

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

SILVIA APARECIDA FERREIRA ALBUQUERQUE

**DIVERSIDADE GENÉTICA E FUNCIONAL DE RIZOBACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS**

PONTA GROSSA

2016

SILVIA APARECIDA FERREIRA ALBUQUERQUE

DIVERSIDADE GENÉTICA E FUNCIONAL DE RIZOBACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Weigert Galvão
Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Mazer Etto

Ponta Grossa

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

A345 Albuquerque, Silvia Aparecida Ferreira
Diversidade genética e funcional de
rizobactérias diazotróficas/ Silvia
Aparecida Ferreira Albuquerque. Ponta
Grossa, 2016.
89f.

Dissertação (Mestrado em Ciências
Biológicas - Área de Concentração:
Biologia Evolutiva), Universidade Estadual
de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof^a Dr^a Carolina Weigert
Galvão.

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Mazer
Etto.

1.PGPR. 2.Biofertilizantes. 3.16S rRNA.
I.Galvão, Carolina Weigert. II. Etto,
Rafael Mazer. III. Universidade Estadual
de Ponta Grossa. Mestrado em Ciências
Biológicas. IV. T.

CDD: 631.86



PARANÁ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta
Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e
Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste
(Departamento de Ciências Biológicas).



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 04/2016

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **Silvia Aparecida Ferreira Albuquerque**.

Aos vinte e cinco dias do mês de fevereiro de dois mil e dezesseis, no auditório do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência da Dr^a Carolina Weigert Galvão em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Silvia Aparecida Ferreira Albuquerque**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr^a Carolina Weigert Galvão (Orientadora UEPG), Dr. André Luiz Martínez de Oliveira (UEL) e Dr^a Jesiane Stefania da Silva Batista (UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: **"Diversidade e análises bioquímicas de Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal isoladas de milho"**. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de sessenta dias**; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) **até o prazo máximo de 90 dias após a defesa**; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

ANALISAR AS SUGESTÕES DA BANCA E FAZER AS MODIFICAÇÕES NA
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO

Alteração de Título: sim ☒ não ☐

Novo título: DIVERSIDADE GENÉTICA E FUNCIONAL DE RIZOBACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS

Ponta Grossa, 25 de fevereiro de dois mil e dezesseis.

Prof. Dr^a Carolina Weigert Galvão (UEPG)

Prof^o Dr. André Luiz Martínez de Oliveira (UEL)

Prof. Dr^a Jesiane Stefania da Silva Batista (UEPG)

Dedico esta dissertação aos meus afilhados Artur, Ester e Maria Cecília.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Carolina e Rafael, por todo carinho, paciência e dedicação. Por me receberem no LABMOM e terem transmitidos não apenas conhecimentos científicos, mas também valores, se tornando referências como profissionais e pessoas, exemplo de simplicidade e humildade. Por todo incentivo e confiança, por acreditarem em mim muitas vezes mais que eu mesma, pelos conselhos, por dividirem comigo parte de suas histórias e experiências vividas, sempre me impulsionando a olhar além. Pelas correções quando necessárias e auxílio em concertar os erros cometidos e seguir em frente, enfim pela amizade e relação paternal. Por tudo, minha profunda gratidão.

Ao professor Marcos Pileggi, pela colaboração com a realização deste trabalho, contribuindo para que essa orientação fosse possível.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, pelo conhecimento compartilhado, colaborando com a formação acadêmica. De modo especial também aos professores coordenadores do curso, pelo seu desdobramento e pro do mesmo. A querida Zoli, pela sua disposição em nos atender e auxiliar, sempre resolvendo as questões burocráticas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT) e Fundação Araucária, pelo suporte financeiro.

À professora Jesiane S. S. Batista, por todo empenho em ajudar sempre que necessário, proporcionando oportunidades de participar em eventos, quais contribuíram diretamente para formação e crescimento profissional, por toda colaboração na realização deste trabalho. Pelas partilhas e momentos descontraídos durante as viagens, pelas jantas deliciosas e todo “cuidado de tia”.

Aos professores Emanuel M. Souza, Fabio O. Pedrosa e demais professores do laboratório de Bioquímica - Núcleo de Fixação de Nitrogênio da Universidade Federal do Paraná (UFPR), por todo suporte e parceria com as pesquisas do LABMOM. Agradeço de modo singular ao Valter Baura, por todo apoio com os sequenciamentos e sua exemplar dedicação à pesquisa.

A toda família científica LABMOM, pela dedicação em seus projetos tornando possível a realização deste trabalho, pelo companheirismo e partilha de

conhecimentos. Agradeço a Rafa Furman e ao Adrian pela paciência em me acompanhar nos primeiros passos e aos demais alunos de iniciação científica e pós-graduação, que além do auxílio prático me ajudaram a ser profissional, também ao Adenilson pelo início das atividades deste trabalho.

À Ligia, que além do relacionamento profissional e todo auxílio prestado para o bom andamento dos experimentos, vem acompanhando meus passos desde a graduação permitiu me tornar parte da sua história e junto com sua família me ofereceram apoio em todos os momentos e vibraram com minhas conquistas, coração eternamente grato pela sua amizade. Ah! Obrigada pelas caronas!!!

Aos colegas da turma de 2014/2016 pela convivência, troca de experiências, momentos de estudos árduos e divertidos, os quais tornaram as semanas de disciplinas mais leves. Em especial ao Leandro e o Luiz pela amizade e companheirismo.

Aos meus pais José e Maria, por todo carinho e apoio, mesmo nas situações de difícil compreensão das minhas decisões “absurdas” estiveram torcendo por mim, por terem me corrigido com postura durante as fases da minha vida me ensinando a retidão, obediência e respeito, por suportarem junto comigo a saudade e a dor da distância.

Aos meus irmãos Amilton e Michele e cunhado Welinton por estarem sempre torcendo por mim, pelo carinho e amizade. Minha Vó Josefa por ter contribuído na minha formação desde a infância, por todo cuidado e carinho, pelas conversas e ensinamentos. Meus primos Josiane e José Carlos que sempre torceram muito por mim. É sempre bom poder contar com vocês!

À família Ribas da Costa, que me adotaram com amor incondicional. Sem o apoio de vocês muitos sonhos não seriam possíveis. Obrigada pela permissão de fazer parte da vida de vocês, por suportarem meus momentos de cansaço e mau-humor e ainda celebrar minhas conquistas. Obrigada pelos sobrinhos do coração, muitas vezes ao chegar cansada encontrava um oásis no sorriso das crianças.

A todos os amigos e parceiros do Projeto Contrastes, por todos os momentos de convivência fraterna e oração, em especial a família Arcanjo que sempre estão ao meu lado e mesmo distantes animam e fortalecem a caminhada, pelos questionamentos e reflexões, também ao Douglas pelos conselhos e dicas. Por todas as vezes que eu ouvi de vocês: Calma, já deu tudo certo! Dando-me tranquilidade e segurança.

Ao Jonathan por toda paciência, digamos que muita paciência, chegou em um momento bem atribulado da minha vida e se manteve ao meu lado. Seu amor, carinho e cuidado foram fundamentais em todos os momentos. Obrigada também pelas correções que me fizeram olhar adiante e prosseguir. Ah, claro! Obrigada pelas inacabáveis edições de imagens, melhor que elas bem elaboradas eram os recadinhos que vinham de brinde.

Aos amigos do Grupo Sentinelas da Manhã que acompanharam o início dessa fase e torceram por mim.

A todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

À Deus pelo dom da vida, amor e misericórdia. Por ter colocado em meu caminho pessoas especiais, verdadeiros Anjos, que ajudaram a superar dificuldades e me tornar uma pessoa melhor.

“Nenhum atleta será coroado, se não tiver lutado segundo as regras. ”
(2Timóteo 2,5)

RESUMO

Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPR) estimulam o desenvolvimento das plantas hospedeiras, e a planta, por sua vez, em conjunto com as condições de cultivo, têm um significativo efeito sobre a estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera. Nesse estudo, foi analisada a diversidade de rizobactérias isoladas de milho inoculado com diferentes biofertilizantes e cultivado na presença de diferentes doses de nitrogênio. Além disso, foi avaliado o perfil dos isolados por espectrometria de massa e o potencial de tais isolados na produção de sideróforos, protease, compostos indólicos, cianeto e celulase e na solubilização de fosfato; atividades relacionadas à promoção do crescimento vegetal. Os setenta e sete isolados bacterianos obtidos a partir do uso de cinco diferentes meios de cultivo (JMV, JNFb, NFb, LGI e LGI-P) livres de amônia, foram identificados pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. O biofertilizante e as dosagens de nitrogênio não interferiram significativamente na composição da comunidade de bactérias diazotróficas isoladas da rizosfera de milho. O meio JNFb permitiu o isolamento de um número maior de indivíduos, e esses apresentaram maior riqueza e diversidade. Dentre os isolados, houve a predominância das classes β e γ -Proteobacteria, sendo *Burkholderia* o gênero mais abundante. A análise por espectrometria de massa mostrou potencial para separar gêneros bem representados em nível de estirpe. Mais da metade dos isolados produziram sideróforos (58%) e protease (50,7%); solubilização de fosfatos (36,2%) e aproximadamente um quarto deles (23,1%) foram capazes de produzir celulase. A produção de cianeto de hidrogênio se mostrou bastante rara, sendo detectada em apenas 4,3% dos isolados, todos pertencentes ao gênero *Pseudomonas* sp. Todas as bactérias analisadas apresentaram ao menos uma atividade e 55% apresentam três ou mais. Análises de componentes principais indicaram que (1) os gêneros *Burkholderia* sp. e *Luteibacter* sp., tem correlação significativa ($p < 0,05$ ou $p < 0,001$) com a produção de protease, sideróforos e solubilização de fosfato, (2) *Bacillus* sp. e *Luteibacter* sp., com produção de compostos indólicos e celulase e (3) *Pseudomonas* sp., com produção de protease, cianeto e sideróforos, compostos indólicos e celulase. Diante da demanda de biofertilizantes de gramíneas capazes de substituir parcialmente ou integralmente o uso de fertilizantes químicos, os isolados que apresentaram diversas atividades promotoras do crescimento vegetal se mostram promissores para aplicação como biofertilizante.

Palavras-chave: PGPR, biofertilizantes, 16S rRNA.

ABSTRACT

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) stimulate the development of their host plant, and the plant, in turn, together with the culture conditions has a significant effect on rhizospheric bacterial community structure. In this study, the diversity of cultivable bacteria associated with the rizosphere of maize inoculated with different biofertilizers and growth in different nitrogen doses was analyzed. It was also evaluated the mass spectrometry profile of the isolates and their potential to produce siderophores, protease, indole compounds, cyanide and cellulose, and to solubilize phosphate, all activities related to plant growth promotion. The seventy seven bacterial isolates obtained by the use of five different nitrogen-free media (JMV, JNFb, NFb, LGI e LGI-P) were identified by partial sequencing of the 16S rRNA gene. The biofertilizers and the nitrogen doses did not interfere in the composition of the isolated diazotrophs from maize rhizosphere. JNFb medium permitted the isolation of a greater number of individuals, and they presented the highest richness and diversity. Among the isolates, there was a predominance of β e γ -Proteobacteria classes, being *Burkholderia* the most abundant genus. Mass spectrometry analysis showed potential to separate well represented genus into strain, evidencing new species of the *Burkholderia* genus. More than half of the isolates produced siderophores (58%) and protease (50.7%); solubilize phosphate (36.2%) and approximately a quarter of them (23.1%) were able to produce cellulase. The hydrogen cyanide production showed to be rare, being detected in only 4.3% of isolates, all belonging to the genus *Pseudomonas* sp.. All analyzed bacteria showed at least one activity and 55% showed three or more. Principal component analysis indicated that (1) *Burkholderia* sp. e *Luteibacter* sp. genus have significant correlation ($p < 0,05$ or $p < 0,001$) with protease and siderophores production and phosphate solubilization, (2) *Bacillus* sp. and *Luteibacter* sp. have significant correlation with indole compounds and cellulase production and (3) *Pseudomonas* sp. has significant correlation with protease, cyanide, siderophores, indole compounds and cellulase production. Based on the demand for grass biofertilizers able to partially or completely replace chemical fertilizers, the isolates which have several activities that promote plant growth are promising to be used as biofertilizer. Some genus clearly they share at least three equal activities featuring redundant function among them.

Key words: PGPR, biofertilizer, 16S rRNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão geral de (micro) organismos presentes na rizosfera.	19
Figura 2. Visão esquemática das funções e impacto dos microrganismos da rizosfera na planta hospedeira	21
Figura 3. Representação de algumas atividades promotoras do crescimento vegetal realizadas por rizobactérias.	24
Figura 4. Indicação da caracterização da produção de celulase	32
Figura 5. Indicação da caracterização da produção de Cianeto	33
Figura 6. Indicação da caracterização da produção de compostos indólicos.....	34
Figura 7. Indicação da caracterização da solubilização de minerais.....	36
Figura 8. Indicação da caracterização da produção de protease.....	37
Figura 9. Metodologia CAS-Agar para detecção de bactérias produtoras de sideróforos	38
Figura 10. Metodologia O-CAS para detecção de bactérias produtoras de sideróforos	39
Figura 11.1. Relações filogenéticas para os isolados bacterianos baseado nas sequências de genes 16S rRNA..	54
Figura 12.1. Dendrograma com base nos espectros de massa MALDI-TOF de células inteiras dos isolados bacterianos da rizosfera do milho.....	55
Figura 13.1 Perfis de diversidade Renyi com base em gêneros de bactérias	57
Figura 14.1. Diagrama de Venn.....	60
Figura 15.1 Ordenação dos isolados bacterianos com base nas atividades que promovem o crescimento das plantas por Análise de Componentes Principais	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tratamentos de inoculação e dosagem de Nitrogênio (Kg/ha) em campo experimental de milho.	28
Tabela 2. Composição dos meios de cultura JNFb, NFB, JMV, LGI, LGI-P e DYGS. (DÖBEREINER, ANDRADE e BALDANI, 1999).	30
Tabela 3. Composição da solução de cada micronutriente usada para os meios de cultura.	30
Tabela 4.1. Tratamentos de inoculação e dosagem de Nitrogênio (Kg/ha) em campo experimental de milho.	45
Tabela 5.1. Número de isolados provenientes da rizosfera do milho obtido em cada meio de cultivo utilizado.	53
Tabela 6.1. Número de isolados provenientes de cada tratamento utilizado.	53
Tabela 7.1. Gêneros isolados em meios de cultivo JMV, NFB, JNFb, LGI e LGI-P. .	58

LISTA DE SIGLAS

µg	-	Micrograma
µL	-	Microlitro
µM	-	Micromolar
ACC	-	Aminociclopropano-1-carboxilato
AIA	-	Ácido-Indol-Acético
BLASTn	-	<i>Basic Local Alignment Search Tool nucleotide</i>
BSA	-	Albumina de soro bovino
CAS	-	<i>Crome azurof S</i>
CI	-	Compostos Indólicos
Cm	-	Centímetro
CMC	-	Carboximetilcelulose
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	-	Ácido etilenodiamino-tetra acético
FAO	-	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FAOSTAT	-	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics division</i>
FBN	-	Fixação Biológica de Nitrogênio
g	-	Grama
<i>g</i>	-	Gravidade
h	-	Hora
ha	-	Hectare
HCN	-	Cianeto de Hidrogênio
IS	-	Índice de solubilização
Kg	-	Quilograma
L	-	Litro
M	-	Molar
m/z	-	Razão massa carga
MALDI-TOF	-	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight</i>
MAPA	-	Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento
min	-	Minuto
mL	-	Mililitro
mm	-	Milímetro
N	-	Nitrogênio
nm	-	Nanômetro
NMP	-	Número mais provável
pb	-	Pares de base
PCA	-	Análise de componentes principais
PCR	-	Reação em cadeia da polimerase

PGPR	-	<i>Plant Growth Promoting Rhizobacteria</i>
PS	-	Refere-se à solubilização de minerais
R1	-	Primeiro estágio reprodutivo da cultura
RDP II	-	<i>Ribosomal Database Project II</i>
RNA	-	Ácido ribonucleico
rpm	-	Rotações por minuto
rRNA	-	RNA ribossomal
TFSA	-	Terra fina seca ao ar
UEPG	-	Universidade Estadual de Ponta Grossa
UV	-	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. CULTIVO DO MILHO (<i>Zea mays</i>)	16
1.2. MICROBIOMA DA RIZOSFERA	18
1.3. RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL	23
2. OBJETIVOS	27
2.1. OBJETIVO GERAL	27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. EXPERIMENTO DE CAMPO	28
3.2. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS E QUANTIFICAÇÃO DE DIAZOTRÓFICOS	29
3.3. CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOQUÍMICAS	31
3.3.1 Atividade da Celulase	31
3.3.2 Produção de Cianeto	32
3.3.3 Produção de Compostos Indólicos	33
3.3.4. Solubilização de minerais	35
3.3.5. Produção de Protease	36
3.3.6. Produção de Sideróforos	37
3.4. IDENTIFICAÇÃO POR SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE 16S rRNA	39
3.5. ANÁLISE POR ESPECTOMETRIA DE MASSAS DO TIPO MALDI-TOF	40
3.6. ANÁLISES DE DIVERSIDADE E ESTATÍSTICA	41
4. RESULTADOS	42
4.1CAPÍTULO 1	42
Diversidade genética e funcional de rizobactérias diazotróficas cultiváveis com potencial para a promoção do crescimento vegetal	42
Resumo	42
Palavras-chave: PGPR, biofertilizantes, 16S rRNA.	42
1.1 INTRODUÇÃO	43
1.2.MATERIAL E MÉTODOS	45
Isolamento de bactérias diazotróficas da rizosfera do Milho	45
Atividade da Celulase	46
Produção de Cianeto de Hidrogênio (HCN)	46
Produção de Compostos Indólicos	47
Solubilização de minerais	48
Produção de Protease	48

Produção de Sideróforos	49
Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e Análises de sequências	50
Análise por Espectrometria de Massas do Tipo MALDI-TOF	51
Diversidade e Análise Estatística	52
1.3.RESULTADOS	53
Isolamento e identificação de rizobactérias diazotróficas	53
Análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF	55
Diversidade de rizobactérias diazotróficas cultiváveis	56
Caracterização das atividades promotoras do crescimento vegetal dos isolados bacterianos	59
1.4. DISCUSSÃO	62
Identificação taxonômica dos isolados	62
Análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF	64
Diversidade de rizobactérias diazotróficas promotoras do crescimento vegetal	66
Caracterização fisiológica dos isolados bacterianos por meio de atividades promotoras de crescimento vegetal	69
5. CONCLUSÕES	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1. INTRODUÇÃO

A produção de grãos tem aumentado substancialmente nas últimas décadas, em torno de 47% entre 1985 e 2005 (FAOSTAT - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*). Porém, estudos apontam que esse crescimento precisaria ser duas vezes maior para acompanhar o crescimento populacional, as mudanças alimentares e o aumento do uso de bioenergia (FAO, 2009; PELLETIER e TYEDMERS, 2010; KEARNEY, 2010; CIRERA e MASSET, 2010). A expansão de áreas de cultivo e o aumento do uso de fertilizantes químicos, na tentativa de alcançar tamanha demanda, podem trazer consequências danosas para o meio ambiente como a perda da biodiversidade e a liberação de poluentes no solo e na água doce (FOLEY et al, 2011).

A agricultura e a pastagem ocupam cerca de 12% e 26%, respectivamente, de toda a superfície terrestre livre de gelo. A maior parte das áreas restantes é imprópria para o cultivo, já que são cobertas por desertos, montanhas, cidades e reservas ecológicas (FOLEY et al., 2011). Mesmo diante dessas limitações, a agricultura vem crescendo principalmente nos trópicos, onde é estimado que 80% das novas áreas de atividade agrícola estão substituindo florestas gerando implicações ambientais negativas (GIBBS, et al. 2010; FOLEY et al., 2011).

1.1. CULTIVO DO MILHO (*Zea mays*)

O milho é uma das culturas de cereais mais importantes no mundo, pois fornece alimento básico para muitas populações. Além de compor a base da alimentação de animais, serve também como matéria-prima para diversos produtos dentro da indústria, como por exemplo, biocombustíveis. Nos países em desenvolvimento é uma importante fonte de renda para os agricultores. Devido a esta importância socioeconômica e a necessidade alimentar, cada vez mais investimentos são aplicados em tecnologia no campo da fertilização e manejo de pragas e doenças, com o objetivo de expandir a produção deste cereal, aumentando a rentabilidade de agricultores e otimizando o trabalho no campo (RIBEIRO FILHO, 2012; MEISSLE et al, 2010).

No Brasil, a produção do milho é distribuída em todo território nacional concentrando-se nas regiões Sul e Centro Oeste com 30,6% e 43,9% da produção nacional respectivamente. A safra 2013/14 foi de 79,0 milhões de toneladas (Conab), e segundo estimativas com projeções de 99,8 milhões de toneladas em 2024/25 (MAPA, 2015).

Um dos nutrientes mais importantes para essa cultura é o nitrogênio, o qual se encontra na atmosfera na forma molecular N_2 e desta maneira não pode ser assimilado pelas plantas. Dessa forma, a prática agrícola requer o uso de fertilizantes nitrogenados químicos para suprir a necessidade desse nutriente e torna-lo disponível para a planta (WALKER et al, 2012).

As abordagens atuais envolvem a aplicação de agroquímicos que, em geral, aumentam os custos da produção e podem gerar impactos ambientais negativos (SALAMONE et al, 2010) pois alteram a população de organismos benéficos incluindo polinizadores, decompositores e inimigos naturais (PIMENTEL 2005; MEISSLE et al. 2010). Fontes de fertilizantes estão se tornando menos abundantes (WALKER et al., 2012) e o uso de fertilizantes químicos pode ter efeitos adversos também sobre a qualidade das águas subterrâneas, tornando estas práticas agrícolas insustentáveis em longo prazo (SÁNCHEZ-PÉREZ et al., 2003).

Portanto, há uma necessidade de desenvolver estratégias e encontrar alternativas que possam garantir o rendimento das culturas, proporcionando segurança ambiental e de proteção enquanto mantém o equilíbrio ecológico em longo prazo nos agroecossistemas. Assim, o uso de inoculantes contendo rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPR - *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) vem sendo testado e implementado para reforçar a produção sustentável de diversas culturas agrícolas (KUMAR et al., 2014; MAJEED et al., 2015).

Desde a descoberta de rizóbios em 1886, inoculantes com bactérias do gênero *Rhizobium* sp. foram produzidos e comercializados em todo o mundo, principalmente nos países desenvolvidos (CATROUX et al., 2001; DEAKER et al., 2004). Com o avanço dos estudos, outros gêneros comumente encontrados colonizando importantes culturas como *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, e *Pseudomonas*, passaram a ser avaliados quanto ao benefício que proporcionam à planta associada (ISLAM et al., 2009; BASHAN et al., 2014).

