

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

KAMYLLA RAMIREZ FIDELIS

**DIVERSIDADE FUNCIONAL DE BACTÉRIAS DIAZOTROFICAS ISOLADAS DO
TRIGO TRATADO COM BIOFERTILIZANTE E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES
DE FERTILIZANTE NITROGENADO**

PONTA GROSSA

2017

KAMYLLA RAMIREZ FIDELIS

**DIVERSIDADE FUNCIONAL DE BACTÉRIAS DIAZOTROFICAS ISOLADAS DO
TRIGO TRATADO COM BIOFERTILIZANTE E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES
DE FERTILIZANTE NITROGENADO**

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

2017

F451 Fidelis, Kamylla Ramirez

Diversidade funcional de bactérias diazotróficas isoladas do trigo tratado com biofertilizante e diferentes concentrações de fertilizante nitrogenado / Kamylla Ramirez Fidelis. Ponta Grossa, 2017. 109 f.

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

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Weigert Galvão.
Coorientador: Prof. Dr. Rafael Mazer Etto.

1. Inoculante. 2. Doses de nitrogênio. 3. Nmp. I. Galvão, Carolina Weigert. II. Etto, Rafael Mazer. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Evolutiva. IV.T.

CDD: 574

UEPG



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. 02/2017

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 **Kamylla Ramirez Fidelis**.

Aos vinte dias do mês de fevereiro de dois mil e dezessete, no auditório do Centro Interdisciplinar de Pesquisa e Pós-Graduação – CIPP, sob a presidência do Dr^a Carolina Weigert Galvão em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Kamylla Ramirez Fidelis**, 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^a Maria Berenice Reynaud Steffens (UFPR) e Dr. Helio Antonio Wood Joris (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 Funcional de Bactérias Diazotróficas Isoladas do Trigo Tratado com Biofertilizante e Diferentes Concentrações de Fertilizante Nitrogenado"**. 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)

Fazer as sugestões da banca na versão final

Alteração de Título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

Ponta Grossa, 20 de fevereiro de dois mil e dezessete.

Prof. Dr^a Carolina Weigert Galvão (UEPG) _____

Prof^a Dr^a Maria Berenice Reynaud Steffens (UFPR) _____

Prof. Dr. Helio Antonio Wood Joris (UEPG) _____

Dedico esta dissertação ao meu esposo Ronaldo, a minha mãe Edilene e a minha avó Neide.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por sempre ser luz nos momentos de escuridão e por me abençoar durante essa caminhada.

Agradeço imensamente aos mestres LABMOM, Prof. Carolina e Prof. Rafael, por todo apoio, ensinamento, orientação, em especial à Prof. Carolina por ter aceitado o papel de ser minha orientadora, por toda a paciência e orientações durante esse período.

Aos meus colegas de LABMOM por toda ajuda e apoio vocês são 1000!!! Agradeço principalmente ao Erick, Vanilda, Daiane B., Fernanda Silva, e Satomi, que fizeram parte desse trabalho, vocês foram fundamentais, muito obrigada!!!!

Aos meus professores e colegas do mestrado que fizeram parte da minha formação.

Agradeço à Prof. Jesiane por toda colaboração do trabalho, sempre disposta a ajudar e com sugestões incríveis, muito obrigada mesmo!

Ao Prof. Hélio pela parceria e colaboração no trabalho, foi fundamental.

Ao Prof. Ricardo Ayb pela parceria durante a realização desse projeto.

Obrigada a Prof. Mara, coordenadora do PPG por toda a disposição durante o curso, assim como a querida Zoli, sempre muito prestativa e atenciosa.

Agradeço ao pessoal da UFPR pela parceria, em especial à Edileusa e a Leilane pela ajuda.

Agradeço ao meu querido esposo, meu companheiro, meu amigo e meu amor, por todo apoio, compreensão, preocupação, que foi meu alicerce durante esse período.

Agradeço à minha linda família: minha avó, minhas irmãs, minha sogra, meu sogro, minhas cunhadas e cunhados, por todo apoio sempre, vocês me deram a força que eu precisava!

Agradeço em especial a minha querida mãe que me ensinou o quanto é importante o saber, o estudo, se hoje estou aqui é graças ao incentivo dela.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram me apoiaram, vocês fazem parte desse trabalho, o meu muito obrigada!!!!

*“O Senhor é meu pastor e nada me faltará. Ainda que eu ande pelo vale das
sombras não temerei mal algum, pois Tu estás comigo”
(Salmo 22)*

RESUMO

Bactérias Promotoras do crescimento vegetal possuem a capacidade de estimular o crescimento vegetal e promover proteção a planta hospedeira, reduzindo o uso de fertilizantes nitrogenado e o impacto ambiental causado pelas práticas agrícolas. Foram analisados se diferentes doses de nitrogênio e a presença ou ausência do inoculante contendo *Azospirillum brasilense*, podem interferir na população diazotrófica, NMP, presente na rizosfera e na raiz do trigo em sistema de rotação de cultura. Os 80 isolados obtidos a partir da raiz do trigo e os 193 obtidos a partir da rizosfera a partir da utilização dos meios NFb, JNFb, JMV e LGI, foram submetidos a testes bioquímicos para verificar a capacidade de produção de sideróforos, protease, AIA, cianeto e celulase e solubilização de fosfato para avaliarmos o potencial de promotor do crescimento vegetal dessas bactérias. Os diferentes tratamentos não interferiram no NMP encontrado tanto na rizosfera quanto nas raízes de trigo. A presença do inoculante se mostrou mais elevada no isolamento do meio JMV dos endofíticos e no NFb e LGI rizosféricos. As diferentes doses de N não interferiram na população nos diferentes meios. Dos isolados endofíticos destacamos 25 que apresentaram 3 atividades bioquímicas ou mais, dentre esses 2 realizam todas as atividades bioquímicas. Estes foram submetidos a quantificação do AIA em que 01 isolado se destacou por ser alto produtor deste indólito. Quanto aos rizosféricos, 43 se destacaram por realizar 3 atividades bioquímicas ou mais, e submetidos a quantificação do AIA 5 eles apresentaram alta produção. Os isolados que se destacaram foram submetidos a espectrometria de massa (MALDI-TOF). O dendograma dos isolados mostrou que isolados de mesmo meio e tratamento apresentam melhor agrupamento os quais serão futuramente identificados.

Palavras-chave: Inoculante, doses de Nitrogênio, NMP.

ABSTRACT

Bacteria Promoting plant growth have the ability to stimulate plant growth and promote protection of the host plant, reducing the use of nitrogen fertilizers and the environmental impact caused by agricultural practices. It was analyzed whether different doses of nitrogen and the presence or absence of the inoculant containing *Azospirillum brasilense* could interfere in the diazotrophic population, NMP, present in the rhizosphere and in the root of the wheat in a crop rotation system. The 80 isolates obtained from the wheat root and the 193 obtained from the rhizosphere using the NFb, JNFb, JMV and LGI media were submitted to biochemical tests to verify the production capacity of siderophores, protease, AIA, Cyanide and cellulase and phosphate solubilization to evaluate the potential of plant growth promoter of these bacteria. The different treatments did not interfere in the NMP found in both rhizosphere and wheat roots. The presence of the inoculant was shown to be higher in the isolation of the endophytic JMV medium and the rhizosphere NFb and LGI. The different doses of N did not interfere in the population in the different media. Of the endophytic isolates we highlight 25 that presented 3 or more biochemical activities, of which 2 performed all biochemical activities. These were submitted to quantification of AIA in which isolated isolates were high as the producer of this indolite. As for rhizospheric, 43 were distinguished by performing 3 biochemical activities or more, and submitted to quantification of AIA 5 they presented high production. The isolates that stood out were submitted to mass spectrometry (MALDI-TOF). The dendrogram of the isolates showed that isolates of the same medium and treatment presented better grouping which will be identified in the future.

