solubilize inorganic phosphate (SIP) and to grow in culture medium free of nitrogen source under different NaCl concentrations of diazotrophic bacterial isolates associated with plant roots of sugarcane. A total of 30 isolates, 15 root endophytic and 15 of rizosphere, were analyzed. The selection of SIP bacteria was assayed by the solubilization index (SI) in solid medium containing insoluble phosphate. The study of the influence of salt on the growth in culture medium free of nitrogen source was evaluated by cultivation in semisolid NFb medium, added of 0; 2.5; and 5% of NaCl. It was observed that 90% of the diazotrophic isolates were able to solubilize inorganic phosphate. It was also observed that the rizosphere bacteria presented the largest SI. The results in the absence of salt showed that all bacteria were able to grow in NFb. However, 60% of the isolates were able to grow in NFb plus 2.5% NaCl and 17% in 5% NaCl. It also was observed that the root endophytic bacteria and rizosphere bacteria presented differences in the ability to grow in NFb under NaCl different concentrations. The results allow inferred that those bacterial isolates have technological applications such as plant growth promoters, even in saline soils.

KEYWORDS: Endophytic Bacteria. Salinity. *Saccharum* spp. Sodium chloride. Rhizosphere.

REFERÊNCIAS

- BAREA, J. M.; POZO, M. J.; AZCÓN, R.; AGUILAR, C. A. Microbial cooperation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 56, p. 1761-1778, jul. 2005.
- BERRAQUERO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, Granada, v. 17, p. 399-406, sep. 1976.
- BARROTI, G.; NAHAS, E. População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 2043-2050, out. 2000.
- BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, The Hague, v. 252, p. 139-149, may. 2003.
- COMPANT, S; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth promoting bacteria in the rhizo - and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 669-678, may. 2010.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D. e BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília, EMBRAPA-SPI; Itaguaí, EMBRAPA-CNPAB, 60p, 1995.
- 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.
- FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 321, p. 35-59, aug. 2009.
- GOMES, E. A.; SOUZA, F. A.; SOUZA, S. M.; VASCONCELOS, M. J. V.; MARRIEL, I. E.; SILVA, U. C. Prospecção de Comunidades Microbianas do Solo Ativas no Aproveitamento Agrícola de Fontes de Fósforo de Baixa Solubilidade. **Embrapa Milho e Sorgo**, Sete Lagoas – MG, p.34, dez. 2010.
- GRAYSTON, S. J. & JONES, D. V. D. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with an annual plant: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. **Applied Soil Ecology**, Vancouver, v. 5, p. 29-56, jan. 1997.
- GYANESHWAR, P.; KUMAR, G.N.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 245, p. 83-93, aug. 2002.

INUI, R. N. **Isolamento e Identificação e bactérias solubilizadoras de fósforo e produtoras de auxina em solos com cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação em genética e melhoramento de plantas Genética do Melhoramento de Plantas. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal – SP, f. 90, jun. 2009.

JALILI, F.; KHAVAZI, K.; PAZIRA, E.; NEJATI, A.; ASADI RAHMANI, H.; RASULI SADAGHIANI, H.; MIRANSARI, M. Isolation and characterization of ACC deaminase producing fluorescent pseudomonads to alleviate salinity stress on canola (*Brassica napus* L.) growth. **Journal of Plant Physiology**, Irvine, v. 166, p. 667–674, set. 2009.

KYAW, C.M. **Domínio Archaea**. Disponível em: <<http://vsites.unb.br/ib/cel/microbiologia/archaea/archaea.html>>. Acesso em: 30 de outubro de 2011.

LÓPEZ-BUCIO, J.; HERNADÉZ-ABREU, E.; SÁNCHEZ-CALEDERÓN, L.; NIETOJACOBO, M.F.; SIMPSON, J.; HERRERA-ESTRELLA, L. Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root systems. **Plant Physiology**, Illinois, v. 129, p. 244-256, may. 2002.

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 - PB, v. 7, n. 2, p. 159-168, 2º semestre. 2007.

MIFLIN, B. J. & LEA, P. J. The pathway of nitrogen assimilation in plants. **Phytochemistry**, London, v. 15, p. 873-885, dez. 1976.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, Exeter, v. 54, p. 655–670, dez. 2003.

NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. e 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 – MG, v. 28, p. 269-279, mar./apr. 2004.

OETTERER, M. **O processo de fermentação do pescado (Anchovamento)**. USP/ ESALQ. 662p. 2009. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/Fermentação%20%20pescado.pdf>>. Acessado em: 17 de junho. 2011.

PRADO JUNIOR, J. P. Q. **Qualidade e produtividade de cana-de-açúcar inoculada com *Gluconacetobacter diazotrophicus* e adubada com nitrogênio mineral e orgânico**. 2008, 58f. Dissertação (Mestrando em Agricultura Tropical e Subtropical), – Instituto Agronômico, Campinas - SP, f. 58, Jan. 2008.

POLIDORO, J. C.; RESENDE A. S.; QUESADA, D. M.; XAVIER, R. P.; COELHO, C. H. M.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. **Levantamento da contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura da cana-de-açúcar no Brasil**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, Seropédica – RJ, p. 8, Dez. 2001.

REBOUÇAS, M. A. A.; FAÇANHA, J. G. V.; FERREIRA, L. G. R.; PRISCO, J. T. Crescimento e conteúdos de N, P, K e Na em 3 cultivares de algodão sob condições de estresse salino. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 1, n. 1, p. 79-85, Jan. 1989.

SANTOS, H.; LAMOSA, P.; COSTA, M. S. Extremófilos: microrganismos à prova de agressões ambientais extremas. **Boletim de Biotecnologia**, Lisboa, v. 69.p. 2-10, aug. 2001.

- SARDINHA, M., MULLER, T., SCHMEISKY, H., JOER GENSEN R. G. Microbial performance in soils along a salinity gradient under acidic conditions. **Applied Soil Ecology**, Vancouver, v. 23, p. 237-244, Jul. 2003.
- SHEREEN, A.; ANSARI, R.; NAQVI, S. S. M.; SOOMRO, A. Q. Effect of salinity on *Rhizobium* sp., nodulation and growth of soybean (*Glycine max.* L.). **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 30, n.1, p. 75-81, Jun. 1998.
- STAMFORD, N. P.; STAMFORD, T. L. M.; ANDRADE, D. E. G. T.; MICHEREFF, S. J. **Microbiota dos Solos Tropicais**. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T. & MENEZES, M., eds. *Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais*, Recife - PE. p. 399, 2005.
- TAÍZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 Ed. Porto Alegre: Artemed, p. 719, 2004.
- TAURIAN, T.; ANZUAY, M. S.; ANGELINI, J. G.; TONELLI, M. L.; LUDUEÑA, L.; PENA, D.; IBÁÑEZ, F.; FABRA, A. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. **Plant Soil**, The Hague, v. 329, p. 421–431, Apr. 2010.
- TROEH, F. R.; THOMPSON, L. M. **Solos e fertilidade do solo**. São Paulo, Andrei, p. 718, 2007.
- VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, Varanasi, v. 91, p. 127-141, Oct. 2001.
- ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 20, p. 391-411, set./dez. 2003.