Esses microrganismos estabelecem comunidades no solo ou em diversas partes da planta como na superfície aérea, dentro dos tecidos vegetais ou na região da rizosfera, sendo então denominadas bactérias da filosfera, bactérias endofíticas e rizobactérias, respectivamente (LINDOW e BRAND, 2003; KNIEF et al., 2012; GLICK, 2012).

1.2. MICROBIOMA DA RIZOSFERA

O termo rizosfera derivado da palavra grega “rhiza” – raiz e “sphere” (esfera) – campo de influência, foi proposto primeiramente por Hiltner (1904). Rizosfera refere-se a uma fina camada de solo de cerca de 1 a 7 mm, intimamente relacionado à raiz, que sofre influência pelo crescimento e atividade da raiz e pode variar de planta para planta (UROZ et al., 2010; PRASHAR et al., 2014). Já o volume de solo que não está sob influência da raiz é comumente chamado de solo não rizosférico (SNR), assim a rizosfera é considerada uma região distinta do SNR (MENDES et al., 2013; PRASHAR et al., 2014).

A rizosfera é entendida como um sítio de alta atividade (*hotspot*) para inúmeros organismos sejam eles macro ou micro, uni ou pluricelular, como demonstrado na Figura 1. Este local é considerado um dos ecossistemas mais complexos da Terra (MENDES et al., 2013), onde ocorrem inúmeras relações associativas entre os diversos organismos que ali habitam, principalmente bactérias, formando comunidades complexas.

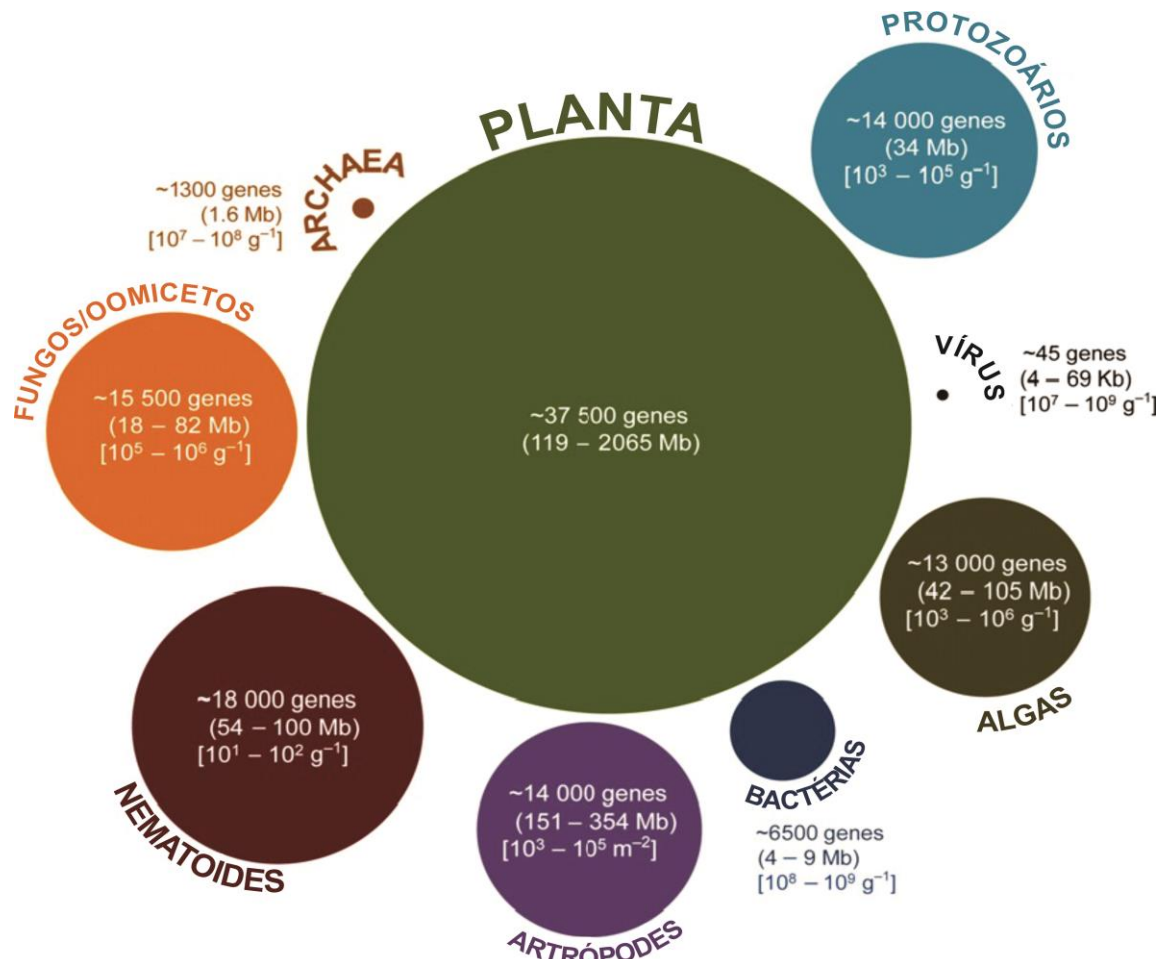


Figura 1. Visão geral de (micro) organismos presentes na rizosfera. O tamanho do círculo corresponde ao número médio de genes (exceto para vírus) encontrados nos genomas de espécies representativas de cada grupo, o tamanho médio dos respectivos genomas está indicado entre parênteses e sua abundância em colchetes. Microrganismos endofíticos, incluindo endossimbiontes, não estão representados (MENDES et al., 2013).

Mendes et al. (2013) apresentam diversos estudos que mostram claramente que o genótipo da planta e o tipo de solo são agentes moduladores do microbioma da rizosfera. As plantas são capazes de recrutar membros específicos da microbiota do solo para a região da rizosfera, como mostrado por Rudrappa et al. (2008), onde o ácido málico presente nos exsudatos foi estimulante para *Bacillus subtilis*. Levando-se em consideração que os nutrientes da rizosfera estão sempre variando dependendo da espécie vegetal, das condições bióticas e abióticas do solo etc., diferentes microrganismos devem compor esse habitat. Sendo assim, a planta pode ser considerada como um grande “meio de cultivo” para sua microbiota (LÓPEZ-GUERRERO et al., 2013; VACHERON et al., 2013).

A regulação de populações bacterianas específicas realizada pelas plantas de acordo com os nutrientes que ela disponibiliza por meio dos exsudatos é

denominada 'efeito da rizosfera'. Tal efeito reflete uma diferença notável na estrutura microbiana de solos cultivados e não cultivados (PRASHAR et al., 2014). Experimentos a campo revelaram mudança na comunidade bacteriana tendo enriquecimento taxonômico específico ou de grupos funcionais na rizosfera, enquanto que o solo não rizosférico se manteve estável frente às mudanças (UROZ et al., 2010; PRASHAR et al., 2014, MENDES et al. 2013).

Os exsudatos estão entre os compostos secretados pelas raízes e sementes e compreendem carboidratos simples, aminoácidos, ácidos orgânicos, hormônios vegetais, vitaminas, lipídeos, enzimas, compostos aromáticos, compostos fenólicos e muitos outros metabólitos secundários contendo carbono. A composição química, a taxa e a extensão da exsudação dependem de condições ambientais bióticas e abióticas e fatores genéticos que variam muito entre espécies vegetais (PRASHAR et al., 2014).

Dentre a vasta gama de organismos encontrados na rizosfera, estão indivíduos que estabelecem relações neutras, relações benéficas, os que causam efeitos negativos para a planta (patógenos) e até patógenos de humanos (Figura 2).

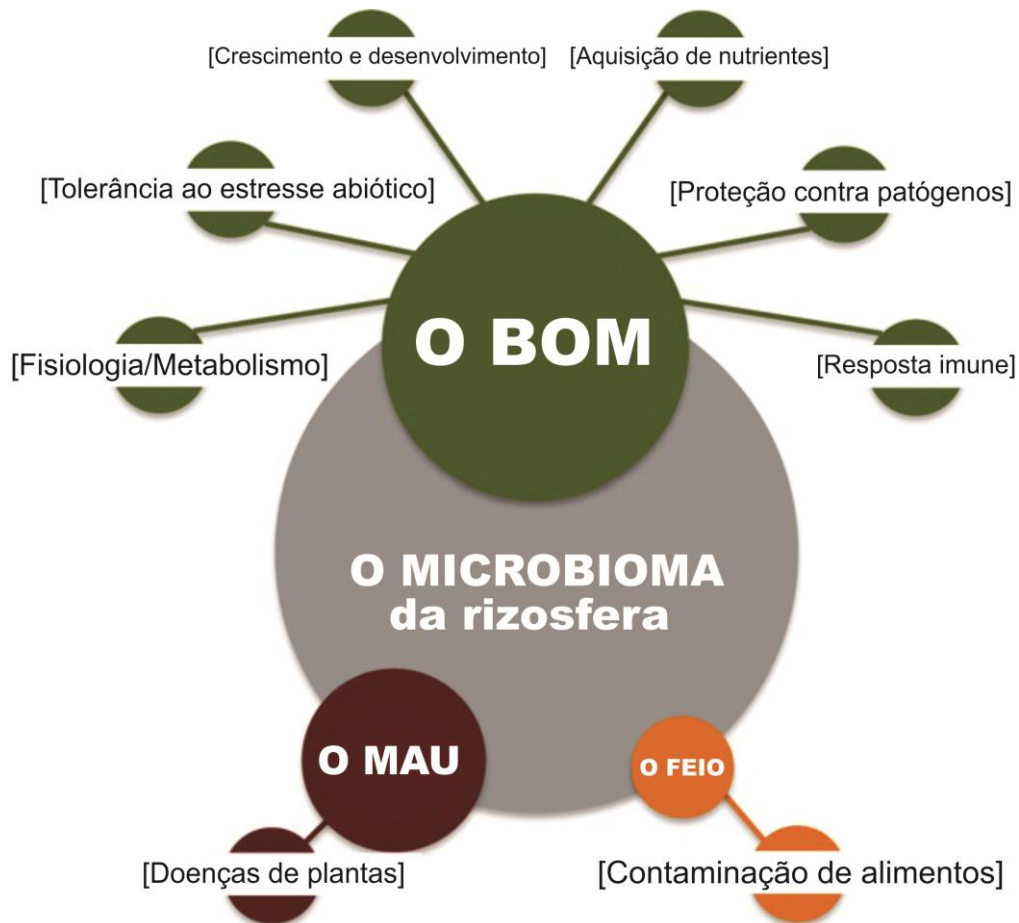


Figura 2. Visão esquemática das funções e impacto dos microrganismos da rizosfera na planta hospedeira, sendo benéfico “o bom”, patógeno “o mau” e patógeno em humanos “o feio”. (MENDES et al., 2013).

Os termos “bom”, “mau” e “feio” são usados de maneira arbitrária, para melhor entendimento do microbioma, visto que uma espécie pode ser benéfica ou deletéria, dependendo da condição que se encontra (MENDES et al., 2013).

Os microrganismos benéficos para as plantas são aqueles cujas atividades promovem o crescimento do vegetal ao qual estão associados. Dentre as atividades benéficas está a disponibilização de nutrientes e/ou a redução da incidência de doenças (biocontrole) além de outras mencionadas na Figura 2, que serão melhor discutidas a seguir (seção 1.3). Os efeitos negativos são aqueles que de alguma maneira causam danos à planta.

Na terceira classe encontram-se os agentes causadores de doenças em humanos, os quais usam a planta como hospedeiro intermediário, até entrar em contato com o animal e/ou humano a partir da ingestão da planta, por exemplo. Tais microrganismos encontram na rizosfera alta disponibilidade de nutrientes, proteção à radiação UV e disponibilidade de água para dispersão e proteção contra

dessecação. Uma vez que causam patogenicidade principalmente em pessoas com a saúde debilitada e/ou imunodeprimidas, são chamados de patógenos oportunistas (MENDES et al., 2013), no entanto comparado com os demais grupos, esses se encontram em menor quantidade nesse ambiente (Figura 2).

Grande parte dos trabalhos mostra que há predominância do Filo Proteobacteria na rizosfera, seguido de Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes e em alguns casos Acidobacteria. Tais estudos buscam também correlacionar tais grupos com suas funções na comunidade (DeANGELIS et al, 2009; UROZ et al, 2010; PEIFFER et al., 2013; MENDES et al., 2013).

Há uma variedade de abordagens moleculares para estudar a expressão de genes bacterianos na rizosfera a fim de compreender a funcionalidade desses microrganismos e avaliar como os membros específicos do microbioma da rizosfera percebem seu habitat a partir de estímulos biológicos, físicos e químicos. Identificaram-se genes em *Pseudomonas fluorescens* relacionados à aquisição de nutrientes, resposta ao estresse e secreção. Estudos têm utilizado genes repórter para verificar respostas da bactéria a carbono, nitrogênio e disponibilidade de fósforo. Genes conhecidos são significativamente alterados em resposta a exsudatos, exemplificando uma correlação existente entre a funcionalidade das comunidades presentes nesse microambiente (RAINEY, 1999; MENDES et al., 2013).

López-Guerrero et al. (2013) relatam que nem todas as bactérias tem a mesma capacidade de degradar compostos secretados pelas raízes ou oriundos do solo. *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Streptomyces* possuem alta capacidade degradadora e todas podem ser encontradas associadas à raiz, sendo que essa capacidade pode ser vantajosa na rizosfera. O mesmo autor sugere que muitos genes de rizóbios com funções desconhecidas participam no catabolismo de substâncias da raiz, da rizosfera e do solo, e isso poderia ser aplicado a outras rizobactérias.

Com o mesmo intuito de estudar a função das comunidades da rizosfera, Li et al (2014) detectaram 6.201 genes, dos quais 93,2% foram relacionados com a rizosfera e 32 % com solo não rizosférico. A presença de famílias gênicas relacionadas com a ciclagem de carbono, nitrogênio e enxofre, utilização de fosfato e resistência a antibióticos foi significativamente maior na rizosfera que no solo não rizosférico. Mendes et al., (2014) observou especificidade funcional em grupos

taxonômicos da rizosfera de soja. Ou seja, substâncias orgânicas liberadas a partir da raiz podem suportar alta biomassa microbiana a atividade metabólica e assim, um conjunto de comunidades microbianas mais ativas e distintas na rizosfera comparadas com aquelas no solo não rizosférico (LI et al., 2014).

Segundo o mesmo autor, alguns microrganismos produzem metabólitos antimicrobianos tóxicos para outros microrganismos, permitindo a eles colonizar e proliferar na superfície das plantas, na presença de outras comunidades microbianas. A presença e expressão desses genes fornece uma linha de defesa primária para as raízes e plantas contra o ataque de patógenos oriundos do solo e atuam na sua própria defesa, ganhando assim vantagem competitiva.

Em síntese, a composição do microbioma da rizosfera pode ser afetada e alterada por fatores bióticos e abióticos, sendo a própria planta a peça mais importante na determinação das estirpes bacterianas predominantes, pois seus exsudatos variam conforme a espécie vegetal ou cultivar e estágio de desenvolvimento da mesma. Além disso, as comunidades bacterianas variam em diferentes condições físico/químicas do solo, distribuição de nutrientes, incorporação de resíduos. Essas interações da planta com outros microrganismos, como bactérias e fungos, por sua vez, alteram a exsudação da planta, e toda essa variação reflete diretamente no desenvolvimento da própria planta (VACHERON et al., 2013; PRASHAR et al., 2014, MENDES et al., 2013; BERG & SMALLA, 2009). Em sistema de manejo com rotação de culturas, foi observado que até mesmo a cultura anterior exerce influência sobre a estrutura das suas comunidades microbianas do solo (MAUL et al., 2014).

1.3. RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL

Como já discutido na seção anterior, as relações ecológicas estabelecidas entre bactérias e plantas podem ser de caráter neutro, negativo ou positivo. Aqui, teremos como foco de abordagem as rizobactérias (bactérias que habitam a rizosfera) promotoras do crescimento vegetal (PGPRs), as quais geram benefícios à planta associada a partir da disponibilização de mais nutrientes e/ou da redução da incidência de doenças (biocontrole) (ROBBS, 1991).

Os mecanismos gerais de promoção de crescimento vegetal por esses microrganismos podem ser diretos ou indiretos, incluindo: a) a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), (b) a síntese de fitormônios, como auxinas, citocininas e giberelinas e compostos indólicos como ácido-indol-acético – AIA, (c) a produção de enzimas que modulam o crescimento e o desenvolvimento da planta como a 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase e (d) a solubilização de minerais (CATTELAN, 1999; ZAGO, DE-POLLI e RUMJANEK, 2000; ISLAM et al., 2009; GLICK, 2012; VACHERON et al., 2013).

O biocontrole, por sua vez, é realizado utilizando-se das seguintes estratégias: (1) competição por compostos orgânicos e micronutrientes com os patógenos, (2) produção de sideróforos, (3) produção de metabólitos secundários que agem como antimicrobianos, (4) produção de enzimas líticas extracelulares (celulases, quitinases, glucanases, lipases e proteases) que podem agir de diferentes maneiras afetando a integridade da célula do patógeno, (5) ativação do mecanismo de defesa da planta através da indução da resposta sistêmica (RAAIJMAKERS et al., 2009; ZAGO, DE-POLLI e RUMJANEK, 2000).

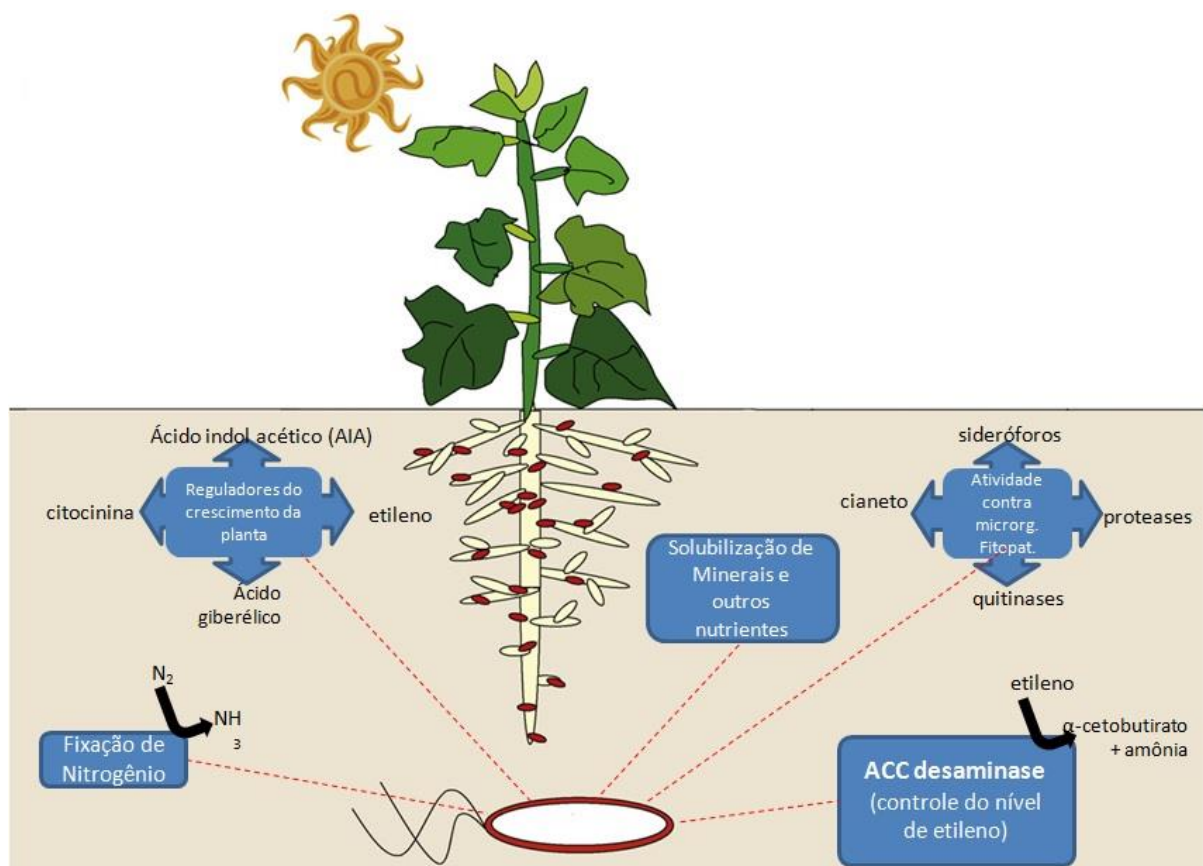


Figura 3. Representação de algumas atividades promotoras do crescimento vegetal realizadas por rizobactérias.

Muitos microrganismos procariotos de vida livre ou simbiontes (principalmente de plantas leguminosas) são capazes de fixar nitrogênio atmosférico. O nitrogênio na forma molecular (N_2), não é prontamente assimilado pelas plantas, mas estas podem se beneficiar da capacidade desses microrganismos de reduzirem N_2 a NH_3 (amônia). Isso é possível por meio do processo conhecido como Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), o qual é catalisado pelo complexo enzimático denominado nitrogenase, encontrado somente em procariotos (Bacteria e Archaea). Um exemplo é o gênero *Azospirillum*, o qual apresenta potencial para realização da FBN, e já vem sendo utilizado como inoculante de gramíneas a campo (DÖBEREINER, 1992; HUNGRIA et al., 2010; MONTAÑEZ et al., 2012).

A produção de sideróforos pelas bactérias aumenta a captura de ferro pelas plantas devido a formação do complexo ferro-sideróforo (BENEDUZI, AMBROSINI e PASSAGLIA, 2012). Sua importância relaciona-se diretamente com a absorção de ferro, elemento essencial a diversos processos biológicos, ao ligar-se ao ferro (Fe^{3+}) disponível na rizosfera, torna-o indisponível também para os fitopatógenos, assim atua também no biocontrole (CROSA e WALSH, 2002; GLICK, 2012).

Os fitormônios, como auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abicísico, produzidos por bactérias associadas, levam a um maior êxito no crescimento e desenvolvimento vegetativo (RAVEN et al, 2001). O AIA é uma auxina natural que atua principalmente na formação de raízes laterais e pelos radiculares, proporcionando um aumento na absorção de nutrientes (PATTEN e GLICK, 2002).

Entre as enzimas produzidas, estão as pectinases microbianas, que catalisam a degradação de substâncias pécticas as quais são importantes em processos de biocontrole, simbiose e na decomposição de material vegetal, auxiliando no ciclo do carbono (PEDROLLI et al, 2009). Microrganismos também podem catalisar a oxidação de enxofre, melhorando assim a fertilidade do solo, já que o sulfato produzido pode ser usado pelas plantas além de alterar a acidez do solo ajudando na solubilização de nutrientes (WAINWRIGHT, 1984).

A enzima ACC-desaminase quebra a molécula precursora do etileno, reduzindo dessa forma a concentração desse fitormônio durante o desenvolvimento ou em situações de estresse da planta, como infecção por patógeno (VESSEY, 2003). Picos de etileno são importantes para quebra de dormência da semente

(ESASHI, 1991); entretanto, se manter alto o nível de etileno após a germinação, esse inibe a expansão das raízes (JACKSON, 1991).