Key words: Inoculant, doses of Nitrogen, MPN.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Um diagrama simplificado da microbiota do solo.....	19
Figura 2-	Relação das atividades bioquímicas com o crescimento vegetal.....	22
Figura 3-	O microbioma da rizosfera.....	23
Figura 4-	Mecanismo de promoção do crescimento das plantas por rizobactérias.....	24
Figura 5-	Película formada pelos organismos diazotrofos.....	39
Figura 6-	Sacos de polipropileno com planta pré- germinada e solução nutritiva..	42
Figura 7-	Produção de Cianeto. Produção de Cianeto.....	44
Figura 8-	Produção de Protease.....	46
Figura 9-	Produção de celulase.....	47
Figura 10-	Solubilizadores.....	48
Figura 11-	Reagente de Salkowski.....	49
Figura 12-	Produção de Sideróforos.....	51
Figura 13-	Visão geral dos isolados Endofíticos onde os meios NFb e LGI se diferenciam nos tratamentos com inoculação.....	63
Figura 14-	NMP dos isolados Rizosféricos onde se destaca o meio JMV com maior densidade de diazotrofos.....	64
Figura 15-	Visão geral dos isolados por tratamento onde os tratamentos com inoculante apresentaram maior NMP.....	65
Figura 16-	Isolados finais onde nos tratamento com inoculante obtivemos maior NMP.....	67
Figura 17-	Quantidade final de Isolados endofíticos por meio.....	68
Figura 18-	Quantidade final de isolados rizosféricos por meio.....	69
Figura 19-	Diagrama de Venn das atividades bioquímicas dos isolados Endofíticos.....	71
Figura 20-	Diagrama de Venn das atividades bioquímicas dos isolados Rizosféricos.....	72
Figura 21-	Perfil de Renyi da diversidade bioquímica em cada meio dos isolados Endofíticos.....	73
Figura 22-	Perfil de Renyi da diversidade bioquímica em cada meio dos isolados Rizosféricos.....	74
Figura 23-	Crescimento de bactérias totais da rizosfera.....	77
Figura 24-	Dendograma comparativo entre o agrupamento dos isolados rizosféricos e endofíticos.....	78
Figura 25-	Dendograma comparativo entre o agrupamento dos isolados quanto a presença e ausência do inoculante.....	79
Figura 26-	Dendograma comparativo entre o agrupamento dos isolados de acordo com as.....	81
Figura 27-	Dendograma comparativo entre o posicionamento dos isolados de acordo como meio.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos meios de culturas.....	40
Tabela 2 - Solução de Micronutrientes para meio de cultura.....	41
Tabela 3 - Composição do meio para Cianeto.....	44
Tabela 4 - Composição da solução de glicina.....	45
Tabela 5 - Composição do ácido pícrico.....	45
Tabela 6 - Composição do meio para Celulase.....	47
Tabela 7 - Reagente R1 AIA.....	50
Tabela 8 - Composição do meio para Sideróforos.....	51
Tabela 9 - Composição das soluções para Sideróforo.....	52
Tabela 10 - Efeito dos diferentes tratamentos no NMP em cada meio de cultivo.....	62
Tabela 11 - Comparação entre o NMP de bactérias rizosféricas e endofíticas.....	64
Tabela 12 - Análise geral da influência dos tratamentos.....	66
Tabela 13 - Atividades bioquímicas realizadas por tratamento onde a atividade de produção de sideróforos teve maior índice.....	70
Tabela 14 - Produção de AIA pelos 25 isolados endofíticos.....	75
Tabela 15 - Produção de AIA pelos 43 isolados Rizosféricos.....	76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1	CULTURA DO TRIGO.....	14
2.2	O USO DE BACTÉRIAS NA AGRICULTURA.....	16
2.3	A MICROBIOTA DO SOLO.....	18
2.3.1	PGPBs rizosféricas.....	23
2.3.2	PGPBs endofíticas.....	25
2.4	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL.....	27
2.4.1	Fixação Biológica do Nitrogênio.....	27
2.4.2	Produção de Cianeto.....	28
2.4.3	Produção de Celulase.....	29
2.4.4	Produção de Sideróforos.....	30
2.4.5	Produção de Protease.....	31
2.4.6	Solubilização de Minerais.....	32
2.4.7	Produção De Ácido Indol Acético (AIA).....	33
2.5	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS.....	34
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	OBJETIVO GERAL.....	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4	METODOLOGIA.....	37
4.1	MATERIAL.....	37
4.1.1	Histórico da Área.....	37
4.2	PREPARO DO MATERIAL.....	38
4.3	CONTAGEM DE MICRORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS.....	38
4.4	ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS.....	41
4.5	CONTAGEM DE RIZÓBIOS DO SOLO.....	41
4.6	CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS TOTAIS.....	43
4.7	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS ISOLADOS.....	43
4.7.1	Produção de Ácido Cianídrico.....	43
4.7.2	Produção de Protease.....	45
4.7.3	Produção de Celulase.....	46
4.7.4	Solubilização de Minerais.....	47
4.7.5	Produção e Quantificação do Ácido Indol Acético (AIA).....	48
4.7.6	Produção de Sideróforos.....	50
4.8	ESPECTROMETRIA DE MASSA DO TIPO MALDI-TOF.....	52
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
5	RESULTADOS.....	54
5.1	DIVERSIDADE FUNCIONAL DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ISOLADAS DO TRIGO TRATADO COM BIOFERTILIZANTE E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FERTILIZANTE NITROGENADO.....	54
5.1.1	Introdução.....	55
5.1.2	Material e Métodos.....	56
5.1.3	Resultados.....	61
5.1.3.1	NMP das bactérias isoladas da rizosfera e da raiz do trigo nos diferentes tratamentos.....	61
5.1.3.2	Isolamento.....	66
5.1.3.3	Caracterização bioquímica dos isolados.....	69

5.1.3.4 Contagem de rizóbios do solo e de Bactérias totais do solo.....	76
5.1.3.5 Espectometria de massa- MALDI-TOF.....	77
5.1.4 Discussões.....	83
5.1.5 Conclusão.....	94
5.1.6 Perspectivas.....	94
REFERÊNCIAS.....	95

1 INTRODUÇÃO

O crescente aumento populacional leva a um maior consumo de alimentos. O trigo (*Triticum* sp) sendo um cereal de grande importância, utilizado principalmente na alimentação humana, precisa ser produzido em escalas cada vez maiores (PASINATO et. al, 2014; FOLEY et al., 2011). Para aumentar essa produção, agricultores fazem uso de agroquímicos, como a fertilização nitrogenada. Porém o uso contínuo desses fertilizantes trazem consequências indesejadas, pois causam danos ambientais além de aumentar significativamente os custos de plantio.

Nesse contexto, a utilização de bactérias associativas que realizam atividades bioquímicas que promovem o crescimento vegetal, vem sendo empregadas com sucesso como inoculantes na agricultura. O uso dessas bactérias possui um enorme potencial, pois podem suprir as necessidades das plantas e diminuir consideravelmente a utilização de fertilizantes nitrogenados, o que, por consequência minimiza os danos ambientais e reduz os custos de produção.

Para preservar a comunidade bacteriana existente no solo, o sistema de plantio com rotação de cultura vem sendo empregado, pois já é conhecido que no sistema de plantio direto a população bacteriana é afetada (YANG, et al., 2015).

Essas bactérias são encontradas na rizosfera, no *bulk soil*, e no interior do tecido das plantas e contribuem para o desenvolvimento da planta através da fixação biológica do nitrogênio (FBN) e sua habilidade de produzir hormônios, compostos e enzimas que fornecem ações benéficas às plantas (HUNGRIA, 2010).

Bactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPB) são capazes de produzir cianeto, o qual é eficaz na ação contra patógenos; de produzir sideróforos que complexa metais como o ferro, o qual faz parte de uma enzima auxiliar na conversão do nitrogênio em amônia. São capazes de solubilizar fosfato e produzir ácido indol acético, que afetam diretamente o crescimento das plantas, produzir enzimas como a celulase que decompõe resíduos celulósicos e a protease, que combate os microrganismos fitopatógenos (FALESTRINO, 2013).

Dentre os diversos gêneros já identificados como promotores do crescimento vegetal, encontramos: *Gluconacetobacter*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Beijerinckia*, *Acetobacter*, etc. Apesar da imensa diversidade de PGPB, poucos são utilizados como inoculan-

tes, e embora os avanços nessa área sejam significativos, ainda se conhece pouco sobre a identidade, diversidade e densidade populacional destes microrganismos em diferentes plantas (VIDEIRA, et al., 2007).

Apesar da vasta gama de bactérias existentes, sabemos que ainda são pouco exploradas, e o conhecimento da sua diversidade ainda é pouco. Buscando explorar os benefícios produzidos por esses microrganismos e pela notável economia na agricultura através do uso de inoculantes, as pesquisas relacionadas às diversas maneiras da utilização dessas bactérias estão avançando e buscam melhorias na agricultura para reduzir impactos ambientais sem prejudicar a rentabilidade da produção.

Nesse sentido, o presente trabalho buscou avaliar o impacto da introdução de diferentes doses de nitrogênio e do inoculante *Azospirillum brasilense* na diversidade e função de rizobactérias do trigo em sistema de rotação de cultura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CULTURA DO TRIGO

A agricultura corresponde a 38% da superfície terrestre, o restante é coberto por desertos, montanhas, vegetações, cidades e outras áreas não agricultáveis. O rendimento da safra global cresce substancialmente para suprir o aumento populacional, forçando os produtores a buscar novas áreas cultiváveis. Nesse cenário, os impactos ambientais da agricultura causados pela expansão dessas novas áreas para suprir tal necessidade, vêm afetando drasticamente o meio ambiente, como o desmatamento. No entanto, esta expansão tem feito relativamente pouco para adicionar à oferta mundial de alimentos. A maioria dos ganhos de produção, foram alcançados através da intensificação agrícola, contudo, os custos e benefícios dessa intensificação variam muito. Tal atividade também proporciona prejuízos ambientais, como o uso de fertilizantes e herbicidas, a redução da biodiversidade, o aumento das emissões de gases do efeito estufa, e esgotando as fontes de nutrientes naturais dos ecossistemas (FOLEY et al., 2011).

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é um cereal de grande importância, utilizado na alimentação humana (farinha, macarrão, biscoitos, bolos, pães, etc.), na elaboração de diversos produtos não alimentícios (misturas adesivas ou de laminação para papéis ou madeiras, colas, misturas para impressão, agentes surfactantes, embalagens solúveis ou comestíveis, álcool, antibióticos, vitaminas, fármacos, cosméticos, etc.), bem como na alimentação animal, na forma de forragem, de grão ou na composição de rações (PASINATO et. al, 2014).

Por se tratar de uma cultura de inverno, sua colheita é realizada no verão ano após ano, as desvantagens deste sistema de cultivo contínuo podem reduzir significativamente a diversidade microbiana, diminuindo também a fertilidade do solo após a colheita do trigo. A diversidade microbiana da rizosfera foi considerada como sendo significativamente diferente quando se trata de diferentes culturas, bem como diferentes sistemas de plantio (YANG, et al., 2016).

É um grão que possui uma grande representatividade na produção agrícola mundial com cerca de 722 milhões de toneladas por ano, estando entre os três principais cereais mais produzidos no mundo, junto com arroz e milho (CONAB, 2016; CAIRAO, 2014). A União Europeia é a líder de produção com aproximadamente 140

milhões de toneladas produzidas, seguida pela China com 130 milhões de toneladas, os quais são líderes também no consumo de trigo, 123,9 e 118 milhões de toneladas, respectivamente (USDA, 2015; CONAB, 2015).

Já a produção brasileira foi em torno de 5 milhões de toneladas (2015/2016), participando com apenas 3,6% da produção mundial. Como o consumo nacional está em torno de 11 milhões de toneladas, ainda é necessária a importação desse grão. Sua área de produção nacional está concentrada principalmente na Região Sul do Brasil: Paraná, representando 53%, Rio Grande do Sul, 37%, e Santa Catarina, 4%. (CONAB, 2015; CAIERAO, 2014; USDA, 2015; MAFOLETTI *et al.*, 2012; MAPA, 2015).

O uso de agroquímicos como a fertilização nitrogenada (FN), é uma das técnicas para a intensificação da agricultura, pois o nitrogênio se caracteriza como um dos principais fatores limitantes ao crescimento e desenvolvimento das plantas. Porém, a adubação requer cuidados e trazem perigos os quais altas doses de N podem levar danos como ao acamamento, dificultar a colheita, provocar queda na produção, pelo aumento de gases que causam o efeito estufa, contaminação e acidificação do solo, também podem trazer prejuízo ao ambiente, pela lixiviação de nitrato para lençóis de água, e prejuízo ao produtor por gasto desnecessário com a compra do adubo nitrogenado (TEIXEIRA-FILHO, 2010; SOUZA *et al.*, 2013).

Atualmente são utilizadas na produção agrícola cerca de 1,48 bilhão de toneladas métricas de Nitrogênio (N), sendo 60% são aplicados nas culturas dos cereais mais importantes do mundo: arroz, milho e trigo. O Brasil utiliza 32,3 milhões ocupando o 4º lugar no ranking mundial de consumo. A eficiência e recuperação desse fertilizante na primeira colheita estão entre 30 a 50%, o restante do N ou permanece no solo ou é perdido no sistema solo-planta, causando graves perturbações nos ecossistemas. No Brasil, cerca de 70% dos FN são importados, sendo os custos da aplicação de N muito elevados, o uso desse agroquímico em plantas não leguminosas, como o trigo, constituem um dos mais altos custos da agricultura (LADHA, 2005; LOPES, *et al.*, 2008).

Tendo em vista a necessidade do uso de FN e o alto consumo do trigo, são constantes as buscas por melhores condições de plantio, qualidade de produção, redução de custos, redução nos danos ao meio ambiente, sem afetar o cultivo (ALVES; AMARAL, 2011). Nesse contexto, experimentos são realizados há vários anos para testar a eficiência da associação planta-bactéria, através de bactérias que

promovam o crescimento vegetal, como uma alternativa economicamente viável e benéfica ao meio ambiente (HUNGRIA, 2011).

Embora o N_2 seja um gás de abundância na atmosfera nenhum animal ou planta consegue utiliza-lo como nutriente na sua forma molecular, o que leva a utilização de alternativas para a assimilação desse N como uso de bactérias que promovem o crescimento vegetal em forma de inoculantes, pois alguns gêneros dessas bactérias, conseguem fixar esse nitrogênio e converter em amônia, para que as plantas possam assimilar, além de conferirem proteção e outros nutrientes à planta (HUNGRIA, 2011; MAPA, 2010).

2.2 O USO DE BACTÉRIAS NA AGRICULTURA

Bactérias são utilizadas na agricultura como inoculante ou biofertilizante que refere-se ao produto final da formulação contendo um veículo e agente bacteriano ou consórcio de bactérias que promovem o crescimento vegetal (BPCV, ou do termo inglês *Plant growth promoting bacteria*- PGPB) (BASHAN, 2014). Tais bactérias podem ser encontradas na superfície das raízes (rizosfera), na parte aérea (filosfera) e ainda nos tecidos internos das plantas, denominados bactérias endofíticas. Esses organismos desempenham, dentro e fora da planta, papéis importantes na associação com a planta e na fixação do nitrogênio, sendo as bactérias que possuem essa capacidade denominadas diazotróficas (HUNGRIA, 2011).

Não é nem um único gênero ou uma única espécie de bactéria nem uma única característica que induz a promoção de crescimento vegetal, e sim um consórcio de bactérias que possuam várias propriedades de promoção do crescimento vegetal (MADHAIYAN, et al., 2009).

Tais atividades compreendem a fixação biológica do nitrogênio, produção de sideróforos, que auxilia na FBN, pois, esse composto complexa metais como o ferro, o qual faz parte de uma enzima auxiliar na conversão do nitrogênio em amônia; solubilização de fosfato; produção de compostos análogos a hormônios vegetais como ácido-indol-acético (AIA) que é um hormônio e metabólito secundário que afeta diretamente o crescimento das plantas, produção de enzimas como a celulase que possui um importante papel na natureza, pois tem a capacidade de decompor resíduos celulósicos e protease, que combate os organismos fitopatógenos

(CARDOSO ; FREITAS, 1992; CATTELAN, 1999; ZAGO *et al.*, 2000; ISLAM *et al.*, 2009; FALESTRINO, 2013).

Desde a descoberta dos rizóbios em 1886 por Hellriegel, a utilização de bactérias como inoculantes contendo *Rhizobium*, que são bactérias associadas a leguminosas, estão sendo utilizadas principalmente em soja, e levam a redução ou até mesmo substituição por completo o uso de FN, e essas bactérias são consideradas os precursores da pesquisa (BASHAN *et al.*; 2014).

Já os estudos com gramíneas se iniciaram com Dobereiner e colaboradores em 1974, os quais encontraram bactérias diazotróficas associadas à cana de açúcar, e demonstraram que as bactérias endofíticas associadas a essa gramínea possuem um grande potencial para aumentar a biomassa da planta na ausência de FN (SALA, 2002). Recentemente em cana de açúcar, pesquisas realizadas com associação de *Gluconacetobacter* sp. representou uma considerável efetividade na FBN, reduzindo o uso de fertilizante nitrogenado em quase 100% (FREITAS, 2011; PERIN *et al.*, 2004).

Dentre os grupos de bactérias promotoras do crescimento vegetal estão os gêneros: *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* sp., *Burkholderia* sp., *Azotobacter* sp., *Beijerinckia* sp., *Gluconacetobacter* sp., *Acetobacter* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Rhizobium* sp., *Pseudomonas* etc (DOBEREINER, *et al.*, 1995).

Em 1993, um experimento realizado por Didonet e Magalhães avaliaram a inoculação de *Azospirillum* em plântulas de trigo e constataram a indução do alongamento e ramificação radicular e associaram esses resultados com a capacidade de algumas estirpes de *Azospirillum* produzirem AIA e nitrito, substâncias que atuam na promoção do crescimento vegetal. E foi possível, a partir desses resultados encontrados, verificar que a inoculação de estirpes de *Azospirillum brasiliense*, nas formas de inoculantes com turfa em pó e turfa granulada favorecem o aumento da produção de grãos de trigo em relação à testemunha sem nitrogênio (MOREIRA *et al.*, 2010).

No Brasil, são comercializadas cerca de 25 milhões de doses de inoculantes, principalmente para a soja, o que justifica o fato dessa cultura ser o diferencial de produção, sendo a cultura mais produzida, e a grande utilizadora de inoculantes. O uso de inoculantes contendo bactérias fixadoras de nitrogênio dispensa o uso de fertilizantes nitrogenados, o que resulta para o país uma economia estimada em 14 bilhões de reais por ano (RUFINO, 2013; EMBRAPA, 2015).