Os microrganismos capazes de sintetizar a enzima celulase desempenham papéis importantes no controle de patógenos inibindo a germinação de esporos ou o crescimento de fungos contendo celulose em sua parede celular. Além disso, tais microrganismos disponibilizam nutrientes à planta pela hidrólise da celulose, favorecendo assim o rendimento das culturas (BHAT, 2000). A ação enzimática das celulasas produzidas por bactérias rizosféricas nas moléculas de celulose e hemicelulose presentes nas células das raízes da planta, facilitam a penetração de rizóbios e a nodulação, deste modo favorecem também a FBN (SINDHU e DADARWAL, 2001).

O fósforo é um importante macronutriente para a planta, correspondendo a 0,2% do seu peso seco. É um nutriente limitante para o crescimento vegetal, tendo em vista a participação ativa nas atividades metabólicas e bioquímicas, além da formação de ácidos nucleicos e fosfolipídios (GYANESHWAR et al., 2002). O mecanismo mais comum de solubilização de fosfatos minerais consiste na ação dos ácidos orgânicos sintetizados pelas bactérias. A produção de ácidos orgânicos resulta em acidificação da célula microbiana e seu microambiente. Em consequência, o fósforo inorgânico é liberado do mineral pela substituição por Ca^{2+} (KUSS, 2006).

Diversos gêneros vêm sendo descritos como PGPR, entre eles encontra-se: *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp., *Bacillus* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Rhizobium* sp., *Gluconacetobacter* sp., *Herbaspirillum* sp. e *Azospirillum* sp. (GLICK, 1995; DOBBELAERE et al., 2003; LUGTENBERG e KAMILOVA, 2009). A atuação na promoção do crescimento vegetal de modo geral não fica restrita a apenas um gênero ou por apenas uma atividade, mas sim, pela atuação em conjunto de bactérias que possuem diversas atividades (ISLAM et al., 2009).

Diante da potencialidade das PGPR como alternativa para o incremento da produção de alimentos sem aumentar as áreas agricultáveis ou o uso de fertilizantes químicos, é imprescindível a compreensão do papel dessas bactérias no solo e na planta hospedeira. Nesse contexto, o isolamento, a identificação e a caracterização bioquímica dessas PGPRs são fundamentais para a compreensão da sua fisiologia e provável função no ecossistema.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a diversidade genética e funcional das bactérias diazotróficas cultiváveis presentes na rizosfera do milho.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar bactérias diazotróficas associadas à cultura de milho;
- Identificar os isolados por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.
- Analisar o perfil dos isolados por espectrometria de massa.
- Caracterizar os microrganismos isolados quanto à capacidade de produzir protease, compostos indólicos, sideróforos, cianeto e celulase;
- Caracterizar os microrganismos isolados quanto à capacidade de solubilizar minerais.
- Relacionar a diversidade bacteriana com os tratamentos do milho.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. EXPERIMENTO DE CAMPO

O milho 30F53H (Pioneer) foi submetido à inoculação com diferentes bactérias promotoras do crescimento vegetal (1L inoculante/50 kg de semente) e sob diferentes doses de nitrogênio resultando em 11 tratamentos descritos na Tabela 1. O experimento foi conduzido entre outubro de 2012 a março de 2013 na Fazenda Experimental da Fundação ABC (25°00'50''S, 50°09'18''W), localizada na cidade de Ponta Grossa/PR (888m de altitude e clima Cfb de acordo com Köppen). O isolamento das bactérias utilizadas nesse trabalho foi realizado a partir do solo proveniente da rizosfera do milho no estágio R1.

Tabela 1. Tratamentos de inoculação e dosagem de Nitrogênio (Kg/ha) em campo experimental de milho.

Tratamento	Dose de N (kg/ha)	Bactéria inoculada
1	30	Sem inoculação
2	160	Sem inoculação
3	30	Inoculante comercial AzoTotal (Total Biotecnologia) ¹
4	160	Inoculante comercial AzoTotal (Total Biotecnologia) ¹
5	30	<i>Azospirillum</i> sp. L26
6	30	<i>Herbaspirillum</i> sp. L27
7	30	<i>Rhizobium</i> sp. 8121
8	30	<i>Enhydrobacter</i> sp. 4331
9	30	<i>Azospirillum brasilense</i> HM053
10	30	<i>Azospirillum brasilense</i> Abv5
11	0	Sem inoculação

¹ Inoculante contendo *Azospirillum brasilense* Abv5 e Abv6.

O isolamento e a caracterização de bactérias quanto à presença de atividades que contribuem para o crescimento vegetal foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular Microbiana (LABMOM - UEPG).

3.2. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS E QUANTIFICAÇÃO DE DIAZOTRÓFICOS

A retirada da planta do solo se deu por meio de um corte 10x10cm feito com pá-reta, o solo aderido às raízes das mesmas (solo rizosférico) foi coletado. Três amostras (10x10cm) aleatórias de um mesmo tratamento foram coletadas e agrupadas (gerando uma amostra composta) e secas ao ar, na sombra, gerando terra fina seca ao ar (TFSA). Após a secagem, as amostras de solo rizosférico foram peneiradas e armazenadas em sacos de papel até o momento das avaliações microbiológicas, as quais ocorreram até seis meses após a sua coleta.

Para a realização da contagem de microrganismos diazotróficos, 10 g de TFSA de cada amostra composta foram incubados com 2 mL de água destilada esterilizada a 30 °C por 48 h. Após este período, as amostras foram transferidas para Erlenmeyer de 250 mL, contendo 90 mL de solução salina esterilizada (NaCl 0,85%) e mantidas sob agitação orbital (80 rpm) por 15 min à temperatura ambiente. Após a agitação, 0,1 mL da solução de solo foi submetido a uma diluição seriada (10^{-2} a 10^{-6}) em solução salina. Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram inoculadas em triplicata em frascos contendo 3 mL dos meios de cultura semi-sólido JMV, LGI, LGI-P, JNFb ou NFB livres de nitrogênio (DÖBEREINER, ANDRADE e BALDANI, 1999, Tabelas 02 e 03) para contagem pelo método do número mais provável (NMP) como descrito em Döbereiner, Baldani e Baldani (1995). Todas as etapas metodológicas que requeriam incubação de bactérias foram realizadas a 30 °C.

Os frascos inoculados foram incubados por até 10 dias. Aqueles que apresentaram a formação de película, indicadora de crescimento bacteriano, foram selecionados para repicagem, a qual foi feita em novos frascos com o mesmo meio semissólido, e incubados. Os isolados que apresentaram película foram indicativos de bactéria fixadora de nitrogênio.

Para efetuar o isolamento dos microrganismos diazotróficos, a massa de células presente na diluição mais elevada, formada de duas das amostras da replicata foram inoculadas em placas contendo o meio sólido correspondente ao semissólido (com adição de extrato de levedura e Agar) (DÖBEREINER, ANDRADE e BALDANI, 1999) e incubadas em estufa. Posteriormente, as colônias isoladas foram crescidas em meio DYGS líquido, e estocadas em glicerol 50% até a caracterização bioquímica e molecular.

Tabela 2. Composição dos meios de cultura JNFb, NFB, JMV, LGI, LGI-P e DYGS. (DÖBEREINER, ANDRADE e BALDANI, 1999).

Composto	Concentração/Litro					DYGS
	JNFb	NFB	JMV	LGI	LGI-P	
Manitol	-	-	5g	-	-	-
Glicose	-	-	-	-	-	2g
Ácido málico	5g	5g	-	-	-	2g
Sacarose	-	-	-	5g	100g	-
Peptona Bacterológica	-	-	-	-	-	1,5g
Extrato de Levedura *	0,02g	0,05g	0,1g	0,02g	0,02g	2g
K ₂ HPO ₄	0,6g	0,5g	0,6g	0,2g	0,2g	0,5g
KH ₂ PO ₄	1,8g	-	1,8g	0,6g	0,6g	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g	0,2g	0,2g	0,2g	0,2g	0,5g
NaCl	0,1g	0,1g	0,1g	-	-	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02g	0,02g	0,02g	0,02g	0,02g	-
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	-	-	-	0,002g	0,002g	-
FeCl ₃ .6H ₂ O	-	-	-	0,01g	0,01g	-
Azul de Bromotimol (0,5% em 0,2N de KOH)	2mL	2mL	2mL	5mL	5mL	-
Fe EDTA (solução a 1,64%)	4mL	4mL	4mL	-	-	-
Solução de micronutrientes**	+	+	+	-	-	-
Ácido Glutâmico	-	-	-	-	-	1,5g
KOH	4,5g	4,5g	-	-	-	-
pH	5,8	6,5	4,2 - 4,5	6,0 - 6,2	5,5	6
Ágar - semissólido	1,9g	1,8g	2,1g	1,8g	1,6g	-
Ágar – sólido	17g	15g	25g	15g	25g	15g

* Extrato de Levedura é usado apenas no meio sólido, exceto para o meio DYGS, no qual também é usado para o meio líquido.

** De acordo com a Tabela 3.

Tabela 3. Composição da solução de cada micronutriente usada para os meios de cultura.

Composto	Concentração na solução (g/L)	Volume de cada composto adicionado no meio (mL/L)
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1	2
MnSO ₄ .H ₂ O	1,175	2
H ₃ BO ₃	1,4	2
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,04	2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,12	2

3.3. CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOQUÍMICAS

Os isolados obtidos no isolamento foram avaliados quanto à produção de compostos indólicos, cianeto, sideróforos, protease, atividade da celulase e solubilização de minerais. Para cada teste, foram feitos pré-inóculos usando 20 µL de células bacterianas estocadas em glicerol em 3 mL de meio DYGS líquido, incubados a 30 °C por 24 – 48h, sob agitação de 180 rpm.

3.3.1 Atividade da Celulase

Para o teste da atividade enzimática da celulase, foi utilizada e adaptada a metodologia descrita por Kasana et al. (2008), utilizando como corante o iodo de Gram. Os isolados foram crescidos em DYGS (pré-inóculo) até a saturação e 5 µL do pré-inóculo foram colocados no centro de placas individuais (49x12mm) em triplicata contendo 10 mL de meio ágar celulose.

Este meio de cultivo foi preparado a partir da diluição de 2 g/L de NaNO₃, 1 g/L de K₂HPO₄, 0,5 g/L de MgSO₄, 0,5 g/L de KCl e 0,2 g/L de peptona bacteriológica com adição de 17 g/L de ágar e 2 g/L de celulose, qual apresenta turbidez devido à insolubilidade da celulose. As placas foram seladas com filme de PVC e incubadas por cinco dias. Depois desse período foi vertido sobre o meio de cultivo 2 mL de solução corante iodo de Gram (6,6 g/L de KI, 3,3 g/L de iodo) durante 30 minutos. Após o descarte da solução corante, a degradação de celulose pode ser evidenciada pela presença de halos claros ao redor das áreas de crescimento bacteriano. A intensidade de produção de celulasas foi avaliada como representado na Figura 4.

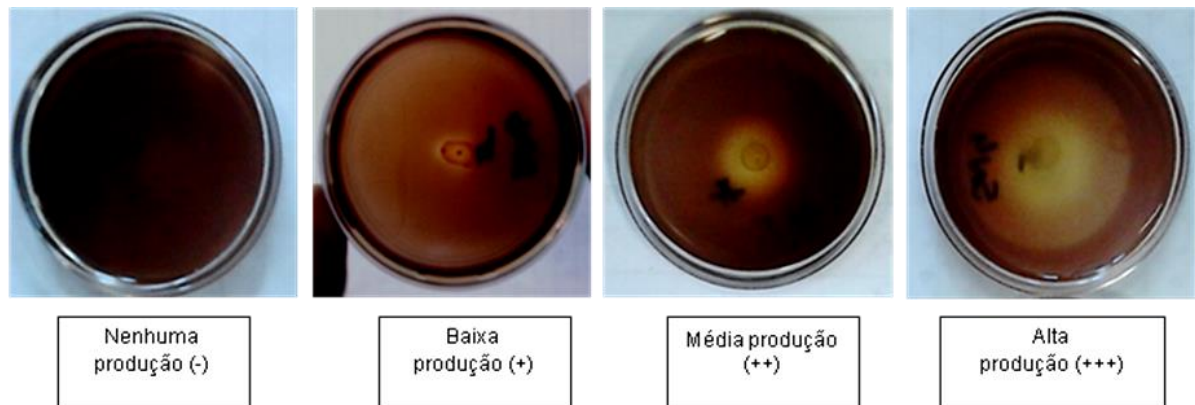


Figura 4. Indicação da caracterização da produção de celulase. Ausência de celulase (-) ausência de halo; produção de celulase sendo baixa (+), média (++) ou alta (+++) de acordo com as intensidades dos halos.

3.3.2 Produção de Cianeto

Para a avaliação da produção de cianeto foi utilizada a metodologia descrita por Lorck (1948). Os pré-inóculos dos isolados bacterianos foram crescidos até a saturação, em seguida inoculados em triplicata em placas de 49x12mm contendo 10 mL de meio ágar nutriente constituído por 5 g/L de extrato de carne, 10 g/L de peptona, 5 g/L de NaCl, e 15 g/L de ágar, enriquecido com 4,4 g/L de glicina. Em seguida as placas foram invertidas e colocado papel germitest (previamente autoclavado) umedecido com 500 µL de solução ácido pícrico (0,5%) filtrada, feita a partir da solubilização de 5 g/L de ácido pícrico e 20 g/L de carbonato de sódio. O papel germitest foi colocado na tampa da placa, sem qualquer contato com o meio de cultura.

Todas as placas foram incubadas por 48h. A presença de HCN foi indicada pela formação do ácido isopurpúrico no papel, responsável por alterar a coloração. Os diferentes tons obtidos do amarelo para o vermelho indicaram a intensidade da presença de cianeto como mostra a Figura 5.

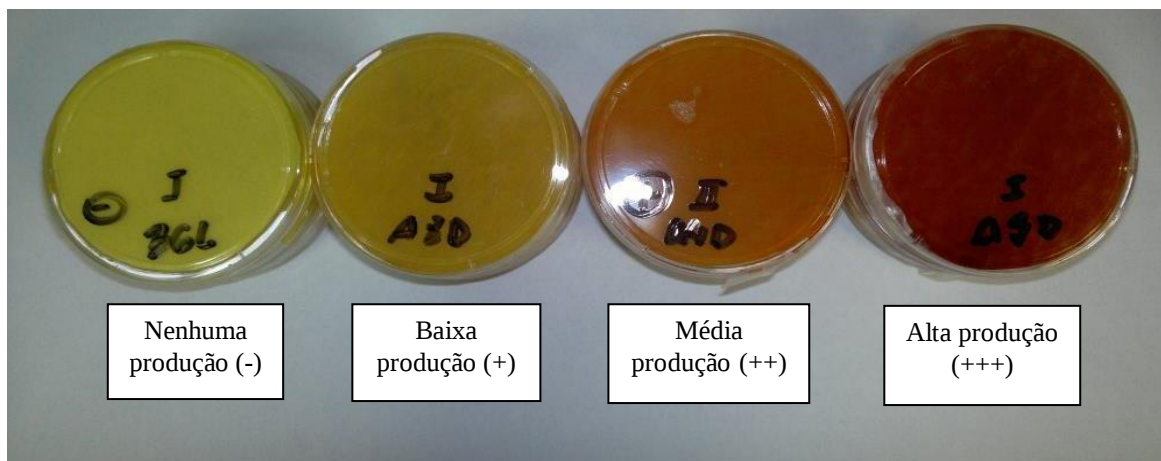


Figura 5. Indicação da caracterização da produção de Cianeto. Padrão de coloração indicando a formação de ácido isopurpúrico. Ausência de produção (-) Amarelo claro, produção sendo baixa (+) Amarelo escuro, média (++) Laranjado e alta (+++) Vermelho.

3.3.3 Produção de Compostos Indólicos

A capacidade de produção de compostos indólicos foi determinada de acordo com o método descrito por Glickmann e Dessaux (1995), por meio da reação com reagente de Salkowski. Esse teste foi realizado em placas de 96 poços (Figura 6). O pré-inóculo para cada isolado, foi feito em DYGS enriquecido com triptofano (0,5 g/L) e incubado por 48 h sob agitação de 180 rpm.

Uma amostra de cada inóculo foi coletada em microtubo e centrifugada a 13000 rpm (Microcentrífuga 5417C – Eppendorf), coletando-se 100 µL do sobrenadante ao qual acrescentou-se 100 µL do reagente Salkowski (12 g/L de FeCl_3 em 7,9 M de H_2SO_4) na proporção de 1:1. Logo após, a amostra foi incubada no escuro durante 30 minutos à temperatura ambiente e procedida a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 540 nanômetros (nm). Para cada isolado o teste foi realizado em quadruplicata.

A quantificação foi feita por meio de uma curva padrão (0 – 100 µM) a partir de uma solução de AIA 5000 µM. A reação com o reagente de Salkowski resulta coloração amarelada para ausência de AIA e rosa avermelhado para a presença de AIA (Figura 6.A).

O restante do conteúdo do microtubo foi congelado para posterior quantificação de proteínas totais conforme Bradford (1976), adaptado para condições de realização do teste em placas de 96 poços descritas por Schwab

(2006). Para obter o valor final de produção de compostos indólicos pelas bactérias é necessário realizar a quantificação de proteínas totais das mesmas, pois o resultado se dá por meio da concentração de AIA dividido pela concentração de proteínas produzida pelas bactérias ($\mu\text{M}/\mu\text{g}$) com o objetivo de normalizar a comparação entre os diferentes isolados bacterianos.

Para tal, as amostras foram descongeladas e submetidas à homogeneização do conteúdo celular em agitador vortex. Deste material, 20 μL foram adicionados na placa juntamente com 80 μL de água ultrapura autoclavada e 100 μL de NaOH 0,2 M, deixando decorrer a lise celular, por cerca de 1h, à temperatura ambiente, sendo o mesmo teste realizado em quadruplicata. Após, 20 μL deste material foram transferidos para outra placa e adicionado 200 μL do reagente de Bradford, mistura foi homogeneizada e realizada a leitura em comprimento de onda de 595 nm. A determinação da concentração de proteína produzida pelas bactérias foi por meio de curva padrão (0 – 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de BSA (albumina de soro bovino) a partir de uma solução de estoque de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 6.B).

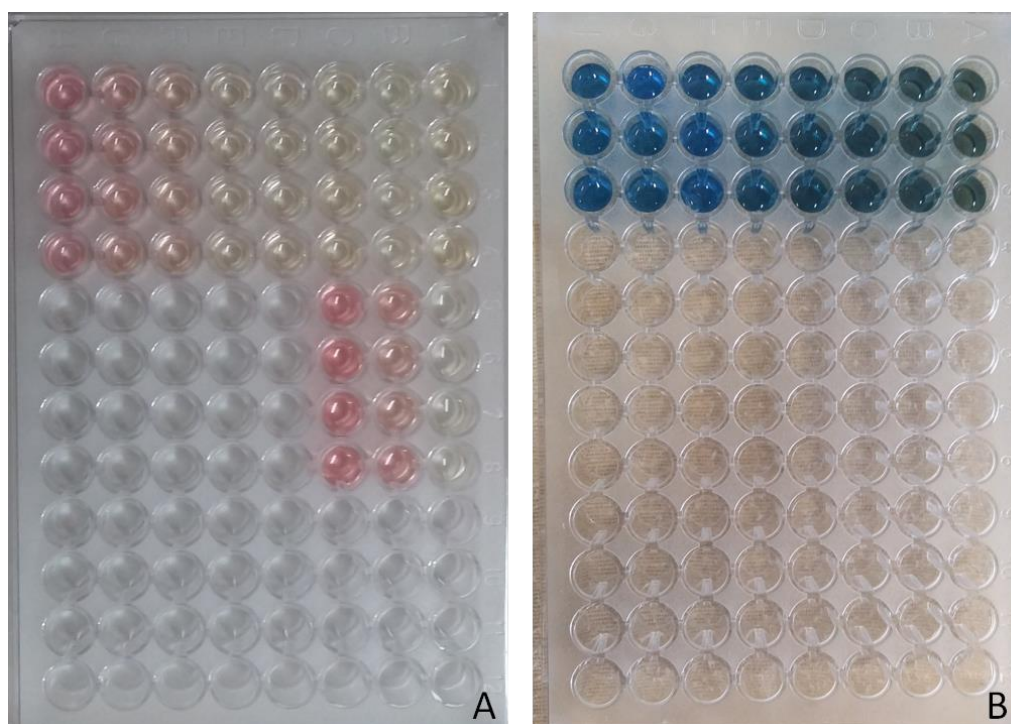


Figura 6. Indicação da caracterização da produção de compostos indólicos. O teste foi realizado em placas de 96 poços. Em A: curva de calibração para as concentrações de AIA com reagente de Salkowski; cores mais avermelhadas indicam maior concentração do composto. Em B: calibração da concentração de proteínas pelo método de Bradford (1976); cores no tom azulado indicam maior concentração de BSA (proteína padrão para o teste).

3.3.4. Solubilização de minerais

A capacidade dos isolados de solubilizar os minerais fósforo e zinco foi determinada em meio de cultivo desenvolvido por Pikovskaya (1948), enriquecido com 0,5% de fosfato de tricálcio [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] e 0,12% de óxido de zinco (ZnO) como fontes de fósforo e zinco inorgânico, respectivamente. Identificaram-se os isolados com potencial de solubilização pela formação de um halo claro ao redor da colônia (Figura 7).

Foram utilizadas placas contendo uma mistura de 80 mL ágar Pikovskaya (HIMEDIA) (31,3 g de ágar Pikovskaya/L de água destilada) com 0,8 mL de óxido de zinco 12% (concentração final de 0,12%), plaqueadas e incubadas a 30 °C por sete dias. O diâmetro do halo de solubilização foi medido aos três e sete dias. A partir dessas medidas, foram obtidos os Índices de Solubilização (IS) para cada isolado por meio da fórmula: $\text{IS} = \text{diâmetro do Halo (mm)} / \text{diâmetro da colônia (mm)}$ (BERRAQUERO, BAYA e CORMENZANA, 1976).

As bactérias foram classificadas conforme os índices de solubilização, onde as estirpes que apresentaram $\text{IS} < 2$, $2 > \text{IS} < 4$ e $\text{IS} > 4$, foram classificadas respectivamente como sendo de baixa, média e alta capacidade de solubilização. As bactérias que iniciaram solubilização até o terceiro dia foram ditas precoces, após esse tempo foram consideradas tardias e aquelas que não apresentaram solubilização visível até o 15º dia de avaliação foram classificadas como 'não solubilizadoras aparentes' (HARA e OLIVEIRA, 2004).

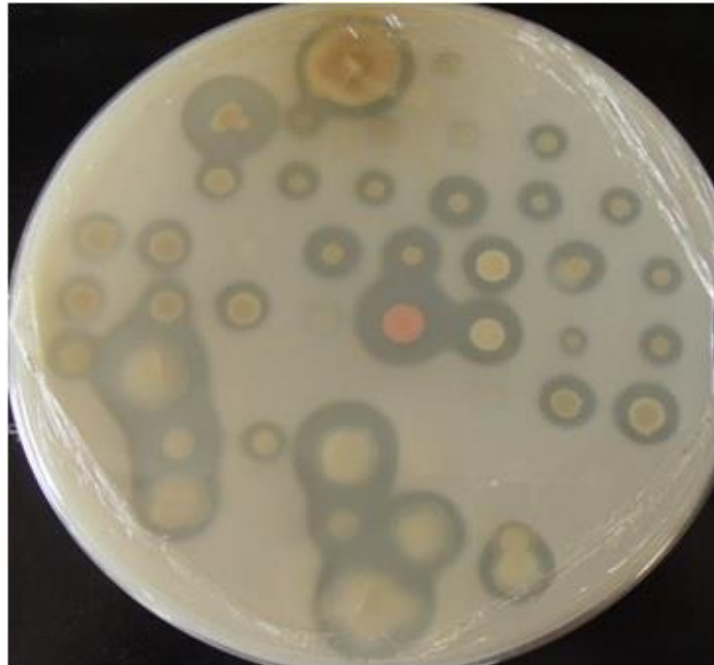


Figura 7. Indicação da caracterização da solubilização de minerais, pela formação de halo claro em torno das colônias.

3.3.5. Produção de Protease

O teste para determinar a capacidade de produção de protease foi efetuado conforme descrito em Smibert e Krieg (1994) utilizando ágar e leite desnatado. A protease produzida pelas bactérias degrada as proteínas presentes no leite, formando halo claro quando observado contra um fundo branco.

A produção de protease foi ensaiada utilizando ágar (30 g/L de água ultrapura) autoclavado à 121 °C por 20min e leite em pó desnatado (100 g/L água ultrapura) autoclavado em vapor fluente à 100 °C por 45min. Após a esterilização, as soluções foram misturadas (1:1, v/v) e plaqueadas. As bactérias foram inoculadas e incubadas durante dois dias. As bactérias que apresentaram halo claro foram classificadas como positivas para produção de protease (Figura 8).

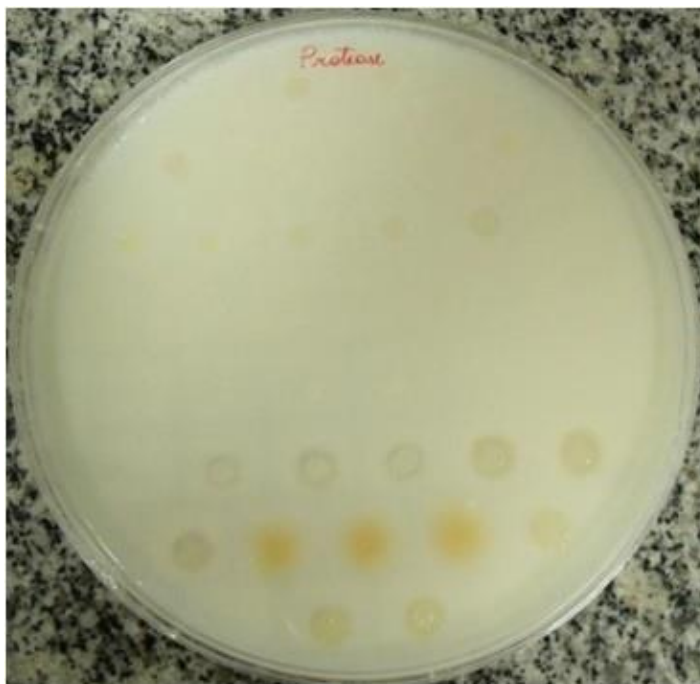


Figura 8. Indicação da caracterização da produção de protease, pela formação de halo claro em torno das colônias.

3.3.6. Produção de Sideróforos

O pré-inóculo foi realizado como descrito para os testes anteriores e em seguida inoculados nos meios específicos para o teste descritos a seguir. Para a realização dos testes de produção de sideróforos, foram seguidos dois protocolos, sendo 1) CAS-Ágar (*Crome Azurol S*) descrito por Schwyn e Neilands (1987) e 2) método O-CAS descrita por Pérez-Miranda et al. (2007).

Para o primeiro método, cada isolado foi inoculado em placas contendo *Crome Azurol S* (CAS-ágar - Fe III), composto pelas seguintes soluções: solução A (0,0027 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 9,917 mL de água destilada e 0,083 mL de HCl 12,1M); solução 1: MgSO_4 1 M; solução 2: CaCl_2 1 M; solução 3: Sacarose 20%; Solução 4: 10 x sais MM9: (3g KH_2PO_4 , 5g NaCl, 1g NH_4Cl em 100 mL de água); Solução 5: 0.0605 g *Chrome Azurol S* em 50 mL de água e 10 mL da Solução A; solução 6 (0.0729 g Brometo de amônio hexadexil trimetil (HDTMA ou CTAB) em 40 mL de água) e meio base (15 g/L Agar; 30,24 g/L piperazina-1,4-bis (PIPES); solução de NaOH 50% v/v até pH final 6,8). Para o preparo de 04 placas, adicionou-se em erlenmeyer: 0,2 mL da solução 1; 0,01 mL da solução 2; 1 mL da solução 3; 10 mL da solução 4; 6 mL da solução 5 e 75 mL do meio base. Homogeneizado e

distribuídos nas placas de petri (Figura 9.A), inoculado 5 μ L do pré-inóculo de cada isolado, sendo distribuído no máximo 16 isolados/placa (Figura 9.B) e incubados (30 °C/24h), sideróforos foram detectados pela formação de halo à volta das colônias (Figura 9.B).

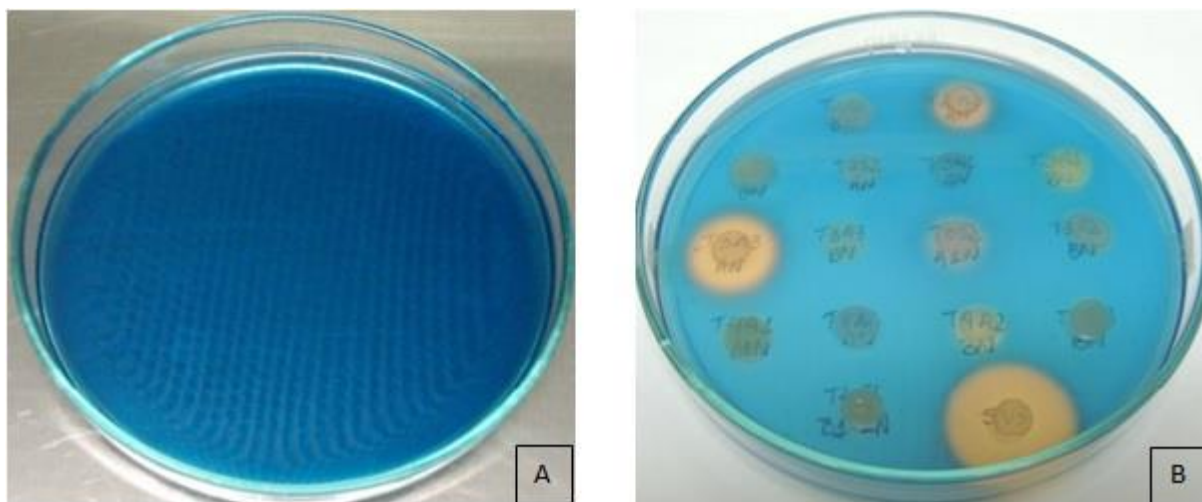


Figura 9. Metodologia CAS-Agar (SCHWYN e NEILANDS, 1987) para detecção de bactérias produtoras de sideróforos. Em A: placa de petri com o meio CAS-Agar sem inoculação de bactéria. B: crescimento bacteriano com formação do halo ao redor da colônia caracterizando resultado positivo para o teste.

Para outra metodologia utilizada (O-CAS), os isolados foram inoculados em placas com meio ágar nutriente 28 g/L (HIMEDIA) (Figura 10. A), incubados por um período de 24h a 30 °C. Após esse período, 10 mL do meio CAS (preparado apenas como meio revelador, sem a presença de nutrientes – 0,0605 g/L CAS; 0,0729 g/L brometo de amônio hexadeciltrimetil (HDTMA/CTAB); 30,24 g/L de piperazina-1,4-bis (ácido 2-etano sulfônico) (PIPES), e 10 mL de 1 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 10 mM HCl) foram adicionados sobrepondo inteiramente o meio ágar nutriente, como meio revelador (Figura 10. B). Após 15min pode-se observar a formação de halo claro ou mudança de cor (de azul para púrpura ou laranja, dependendo do tipo de sideróforo) em torno dos microorganismos produtores (Figura 9. C). Esta metodologia foi testada devido à toxicidade que o HDTMA pode apresentar no meio CAS-Ágar convencional, sobre as bactérias Gram-positivas, inibindo assim seu crescimento (PÉREZ-MIRANDA et al., 2007).

O teste CAS é baseado na quelação do ferro por sideróforos, detectado pela mudança de cor do complexo CAS-ferro (SCHWYN e NEILANDS, 1987). Quando um agente quelante como o sideróforo, retira o Fe(III) do complexo indicador universal de sideróforos (CAS), ocorre uma mudança da cor de azul para

púrpura, a qual indica sideróforos do tipo catecol, ou de azul para cor laranja como relatado por microrganismos que produzem hidroxamatos.

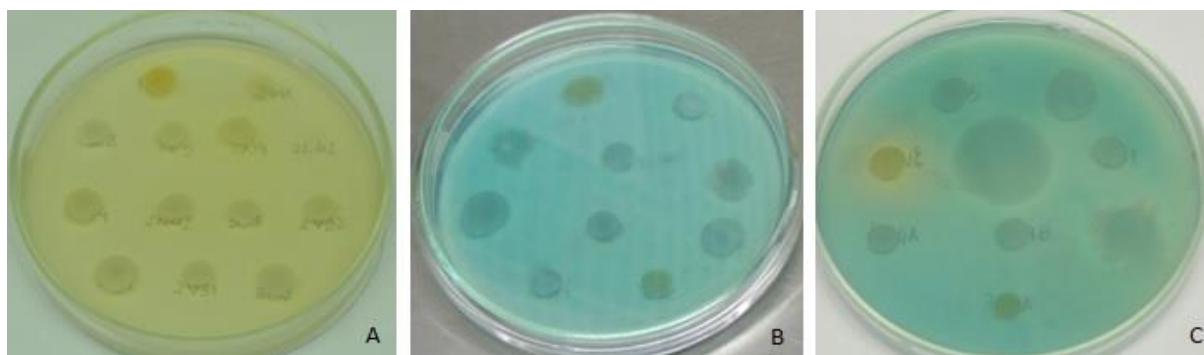


Figura 10. Metodologia O-CAS (PÉREZ-MIRANDA et al., 2007) para detecção de bactérias produtoras de sideróforos. Em A: isolados inoculados em placa de petri com o meio Agar nutrienste. B: sobreposição do meio (CAS) revelador sobre as colônias. C: alteração na cor do meio sobre a colônia, caracterizando resultado positivo para a atividade.

3.4. IDENTIFICAÇÃO POR SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE 16S rRNA

Os isolados da cultura de milho foram submetidos à análise molecular do gene 16S rRNA pela técnica de PCR de colônia, realizada com o oligonucleotídeo iniciador universal 27F: 5' - AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3' e 1492R: 5' - ACCTTGTTACGACTT -3' (LANE,1991). O programa de PCR usado foi: 1 ciclo de 2min a 94 °C, 25 ciclos de 45s a 94 °C, 45s a 60 °C, 75s a 72 °C e 1 ciclo de 10min a 72°C. Em seguida, os produtos de PCR foram tratados com 5,2 U e 0,77 U de Exonuclease/SAP (*shrimp alkaline phosphatase* – Fermentas), respectivamente, e incubados a 37 °C por 1h, seguido com a inativação das enzimas a 80 °C por 30min. O produto amplificado de gene 16S rRNA foi parcialmente sequenciado usando o primer 27F e 1492R e BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencing Kit (AppliedBiosystems) em sequenciador de DNA ABI 3500 (Applied Biosystems).

As sequências derivadas de cada iniciador foram editadas, extremidades com valor de Phred menor que 20 foram removidas (EWING et al., 2005), gerando sequências de aproximadamente 800pb. Posteriormente, as sequências derivadas dos primers 27F e 1492R de cada isolado foram alinhadas no programa BioEdit (HALL et al., 1999), e uma sequência consenso de

aproximadamente 1500pb foi gerada. A classificação taxonômica das sequências consenso foi realizada pelo programa RDP II Classifier (WANG et al., 2007) e pelo MEGA-BLAST (ZHANG et al., 2000). Os isolados foram classificados em nível de gênero quando suas sequências do 16S rRNA apresentaram valor maior que 97% de identidade com sequências de referência presentes no banco do *Ribosomal Database Project* (SCHLOSS et al., 2005) e no banco de dados “16S ribosomal RNA sequences (Bacteria/Archaea)” do *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando a ferramenta BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997). As sequencias foram depositadas no GenBank – NCBI, sob código de acesso KX066708 - KX06676.

Para a análise filogenética, alinhamentos foram obtidos usando INFERNAL aligner (NAWROCKI et al., 2009) e editadas manualmente com programa GBlocks (CASTRESANA, 2000). Modelo de substituição de nucleotídeos foi selecionado usando MEGA software versão 6 (TAMURA et al., 2013). Árvore filogenética foi gerada com algoritmo Máxima Verossimilhança e a representação gráfica da árvore filogenética foi obtida pelo iTOL (LETUNIC e BORK, 2007). Foram inclusas nesta análise apenas as sequencias 16S rRNA dos isolados que apresentaram também a análise de espectrometria de massas (descrito a baixo).

3.5. ANÁLISE POR ESPECTOMETRIA DE MASSAS DO TIPO MALDI-TOF

Colônias isoladas de uma cultura de cada isolado foram lavadas duas vezes com 1 mL de água ultrapura estéril, seguindo centrifugação por 2min a 12000 *g*. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 5 µL de ácido fórmico (35%) e 5 µL de acetonitrila (50%), seguindo centrifugação por 10min a 12000 *g*, e 8 µL do sobrenadante foi então transferido para um novo tubo. Cerca de 1 µL do sobrenadante foi depositado manualmente na placa do espectrômetro de massa (Autoflex; Bruker Daltonics), e deixados secar à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 1µL da matriz (α - ciano-4-ácido hidroxicinâmico 10 mg/mL em acetonitrila 50 % e ácido trifluoroacético 2,5 %), e novamente deixado secar à temperatura ambiente (STETS et al, 2013).

O processamento das amostras ocorreu com um espectrômetro de massa MALDI-TOF (Autoflex, Bruker Daltonics), o qual possui um laser de nitrogênio e

utiliza o software Flex Control v. 3.0 (BrukerDaltonics). Os íons positivos foram extraídos utilizando uma voltagem de aceleração de 20 Hz no modo linear e cada espectro foi gerado pela soma dos íons obtidos de 1.000 pulsos do laser com etapas de 100 em 100 pulsos em pontos da amostra variados. Os espectros foram obtidos de forma manual com uma resolução mínima de 600 e analisados em uma faixa de relação massa/carga (m/z) de 2.000 a 20.000 utilizando como calibradores uma mistura de insulina (5.734,51 m/z), ubiquitina I (8.565,76 m/z) apomiglobina (16.952,27 m/z), insulina cadeia B oxidada (3.493,6513 m/z), ribonuclease A (13.700 24 m/z) e citocromo C (12.360,97 m/z) (Protein Calibration Standard I – Bruker Daltonics). O software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics) foi utilizado para o processamento dos espectros, onde foi possível a obtenção das listas de picos por meio do programa MS-Analyser (SANTOS et al., 2012).

A partir da obtenção dos espectros de cada amostra, foi descartada a replicata que apresentava menor reprodutibilidade de picos, então um dendrograma foi gerado pelo programa R (R Development Core Team, 2007) com as amostras em duplicatas.

3.6. ANÁLISES DE DIVERSIDADE E ESTATÍSTICA

A análise de cluster, Análise de Componentes Principais e perfis de diversidade Rényi foram feitos com Cluster (MAECHLER et al., 2015), Vegan (OKSANEN et al., 2007) e pacotes Biodiversidade (KINDT et al., 2005), respectivamente, no programa R (R Development Core Team, 2007).

4. RESULTADOS

4.1CAPÍTULO 1

Diversidade genética e funcional de rizobactérias diazotróficas cultiváveis com potencial para a promoção do crescimento vegetal

Resumo

Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPR) estimulam o desenvolvimento das plantas hospedeiras, e a planta, por sua vez, em conjunto com as condições de cultivo, têm um significativo efeito sobre a estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera. Neste estudo, foram isoladas e identificadas rizobactérias cultiváveis associadas com a cultura de milho (*Zea mays*), analisado o perfil dos isolados por MALDI-TOF e caracterizados quanto as suas atividades promotoras do crescimento vegetal. Os setenta e sete isolados bacterianos obtidos a partir do uso de cinco diferentes meios de cultivo (JMV, JNFb, NFb, LGI e LGI-P) livres de amônia, foram identificados pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. O biofertilizante e as dosagens de nitrogênio não interferiram significativamente na composição da comunidade de bactérias diazotróficas isoladas. O meio JNFb permitiu o isolamento de um maior número de indivíduos, apresentando maior riqueza e diversidade. Dentre os isolados, houve a predominância das classes β e γ -Proteobacteria, sendo *Burkholderia* o gênero mais abundante. A análise por espectrometria de massa mostrou potencial para separar gêneros bem representados em nível de estirpe. Mais da metade dos isolados produziram sideróforos (58%) e protease (50,7%); solubilização de fosfato (36,2%) e aproximadamente um quarto deles (23,1%) foi capaz de produzir celulase. A produção de cianeto de hidrogênio se mostrou bastante rara, sendo detectada em apenas 4,3% dos isolados, todos pertencentes ao gênero *Pseudomonas* sp. Todas as bactérias analisadas apresentaram ao menos uma atividade e 55% apresentam três ou mais. Análises de componentes principais indicaram que (1) os gêneros *Burkholderia* sp. e *Luteibacter* sp., tem correlação significativa ($p < 0,05$ ou $p < 0,001$) com a produção de protease, sideróforos e solubilização de fosfato, (2) *Bacillus* sp. e *Luteibacter* sp., com produção de compostos indólicos e celulase e (3) *Pseudomonas* sp., com produção de protease, cianeto, sideróforo, compostos indólicos e celulase. Diante da demanda de biofertilizantes para gramíneas capazes de substituir parcialmente ou integralmente o uso de fertilizantes químicos, os isolados que apresentaram diversas atividades promotoras do crescimento vegetal se mostram promissores para aplicação como biofertilizante.

Palavras-chave: PGPR, biofertilizantes, 16S rRNA.

1.1 INTRODUÇÃO

A rizosfera é uma fina camada de solo ao redor da raiz que é imensamente influenciada pelo sistema radicular (UROZ et al., 2010; PRASHAR et al., 2014). Esse complexo ecossistema contém bactérias, fungos, oomicetos, nematoides, protozoários, algas, vírus, archaea e artrópodes; é moldado principalmente pelo tipo de solo e o genótipo da planta, pois ambos afetam o padrão de exsudação da raiz e fisiologia (MENDES et al., 2013).

Muitos membros do microbioma da rizosfera fazem parte de uma complexa cadeia alimentar que utiliza grandes quantidades de nutrientes liberados pelas plantas (MENDES et al., 2013). Comparado com o solo não rizosférico, essa zona é rica em nutrientes devido à acumulação de uma variedade de compostos orgânicos liberados pela raiz por meio da exsudação, secreção e rizodeposição. Esses compostos podem ser usados como fonte de carbono e energia pelos microrganismos, que por sua vez, apresentam uma intensa atividade na rizosfera (CHAUHAN et al., 2015).

Exsudação é conhecida por exibir variações quantitativas e qualitativas entre diferentes espécies de plantas. Tem sido hipotetizado a longo tempo que a diversidade de microrganismos presente na rizosfera de diferentes plantas, e especialmente suas habilidades funcionais, podem ser ligadas a essas variações em exsudatos. Padrões de exsudação sofrem alterações com a idade da planta e localização ao longo do sistema radicular. Geralmente, uma maior concentração de exsudatos é encontrada durante a fase inicial do crescimento, presumivelmente devido a compostos armazenados na semente. Esses locais de exsudação produzem exsudatos que variam em termos de quantidade e composição. Essa variação espacial e temporal de fontes de carbono que ocorrem dentro de um sistema radicular são os fatores que provavelmente influenciam a composição e estrutura da comunidade bacteriana associada à rizosfera. As estruturas dessas comunidades podem ser categorizadas em ampla escala utilizando várias técnicas, incluindo abordagens genotípicas e fenotípicas. Em estudos dedicados ao ambiente do solo, muitos métodos fenotípicos dependem de estirpes viáveis cultiváveis (BAUDOIN, BENIZRI e GUCKERT, 2002).

A interação entre plantas e bactérias do solo podem ser benéficas, prejudiciais ou neutras. Esse efeito está relacionado com a abundância de espécies

microbianas específicas (MENDES et al., 2013). Rizobactérias que influenciam positivamente o crescimento das plantas são denominadas de rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria* - PGPR). O termo PGPR abrange diversos gêneros de diferentes fontes e habitats que representam grande diversidade fisiológica, funcional e ecológica (CHAUHAN et al., 2015). Estirpes de PGPR podem promover o crescimento e desenvolvimento das plantas quer direta ou indiretamente. Estimulação direta inclui fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de fitormônios como auxinas citocininas e giberelinas, solubilização de minerais como fósforo e ferro e indução a resistência sistêmica. Estimulação indireta está relacionada ao biocontrole, incluindo produção de antibióticos, quelação de ferro disponível na rizosfera (produção de sideróforos), síntese de enzimas extracelular para hidrolisar parede celular de fungos e competição por nichos dentro da rizosfera (GLICK, 2012).

A aplicação de PGPR como inoculantes em culturas tem sido uma prática atrativa para promover o crescimento de soja (MAURICE et al., 2001), milho e trigo (HUNGRIA et al., 2010), feijão (HUNGRIA et al., 2000) etc e diminuir ou abolir o uso de fertilizantes e pesticidas, que frequentemente poluem o meio ambiente. Algumas espécies de PGPR apresentaram promoção do crescimento vegetal de diversas culturas: por exemplo, *Azospirillum* associado com milho e trigo diminuiu a necessidade de fertilizantes nitrogenados em 50% e aumentou a produção em até 30% (HUNGRIA et al., 2010).