Alguns inoculantes já vêm sendo utilizados na agricultura, como o Sojamax (Total biotecnologia) contendo *Bradyrhizobium*, SILOBAC 5 (Christian Hansen), contendo *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus* sp., *Enterococcus faecium*, *Enterococcus* sp., *Pediococcus* sp. para milho e cana de açúcar; Graminante, (Laboratórios Alquimia S.A.) contendo *Azospirillum* sp. para gramíneas, Azototal (Total Biotecnologia) utilizado na cultura de milho e trigo, o qual contém *Azospirillum brasilense* AbV5 e AbV6 (EMBRAPA, 2014; STOLLER, 2015; HUNGRIA et al., 2010).

A estirpe Az39 de *Azospirillum brasilense*, é o princípio ativo em 65% dos inoculantes fabricados, e diversas outras estipes são base para outros inoculantes, o que faz dessa espécie um grande promotor do crescimento vegetal, principalmente para gramíneas. Em 2014, foram comercializados cerca de 2,9 milhões de doses de inoculantes a base de *Azospirillum brasilense* (CASSÁN e DIAZ-ZORITA, 2016).

As bactérias diazotróficas podem promover o crescimento vegetal tanto pela FBN como pela produção de substâncias que auxiliam o crescimento radicular, como, por exemplo o AIA. Assim, as PGPB assumem papel importante na interação com raízes de plantas, e as bactérias diazotróficas associativas podem ser denominadas também como Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (MOREITA et al., 2010). Dessa forma é imprescindível estimular o estudo de bactérias diazotróficas associativas ao trigo eficientes na promoção do crescimento vegetal (SALA et al, 2002).

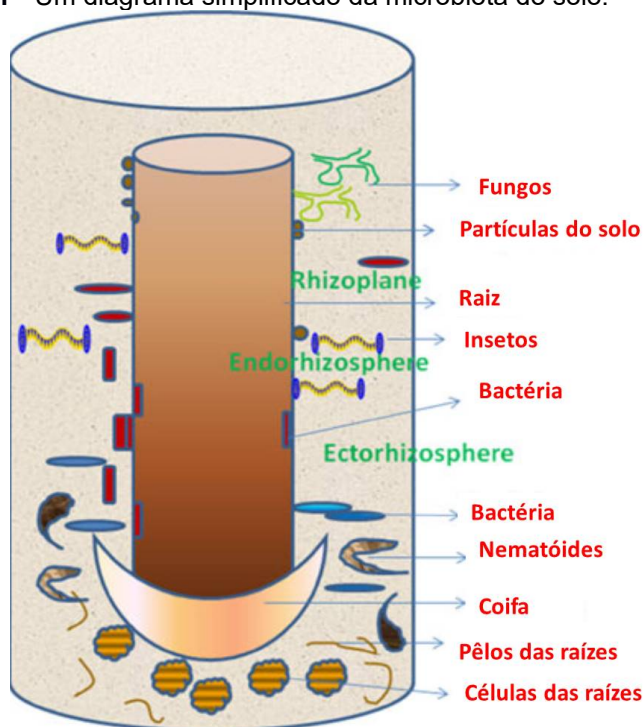
As bactérias podem inibir a ação de fitopatógenos por meio da produção de cianeto de hidrogênio (HCN), antibióticos, sideróforos e enzimas que degradam a estrutura desses patógenos. As bactérias também podem promover o crescimento direto da planta fornecendo elementos essenciais para seu crescimento como íon amônio (NH_4^+), fosfato e AIA (FALESTRINO, 2013).

2.3 A MICROBIOTA DO SOLO

Além de bactérias, outros organismos são encontrados na rizosfera como fungos, nemátodos, oomicetos, protozoários, algas, vírus, arqueias e artrópodes (figura 01), fazem parte de uma teia alimentar complexa que utiliza grande quantidade de nutrientes liberados pela planta. Esses organismos desempenham

um papel fundamental na regulação de quase todos os processos bioquímicos no solo (YANG et al., 2014; MENDES, et al. 2013).

Figura 1 - Um diagrama simplificado da microbiota do solo.



Fonte: (adaptado de PRASHAR et al., 2014)

A rizosfera está dividida em três partes: endorizosfera, que consiste no tecido radicular incluindo a endoderme e camadas corticais; rizoplano é a superfície da raiz onde as partículas do solo e os micróbios aderem, compreendendo a epiderme, o córtex e a camada de polissacarídeo mucilaginoso e ectorizosfera, a qual pertence o solo adjacente à raiz (PRASHAR, et al., 2014).

As bactérias abrangem um grupo considerado o mais diverso e abundante entre os organismos em toda a Terra. Há indícios de que o número de espécies bacterianas conhecidas esteja em torno de 12% do seu total. Porém, menos de 1% dessas bactérias podem ser observadas sob microscopia, cultivadas e caracterizadas. (WHITMAN et al., 1998; BULL et al., 2000; VIDEIRA, et al., 2007). Além de sua abundância, as bactérias compreendem um habitat muito amplo e diverso, o que alimenta sua grande diversidade, sendo encontrados em grande densidade e riqueza em diversos lugares (SALA, 2002).

As plantas podem modular o microbioma da rizosfera a seu favor, estimulando seletivamente os microrganismos que possuem características benéficas para o crescimento e saúde da planta (COOK et al., 1995), e são denominados microrganismos rizosféricos todas as espécies que colonizam as raízes superficialmente (SALA et al., 2007).

Durante a germinação da planta, uma variedade de compostos orgânicos são libertados das raízes por exsudação, secreção e deposição o que torna a rizosfera uma microflora rica em nutrientes em comparação ao “*bulk soil*” (figura 03), fazendo com o que a planta exerça um efeito sobre as populações presentes nessa zona. Esse efeito na rizosfera é refletido pela notória diferença na estrutura das populações microbianas de solos não cultivados e cultivados e as variações nas estruturas da comunidade bacteriana, os estádios de desenvolvimento do crescimento de plantas e as características do solo (PRASHAR, et al., 2014; BERG et al., 2006; ANTON; PREVOST 2005; GOMES et al., 2003; NIE et al., 2009;).

A perda de diversidade de bactérias do solo, sobretudo de diazotróficas, pode alterar a estrutura populacional de outros organismos ao longo da cadeia trófica. Os impactos sofridos pelos processos vitais que ocorrem no solo como a decomposição de matéria orgânica e a ciclagem de nutrientes levam o sistema agrícola à maior dependência por fertilizantes (MOREIRA, 2010). Além disso, a diversidade microbiana do solo pode ser afetada por diferentes práticas agrícolas, como sistemas alternativos, mudança de uso da terra, adubação e outros (ACOSTA-MARTINES et al., 2010; YAO et al., 2006; ZHANG et al., 2015).

Diversos fatores físicos e químicos determinam as condições ambientais, a interação desses fatores atua simultaneamente de forma dinâmica. A relação de fatores como a matéria orgânica do solo, os microrganismos e a sua estruturação, estabilizam a estrutura da planta que protege fisicamente a matéria orgânica e os microrganismos do solo, e formam uma rede complexa fortemente ligada entre microbiota e matéria orgânica. A qualidade do solo pode ser afetada e afetar essa rede, como a intervenção humana que através do cultivo, causa danos como processos erosivos, redução de matéria orgânica, perda de nutrientes, compactação do solo, redução de populações microbianas e de atividades enzimáticas e alteração de pH. Essas modificações podem alterar a comunidade microbiana (MELLONI, 2007; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; STABEN et al., 1997).

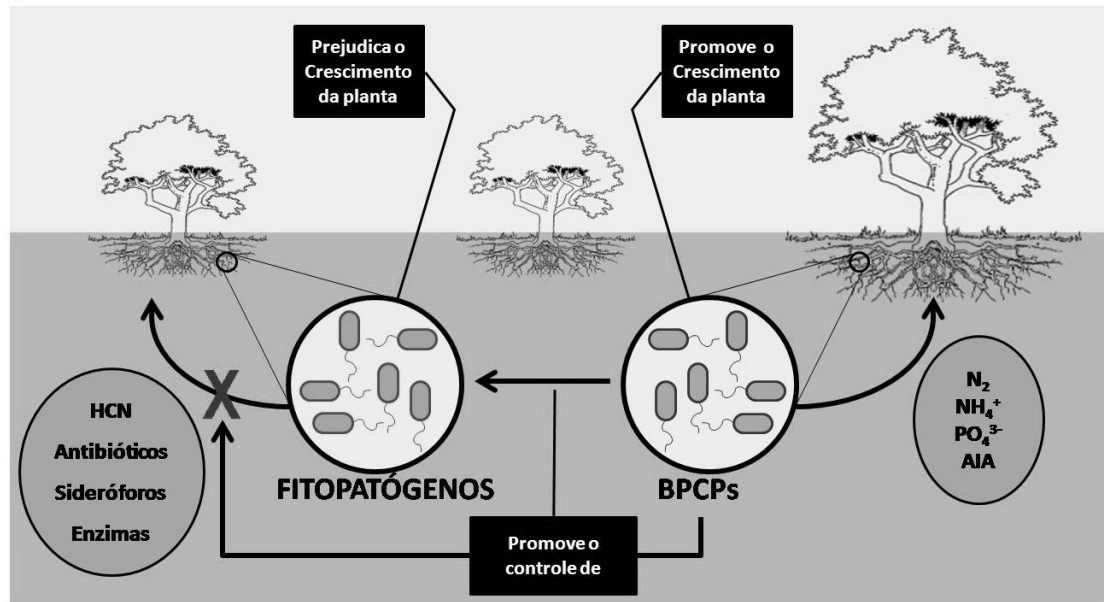
Nesse cenário, diversos fatores afetam os organismos do solo, tornam suas populações extremamente variáveis e evidenciam as alterações na comunidade microbiana em relação ao manejo aplicado. Porém a maioria dos organismos diazotróficos associativos possuem notável resistência a estas mudanças mesmo quando estas são extremamente estressantes (MOREIRA e SIQUEIRA., 2006).