Decifrar o microbioma da planta é fundamental para identificar microrganismos que podem ser explorados para melhorar o crescimento e a saúde das plantas (MENDES et al., 2013). Baseado nisso, a proposta deste estudo foi isolar e identificar bactérias diazotróficas cultiváveis associadas com a rizosfera de milho (*Zea mays*) tratadas com diferentes doses de nitrogênio e diferentes estirpes. Além disso, verificamos também a estrutura da comunidade microbiana partindo da hipótese que a inoculação estaria afetando a composição da comunidade bacteriana e avaliamos as habilidades dos isolados em promover o crescimento vegetal para indicar potenciais PGPR.

1.2.MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento de bactérias diazotróficas da rizosfera do Milho

Milho (*Zea mays* L. 30F53H, Pioneer) foi crescido sob diferentes inoculações e doses de nitrogênio, como descrito na tabela 4.1. O experimento realizou-se na Fazenda Experimental da Fundação ABC (25°00'50''S, 50°09'18''W), Ponta Grossa, Paraná, Brasil em 2012.

Tabela 4.1. Tratamentos de inoculação e dosagem de Nitrogênio (Kg/ha) em campo experimental de milho.

Tratamento	Dose de N (kg/ha)	Bactéria inoculada (1L inoculante/50Kg de semente)
1	30	Sem inoculação
2	160	Sem inoculação
3	30	Inoculante comercial AzoTotal® (Total Biotecnologia) ¹
4	160	Inoculante comercial AzoTotal® (Total Biotecnologia) ¹
5	30	<i>Azospirillum</i> sp. L26
6	30	<i>Herbaspirillum</i> sp. L27
7	30	<i>Rhizobium</i> sp. 8121
8	30	<i>Enhydrobacter</i> sp. 4331
9	30	<i>Azospirillum brasilense</i> HM053
10	30	<i>Azospirillum brasilense</i> Abv5
11	0	Sem inoculação

¹ Inoculante contendo *Azospirillum brasilense* Abv5 e Abv6.

As plantas no estágio R1 foram removidas do solo por meio de corte 10x10 cm realizado com pa reta. O solo aderidos a raiz, considerado rizosfera, foi coletado. Três amostras aleatórias de cada tratamento foram agrupadas e secas ao ar, na sombra, gerando terra fina seca ao ar (TFSA). Após a secagem, as amostras de solo foram peneiradas (2 mm diâmetro) e armazenadas em sacos de papel sob temperatura ambiente, até o momento das avaliações microbiológicas (ocorridas seis meses após a amostragem). Dez gramas de solo da rizosfera foram incubados com 2 mL de água destilada esterilizada a 30 °C por 48 h. Após a incubação, foi realizada diluição seriada como descrito por Döbereiner, Baldani e Baldani (1995).

Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram inoculadas em triplicata em frascos contendo 3 mL dos meios de cultura semi-sólido JMV, LGI, LGI-P, JNFb e NFb livres de nitrogênio (DÖBEREINER, ANDRADE e BALDANI, 1999) para contagem dos microrganismos diazotróficos pelo método do número mais provável (NMP) como descrito em Döbereiner, Baldani e Baldani (1995). Após duas inoculações consecutivas película no respectivo meio de cultura semissólido, a película a partir do tubo de diluição mais elevada foi plaqueada em meio DYGS (DÖBEREINER, ANDRADE e BALDANI, 1999) para isolamento. Isolados eram mantidos em glicerol 50% a -20 °C até caracterização bioquímica e molecular.

Atividade da Celulase

Atividade enzimática da celulase, foi avaliada usando a metodologia descrita por Kasana et al. (2008), substituindo carboximetilcelulose (CMC) por celulose e usou-se o iodo de Gram como colorante. Os isolados foram crescidos em meio líquido DYGS (DOBEREINER, ANDRADE e BALDANI, 1999) até à saturação, e 5 µL das culturas foram inoculados no centro de placas de petri (49x12mm) contendo 10 mL de meio ágar celulose (2g/L de NaNO₃, 1g/L de K₂HPO₄, 0,5g/L MgSO₄, 0,5g/L KCl, 0,2g/L peptona bacteriológica com adição de 17g/L de ágar e 2g/L celulose - exibindo turbidez devido à insolubilidade da celulose) em triplicata. Todas as placas foram seladas com plástico filme e incubadas a 30 °C durante 5 dias. Depois do período de incubação foi transferido sobre o meio de cultura 2 mL solução de iodo de Gram (KI 6,6 g/L; iodo 3,3 g/L) e incubadas por 30 min, após a solução foi descartada. A formação de halo ao redor das colônias indicou a degradação da celulose e os isolados foram arbitrariamente classificados pelo potencial de produção de celulose de acordo com a intensidade do halo de degradação formado.

Produção de Cianeto de Hidrogênio (HCN)

A produção de HCN foi determinada de acordo com o método de Lorck, 1948. Células recém-crescidas em meios DYGS foram espalhadas em placas de

49x12 mm contendo 10 mL de Agar nutriente (5 g/L de extrato de carne, 10 g/L de peptona, 5 g/L de NaCl e 15 g/L de Agar e enriquecido com solução de glicina – 4,4 g/L). Papel germitest umidificado com 500µL de solução de ácido pícrico (0,5% ácido pícrico e 2% carbonato de sódio) foi fixado na tampa das placas de petri, que foram em seguida seladas com plástico filme e incubadas a 30 °C durante 48h. Quando houve alteração na cor do papel germitest do amarelo ao marrom avermelhado foi interpretada como atividade cianogênica, sendo os isolados arbitrariamente classificados pelo potencial de produção de HCN conforme a intensidade da cor vermelha formada.

Produção de Compostos Indólicos

A produção de compostos indólicos foi determinada pelo método descrito por Glickmann e Dessaux (1995), por meio da reação de Salkowski. Esse teste foi realizado em placa de titulação de 96 poços. Células crescidas em 3 mL de meio líquido DYGS enriquecido com triptofano (0,5g/L) e incubadas a 30 °C por 48h sob agitação de 180 rpm. Uma alíquota de cada amostra foi coletada em microtubo e centrifugado a 13000 rpm (centrifuga 5417C – Eppendorf). Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e utilizado nas determinações de indóis totais, enquanto o precipitado de células foi armazenado para a determinação do conteúdo proteico, conforme descrito a seguir, adaptado para realizar em placa de titulação 96 poços como descrito por Schwab (2006).

Para a determinação de auxina, 100 µL de reagente Salkowski foi adicionado para 100µL de sobrenadante de amostra (razão 1:1), deixado no escuro durante 30min à temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 530 nm. Teste realizado em quadruplicata. A quantificação foi por meio de curva de calibração (0 - 100 µM) preparada a partir da solução de AIA 5000 µM. A reação de compostos indólicos com reagente Salkowski resulta em coloração amarela para teste negativo e rosa avermelhado para o teste positivo. O conteúdo proteico presente nos respectivos precipitados de células foi determinado conforme Bradford (1976). Foi adicionado 20 µL, do precipitado ressuspendido, em placas com 80 uL de água ultrapura esterilizada e 100 µL de NaOH (0,2 M), deixando ocorrer lise celular por 1h, a temperatura ambiente. Depois, 20 µL deste material foi transferido para outra

placa e adicionado 200 µL de reagente Bradford, com leitura em comprimento de onda 595 nm. A determinação da concentração de proteínas totais no precipitado de células foi por meio da curva de calibração (0 - 50 ug / ml) de BSA (albumina de soro bovino) partir da solução de 500 µg/mL. No final, os resultados foram expressos como a produção de compostos indólicos / proteína (µM / µg).

Solubilização de minerais

A capacidade de solubilização minerais pelos isolados obtidos, foi determinada em meio de cultura desenvolvido por Pikovskaya (1948) enriquecido com 0,5% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e 0,12% de ZnO como fontes de fósforo inorgânico e zinco, respectivamente. Os isolados com potencial de solubilização foram identificados através da zona de halo em torno das colônias. As placas foram incubadas a 30 °C. Os diâmetros dos halos foram medidos com 03 e 07 dias de incubação. A partir destas medições, foram obtidos Índice de Solubilização (IS) para cada isolado foi obtido pela razão do diâmetro do halo (mm) pelo diâmetro da colônia (mm) (BERRAQUERO, BAYA e CORMENZANA, 1976).

As bactérias foram arbitrariamente classificadas de acordo com o índice de solubilização em $\text{IS} < 2$, $2 < \text{IS} < 4$ e $\text{IS} > 4$, baixa, média e alta capacidade de solubilização, respectivamente. As bactérias que começam solubilização até terceiro dia foram consideradas precoces, após terceiro dia considerado lento, quando não ocorreu solubilização visível até o 15º dia foram classificados como 'não solubilizante aparente'.

Produção de Protease

A produção de protease foi como descrita por Smibert e Krieg (1994). O ensaio foi realizado utilizando ágar (30 g/L de água ultrapura) autoclavado a 121 °C durante 20 min e leite desnatado (100 g/L de água ultrapura) autoclavado em vapor fluente a 100 °C durante 45 min. Depois disso, as soluções foram misturadas e plaqueadas. Os isolados foram inoculados e incubados durante dois dias a 30 °C. A

bactérias que apresentaram halo claro foram classificadas como positivas para produção de protease.

Produção de Sideróforos

Células crescidas em meio líquido DYGS foram usadas para o teste, seguindo dois métodos, I) CAS-Ágar descrito por Schwyn e Neilands (1987) e II) método O-CAS descrito por Pérez-Miranda et al., (2007). Para o primeiro método, cada isolado foi inoculado em placas contendo *Chrome Azurol S* (CAS-ágar - Fe III) e depois submetido à incubação (30 °C/24h), a capacidade de produção de sideróforos foi detectado pela formação de halo à volta das colônias. Para o preparo de ~100mL de meio, utilizou-se 0,2mL de solução MgSO₄ 1M; 0,01mL de solução CaCl₂ 1M; 1mL da solução de sucrose 20%; 10mL de sais 10xMM9; 6mL da solução CAS+FeCl₃ (0.0605 g *Chrome Azurol S* em 50 mL de água, misturado com 10 mL da solução de ferro III - 0,0027 g de FeCl₃.6H₂O em 9,917 mL de água destilada e 0,083 mL de HCl 12,1M),; 4mL da solução HDTMA (CTAB) (0.0729 g Brometo de amônio hexadecil trimetil (HDTMA ou CTAB) em 40 mL de água) e 75mL do meio base (15 g/L Agar; 30,24 g/L piperazina-1,4-bis (PIPES); solução de NaOH 50% v/v até pH final 6,8), o meio foi agitado cuidadosamente e distribuído em placas de petri e inoculado 5 µL de cada isolado (em triplicata).

Pelo segundo método *Overlay* CAS (O-CAS), os isolados foram crescidos em meio ágar nutriente (28 g/L – HIMEDIA) por 24h a 30 °C, em seguida adicionados 10 mL de meio CAS (preparado apenas como meio revelador, sem a presença de nutrientes – 0,0605 g/L CAS; 0,0729 g/L brometo de amônio hexadeciltrimetil (HDTMA/CTAB); 30,24 g/L de piperazina-1,4-bis (ácido 2-etano sulfônico) (PIPES), e 10 mL de 1 mM FeCl₃ · 6H₂O em 10 mM HCl) sobre a placa como meio revelador. Após 15 min foi possível observar a mudança de cor (de azul para púrpura ou laranja, dependendo do tipo de sideróforo) foi observada na forma sobreposta, exclusivamente em torno dos microorganismos produtores.

Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e Análises de sequências

Colônias isoladas obtidas pela inoculação em meio DYGS foram suspensas em 10 µL de água deionizada esterilizada e lisadas após 15 min de incubação a 95°C. Em seguida, os seguintes reagentes foram adicionados a um volume final de 30 µL: tampão PCR 1X (Invitrogen); 0,2 µM de oligonucleotídeo 27F: 5' - AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3' e 1492R: 5' - ACCTTGTTACGACTT -3' (LANE,1991); 2 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP (Invitrogen) e 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen). O gene 16S rRNA foi amplificado usando o seguinte perfil de ciclos térmicos: 2 min a 95°C; 25 ciclos de 45 s a 95°C, 45 s a 55 °C e 1,5 min a 72°C.

Os produtos de PCR foram separados em gel agarose 1,8% (TAE 1X) e quantificados usando UVP Labwork Software (UVP Inc.). Os produtos amplificados (20 µL) foram tratados com 10 U de exonuclease I (Biolabs, Ipswich, New England) e 1 U de Fosfatase alcalina (USB, Cleveland, Ohio, USA) a 37°C por 90 min, depois inativadas a 80°C por 30 min (Werle et al., 1994). Os produtos de PCR tratados foram sequenciados usando 0,5 µL de iniciadores 27F e 1492R (10 mM), 1 µL de Big Dye Terminator mix (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA), 3 µL de tampão Big Dye 1X e água ultrapura para volume final de 10 µL usando o seguinte programa: 2 min a 96 °C e 30 ciclos de 15 s a 96 °C, 30 s a 55.4 °C e 4 min a 60 °C. O produto de PCR sequenciamento (10 µL) foi precipitado usando 2.5 µL de acetato de amônia (7.5 µM), 60 µL de etanol absoluto e 10 µL de água ultrapura seguido por 45 min de centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70%, seco e dissolvido em formamida deionizada. Sequenciamento foi realizado usando 24-capillary 3500xL System (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA). Sequências foram tratadas usando programa Phred (EWING et al., 1998). Sequências derivadas de cada oligonucleotídeo (27F e 1492R) foram alinhados pelo programa Bioedit (HALL et al., 1999) e gerado sequência consenso de aproximadamente 1500 pb. A classificação taxonômica foi realizada pelo programa RDP II Classifier (WANG et al., 2007) e MEGA-BLAST (ZHANG et al., 2000), sendo os isolados classificados a nível de gênero com valor acima de 97% de similaridade com sequencias de referencia no banco de dados do Ribosomal Database Project (SCHLOSS et al., 2005) e no banco de dados "16S ribosomal RNA sequences (Bacteria/Archaea)" do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando a

ferramenta BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997). Após identificação taxonômica as sequencias foram depositadas no GenBank – NCBI, sob código de acesso KX066708 - KX06676.

Para a análise filogenética, alinhamentos foram obtidos usando INFERNAL aligner (NAWROCKI et al., 2009) e editadas manualmente com programa GBlocks (CASTRESANA, 2000). Modelo de substituição de nucleotídeos foi selecionado usando MEGA software versão 6 (TAMURA et al., 2013). Árvore filogenética foi gerada com algoritmo Máxima Verossimilhança e a representação gráfica obtida pelo iTOL (LETUNIC e BORK, 2007). Foram inclusas na árvore filogenética apenas as sequencias 16S rRNA dos isolados que apresentaram também a análise de espectrometria de massas (descrito a baixo).

Análise por Espectrometria de Massas do Tipo MALDI-TOF

Colônias isoladas de cada isolado foram lavadas duas vezes com 1 mL de água ultrapura estéril, seguindo com centrifugação por 2 min a 12000 *g*. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 5 µL de ácido fórmico e 5 µL de acetonitrila, seguindo uma centrifugação por 10 min a 12000 *g*, e 8 µL do sobrenadante foi então transferido para um novo tubo. Cerca de 1 µL do sobrenadante foi depositado manualmente na placa do espectrômetro de massa (Autoflex; Bruker Daltonics), e deixados secar à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 1µL da matriz (α - ciano-4-ácido hidroxicinâmico 10 mg/mL em acetonitrila 50 % e ácido trifluoroacético 2,5 %), e novamente deixado secar à temperatura ambiente (STETS et al, 2013).

O processamento das amostras ocorreu com um espectrômetro de massa MALDI-TOF (Autoflex; Bruker Daltonics), o qual possui um laser de nitrogênio e utiliza o software Flex Control v. 3.0 (BrukerDaltonics). Os íons positivos foram extraídos utilizando uma voltagem de aceleração de 20 Hz no modo linear e cada espectro foi gerado pela soma dos íons obtidos de 1.000 pulsos do laser com etapas de 100 em 100 pulsos em pontos variados da amostra. Os espectros foram obtidos de forma manual com uma resolução mínima de 600 e analisados em uma faixa de relação massa/carga (m/z) de 2.000 a 20.000 utilizando como calibradores uma mistura de insulina (5.734,51 m/z), ubiquitina I (8.565,76 m/z) apomiloglobina

(16.952,27 m/z), insulina cadeia B oxidada (3.493,6513 m/z), ribonuclease A (13.700 24 m/z) e citocromo C (12.360,97 m/z) (Protein Calibration Standard I – Bruker Daltonics). O software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics) foi utilizado para o processamento dos espectros, onde foi possível a obtenção das listas de picos por meio do programa MS-Analyser (SANTOS et al., 2012).

A partir da obtenção dos espectros de cada amostra, foi descartada a replicata que apresentava menor reprodutibilidade de picos, então um dendrograma foi gerado pelo programa R (R Development Core Team, 2007) com as amostras em duplicatas.

Diversidade e Análise Estatística

A análise de cluster, Análise de Componentes Principais e perfis de diversidade Rényi foram feitos com Cluster (MAECHLER et al., 2015), Vegan (OKSANEN et al, 2007) e pacotes Biodiversidade (KINDT et al., 2005), respectivamente, no programa R (R Development Core Team, 2007).

1.3.RESULTADOS

Isolamento e identificação de rizobactérias diazotróficas

Setenta e sete isolados bacterianos foram obtidos a partir dos solos coletados da rizosfera de milho submetido a onze tratamentos. Para tal isolamento, foram utilizados cinco meios semissólidos contendo diferentes fontes de carbono, sem nitrogênio. O número de isolados obtido em cada meio é mostrado na Tabela 5.1. Como todos os isolados formaram película, pode-se assumir que são potenciais fixadores de nitrogênio.

Tabela 5.1. Número de isolados provenientes da rizosfera do milho obtido em cada meio de cultivo utilizado.

Meio de Cultivo	Nº de Isolados
JNFb	20
NFb	17
JMV	17
LGI	18
LGI-P	5

O número de isolados em cada tratamento foi semelhante, conforme apresentado na Tabela 6.1 e o tratamento controle (T11) apresentou número inferior aos demais.

Tabela 6.1. Número de isolados provenientes de cada tratamento utilizado.

Tratamento	Nº de Isolados
T1 (30N sem inoculação)	8
T2 (160N sem inoculação)	9
T3 (30N+Azo Total)	8
T4 (160N+Azo Total)	9
T5 (30N+Azospirillum sp. L26)	8
T6 (30N+Herbaspirillum sp. L27)	6
T7 (30N+Rhizobium sp. 8121)	7
T8 (30N+Enhydrobacter sp. 4331)	6
T9 (Azospirillum brasilense HM053)	6
T10 (30N+Azospirillum brasilense Abv5)	6
T11 (0N sem inoculação)	4

Análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF

Os isolados bacterianos foram também analisados pela técnica de espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF resultando em um dendrograma gerado a partir dos espectros de massas obtidos (Figura 12.1) mostrando agrupamento dos isolados pertencentes ao gênero *Burkholderia* sp. (mais representativo) congruente com a identificação pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA (Figura 11.1). No entanto, a disposição dos isolados no agrupamento de *Burkholderia* sp. na análise por espectrometria de massas se apresentou diferente das sequências do gene 16S rRNA. Por exemplo, os isolados 7L4B e 6V4, 6J3 e 9N4, 1J2 e 9N5, 1V31 e 5V3 agruparam-se próximos pela sequência 16S rRNA (Figura 11.1) mas não pelo espectro de massas (Figura 12.1). Os isolados de grupos taxonômicos pouco representativos não apresentaram agrupamento congruente com a filogenia de 16S rRNA, provavelmente devido a presença de picos compartilhados por várias espécies.

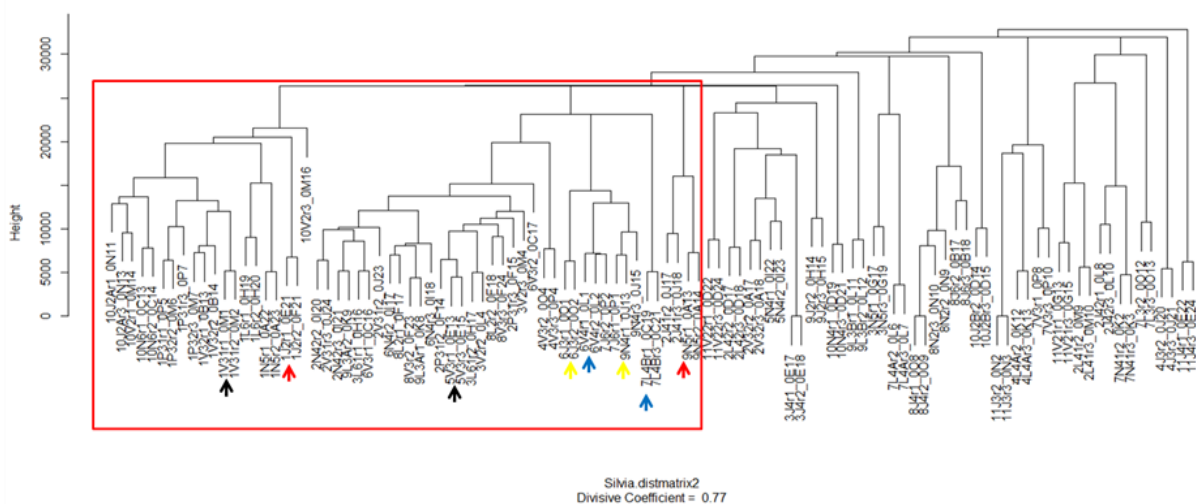


Figura 12.1. Dendrograma com base nos espectros de massa MALDI-TOF de células inteiras dos isolados bacterianos da rizosfera do milho. O retângulo vermelho indica o cluster de *Burkholderia* sp. identificado com base no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. As setas coloridas destacam os isolados que eram agrupados no mesmo ramo na árvore do gene 16S rRNA (acima). O dendrograma foi obtido com o programa estatístico R. Setas pretas indicam: 1V31 e 5V3; setas vermelhas: 1J2 e 9N5; setas amarelas: 6J3 e 9N4; setas azuis: 6V4 e 7L4B.

Além disso, agrupamentos do MALDI não puderam ser correlacionados com atividades bioquímicas (Figura 15.1), devido algumas combinações serem realizadas por isolados de diferentes ramos ou isolados do mesmo ramo presente em diferentes atividades bioquímicas.

Diversidade de rizobactérias diazotróficas cultiváveis

Baseado na identificação taxonômica, a diversidade de rizobactérias cultiváveis isoladas do tratamento de milho foi comparada. A rizosfera no tratamento 01 (T1; 30N sem inoculação) apresentou a menor riqueza e diversidade de gêneros seguido, em ordem crescente, por T9 (30N+*A.brasilense* HM053) e T6 (30N+*Herbaspirillum* sp. L27), T8 (30N+*Enhydrobacter* sp. 4331), T10 (30N+*A.brasilense* AbV5) e T5 (30N+*Azospirillum* sp L26). Por outro lado, a rizosfera nos tratamentos T4 (160N+AzoTotal), T3 (30N+AzoTotal), T7 (30N+*Rhizobium* sp. 8121) e T2 (160N sem inoculação) apresentaram os maiores índices de riqueza e diversidade (Figura 13.1 A).

A riqueza e a diversidade de gêneros isolados em cada meio de cultivo também foram avaliadas (Figura 13.1 B). O meio JNFb mostrou-se menos seletivo, proporcionando acesso à maior diversidade (gêneros), seguido pelo NFb e LGI. O meio de cultivo LGI-P apresentou o menor índice de riqueza e diversidade.

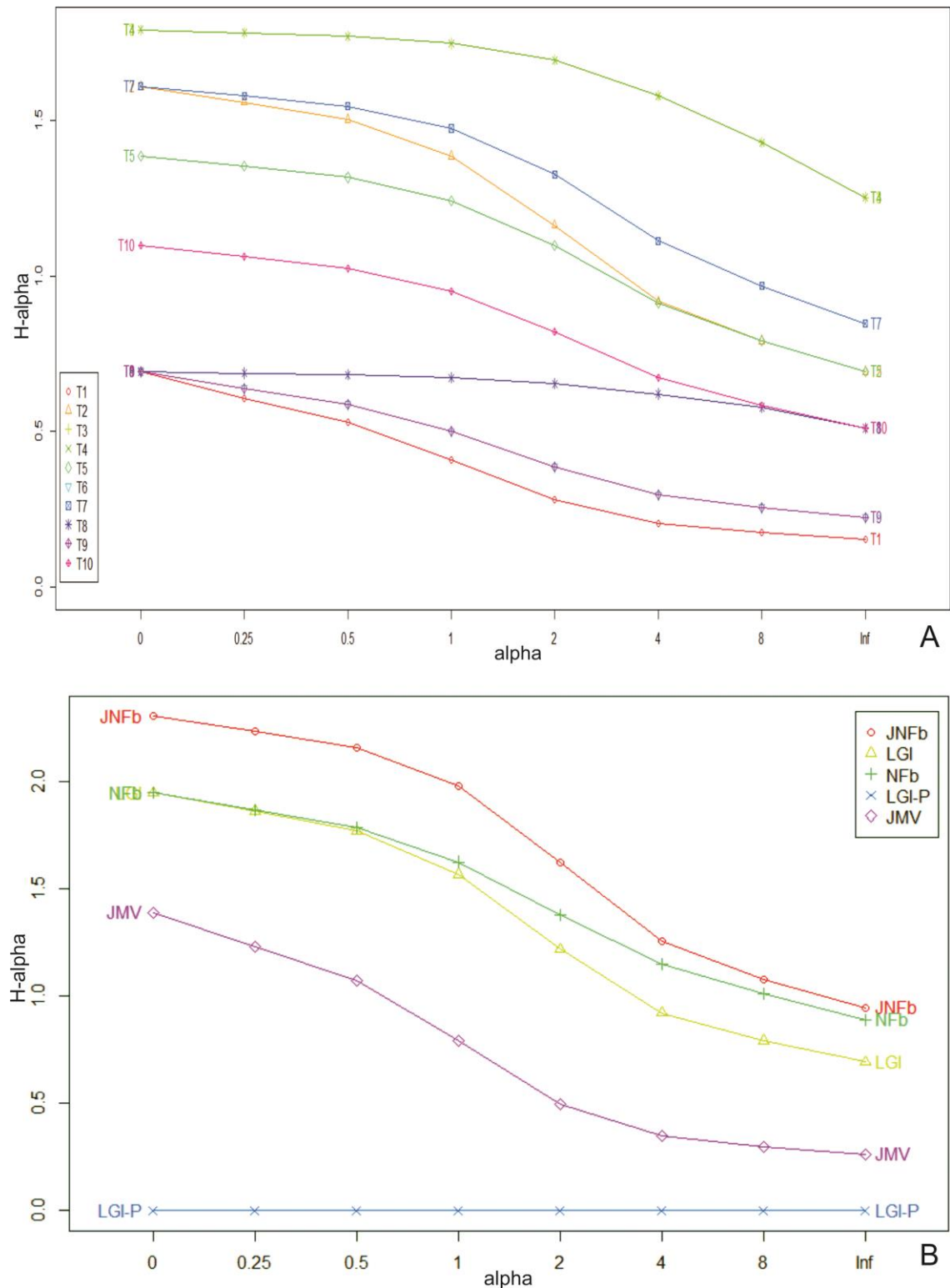


Figura 13.1 Perfis de diversidade Renyi com base em gêneros de bactérias. Os valores de perfil para $\alpha = 0, 1, 2$ e infinito indica a riqueza de espécies, índice de diversidade de Shannon, logaritmo do índice recíproco da diversidade de Simpson e Berger Parker, respectivamente. Se o perfil de uma amostra foi consistentemente mais elevado do que o perfil para outra amostra, a amostra com o perfil superior foi considerada mais diversificada. Quando as curvas de duas comunidades se cruzam, isto significa que eles não podem ser classificados. A: comparação dos perfis de diversidade Renyi dos diferentes tratamentos do milho realizados antes do plantio. B: comparação dos perfis de diversidade Renyi dos diferentes meios de cultivo utilizados para o isolamento. Somente tratamentos que receberam pelo menos 30 kg/ha de nitrogênio foram analisados (T1-T10). T11 estava atrapalhando a visualização dos perfis de vários tratamentos.

Alguns gêneros foram isolados em apenas um dos meios de cultivo testados (Tabela 7.1). *Novosphingobium* sp., *Rhizobium* sp., *Achromobacter* sp. e *Kosakonia* sp. foram isolados apenas em JNFb, meio semisseletivo para *Herbaspirillum* sp.; enquanto que *Cupriavidus* sp., *Chitinophaga* sp., *Ralstonia* sp. e *Paenibacillus* sp. foram isolados apenas em LGI, meio semisseletivo para *Burkholderia* sp. e *Azospirillum amazonense*; *Staphylococcus* sp. e *Arthrobacter* sp. foram isolados apenas em NFb, meio semisseletivo para *Azospirillum* sp. Enquanto *Enterobacter* sp. foi isolado apenas em JMV, meio semisseletivo para *Burkholderia* sp. Os demais gêneros foram isolados em pelo menos dois diferentes meios de cultivo e *Burkholderia* sp. apresentou crescimento nos cinco meios utilizados.

Tabela 7.1. Gêneros isolados em meios de cultivo JMV, NFb, JNFb, LGI e LGI-P.

	JMV	NFb	JNFb	LGI	LGI-P
<i>Achromobacter</i> sp.			01		
<i>Acinetobacter</i> sp.		01	01	02	
<i>Arthrobacter</i> sp.		04			
<i>Bacillus</i> sp.		01	01		01
<i>Burkholderia</i> sp.	10	07	07	07	03
<i>Chitinophaga</i> sp.				01	
<i>Cupriavidus</i> sp.				01	
<i>Enterobacter</i> sp.	01				
<i>Kosakonia</i> sp.			01		
<i>Leifsonia</i> sp.	01		01		
<i>Luteibacter</i> sp.	01			01	
<i>Novosphingobium</i> sp.			01		
<i>Paenibacillus</i> sp.				01	
<i>Pseudomonas</i> sp.		02	02		
<i>Ralstonia</i> sp.				01	
<i>Rhizobium</i> sp.			02		
<i>Staphylococcus</i> sp.		01			
<i>Variovorax</i> sp.		01	01		

Análise de Componentes Principais foi usada para avaliar a correlação entre (1) diferentes tratamentos de campo (2) atividades bioquímicas apresentadas pelos isolados, (3) taxonomia dos isolados e (4) meios de cultivo usados para o isolamento, mas nenhuma correlação significativa foi observada (dados não mostrados).

Caracterização das atividades promotoras do crescimento vegetal dos isolados bacterianos

Os isolados bacterianos foram caracterizados quanto as seguintes atividades promotoras do crescimento vegetal: (1) atividade da celulase, (2) solubilização de minerais, (3) produção de cianeto, (4) produção de sideróforos, (5) produção de protease e (6) produção de compostos indólicos.

Foram avaliados sessenta e nove isolados e desses, 88,4% produziram compostos indólicos (CI) numa taxa que variou entre 3,4 a 43.481,5 μM de CI/ μg de proteína (dados não mostrados). Mais da metade dos isolados produziram sideróforos (58%) e protease (50,7%), menos da metade se apresentaram solubilizadores de minerais (36,2%) e aproximadamente um quarto deles capaz de produzir celulase (23,1%). Numa taxa reduzida, em 4,3% dos isolados, foi detectada a atividade de produção de cianeto de hidrogênio.

Além da produção de compostos indólicos ser a atividade mais frequente entre os isolados, essa é desempenhada por um maior número de gêneros (16). Vários gêneros também foram capazes de produzir sideróforos (12), solubilizar minerais (10) e produzir protease (07). Em contraste, a produção de cianeto ficou restrita a dois gêneros, *Arthrobacter* e *Pseudomonas*. A distribuição dos gêneros e suas respectivas atividades de promoção do crescimento vegetal podem ser observadas na Figura 14.1.

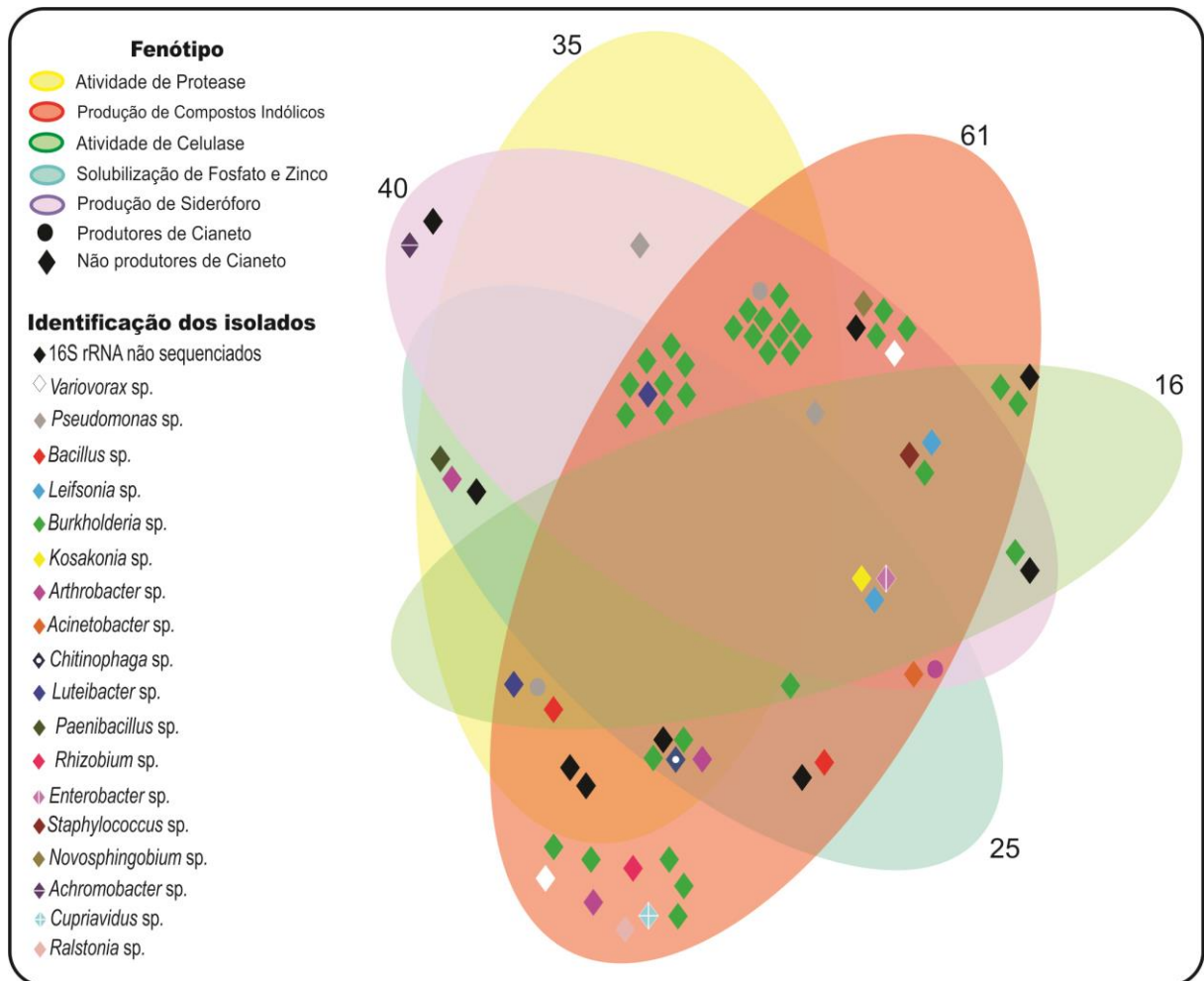


Figura 14.1. Diagrama de Venn. Distribuição dos gêneros e atividades dos isolados do milho.

Todos os isolados analisados apresentaram ao menos uma das atividades testadas e 55% mostraram três ou mais atividades. Bactérias das classes Alpha e Betaproteobacteria apresentaram maior número de isolados com atividades positivas, sendo *Burkholderia* (β -Proteobacteria) o gênero com maior número de isolados capaz de produzir protease, sideróforos, compostos indólicos, celulase e solubilização de minerais.

Com base nos dados quantitativos de produção (classificação baixa, média, alta e valores mensurados), realizou-se uma análise de componentes principais entre os isolados e suas taxas de produção para cada atividade testada. As atividades bioquímicas que apresentaram correlação positiva ($p < 0,05$ ou $p < 0,001$) com os respectivos isolados (indicados pelo código de identificação) estão indicadas como vetores (Figura 15.1), sendo eles produção de celulase, compostos indólicos, cianeto, protease e sideróforos e solubilização de minerais. Os isolados

alocados nos quadrantes abaixo do eixo x apresentaram em sua maioria três ou quatro atividades bioquímicas positivas.

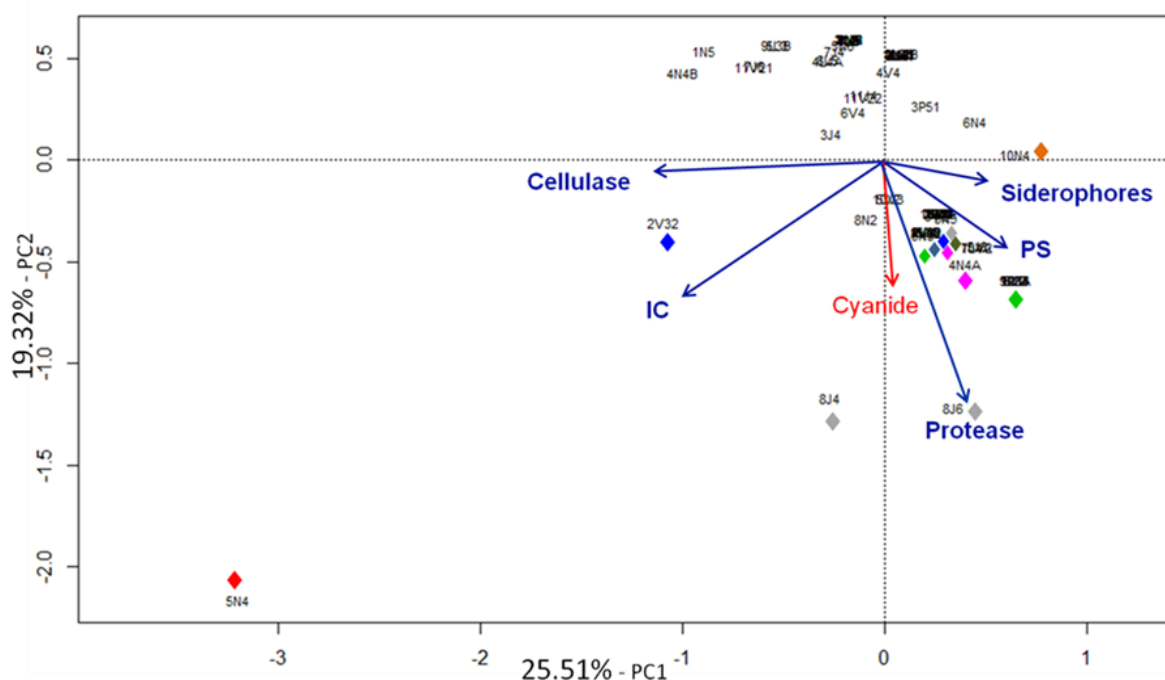


Figura 15.1 Ordenação dos isolados bacterianos com base nas atividades que promovem o crescimento das plantas por Análise de Componentes Principais. Somente os dados bioquímicos com $p < 0,05$ (vermelho) ou $p < 0,001$ (azul) para significância após 999 permutações são exibidos. Cada ponto de vetor para a direção de aumento para uma dada variável e o seu comprimento indica a força da correlação entre a variável e as pontuações de ordenação. IC = Indol Compounds, PS = Mineral Solubilization (refere-se a solubilização de fosfato e zinco). Losangos coloridos indicam: ◆ *Bacillus* sp., ◆ *Pseudomonas* sp., ◆ *Burkholderia* sp., ◆ *Luteibacter* sp., ◆ *Acinetobacter* sp., ◆ *Arthrobacter* sp., ◆ *Paenibacillus* sp., ◆ *Chitinophaga* sp.

Os isolados 5N4 (*Bacillus* sp), 2V32 (*Luteibacter* sp.), 8J4 e 8J6 (*Pseudomonas* sp.) apresentaram correlação positiva significativa com a produção de compostos indólicos. Os isolados *Pseudomonas* sp. 8J4 e 8J6 apresentaram também correlação significativa com protease, e ainda mostraram alta produção de cianeto (HCN) e o último, produção de sideróforos (Figura 15.1).

Os isolados agrupados entre os vetores de protease e solubilização de minerais (PS) (Figura 15.1) foram identificados como *Burkholderia* sp., *Pseudomonas* sp., *Arthrobacter* sp., *Chitinophaga* sp., *Luteibacter* sp. e *Paenibacillus* sp. Todos com exceção do último, apresentaram essas duas atividades, com índice médio de solubilização de minerais e um isolado (*Acinetobacter* sp.) com alto índice. *Pseudomonas* sp., *Arthrobacter* sp. e

Luteibacter sp. e os isolados presente no quadrante superior direito da Figura 15.1, apresentaram boa produção de sideróforos, já os isolados posicionados no quadrante superior esquerdo, produziram apenas baixos níveis de compostos indólicos (sem correlação significativa).

1.4. DISCUSSÃO

Identificação taxonômica dos isolados

A maioria dos isolados bacterianos obtidos neste estudo pertencem a três classes (α , β e γ) do filo Proteobacteria (Figura 11.1). Indivíduos desse filo já foram detectados em diversas culturas de importância agrícola como milho (PEIFFER et al, 2013), canola (CAMPOS et al, 2012), girassol (AMBROSINI et al, 2012) e ainda em florestas de carvalho (UROZ et al, 2010) entre muitos outros. Proteobacteria engloba uma ampla variedade de gêneros, apresenta grande diversidade metabólica e contém a maioria das bactérias Gram-negativas conhecidas, tendo importância médica, industrial e agrícola (MADIGAN, MARTINKO e PARKER, 2004). Muitos genes envolvidos na FBN foram encontrados na rizosfera de milho, especialmente no genoma de membros de Proteobacteria, bem como, genes envolvidos na ciclagem de carbono, fósforo e enxofre (LI et al., 2014).

O gênero *Burkholderia*, apresentou maior abundância de indivíduos no presente trabalho. A ocorrência deste gênero em solos e na rizosfera de milho, bem como a sua atuação benéfica para as plantas vêm sendo relatada (DI CELLO et al, 1997; BEVIVINO et al, 1998; CHIARINI et al., 2006; COMPANT et al., 2008).

Embora algumas espécies possam sobreviver em sedimentos e solo, indivíduos do gênero *Burkholderia* que habitam a rizosfera podem influenciar o crescimento da planta com a disponibilidade de fitormônios como auxinas (CABALLERO-MELLADO et al., 2007) e diversas espécies desse grupo possuem a capacidade de converter nitrogênio atmosférico a amônia (FBN) (MARTINEZ-AGUILAR et al., 2008). Outro mecanismo é a redução dos níveis de etileno da planta pela ação da enzima 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase (SUN, CHENG e GLICK, 2009) e controle biológico pela produção de sideróforos, qual é considerado importante na supressão de microrganismos deletérios e patógenos do

solo pela monopolização do ferro disponível no solo (LUGTENBERG e KAMILOVA, 2009; SUÁREZ-MORENO et al., 2012). Em adição, espécies de *Burkholderia* são catabolicamente versáteis: tem a capacidade de utilizar um grande número de compostos aromáticos como fonte de carbono e energia, inclusive compostos recalcitrantes (SUÁREZ-MORENO et al., 2012). Além disso, agem na biorremediação reduzindo a concentração de poluentes tóxicos do ambiente (SALLES, SOUZA e ELSAS, 2002). Espécies não cultiváveis de *Burkholderia* foram encontradas como endosimbiontes de fungos micorrízicos arbusculares, e genes envolvidos na FBN se mostraram ativos ao menos durante a germinação de esporos (MINERDI et al., 2001). A grande versatilidade nutricional e metabólica do gênero *Burkholderia* certamente favorece o sucesso desse grupo na competição por exsudatos da raiz e na colonização de habitats como a raiz das plantas. Algumas têm um considerável potencial para reduzir a concentração e toxicidade de poluentes químicos ambientais.

Embora seja elucidada cada vez mais a importância ecológica do gênero, incluindo atuação na promoção do crescimento vegetal, existe uma resistência para sua aplicação biotecnológica devido a patogenicidade de algumas espécies, principalmente espécies relacionadas ao complexo *B. cepacia* (Bcc) e grupo *B. pseudomallei*. Recentes trabalhos envolvendo análises além das sequências do gene 16S rRNA, como análises multilocus de genes *housekeeping* *recA*, *gyrB*, *rpoB*, *acdS*, *atpD*, *gltB*, *lepA*, etc. sendo elas, com sequência de DNA ou proteínas (SUÁREZ-MORENO et al., 2012; ESTRADA-DE-LOS SANTOS 2013; SAWANA, ADEOLU e GUPTA, 2014). Interessantemente, esses trabalhos têm sido congruentes em mostrar que existe um agrupamento genômico divergente entre espécies do complexo *B. cepacia* e espécies que são ambientais. Esses resultados levaram Sawana, Adeolu e Gupta (2014) a proporem uma nova reclassificação do gênero dividindo o mesmo em *Burkholderia* e *Paraburkholderia*, sendo que o novo gênero compreende as espécies não patogênicas. No entanto, essa classificação ainda não foi adotada completamente pela comunidade científica.