A presença de um determinado microrganismo em um solo é de acordo com as condições ambientais dominantes e sua permanência em qualquer habitat pode ser determinada também de acordo com a extensão e rapidez de suas respostas fisiológicas às condições ambientais predominantes, e fatores como a salinidade, temperatura, pressão e pH, presentes nesse solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; LEITE; ARAÚJO, 2007).

As interações microbianas no solo têm participações importantes para os diferentes processos microbiológicos e bioquímicos que ocorrem no sistema solo-planta-bactéria e podem proporcionar aumento na produção de alimentos, ou seja, no aumento de produtividade de diversas culturas utilizadas na alimentação humana, além da conservação da qualidade ambiental (LEITE e ARAÚJO, 2007).

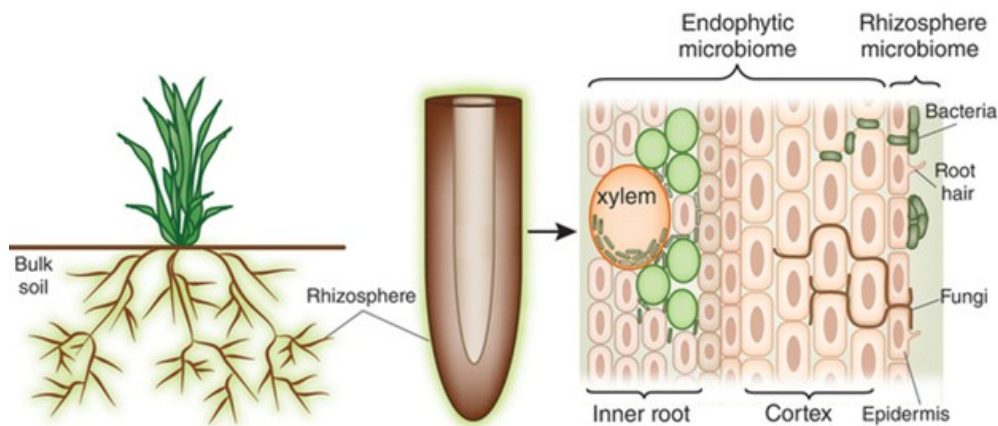
As PGPBs podem afetar a planta de duas maneiras: direta ou indiretamente (Figura 02). A promoção do crescimento vegetal de forma direta ocorre quando a bactéria sintetiza um composto e o libera para o ambiente facilitando a absorção pela planta. O efeito indireto implica na produção de substâncias pelas bactérias que diminuem ou reduzem efeitos deletérios de um ou mais organismos patogênicos, através da produção de fitormônios (BENEDUZI, et al., 2012; AHMAD, et al., 2008).

Figura 2- Relação das atividades bioquímicas com o crescimento vegetal.



Fonte: FALESTRINO, 2013

Inicialmente Baldani et al. (1997), agruparam as bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas em três categorias: organismos rizosféricos, endofíticos facultativos e endofíticos obrigatórios. Atualmente a classificação para essas bactérias são: bactérias endofíticas e de vida livre (figura 02). As de vida livre são provenientes do solo (rizosféricas) e vivem em harmonia com as plantas, utilizando para sua nutrição os exsudatos liberados pela planta através de suas raízes. Nesta associação não ocorre modificação morfológica, ou seja, a formação de uma estrutura especializada para a fixação do nitrogênio como ocorrem na interação de bactérias diazotróficas do gênero *Rhizobium* e as raízes de leguminosas onde há presença de nódulo, por exemplo (VIDEIRA, et al., 2007; ROESCH, 2003). As bactérias endofíticas fazem associações internas, colonizam o interior dos tecidos vegetais (raízes, caules, folhas), sem causar nenhum sintoma de patogenicidade, e promovendo o crescimento da planta hospedeira (KLOEPPER et al., 1997).

Figura 3- O microbioma da rizosfera

Fonte: Adaptado de Hirsch & Mauchline (2012).

Nota: O microbioma da rizosfera inclui bactérias que são recrutados a partir do solo e colonizam a superfície radicular. O microbioma endófito inclui as espécies que se infiltram no córtex radicular e vivem no espaço intercelular, principalmente.

2.3.1 PGPBs rizosféricas

O termo rizosfera deriva da palavra grega “rhiza” (raiz) e “sphere” (esfera) que significa campo de influência (HILTNER, 1904), e compreende uma fina camada de solo de cerca de 1 a 7 mm que fica em contato direto com as raízes, e sofre influência do crescimento e das atividades da raiz, variável de planta para planta (UROZ et al, 2010; PRASHAR et al, 2013; PIERRET et al., 2007). Além do seu papel de ancoragem das plantas, absorção de água e íons, armazenamento de nutrientes, o sistema radicular está em contato estreito com uma vasta gama de populações microbianas do solo a qual é muito rica contendo 10^{10} bactérias por grama de solo, com uma alta taxa de diversidade (VACHERON et al., 2013).

Na rizosfera, associações entre bactérias fixadoras de nitrogênio e plantas têm sido consideradas uma importante força motriz que permitiu que os organismos se espalhassem por toda a biosfera, ocupassem novos nichos, e se adaptassem a uma variedade de estresses ambientais (SANTI, et al., 2013).

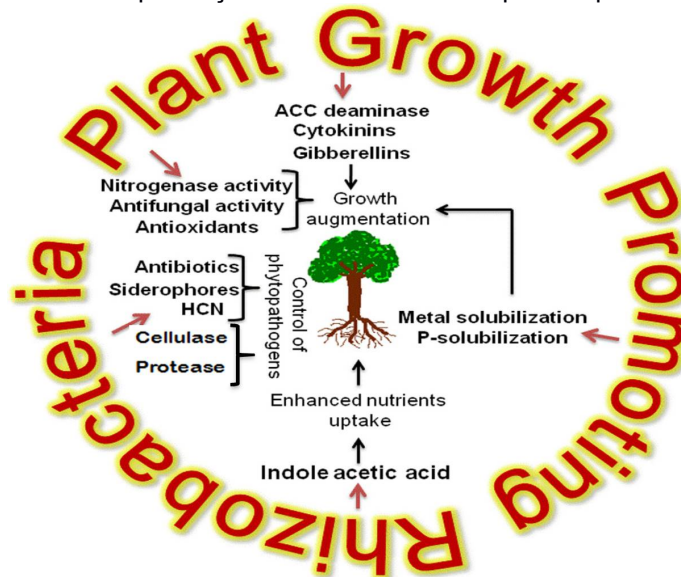
Devido à sua forte associação com a planta, as diversas formas de microrganismos encontrados na rizosfera podem influenciar a planta hospedeira em diversas maneiras. É um *hotspot* para vários organismos e é considerado um dos ecossistemas mais complexos do planeta com enorme fluxo de energia (HINSINGER et al., 2009; RAAIJMAKERS et al., 2009; PRASHAR et al, 2013;).

Os produtos da fotossíntese que são liberados pela planta, podem ser metabolizados pelas bactérias que habitam a rizosfera, as quais fixam o nitrogênio para seu metabolismo e transferem o amônio (NH_4^+) para as plantas (VIDEIRA, et al., 2007).

As PGPBs rizosféricas ou rizobactérias fazem parte de um grupo muito amplo de microrganismos, onde, incluem-se quaisquer bactérias que vivam na rizosfera e afetem benéficamente o crescimento de uma ou mais espécies vegetais (SILVEIRA; FREITAS, 2007).

PGPBs podem promover o crescimento vegetal e proteger as plantas de patógenos por uma série de mecanismos como sua capacidade de solubilizar fosfatos minerais e outros nutrientes do solo, produzir ou aumentar a produção de hormônios vegetais como auxinas (principalmente o AIA), citocinas e giberelinas e a FBN em associação com as plantas (figura 04) (LUGTENBERG ; KAMILOVA, 2009; RAAIJ-MAKERS et al., 2009; FALESTRINO, 2013).

Figura 4- Mecanismo de promoção do crescimento das plantas por rizobactérias.



Fonte: Adaptado de AHEMAD e KIBRET, 2014.

A maioria das populações microbianas está concentrada em nichos ricos em nutrientes como a rizosfera que é fonte constante de nutrientes facilmente utilizáveis. A Rizosfera tem um enorme *pool* de microrganismos do solo e para colonização e atividade microbiana. A rizosfera tem um fornecimento constante de nutrientes facilmente utilizáveis pelos microrganismos (PRASHAR et al., 2013). As bactérias da rizosfera podem influenciar significativamente o estado nutricional das plantas (MENDES, 2013).

Somers et al. (2004) classificaram PGPBs de acordo com suas atividades bioquímicas como: biofertilizantes, as quais aumentam a disponibilidade de nutrientes para a planta; fitoestimuladores, as que promovem o crescimento das plantas, através da produção de fito hormônios; rizoremediadores, as bactérias que combatem poluentes orgânicos degradantes e biopesticidas, as que tem possuem a capacidade de controlar doenças, principalmente pela produção de antibióticos e metabólitos antifúngicos (figura 04) (ANTOUN; PRE'VOST, 2005).

A promoção do crescimento vegetal por rizobactérias pode ser de duas formas: direta, a qual estimula o crescimento da planta e indireta, na qual inibe os efeitos de patógenos (GLICK, 1995; PRASHAR, et al., 2014). Essas bactérias formam um grupo heterogêneo, e atuam na zona da raiz. Diversos gêneros da rizosfera foram classificados como PGPBs: *Pseudomonas* sp, *Azospirillum* sp, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp, *Burkholderia* sp. (GLICK, 1995; OLIVERIA, 2009).

2.3.2 PGPBs endofíticas

A denominação de “bactéria endofítica”, comumente empregada vem do fato de colonizarem o interior das raízes e outros tecidos de plantas, não tendo efeitos nocivos às plantas, estando localizadas principalmente nos espaços intercelulares. Nessa definição estão inclusas as bactérias endofíticas simbióticas, assim como associativas, e ainda, bactérias que são endófitas facultativas, ou seja, colonizam o interior da planta em apenas alguma fase do seu ciclo de vida, transitando entre colonização rizosférica e endofítica. Podem promover o crescimento vegetal e inibir doenças da planta por meios semelhantes a rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (SANTI et al., 2013; SUN et al., 2008; PETRINI, 1991; HALLMANN et al., 1997).

As bactérias diazotróficas endofíticas são consideradas favorecidas devido ao seu habitat, pois o interior da planta é mais protegido de outros microrganismos, e possui um maior acesso aos nutrientes disponibilizados pelas plantas (GYANESHWAR et al., 2001; BALDANI; BALDANI, 2005).

A densidade populacional de endofíticos é extremamente variável, e vai depender principalmente das espécies de bactérias, condições ambientais, do genótipo da planta hospedeira e do seu estágio de desenvolvimento. A estimulação do crescimento por microrganismos é uma consequência da FBN, e da produção de

fitormônios. Atuam também no biocontrole de fitopatógenos na zona da raiz (através da produção de antifúngico ou agentes antibacterianos, na produção de sideróforos, na competição de nutrientes e induzem a uma resistência sistemática no hospedeiro ou imunidade). Essa produção de substâncias indólicas, pode aumentar a eficiência nutricional das plantas, e promover proteção contra doenças além de estimular seu desenvolvimento, aumentando a disponibilidade de minerais, e possuem também a capacidade de solubilizar fosfato (ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006; FREITAS 2011).

Cada planta das cerca de 300 000 espécies existentes no mundo é hospedeira de um ou mais endófitos. Numerosos relatórios mostram que os microrganismos endófitos podem ter a capacidade para controlar patógenos de plantas e prevenir doenças, insetos e nematóides. Podem também atuar na aceleração da emergência de plântulas, promover o estabelecimento das plantas em condições adversas e aumentar o crescimento da planta (RYAN et al., 2008).

Os endófitos podem contribuir de forma mais eficiente para a FBN que as presentes na rizosfera, já que a troca entre planta e microrganismo ocorre de forma direta. Algumas bactérias diazotróficas endofíticas encontradas estão associadas à cultura da cana-de-açúcar e pertencem aos gêneros *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*. *Gluconacetobacter diazotrophicus* é a espécie mais estudada e ocorre em grande número nas raízes e na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar (FREITAS, 2011).

Algumas espécies do gênero *Azospirillum*, como o *Azospirillum brasiliense*, possuem mecanismos específicos de interação com as raízes e são aptas a colonizar todo interior das mesmas, mesmo com a assepsia e desinfestação das raízes foi demonstrado que algumas espécies de *Azospirillum* habitam o interior das raízes de trigo e demonstram a diversidade microbiana endofítica (SALA et al, 2005; SALA et al., 2007). Diversos gêneros encontrados se apresentam como promissores para a fabricação de inoculantes, produto biotecnológico de baixo custo e baixo impacto ambiental (FREITAS, 2011).

2.4 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL

Os microrganismos do solo são considerados membros fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos, isto devido à imensa diversidade genética e funcional, pois são capazes de desempenhar funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas (MYERS, 1996).

2.4.1 Fixação Biológica do Nitrogênio

O nitrogênio (N) é um dos nutrientes de mais importância para o crescimento e produtividade das plantas e apesar do nitrogênio gasoso (N₂) constituir cerca de 78% dos gases da atmosfera terrestre, animais e plantas não conseguem absorvê-lo em sua forma molecular, pois ele possui uma ligação tripla entre os dois átomos de Nitrogênio. Como esse gás consegue se difundir para o solo, algumas bactérias conseguem convertê-lo em formas utilizáveis, por meio da FBN, graças à ação de uma enzima chamada nitrogenase, que realiza a quebra dessa tripla ligação e reduz o N₂ a amônia (AHMAD; KIBRET, 2014; HUNGRIA, 2011).

Essa atividade pode ser detectada *in vitro*, através do uso de meio semi-sólido livre de N, onde bactérias fixadoras de N₂ são inoculadas e formam uma película, assemelhada a um véu, atributo de bactérias diazotróficas (DOBEREINER et al., 1995).

Essas bactérias possuem uma característica aerotóxica e precisam de uma região onde a taxa de difusão de O₂ está em equilíbrio com a de respiração das bactérias. O uso do meio semi-sólido, propicia um gradiente de difusão de O₂ adequado, ou seja, nesse local de equilíbrio ocorre a formação da película, onde as células atingem um número alto suficiente para escoar o O₂ em excesso que acumula ao seu redor, o que irá ativar a enzima nitrogenase. À medida que as bactérias se multiplicam e a sua densidade aumenta, o maior consumo de O₂ leva a película a se mover em direção à superfície onde concentrações maiores de O₂ estão disponíveis (MOREIRA, 2010; DOBEREINER et al., 1995).

O potencial da FBN, e de outros processos microbianos, é devido à quantidade de compostos orgânicos que está depositado na rizosfera, da eficácia da conversão

desses substratos e da proporção utilizada do substrato (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A FBN é um processo complexo e envolve uma cadeia de genes estruturais e regulatórios (TRIPLETT et al., 1989). É realizada pelo complexo proteico nitrogenase, o qual é composto por duas unidades básicas: a nitrogenase ou proteína ferromolibdênio (MoFe-proteína) e a nitrogenase redutase ou ferro-nitrogenase (Fe-proteína) (BURGMANN, 2003; GOMEZ, 2012). As bactérias diazotróficas possuem genes que codificam a nitrogenase, que é o complexo enzimático que catalisa a conversão de gás N_2 para amônia, ou seja, esse complexo reduz a dinitrogênio em amônia. O complexo nitrogenase é altamente conservado em bactérias de vida livre e simbióticas. Vários tipos de associações e interações ocorrem entre bactérias diazotróficas e suas plantas hospedeiras (SANTI, et al., 2013; BULGARELLI et al., 2013).

Bactérias que fixam nitrogênio em leguminosas e, devido a essa atividade, formam uma estrutura especializada, onde realizam a FBN são chamados de rizóbios, e vivem de maneira simbiótica com a planta, ou seja, estão interagindo intimamente, como por exemplo bactérias do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Já bactérias dos gêneros *Azospirillum* e *Burkholderia* realizam a FBN de forma associativa de vida livre ou endofítica facultativa, estabelecendo relações benéficas com a planta (DÖBEREINER et al., 1995, PERIN, 2006, HUNGRIA e ARAÚJO, 1994).

2.4.2 Produção de Cianeto

Em condições fisiológicas em que o pH é neutro, o cianeto encontra-se mais abundante na forma de cianeto de hidrogênio ou ácido cianídrico (HCN), na qual é mais volátil e menos denso que o ar, podendo se difundir rapidamente no ambiente (BLUMER; HAAS, 2000).