Além de *Burkholderia* sp., outros gêneros da família Burkholderiaceae foram encontrados em nosso trabalho: *Ralstonia* e *Cupriavidus*. Possuem versatilidade metabólica, suportando condições adversas e apresentam forte potencial para biorremediação (HABIBI, VAHABZADEH e ZAIAT, 2013; SHAH et al., 2015; BRAUD et al., 2009). O gênero *Cupriavidus* originou-se após uma

reclassificação de *Ralstonia* (VANDAMME e COENYE, 2004) e muitas espécies desse gênero apresentam potencial para biorremediação de ambientes poluídos pela capacidade de degradar 2-4-D entre outros herbicidas (HAN, ZAHO e LI, 2015). Entre esses, foram também observadas espécies que nodulam leguminosas e possuem atividades promotoras do crescimento vegetal como FBN (da SILVA et al., 2012), produção de AIA e amônia (PONGSILP, NIMMOI e LUMYONG, 2012). Estirpes já foram isoladas de vários ambientes como solo (incluindo campos agrícolas), nódulos de leguminosas, água e amostras clínicas (CUADRADO et al., 2010, da SILVA et al., 2012; ESTRADA-DE LOS SANTOS et al., 2014).

Neste trabalho, isolados desses gêneros foram caracterizados fisiologicamente, apresentando atividades bioquímicas supostamente determinadas como promotoras do crescimento vegetal, sugerindo seu papel ecológico no ambiente em que vivem e indicando potencial aplicação da biotecnologia.

Análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF

Análise Filogenética baseada no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, apresenta agrupamentos intrínsecos de isolados identificados taxonomicamente como *Burkholderia* sp., com certa distância da espécie referência (Figura 11.1). Foi gerada árvore filogenética com sequências dos isolados (*Burkholderia* sp.) e estirpes tipo de todas as espécies referência para gênero (dados não mostrados) e obteve-se o mesmo padrão de agrupamento, qual sugere que sejam novas espécies.

A análise de espectrometria de massas apresentou agrupamento bem definido de *Burkholderia* sp. e isolados que se apresentaram próximos na filogenia 16S rRNA, se apresentaram distantes no dendrograma gerado a partir do padrão de picos obtidos pelo MALDI-TOF (Figura 11.1) evidenciando a hipótese de novas espécies do gênero.

A análise de células inteiras por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF é uma ferramenta poderosa para a rápida identificação de microrganismos. Essa abordagem é amplamente utilizada para identificação de espécies bacterianas de interesse clínico, auxiliando o diagnóstico rápido de doenças (KEYS et al., 2004), mas com capacidade de aplicação em inúmeras outras áreas, como controle de

qualidade de alimentos, monitoramento ambiental, manejo agrícola, etc. (DEMIREV e FENSELAU, 2008). Apresenta sucesso na identificação não apenas de bactérias, mas também outros microrganismos como vírus e fungos (FRANCO et al., 2010; STEVENSON et al., 2010), além de insetos (CAMPBELL, 2005) e helmintos (PERERA et al., 2005).

A técnica baseia-se na detecção do peso molecular das proteínas mais abundantes na célula, utilizando os dados de espectros de massa como *fingerprint* de um organismo particular (SAUER e KLIEM, 2010). Porém é relativamente recente, e com isso a cobertura dos bancos de dados para consulta dos espectros ainda são privados e contém número limitado de microrganismos. Além disso, amostras ambientais possuem uma alta diversidade bacteriana dificultando a obtenção de espectros em condições padronizadas, bem como sua consulta nos bancos de dados de espectros de referência, atrapalhando a análise dos mesmos (DIECKMANN et al., 2005; WUNSCHHEL et al., 2005). Os dados deste trabalho contribuem também para a expansão de espectros no banco de dados.

Dentro do cluster de *Burkholderia* sp. (Figura 12.1), é possível identificar pequenos agrupamentos, sugerindo uma separação mais refinada dessas rizobactérias, possivelmente a nível de espécie e/ou estirpe. Stets et al. (2013) ao analisar isolados de trigo, observaram maior resolução a nível de gênero pela análise de MALDI-TOF do que a filogenia baseada no gene 16S rRNA, separando os isolados que compartilham alta identidade de sequência 16S rRNA em grupos diferentes. No mesmo trabalho, para confirmação da análise, os autores utilizaram várias estirpes de três espécies diferentes de *Azospirillum* (*A. brasilense*, *A. amazonense* e *A. lipoferum*) e obtiveram agrupamento separado para cada espécie. Esse resultado se dá devido à análise se basear no perfil proteico de cada indivíduo. Embora seja relatado a variabilidade nos perfis espectrais devido a diversos fatores, a maioria dos picos registrados em espectros de massa de células inteiras foram atribuídos a proteínas ribossomais (STETS et al., 2013) quais são bastante conservadas nas espécies bacterianas, associados aos demais grupos proteicos diferencialmente expressos entre as espécies. Assim é possível uma separação mais refinada que a filogenia pelo gene 16S rRNA, qual leva em conta apenas as informações desse gene.

Ferreira, L. et al. (2011) mostraram que perfil de MALDI-TOF pode ser utilizado para diferenciar espécies da família Rhizobiaceae. Espectros de massa

foram comparados com agrupamentos baseados na filogenia de genes *housekeeping*, além de gene 16S rRNA. Estirpes próximas, porém, com genes *housekeeping* divergentes, foram perfeitamente distinguidos por MALDI-TOF.

Isso é particularmente importante, pois abre novos caminhos de grande utilidade para estudos de ecologia e diversidade, com aplicação na análise de grandes populações de isolados, permitindo a diferenciação de gêneros, espécies e até estirpes, monitoramento ambiental, manejo agrícola, etc. (DEMIREV e FENESLAU, 2008; FERREIRA, L. et al, 2011; STETS et al., 2013). Sendo também uma técnica poderosa para aplicação biotecnológica, como por exemplo, na rápida identificação na seleção de novas estirpes com potencial de uso em biofertilizantes, bem como análises de inoculantes já em processo de comercialização, atribuído ao baixo custo e facilitado preparo das amostras.

Diversidade de rizobactérias diazotróficas promotoras do crescimento vegetal

A ocorrência e a distribuição de bactérias na rizosfera são influenciadas por muitos fatores incluindo a planta hospedeira, seu estágio de desenvolvimento, práticas de cultivo (SMALLA et al., 2001; HOULDEN et al., 2008; FARINA et al., 2012; MENDES et al., 2013). Neste estudo, rizobactérias cultiváveis associadas com milho (*Zea mays*) em estágio R1, foram isoladas usando cinco meios semisseletivos sem nitrogênio. Antes do plantio as sementes de milho foram inoculadas com diferentes estirpes de bactérias promotoras do crescimento vegetal e diferentes doses de nitrogênio.

A hipótese que os diferentes tratamentos de milho no campo, pode interferir a comunidade de bactérias cultiváveis foi checada pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA dos isolados. O efeito da inoculação sobre a comunidade microbiana nativa do solo tem se mostrado bastante distinto. Salamone et al. (2010) observaram alteração na densidade populacional em rizosfera de arroz inoculada com estirpes de *Azospirillum brasilense*, sugerindo que estas podem modificar ao menos temporariamente a comunidade bacteriana das plantas de arroz em condições de campo. Dessa forma, altera-se também a funcionalidade da rizosfera, pois em diferentes estágios da planta ocorreu variação no uso de diferentes fontes

de carbono pelos microrganismos, que são naturalmente encontrados nos exsudatos radiculares. Piromyou et al. (2011), ao avaliar estirpes comerciais (*Azospirillum* sp. e *Azotobacter* sp.) e estirpes isoladas de cultura de milho (*Pseudomonas* sp. e *Brevibacillus* sp.) não observaram alterações na estrutura da comunidade bacteriana relacionada com a inoculação, mas sim aos diferentes estágios de desenvolvimento da planta. Enquanto Castro-Sowinski et al. (2007), afirmam que ao inocular PGPRs a resposta irá depender das interações que ocorrerão entre as populações nativas de bactérias.

Em síntese, a inoculação pode causar impactos sobre grupos taxonômicos específicos resultando em efeitos sobre as capacidades funcionais, causar efeito transitório dependendo do estágio de desenvolvimento da planta, ou não ocasionar nenhum efeito (TRABELSI e MHAMDI, 2013). Segundo o mesmo autor, as alterações observadas ou não pela inoculação também variam de acordo com as técnicas de acesso à diversidade que são utilizadas.

Além disso, o solo representa um ambiente altamente complexo e heterogêneo, qual afeta a fisiologia da planta, os padrões de exsudação e concomitantemente o microbioma da rizosfera. Um fator chave é o pH. A riqueza e diversidade das comunidades bacterianas do solo diferem pelo tipo de ecossistema e são explicadas pelo pH do solo (MENDES et al., 2013). No entanto, estudo realizado Etto et al. (2014) com bactérias do solo de turfeiras ácidas da mata atlântica, mostrou que outro fator, como a precipitação, pode influenciar a diversidade microbiana devido ao aumento dos níveis de água, alterando o estado redox do solo.

As perturbações que ocorrem na comunidade microbiana pelo efeito da inoculação, podem ser vistas não como causas, mas como efeitos ecológicos de um evento com aspectos importantes sobre a biodiversidade. Assim, a perturbação pode ter uma conotação positiva se for visto como algo que também pode contribuir para a liberação de recursos ao ecossistema devido a alterações na sobrevivência ou taxas de reprodução, e/ou o aumento do número de indivíduos que a comunidade pode acomodar. Independentemente das causas ou efeitos ecológicos, uma perturbação surge em resposta a fatores externos que provocam mudanças na estrutura e componentes funcionais de diferentes aspectos do sistema (AMBROSINI, SOUZA e PASSAGLIA, 2015).

Com base na análise de sequências do gene 16S rRNA realizada neste trabalho, quando comparados os tratamentos T1 e T2 ambos sem inoculação, mas com diferentes doses de N (30 e 60 Kg/ha respectivamente), observou-se que T2 apresentou alto índice de riqueza e diversidade em relação a T1, sugerindo que a dosagem de N poderia estar influenciando a estrutura da comunidade bacteriana. Porém, comparando tratamentos com a mesma dosagem de N (T2 160N sem inoculação; T4 160N+AzoTotal) observou-se que T4 (com inoculação) apresentou maior riqueza e diversidade.

Adicionalmente, T3 e T7 com as mesmas doses de N (30 Kg/ha) e diferentes espécies inoculadas (Azo Total – *A. brasilense* abv5/Abv6 e *Rhizobium* sp. 8121 respectivamente) apresentaram altos índices de riqueza e diversidade em relação aos demais; enquanto T6 (30N *Herbaspirillum* sp. L27) e T9 (30N *A. brasilense* HM053) apresentaram exatamente os mesmos índices de riqueza e diversidade (Figura 13.1 A). Esse resultado mostra que os índices de riqueza e diversidade de bactérias cultiváveis são divergentes entre os tratamentos do milho em experimento de campo, incluindo o fato de que não houve nenhuma correlação positiva significativa entre os tratamentos, a taxonomia dos isolados e sua fisiologia na análise de componentes principais. Diferentes fatores bióticos ou abióticos, não analisados neste trabalho, podem estar influenciando a modulação da comunidade microbiana e não a inoculação de diferentes PGPRs, logo a hipótese testada foi descartada.

Em relação aos meios de cultivo utilizados para o isolamento de diazotrofos, o meio JNFb apresentou maior riqueza e diversidade de gêneros seguido pelo NFb e LGI. O meio de cultivo LGI-P apresentou o menor índice de riqueza e diversidade corroborando com os dados apresentados na tabela 5.1, que mostra um menor número de isolados nesse meio, sendo eles identificados como *Bacillus* sp. e *Burkholderia* sp. A partir dessas informações, pode-se inferir que o meio LGI-P é menos eficaz para o isolamento de bactérias diazotróficas do solo rizosférico comparado com os demais meios utilizados neste trabalho. Isso provavelmente se dá devido a sua composição com alta concentração de glicose, que o torna mais seletivo no crescimento bacteriano.

Os microrganismos para os quais são indicados esses meios de cultura são potencialmente diazotróficos, ou seja, realizam FBN; algumas espécies estabelecem relações associativas de vida livre ou são endofíticos facultativos como

Azospirillum sp. e *Burkholderia* sp., e outros endofíticos, como *Herbaspirillum* sp., comumente em associação com gramíneas, sendo que algumas espécies de *Burkholderia* podem também nodular espécie de leguminosas (DÖBEREINER, BALDANI e BALDANI, 1995; PERIN et al., 2006). Neste trabalho pudemos ampliar o espectro de seleção dos meios utilizados, já que outros gêneros, além dos descritos na literatura, apresentaram crescimento em apenas um dos meios.

Baseando-se nos resultados apresentados podemos sugerir o meio JNFb para o isolamento dos seguintes diazotrofos: *Herbaspirillum* sp. (DÖBEREINER, BALDANI e BALDANI, 1995) e *Achromobacter* sp., *Kosakonia* sp., *Novosphingobium* sp. e *Rhizobium* sp. Meio NFb para *Azospirillum* sp. (DÖBEREINER, BALDANI e BALDANI, 1995), *Arthrobacter* sp. e *Staphylococcus* sp. Meio JMV para *Burkholderia* sp. (DÖBEREINER, BALDANI e BALDANI, 1995) e também para *Enterobacter* sp. Por fim, meio LGI para *Burkholderia* sp. e *Azospirillum amazonense* (DÖBEREINER, BALDANI e BALDANI, 1995; PERIN et al., 2006) e *Chitinophaga* sp., *Cupriavidus* sp., *Paenebacillus* sp. e *Ralstonia* sp.

Caracterização fisiológica dos isolados bacterianos por meio de atividades promotoras de crescimento vegetal

Seis características promotoras do crescimento vegetal foram avaliadas para as bactérias isoladas neste estudo: produção de sideróforos, cianeto de hidrogênio (HCN), protease, celulase e compostos indólicos (CI), bem como solubilização de minerais.

Ácido Indol-3-acético (AIA) é um importante fitormônio que coordena diferentes processos de desenvolvimento em plantas. Sua produção é também difundida entre bactérias associadas a plantas onde desempenham um papel fundamental no seu desenvolvimento (COSTACURTA e VANDERLEYDEN, 1995; KHALID et al., 2004 FARINA et al., 2012). A maioria dos isolados testados (61 de 69) mostraram capacidade para sintetizar CI em diferentes concentrações, na presença do precursor triptofano. Dentre esses, três isolados apresentaram correlação significativa para tal atividade, sendo identificados como *Bacillus* sp., *Luteibacter* sp. e *Pseudomonas* sp. (Figura 15.1).

O isolado 5N4 identificado como *Bacillus* sp. (Figura 11.1) produziu 43.481µM de CI/µg de proteína e foi o destaque na produção de compostos

indólicos. Esse valor foi superior ao apresentado por outras espécies do gênero *Bacillus* (93 a 1.693 μM de CI/ μg de proteína) relatadas por Goes et al. (2012). Tais autores consideram bactérias com potencial para promoção do crescimento vegetal aquelas capazes de produzir pelo menos 850 μM de CI/ μg de proteína.

Segundo a literatura, o gênero *Pseudomonas* se destaca na atuação contra patógenos (KARNWAL, 2009; SPAEPEN e VANDERLEYDEN, 2011; SEE-TOO et al., 2016), e os nossos resultados indicam correlação desse gênero com a CI, sugerindo assim sua atuação no crescimento vegetal não apenas pelo biocontrole. Já *Luteibacter* sp. ainda é pouco estudado, sendo relatado com atividade promotora do crescimento vegetal apenas por Guglielmetti et al. (2013) com testes *in vitro*. A produção de CI registrada para o isolado 2V32 (*Luteibacter* sp.) foi superior em relação ao isolado 8J4 (*Pseudomonas* sp.) (dados não mostrados), sendo congruente com o resultado encontrado por Guglielmetti et al. (2013) onde a produção de AIA por *Luteibacter rhizovicius* M1MR1 foi superior a *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* DSM 19603. Mirza et al. (2001) mostraram que a produção de CI por bactérias da rizosfera (ou de outras partes da planta), pode variar entre diferentes espécies de um mesmo gênero e é influenciada pelas condições de cultura, estágio de desenvolvimento da planta e substrato disponível.

Outra característica atuante na promoção do crescimento vegetal é a produção de cianeto. A cianogênese compreende um mecanismo potencial para o controle de patógenos e de plantas daninhas, reduzindo a competição entre as espécies, pois o mesmo acaba sendo um composto tóxico para muitas espécies microbianas (KREMER, 2001). Obtiveram-se, no presente estudo, três isolados (4,3%) com capacidade de produzir HCN, caracterizados com média (1/3) e alta produção (2/3) de acordo com metodologia apresentada na Figura 5. Sendo que os últimos, apresentaram correlação significativa com a atividade (Figura 15.1), ambos identificados como *Pseudomonas* sp. (8J4 e 8J6).

Várias espécies desse gênero têm sido investigadas na produção de HCN e outros compostos antifúngicos, incluindo *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. aureofasciens* e *P. chlororaphis* (BLUMER e HAAS, 2000; MICHELSEN et al., 2015). Espécies desse gênero são indicadas por Pereira e Castro (2014) como os melhores produtores de HCN entre as bactérias endofíticas de milho, com nossos resultados estendemos essa informação também para rizobactérias. Kumar et al. (2012) isolaram *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. do feijão, capazes de produzir cianeto, no

entanto os indivíduos pertencentes ao gênero *Bacillus* isolados neste estudo não apresentaram tal atividade.

Por outro lado, o isolado 3N5 apresentou média produção de HCN. O mesmo foi identificado pertencente ao gênero *Arthrobacter* (Figura 11.1). Estirpes desse gênero são descritas como promotoras do crescimento vegetal principalmente em plantas halófitas (crescem em ambientes com elevada salinidade) pela atividade da enzima ACC-desaminase e produção de AIA (RUPPEL, FRANKEN e WITZE, 2013). Francis, Holsters e Vereecke (2010) apresentam várias interações entre plantas e microrganismos, entre elas a produção de fitormônios como AIA e giberelinas, atividade da ACC-desaminase, resistência a metais como cádmio e chumbo e solubilização de ferro por espécies de *Arthrobacter*, estando também entre as principais espécies diazotróficas do filo Actinobacteria. Contudo não se tem relatado sua atuação no biocontrole pela produção de HCN, assim, nosso resultado associado aos demais trabalhos reforçam seu papel ecológico e na melhoria do desenvolvimento das plantas.

Nosso estudo também corrobora com os resultados encontrados por Islam et al. (2009), os quais avaliaram a capacidade de produzir HCN em várias bactérias diazotróficas, incluindo diferentes estirpes de *Burkholderia*, e obtiveram resultados negativos. Esses resultados indicam também que essa habilidade não é amplamente distribuída entre rizobactérias diazotróficas, visto que entre dezoito gêneros isolados, apenas *Pseudomonas* sp. (2 isolados) e *Arthrobacter* sp. (1 isolado) foram produtores de cianeto.

Outra atividade que está relacionada ao biocontrole é a produção de celulasas. Bactérias capazes de degradar a celulose podem apresentar um, dois, três ou mais genes relacionados a essa atividade em seu genoma, e estão distribuídas em diversos filos. Medie et al. (2012) estimaram que 62% dos genomas não contém genes codificantes de celulasas. Os microrganismos capazes de sintetizar a enzima celulase desempenham um papel importante (1) no controle de patógenos a partir da inibição da germinação de esporos ou do crescimento de fungos contendo celulose em sua parede celular (BHAT, 2000) e (2) na facilitação da entrada de rizóbios no processo de nodulação (SINDHU e DADARWAL, 2001). No presente trabalho, o isolado 2V32 identificado como *Luteibacter* sp. apresentou correlação significativa com a atividade de celulase (Figura 15.1) e foi classificada com alta produção, ainda se mostrou capaz de produzir CI, protease, sideróforos e

solubilizar fosfato. Maki et al. (2011) isolou representantes de *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Microbacterium* sp. e *Streptomyces* sp. com atividade de celulase, porém nenhum do gênero *Luteibacter* sp. Já Guglielmetti et al. (2013) isolou uma estirpe de *Luteibacter* (*L. rhizovicius* MIMR1) com atividades promotoras do crescimento vegetal coincidentes com a do isolado 2V32, mas não foi capaz de degradar proteína e celulose, evidenciando o potencial do isolado *Luteibacter* sp. obtido nesse trabalho como PGPR com potencial biotecnológico.

Outros gêneros também apresentaram tal atividade (Figura 14.1) sendo eles: *Leifsonia*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Kosakonia*, *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Enterobacter*, com produção variando entre baixa, média e alta, porém sem correlação quando se avaliou todas as atividades em conjunto.

A solubilização de minerais, principalmente fosfato, por microrganismos no solo também se mostra um processo importante nos ecossistemas naturais e na agricultura (MIKANOVÁ; NOVÁKOVÁ, 2002; KUMAR et al., 2012). O fosfato é um importante macronutriente para a planta, correspondendo a 0,2% do seu peso seco. É um nutriente limitante para o crescimento vegetal, tendo em vista a participação nas atividades metabólicas e bioquímicas, além da formação de ácidos nucleicos e fosfolipídios (GYANESHWAR et al., 2002). É extremamente abundante nos solos, porém, encontrado principalmente na forma insolúvel como complexos de matéria orgânica ou na forma inorgânica, precipitados com íons Ca^{+2} , Fe^{+3} e Al^{+3} ou adsorvidos às superfícies de partículas minerais do solo (FERREIRA, D. et al., 2011), tornando-se indisponíveis para as plantas (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999). No presente trabalho, 25 isolados de um total de 69 (36,2%) apresentaram capacidade de solubilizar fosfato de cálcio enriquecido com óxido de zinco, distribuídos em dez gêneros (Figura 14.1). Apenas um isolado (*Acinetobacter* sp.) apresentou alta produção, 40% deles apresentaram média e 56% baixa produção (dados não mostrados). Cinco gêneros diferentes, *Burkholderia* sp., *Arthrobacter* sp., *Chitinophaga* sp., *Paenibacillus* sp., *Luteibacter* sp. e *Acinetobacter* sp., apresentaram correlação significativa com essa atividade (Figura 15.1). Outros trabalhos apresentam frequências menores dessa atividade dentre bactérias isoladas da rizosfera e endofíticas de raiz: 22 isolados de um total de 296 (7,44%) (BENEDUZZI et al., 2008) e 59 de um total de 299 (19,74%) (AMBROSINI et al., 2012). Nesse último houve uma predominância do gênero *Burkholderia*, assim como no presente trabalho (Figura 14.1). Embora ocorra variação no número de isolados

entre os trabalhos, assegura-se que vários gêneros diferentes possuem habilidade para solubilização de minerais como fosfato.

Análise de componentes principais aponta que os isolados solubilizadores de fosfato também apresentam correlação significativa com protease (Figura 15.1), juntamente com *Pseudomonas* sp. 8J4 e 8J6. Com exceção de *Bacillus* sp., todos os gêneros que apresentaram atividade de protease (Figura 14.1) apresentaram também correlação significativa para a mesma (Figura 15.1).