É um produto químico produzido pelas bactérias que possui propriedades tóxicas, e atua como um inibidor metabólico. Em geral é sintetizado, excretado e metabolizado por centenas de gêneros de microrganismos, como um meio de evitar a predação ou competição. Atua como inibidor de patógenos e a função ecológica das bactérias produtoras de cianeto é devido ao poder antimicrobiano desse composto. A produção dessa substância confere à planta proteção contra

microrganismos patogênicos nas raízes devido seu alto teor de toxicidade, podendo também atuar como mecanismo contra a predação (BLUMER; HAAS, 2000; PESSI; HAAS, 2004).

Um metabólito secundário produzido normalmente por *Pseudomonas* na rizosfera é o cianeto, um gás conhecido por afetar negativamente o metabolismo e crescimento da raiz e é um mecanismo compatível para controle biológico de ervas daninhas (SCHIPPERS, et al., 1990; HEYDARI, et al., 2008).

Castric (1977), em um de seus experimentos apresentou provas de que a glicina é um precursor de HCN produzida por *Pseudomonas aeruginosa*, mas que este processo é significativamente diferente de outras cianogêneses em diferentes bactérias, como a ação de outros aminoácidos, além da glicina, que podem estimular a produção de HCN, e também a utilização de ambos os carbonos de glicina podem ser usados como fontes de carbono cianeto (CASTRIC, 1977 *apud* SAHARAN; NEHRA, 2011).

O ponto chave para a cianogênese consiste na redução da concentração de oxigênio ambiental (O_2), e este elemento influencia a produção de cianeto através do regulador ANR (regulador anaeróbico de arginina desaminase e nitrato redutase), o qual é extremamente sensível às condições ambientais (BLUMER; HAAS, 2000).

Os organismos capazes de realizar essa atividade podem ser detectados plaqueando-os em meio ágar nutriente enriquecido com glicina, um papel germiteste embebido de ácido pícrico na tampa. A coloração do papel mudará de amarelo para vermelho telha para as bactérias produtoras de cianeto (LORCK, 1948).

2.4.3 Produção de Celulase

A celulose $[C_6H_{10}O_5]_n$ é o polímero orgânico composto por monômeros de D-glicose unidos por ligações glicosídicas β -1,4, é o mais abundante do planeta e é o maior componente da biomassa vegetal. É encontrado em sua forma pura, como por exemplo, no algodão, e também em associação com hemiceluloses, pectinas e lignina na parede celular das células vegetais. Podendo ocorrer ainda na parede celular de organismos incluindo fungos e tunicados (LYND et al., 2002; SANDGREN, et al., 2005).

Devido a alta resistência de sua estrutura, a celulose não pode ser facilmente hidrolisada e por isso, requer a ação de microrganismos específicos produtores das

enzimas celulases (MEDIE et al., 2012). A conversão que os microrganismo fazem da celulose para açúcares simples, necessitam de enzimas, como as endoglicanases (GILKES et al., 1991), que também são denominadas de celulases, endo β -1,4 glicanases e carboximetil celulases (SCHÜLEIN, 2000).

Os microrganismos que possuem a capacidade de produzir esse tipo de enzima podem beneficiar seu hospedeiro inibindo patógenos fúngicos, quando degradam a parede celular das células com a ação de enzimas como β -1,4 glicanases, levando a lise da parede celular e por consequência a morte deste patógeno (DOBBELAERE, et al., 2003; STURZ, et al.; 2000).

É possível verificar a atividade desses microrganismos cultivando-os em placa contendo meio Ágar CMC onde ao adicionarmos corante Iodo de Gram houver a formação de uma halo claro ao redor da colônia (KASANA, et al., 2008).

2.4.4 Produção de Sideróforos

A palavra sideróforo é de origem grega: "portador de ferro" definidos como pequenos compostos orgânicos secundários com importantes funções ecológicas nas plantas, que possuem alta afinidade de ferro, possuem baixo peso molecular e competem pela absorção do íon férrico (WHIPPS, 2001; NEILANDS, 1952; NEILANDS, 1995).

Os sideróforos são produzidos por algumas espécies de microrganismos, que tem como principal objetivo complexar metais, em especial ferro encontrado em estado insolúvel no solo, e permite seu transporte à célula, pois o ferro é um elemento essencial para o crescimento de todos os organismos vivos (FALESTRINO, 2013; TAIZ; ZEIGER, 2006; SAHARAN; NEHRAN, 2011).

Os sideróforos são geralmente classificados pelos ligantes usados para quelar o ferro férrico, são classificados em 3 principais grupos: os catecolatos (fenolatos), hidroxamatos e carboxilatos (SAHARAN; NEHRAN, 2011). Sob condições em que o ferro se encontra limitante, PGPB produzem os sideróforos (WHIPPS, 2001).

Algumas estirpes de bactérias que não empregam quaisquer outros meios de biocontrole, podem agir como agentes de controle biológico utilizando os sideróforos produzidos por elas, evitando que os fitopatógenos adquiram quantidade de ferro suficiente evitando assim sua proliferação (GLICK, 2012).

O crescimento das plantas, geralmente não é afetado pela depleção de ferro na rizosfera causada pelos sideróforos produzidos pelas PGPB, sendo que a maioria das plantas podem crescer em baixas concentrações de ferro do que a maioria dos microrganismos (O'SULLIVAN; O'GARA, 1992). Em contrapartida Bulgarelli et al. (2013), relata que sideróforos produzido por bactérias diazotróficas podem indiretamente contribuir para a promoção de crescimento vegetal.

Em laboratório, essa atividade pode ser verificada pela formação de um halo amarelo ao redor da colônia inoculada em placa contendo meio CAS- Ágar (SCHWYN; NEILANDS, 1987).

2.4.5 Produção de Proteases

As proteases são enzimas pertencentes ao grupo das hidrolases, e o principal papel dessas enzimas proteolíticas é nutricional além de estarem envolvidas também em processos biológicos importantes, como o controle de patógenos, pois inibem a formação e germinação de esporos, e no ciclo celular (FEDATTO, 2004; WHITAKER, 1994).

São classificadas em dois grupos principais, as exopeptidases e endopeptidases, variando com o sítio de ação dessas enzimas (RAO et al., 1998). As exopeptidases são as enzimas que iniciam o processo de degradação a partir das extremidades amino (N) ou carboxi-terminal (C) das proteínas, e produzem pequenos peptídeos ou até mesmo aminoácidos. As endopeptidases podem também ser encontradas com o nome de proteinases, sendo muito comum a utilização do termo proteinase para se referir a uma protease. Elas possuem a capacidade de clivar a proteína alvo na sua parte interna, que se encontra longe das extremidades amino e carboxi-terminal, gerando dessa forma peptídeos maiores (SOUZA, 2012).

As proteases de origem microbianas são preferidas às enzimas de origem vegetal e animal uma vez que possuem quase todas as características desejadas para as suas aplicações biotecnológicas. Podem ser encontradas em uma ampla diversidade de organismos, onde desempenham funções fisiológicas vitais. Um gênero bacteriano com alta produção de protease é o gênero *Bacillus* sp., (RAO et al., 1998).

In vitro sua produção pode ser detectada pela presença de um halo claro ao redor de colônias inoculadas em meio ágar enriquecido com leite desnatado em pó (SMIBERT e KRIEG, 1994)

2.4.6 Solubilização de Minerais

Fósforo e Zinco são minerais importantes que servem como nutrientes para as plantas, bem como o seu papel benéfico das bactérias que conseguem solubilizar esses minerais, e atuam na manutenção dos níveis adequados destes nutrientes minerais e nas produções de culturas, a eficiência dessas bactérias tem sido cada vez mais relatada (RODRÍGUEZ ; FRAGA, 1999; SARAVANAN, et al., 2007).

Apesar de estar presente no solo em altas concentrações a maior parte do fósforo é orgânico e insolúvel e, por conseguinte, não está disponível para atuar no crescimento da planta (GLICK, 2012; SAHARAN; NEHRAN, 2011). É um elemento essencial para o crescimento vegetal e sua atividade é atribuída à liberação de diversos ácidos orgânicos durante a decomposição (MOREIRA, 2010; MATIAS, 2010).

Diversos microrganismos do solo são capazes de solubilizar o P disponível no solo através das suas atividades metabólicas, da exsudação de ácidos orgânicos, que se dissolvem diretamente o fosfato da rocha, ou quelantes de íons de cálcio que libertam P para a solução (SAHARAN; NEHRAN, 2011).

Os microrganismos solubilizadores podem realizar essa atividade em diferentes formas de fosfatos e apresentam um maior potencial para o aproveitamento do P presente na fase sólida do solo, apresentando uma alternativa viável para inoculação de plantas. O fato de microrganismos conseguirem solubilizar fosfatos inorgânicos é atribuída pela capacidade de reduzirem o pH ao seu redor (MARRA, 2009).