Juntamente com outras enzimas líticas (quitinases), as proteases podem causar danos à célula de fungos patogênicos impedindo sua proliferação e consequentemente desenvolvimento da doença (AZEVEDO et al., 2000; MEENA et al., 2001; KUMAR et al., 2012), quando esses microrganismos são endofíticos são capazes de induzir a resistência sistêmica contra os patógenos invasores das plantas hospedeiras (KALAI-GRAMI et al., 2014).

A produção de enzimas líticas como a protease, é comumente encontrada em espécies de *Bacillus* e *Pseudomonas* (OLAJUYIGBE e AJELE, 2005; KALAI-GRAMI et al., 2014). Nossos resultados ampliam o espectro de gêneros com capacidade para produção de tal enzima, visto que outros cinco gêneros diferentes foram encontrados.

Com exceção de *Paenibacillus* sp. e *Chitinophaga* sp., todos os gêneros capazes de produzir protease também apresentaram correlação positiva com a produção de sideróforos, contabilizando quarenta isolados capazes de produzir sideróforos, distribuídos em doze gêneros diferentes (66,6% do total) (Figura 14.1) e cinco deles com correlação significativa.

Dos isolados analisados neste trabalho, 58% possuem habilidade para produção de sideróforos. Goes et al. (2012) obtiveram 56,1% de isolados com tal atividade (*Bacillus* sp. e *Methylobacterium* sp.) e Beneduzi et al. (2008) obtiveram 10,81% (*Bacillus* sp. e *Paenibacillus* sp.), enquanto Ambrosini et al. (2012) obtiveram 78,2% dos isolados, os quais são pertencentes a vários gêneros, dentre eles *Burkholderia* sp., *Pseudomonas* sp. e *Enterobacter* sp., gêneros esses também encontrados em nosso trabalho.

Para sobreviver com um fornecimento limitado de ferro, bactérias sintetizam sideróforos – moléculas com alta afinidade por ferro (Fe^{3+}). A produção de sideróforos influencia indiretamente o crescimento vegetal, pelo biocontrole, onde a competição por ferro na rizosfera é controlada pela afinidade de ferro com sideróforo

privando o fitopatógeno de adquirir quantidades suficientes de ferro, limitando assim sua proliferação. Esse mecanismo é regido também pela concentração dos vários sideróforos envolvidos, cinética de troca e a disponibilidade do mesmo (BENEDUZI et al., 2008; RAAIJMAKERS et al., 2009; GLICK, 2012). Por outro lado, a planta pode se beneficiar diretamente pela absorção de ferro por meio do complexo ferro-sideróforo (GLICK, 2012).

Os isolados posicionados no quadrante superior esquerdo da Figura 15.1 não apresentaram a capacidade de produzir HCN, protease ou sideróforos e nem de solubilizar fosfato, porém produzem compostos indólicos sem correlação significativa com essa atividade. Costa et al. (2014) constataram que os melhores produtores de compostos indólicos não foram os melhores solubilizadores de fosfato sendo congruente com os resultados encontrados neste trabalho.

Diante dos resultados obtidos, as estirpes que se destacaram foram (1) *Burkholderia* sp. (6V3, 8L2 e 10N6) e *Luteibacter* sp. (7L4A), com produção de protease, sideróforos e solubilização de fosfato (apresentando também produção de compostos indólicos, porém sem correlação significativa); (2) *Bacillus* sp. (5N4) e *Luteibacter* sp. (2V32), com produção de compostos indólicos e celulase e (3) *Pseudomonas* sp. 8J6, com produção de protease, cianeto e sideróforos e 8J4 com protease, cianeto, compostos indólicos e celulase. Esses isolados foram selecionados para estudos com inoculação e avaliação em plantas, devido aos resultados promissores para aplicação biotecnológica como biofertilizantes.

5. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho indicam a presença de uma diversa população de rizobactérias diazotróficas cultiváveis, associadas com a rizosfera do milho, a qual não foi influenciada significativamente pelos biofertilizantes e pelas dosagens de nitrogênio. *Burkholderia* sp., embora não inoculada apresentou maior abundância entre os gêneros identificados em todos os tratamentos incluindo controle.

Dentre os diferentes meios de cultivo semissólidos livres de nitrogênio utilizados para o isolamento, o meio JNFb gerou um maior número de isolados e com maior diversidade sendo assim considerado o mais eficiente. Já o meio LGI-P permitiu obter poucos isolados sendo estes pertencentes ao gênero *Burkholderia* e *Bacillus*. Meio JNFb indicado para *Herbaspirillum* sp. proporcionou o isolamento de *Achromobacter* sp., *Kosakonia* sp. e *Novosphingobium* sp.; o meio NFb indicado para *Azospirillum* sp. permitiu o isolamento de *Arthrobacter* sp. e *Staphylococcus* sp.; o meio LGI, indicado para *Burkholderia* sp. e *Azospirillum amazonense*, permitiu isolar *Chitinophaga* sp., *Cupriavidus* sp., *Paenibacillus* sp. e *Ralstonia* sp. e JMV para *Burkholderia* sp., onde foi isolado *Enterobacter* sp.

Embora estudos anteriores relatem o melhor crescimento de *Burkholderia* sp. nos meios JMV e LGI, a mesma apresentou crescimento em todos os cinco meios de cultivos utilizados. Análises filogenéticas a partir da sequência do gene 16S rRNA e espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF indicam a presença de espécies/estirpes variadas e possivelmente algumas novas para o gênero *Burkholderia*. A análise por MALDI-TOF mostrou alta sensibilidade e resultados mais refinados que o sequenciamento do gene 16S rRNA em amostras bem representativas.

Todas as bactérias analisadas apresentaram pelo menos uma atividade promotora do crescimento vegetal positiva, e trinta e oito (55%), apresentam três ou mais atividades positivas. Os gêneros *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp. e *Luteibacter* sp., apresentaram correlação significativa positiva com a (1) produção de compostos indólicos e celulase, (2) a produção de cianeto e protease, (3) a produção de protease e sideróforos, e solubilização de fosfatos, (4) a produção de compostos indólicos, celulase, protease, solubilização de fosfato e produção de sideróforos, respectivamente, evidenciando seu potencial como PGPR com

perspectivas de aplicações como biofertilizantes, sendo selecionadas para testes em plantas.

De modo geral observa-se uma diversidade de bactérias diazotróficas, colonizando o mesmo ambiente, que apresentam funcionalidades semelhantes. Grupos como *Burkholderia* sp., *Arthrobacter* sp., *Chitinophaga* sp., *Paenebacillus* sp., *Luteibacter* sp. e *Pseudomonas* sp. claramente compartilham pelo menos três atividades iguais (solubilização de fosfato, protease e sideróforos) caracterizando função redundante entre eles. Embora tenha sido observado variação de riqueza e diversidade e diferente gêneros em cada tratamento, estes compartilhavam as mesmas atividades, mostrando que membros do microbioma trabalham juntos para garantir o desenvolvimento bem-sucedido das plantas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

AMBROSINI, A. et al. Screening of plant growth promoting Rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Plant Soil**, v. 356, p. 245–264, 2012.

AMBROSINI, A.; de SOUZA, R.; PASSAGLIA, L. M. P. Ecological role of bacterial inoculants and their potential impact on soil microbial diversity. **Plant Soil**, v. 400, p. 193-2017, 2006.

AZEVEDO, J. L.; et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB: Electronic Journal of Biotechnology**, v.3, p. 40-65, 2000.

BASHAN, Y. et al. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant Soil**, v. 378, p. 1-33, 2014.

BAUDOIN, E.; BENIZRI, E.; GUCKERT, A. Impact of growth stage on the bacterial community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting. **Applied Soil Ecology**, v. 19, p.135–145, 2002.

BENEDUZI, A. et al. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, V. 39, p. 311 – 320, 2008.

BENEDUZI, A. et al. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing Bacilli isolated from rice fields in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, p. 311-320, 2008.

BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M.P. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. **Genetics and Molecular Biology**, v.35, 4 (suppl), p.1044-1051, 2012.

BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiol Ecol.**, v. 68, p. 1 – 13, 2009.

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**, v. 17, n. 4, p. 399-406, 1976.

BEVIVINO, A. et al. Characterization of a free-living maize- rhizosphere population of Burkholderia cepacia: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 27, p. 225 – 237, 1998.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology advances**, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.

BLUMER, C.; HAAS, D. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. **Arch Microbiol**, v.173, p.170–177, 2000.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding *Anal. Biochem.* 72:248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da agricultura (MAPA). **Milho**. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho>>. Acesso em: 31 de março de 2015.

BRAUD, A. et al. Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. **Chemosphere**, v. 74, p. 280–286, 2009.

CABALLERO-MELLADO, J. et al. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, p. 5308–5319, 2007.

CAMPBELL, P.M. Species differentiation of insects and other multicellular organisms using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry protein profiling. **Systematic Entomology**, v.30, p.186–190, 2005.

CAMPOS, S. B. et al. Changes in Root Bacterial Communities Associated to Two Different Development Stages of Canola (*Brassica napus* L. var *oleifera*) Evaluated through Next-Generation Sequencing Technology. **Microbial Ecology**, DOI 10.1007/s00248-012-0132-9, 2012.

CASTRESANA, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Molecular Biology and Evolution**. v.17, p. 540–552, 2000.

CASTRO-SOWINSKI, S. et al. Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. **FEMS Microbiol**, v. 276, p. 1–11, 2007.

CATROUX, G.; HARTMANN, A.; REVELLIN, C. Trends in rhizobial inoculant production and use. **Plant Soil**, v. 230, p. 21–30, 2001.

CATTELAN, A.J. Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal. **Embrapa Soja**, 36p, Londrina, 1999.

CHIARINI, L. et al. *Burkholderia cepacia* complex species: health hazards and biotechnological potential. **TRENDS in Microbiology** V.14, p. 277-286, 2006.

CIRERA, X.; MASSET, E. Income distribution trends and future food demand. **Phil. Trans. R. Soc. B.** v. 365, p.2821–2834. 2010.

COMPANT, S. et al. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. **FEMS Microbiol.** v. 32, p. 607–626, 2008.

COSTA, P. B. A Model to Explain Plant Growth Promotion Traits: A Multivariate Analysis of 2,211 Bacterial Isolates. **PLOS One**, v. 26, p. 1 – 25, 2014.

COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plant associated bacteria. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 21, p.1–18, 1995.

CROSA, J. H.; WALSH, C. T. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.61, p. 223. 2002.

CUADRADO, V. et al. *Cupriavidus pampae* sp. nov., a novel herbicide-degrading bacterium isolated from agricultural soil. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 60, p. 2606–2612, 2010.

Da SILVA, K. et al. *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, p. 175-182, 2012.

DEAKER, R.; ROUGHLEY, R. J.; KENNEDY, I. R. Legume seed inoculation technology – a review. **Soil Biol Biochem**, v. 36, p. 1275–1288, 2004.

DeANGELIS, K.M. et al. Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots. **The ISME Journal**, V. 3, P. 168–178, 2009.

DEMIREV, P.A., FENSELAU, C. Mass spectrometry for rapid characterization of microorganisms. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 1, p.71–93, 2008.

Development Core Team, R. A language and environment for statistical computing, R Foundation for statistical computing; 2007. Vienna, Austria

DI CELLO, F. et al. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* Population Isolated from the Maize Rhizosphere at Different Plant Growth Stages. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4485–4493, 1997.

DIECKMANN, R., et al. Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the Sula Ridge by intact-cell-MALDI-TOF mass spectrometry (ICM-MS). **Applied. Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p.539–548, 2005.

DOBBELAERE, S. et al. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v.22 (2), p.107-149, 2003.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. O.; BALDANI, V. L. D. Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, dez. 1999. 38p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 110).

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

DÖBEREINER, J.; Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. Microbiologia do solo. **Sociedade Brasileira de Ciências do Solo**. Pp. 173-180, 1992.

ESASHI Y Ethylene and seed germination. In: Matoo AK, Suttle JC, (eds) **The Plant Hormone Ethylene**. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 133–157, 1991.

ESTRADA-de LOS SANTOS, P. et al. *Cupriavidus plantarum* sp. nov., a plant-associated species. **Archives of Microbiology**, v. 196, p. 811-817, 2014.

ESTRADA-de LOS SANTOS, P. et al. Phylogenetic Analysis of Burkholderia Species by Multilocus Sequence Analysis. **Curr Microbiol**, v. 67, p.51–60, 2013.

EWING, B. et al. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred .I . Accuracy Assessment. **Genome Research**, p. 175–185, 1998.

FARINA, R. Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. **Applied Soil Ecology**, v.55, p. 44– 52, 2012.

FERREIRA, D. C.; et al. Solubilização de fosfato por bactérias endofíticas isoladas de girassol. **Simbbtec2011**. Londrina, 2011.

FERREIRA, L. et al. MALDI-TOF mass spectrometry is a fast and reliable platform for identification and ecological studies of species from family Rhizobiaceae. **PLoS ONE** v. 6, p. 1-15, 2011.

FOLEY J.A., et al. Solutions for a cultivated planet. **Nature**, v. 478, p.337–342, out. 2011.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). The State of food Insecurity in the World: Economic crises—Impacts and Lessons Learned 8–12 (FAO, 2009).

FRANCIS, I; HOLSTERS, M.; VEREECKE, D. The Gram-positive side of plant–microbe interactions. **Environmental Microbiology**, v. 12, p. 1–12, 2010

FRANCO, C. F. et al. Monitoring virus-like particle and viral protein production by intact cell MALDI-TOF mass spectrometry. *Talanta*, v.80, p.1561–1568, 2010.

GIBBS, H. et al. Tropical forests were the primary sources of new agricultural land in the 1980s and 1990s. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 107, 16732–16737 (2010).

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, 15 p., 2012.

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Can J Microbiol**, v.41, p.109–117, 1995.

GLICKMANN, E & DESSAUX, Y. A critical examination of the specificity of the Salkowsky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, p. 793-796, 1995.

GOES, K. C. G. P. et al. Biochemical and Molecular Characterization of High Population Density Bacteria Isolated from Sunflower. **Journal of microbiology and biotechnology**, p. 437–447, 2012.

GUGLIELMETTI, S., et. al. *Luteibacter rhizovicius* MIMR1 promotes root development in barley (*Hordeum vulgare* L.) under laboratory conditions. **World J Microbiol Biotechnol**, Itália, 2013.

GYANESHWAR, P. et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v.245, p.83-93, 2002.

MICHELTSEN, C. F. et al. Nonribosomal peptides, key biocontrol components for *Pseudomonas fluorescens* In5, isolated from a Greenlandic suppressive soil. **MBio**, v. 17, p. 1-9, 2015.

MINERDI, D. et al. Nitrogen fixation genes in an endosymbiotic *Burkholderia* strain. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, p. 725 – 732, 2001.

MIRZA, M. S. et al. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro* **Plant and Soil**, v.237, p. 47–54, 2001.

MONTAÑEZ, A. et al. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects *in vitro*. **Applied Soil Ecology**, v. 58, p. 21-28, jul. 2012.

NAWROCKI, E.P.; KOLBE, D.L.; EDDY, S.R. Infernal 1.0: inference of RNA alignments. *Bioinform* 2009;25:1335 e 7.

OKSANEN, J.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; O'HARA, R.B. Vegan: community ecology package version 1.8-6. Available from: <http://cran.r-project.org/>; 2007.

OLAJUYIGBE, F. M.; AJELE, J. O. Production dynamics of extracellular protease from *Bacillus* species. **African Journal of Biotechnology**, v. 4 (8), p. 776-779, 2005.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Role of *Pseudomonas putida* indole-acetic acid in development of the host plant root system. **Appl Environ Microbiol**, v. 8, p.3795–3801, mai. 2002.

PEDROLI, B.D. et al. Pectin and pectinases production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. **Open Biotechnol.J.**, v.3, p.9–18, 2009.

PEIFFER, J. A. et al. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. **PNAS**, v. 110, p. 6548–6553. 2013.

PELLETIER, N.; TYEDMERS, P. Forecasting potential global environmental costs of livestock production 2000–2050. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 107, 18371–18374 2010.

PENROSE, D.M.; GLICK, B.R. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase containing plant growth-promoting rhizobacteria. **Physiologia Plantarum**, v.118, p.10-15, 2003.

PEREIRA, S. I. A.; CASTRO, P. M. L. Diversity and characterization of culturable bacterial endophytes from *Zea mays* and their potential as plant growth-promoting agents in metal-degraded soils. **Environ Sci Pollut Res**, v. 21, p. 14110-14123, 2014.

PERERA, M.R.; VANSTONE, V.A.; JONES, M.G.K. A novel approach to identify plant parasitic nematodes using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of

light mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, p. 1454–1460, 2005.

PÉREZ-MIRANDA, S. *et al.* O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. **Journal of Microbiological Methods**, v.70, p. 127–131, 2007.

PERIN, L.; *et al.* Como isolar e identificar *Burkholderia silvatlantica*. **Embrapa, Seropédica, Comunicado técnico 86**, maio 2006.

PIKOVSKAYA, R. I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. **Mikrobiologiya**, v.17, p.362-370, 1948.

PIMENTEL D. Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. **Environment, Development and Sustainability**, v.7, p.229–252, 2005.

PIROMYOU, P. *et al.* Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, p. 44 – 54, 2011.

PONGSILP, N.; NIMNOI, P.; LUMYONG, S. Genotypic diversity among rhizospheric bacteria of three legumes assessed by cultivation-dependent and cultivation-independent techniques. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p.615-626, 2012.

PRASHAR, P. *et al.* Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. **Rev Environ Sci Biotechnol**, v. 13, p.63–77, 2014.

RAAIJMAKERS, J.M. *et al.* The rhizosphere: a playground and battlefield for soil borne pathogens and beneficial microorganisms. **Plant Soil**, v.321, p.341-361. 2009.

RAINEY P. B. Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere. **Environ Microbiol**, v. 1, p. 243–257, 1999.

RAVEN, P.H; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. Regulando o crescimento e o desenvolvimento: os hormônios vegetais. In: RAVEN, P.H; EVERT, R.F.;

RIBEIRO FILHO, M. Riqueza em forma de grão. In: KIST, B.B. et al. **Anuário brasileiro do milho 2012**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, p. 136, 2012.

ROBBS, C. Bactérias como potencial de controle biológico de Fitopatógenos. In: BETTIOL, W. (Ed.). *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna: **CNPDA/EMBRAPA**, p.121-133, 1991.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, p.319-339, 1999.

RUDRAPPA, T. et al. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. **Plant Physiol**, v. 148, p. 1547–1556, 2008.

RUPPEL,S.; FRANKEN, P.; WITZE, K. Properties of the halophyte microbiome and their implications for plant salt tolerance. **Functional Plant Biology**, v. 40, p.940–951, 2013.

SALAMONE, I. E. G. ET al. Field response of rice paddy crop to *Azospirillum* inoculation: physiology of rhizosphere bacterial communities and the genetic diversity of endophytic bacteria in different parts of the plants. **Plant Soil**, v. 336, p.351–362, 2010.

SALLES, J. F.; De SOUZA, F. A.; Van ELSAS, J. D. Molecular method to assess the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.1595–1603, 2002.

SÁNCHEZ-PÉREZ, J. M. Nitrogen dynamics in the shallow groundwater of a riparian wetland zone of the Garonne, SW France: nitrate inputs, bacterial densities, organic matter supply and denitrification measurements. **Hydrology and Earth System Sciences**, v.7, p. 97-103, 2003.

SANTOS, R. S. et al. MS-Analyser: a whole-cell mass spectrometry analysis system for microorganisms clusterization and identification. In: 8th International Conference

of the Brazilian Association for Bioinformatics and Computational Biology – X-Meeting, Campinas, 2012.

SAUER, S., KLIEM, M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, v.8, p.74–82, 2010.

SAWANA, A.; ADEOLU, M.; GUPTA, R. S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen.nov. harboring environmental species. **Frontiers in Genetics**, v. 5, 2014.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied Environmental Microbiology**, vv.71, p.1501–1506, 2005.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Toward a census of bacteria in soil. **PloS Comput Biol**, v. 2, p.786-793, 2006.

SCHWAB, S. **Identificação e análise de genes de *Herbaspirillum seropedicae* regulados pela disponibilidade de amônio**. 2006, 162 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SCHWYN, B., NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Anal. Biochem**, v. 160, p.47-56, 1987.

SEE-TOO, W. S. et al Complete genome of *Pseudomonas* sp. strain L10.10, a psychrotolerant biofertilizer that could promote plant growth. **Journal of Biotechnology**, v. 222, p. 84–85, 2016.

SHAH, A. A. et al. Degradation of poly(ϵ -caprolactone) by a thermophilic bacterium *Ralstonia* sp. strain MRL-TL isolated from hot spring. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 98, p. 35-42, 2015.

SINDHU, S. S.; DADARWAL, K. R. Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. Cicer in chickpea. **Microbiological research**, v. 156, n. 4, p. 353-358, 2001.

SMALLA, K. et al. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 4742–4751, 2001.

SMIBERT, R. M; KRIEG, N. R. Phenotypic characterization. In Gerharel P, Murray R GE, Wood WA, Krieg NR (Eds) *Methods for general and molecular bacteriology*. **American Society of Microbiology**, Washington, DC. p. 607-654, 1994.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and Plant-Microbe Interactions. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**,v. 3, p. 1 - 13, 2011.

STETS, M. I. et al. Rapid identification of bacterial isolates from wheat roots by high resolution whole cell MALDI-TOF MS analysis. **Journal of Biotechnology**, v.165, p.167– 174, 2013.

STEVENSON, L. G.et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p.3482–3486, 2010.

SUÁREZ-MORENO, Z. R. et al. Common Features of Environmental and Potentially Beneficial Plant-Associated *Burkholderia*. **Microb Ecol**, v. 63, p. 249–266, 2012.

SUN, Y.; CHENG, Z.; GLICK, B.R. The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growthpromoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN. **FEMS Microbiol Lett**, v. 296, p. 131–136, 2009.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725–2729, 2013.

TRABELSI, D.; MHAMDI, R. Microbial inoculants and their impact on soil microbial communities: a review. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1 – 11, 2013.

UROZ, S. et al. Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, p.281-288, 2010.

VACHERON, J. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, 2013.

VANDAMME, P.; COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 54, p.2285–2289, 2004.

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

WAINWRIGHT, M., Sulphur oxidation in soils. **Adv. Agron.**, v.37, p.350-392, 1984.

WALKER, V. Variation of secondary metabolite levels in maize seedling roots induced by inoculation with *Azospirillum*, *Pseudomonas* and *Glomus* consortium under field conditions. **Plant and Soil**, v. 356, p. 151-163, 2012.

WANG, Q. et al. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261–5267, 2007.

WUNSCHER, S. C. et al. Bacterial Analysis by MALDI-TOF Mass Spectrometry: An Inter-Laboratory Comparison. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 16, p. 456-462, 2005.

ZAGO, V. C. P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N. G. *Pseudomonas* spp. Fluorescentes - Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola. **Embrapa Agrobiologia**. Seropédica. 32p. (Documentos, 127). 2000.

ZHANG, Z. et al. A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. **Journal of Computational biology**, v. 7, p. 203–214, 2000.