As bactérias que possuem a capacidade de solubilizar o fosfato são abundantes na maioria dos solos (até 40% da população pode ser cultivável) e geralmente, os organismos que solubilizam fosfato são determinados plaqueando os isolados em meio sólido e adicionado uma forma insolúvel de fósforo, a formação de um halo claro em torno de colônias indica a positividade para essa atividade (BULGAREELLI, 2013).

Diversos gêneros podem solubilizar fosfato, como *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, dentre outros (BULGARELLI, et al. 2013; MARRA, 2009; SAHARAN e NEHRAN, 2011).

2.4.7 Produção de Ácido Indol Acético (AIA)

O AIA é uma auxina natural que faz parte de um grupo que estimula o crescimento da planta e sua denominação deriva do grego "crescer". O AIA é a forma predominante dessa auxina, e evidências sugerem que existem outras auxinas indólicas naturais nas plantas. O principal efeito do AIA é promover o crescimento de raízes e caules, através do alongamento das células recém-formadas nos meristemas (MARCHIORO, 2005; PATTEN; GLICK, 2002).

Hormônios vegetais permitem conduzir o crescimento da planta através da influência espacial e temporal sobre o alongamento, divisão e diferenciação celular. Também exercem um papel chave na resposta da planta aos estresses bióticos e abióticos (FALESRINO, 2013).

O principal precursor para a biossíntese de AIA é o triptofano, e diversas vias dessa biossíntese foram descritas em microrganismos em associação com plantas. A produção de auxina é uma prática comum realizada por muitas bactérias do solo associativas, sendo essa característica de extrema importância para o crescimento de plantas (BULGARELLI, 2013; SPAEPEN, et al., 2009).

O crescimento das plantas não é estimulado apenas pela produção de AIA. Em outros casos, a degradação de AIA por microrganismos também pode estimular alongamento radicular (BULGARELLI, et al., 2013). Com a análise das espécies bacterianas que sintetizam o AIA, o papel realizado pelas auxinas em interações planta-microrganismos aparece bem diversificado (SPAEPEN, et al., 2011).

Bactérias do gênero *Azospirillum* tem sido muito estudadas pelo seu grande potencial para a síntese de AIA (DOBBELAERE et al., 1999), e mostram que bactérias que realizam essa atividade em associação com a planta aumentam a proliferação radicular (SPAEPEN, et al., 2009).

Considerando a diversidade funcional que essas bactérias possuem suas aplicações são imensas havendo cada vez mais a necessidade de estudá-las e explorá-las. Visto que a quantidade e a diversidade de bactérias cultiváveis e não cultiváveis presentes na raiz na rizosfera é imensa através da utilização de técnicas

que possibilitam caracterizar e identificar essas bactérias, para conseguir aplicá-las adequadamente.

2.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS

Para identificação dos microrganismos faz-se necessário o uso de técnicas moleculares, que vem sendo utilizadas desde o uso do sequenciamento por Sanger, et al. (1977), e da descoberta da reação em cadeia da polimerase (PCR) por Kary Mullis em 1983 (SAIKI et al., 1988).

Para caracterização genotípica de isolados aplica-se a técnica do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, uma vez que esse encontra-se presente em todas as bactérias utilizando RNAs ribossômicos, que são considerados cronômetros moleculares, pois são moléculas universais, preservadas e com funções altamente específicas que são estabilizadas ao longo da evolução e não sofrem influência por mudanças no meio ambiente (MOREIRA, 2010; JANDA; ABBOTT, 2007).

A utilização dos ácidos ribonucléicos ribossômicos (rRNA) para identificações taxonômicas é justificada por serem considerados os biopolímeros mais adequados para estudos de diversidade, pois os seus genes, os rDNAs, são universalmente distribuídos entre os diferentes grupos de seres vivos. O 16S rRNA possui tamanho adequado com aproximadamente 1500 nucleotídeos, e permite gerar grande quantidade de informações úteis para análises filogenéticas. Possui 9 regiões variáveis, que possibilitam o estudo de relações evolutivas entre dois organismos próximos. Estas regiões variáveis são alternadas com regiões conservadas, sendo possível o estudo das relações antigas entre duas moléculas, e por possuir uma maior facilidade de sequenciamento, tornou-se referência (REIS JUNIOR, 2002; STAHL, 1997; WOESE, 1987).

O 16S rRNA compõe a subunidade ribossômica menor e pode conservar características ao longo do tempo as quais são utilizadas como indicador comparativo da evolução microbiana (SILVEIRA, 2004).

Em contrapartida a espectrometria de massa é uma técnica analítica utilizada na caracterização fenotípica, baseada no estudo e identificação de proteínas, bem como a definição da massa molecular de biopolímeros, sem a necessidade de gran-

des quantidades de amostra, na qual os compostos químicos são ionizados em moléculas carregadas e a razão entre sua massa para carga (m/z) é medido (ALM et al., 2006; BAKHTIAR; NELSON, 2001; SINGHAL, et al, 2015). Com o auxílio do espectrômetro de massas é possível determinar essa relação m/z de moléculas ionizadas em uma fase gasosa (AEBERSOLD; MANN, 2003). É considerada uma alternativa rápida para identificar vários microorganismos, incluindo bactérias, vírus, fungos, insetos e helmintos (STETS, et al. 2013).

MALDI-TOF é definido como ionização por dessorção por laser de matriz de células inteiras (MALDI) e espectrometria de massa por tempo de voo (TOF) e vem sendo considerada uma alternativa rápida para a identificação de espécies bacterianas muito utilizada e aplicada com sucesso para identificar vários microorganismos. É baseada na detecção do peso molecular das moléculas celulares mais abundantes (proteínas e peptídeos) e utiliza da informação obtida pelo espectrômetro de massa para identificar os organismos. Os espectros de massa gerados são como uma impressão digital para um organismo particular (STETS et al. 2013),

Perante o grande potencial das PGPBs como alternativa viável de desenvolvimento da produção agrícola sem aumentar as áreas de produção ou o uso de agroquímicos, é indispensável a compreensão do papel dessas bactérias no solo e na raiz de plantas de alto consumo, como o trigo, visando a influências de diferentes doses de N na comunidade diazotrófica e da aplicação de inoculante e em um sistema de plantio com rotatividade de culturas. Dessa forma, o isolamento, a caracterização bioquímica e a identificação dessas PGPBs são de extrema importância para compreender seu papel no ecossistema.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto do uso do fertilizante nitrogenado e do biofertilizante na estrutura e na função da comunidade bacteriana rizosférica e endofítica do trigo;

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar PGPBs da rizosfera e das raízes do trigo;
- Avaliar a densidade populacional de diazotrofos associativos e simbióticos;
- Caracterizar a diversidade funcional das bactérias isoladas quanto à capacidade de solubilizar minerais e produzir protease, ácido indol acético, sideróforo, cianeto e celulase.
- Agrupar taxonomicamente os isolados por Perfis de espectrometria de massa (MALDI-TOF).

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAL

Plantas de trigo TBIO Iguaçu na fase de início do perfilhamento foram cultivadas em condições de campo na Fazenda Santa Cruz (25°13' S; 50°07' W), Ponta Grossa/Pr, na presença de quatro condições de nitrogênio (0, 40, 80 e 120 kg/ha de N) e na presença ou ausência do inoculante comercial Azototal®, contendo *A. brasilense* AbV5/ AbV6 em três blocos, totalizando 24 amostras. Após 46 dias do plantio as diferentes doses de N foram aplicadas sobre as plantas, e após 10 dias dessa aplicação, foram coletadas em três diferentes pontos de cada parcela, dois deles utilizados para esta pesquisa e o restante armazenado em freezer para análises posteriores.

4.1.1 Histórico da Área

Desde 2012 é feita a sucessão de culturas aveia preta-milho-trigo-soja em uma área que está há longo período no sistema de plantio direto (> 30 anos) do município de Ponta Grossa. O delineamento experimental foi realizado em blocos ao acaso em parcelas subdivididas, com três repetições. Nas parcelas (64,0 m × 6,5 m) foram empregados dois tratamentos de sementes, sem e com inoculação de *Azospirillum brasilense*. No tratamento das sementes de trigo foi utilizando inoculante líquido comercial Azototal®, contendo as estirpes AbV5/AbV6, desenvolvido pela parceria entre a EMBRAPA-SOJA e a Total Biotecnologia. Nas subparcelas (8,0 m × 6,5 m) foram empregadas três doses de N-ureia em cobertura, além de um tratamento controle sem N em cobertura.

As doses e as épocas de aplicação de N em cobertura para a sucessão aveia-milho-trigo-soja são: 40, 80 e 120 kg N ha⁻¹, por ocasião do perfilhamento da cultura do trigo. O trigo foi semeado após o milho, no espaçamento de 0,17 m entre as linhas, para uma população entre 250 e 300 plantas por m².

Para o milho as doses de N são: 80, 160 e 240 kg N ha⁻¹, no estágio de desenvolvimento V₄ (quatro folhas completamente expandidas) dessa cultura. E 25, 50 e 75 kg N ha⁻¹, no fim do florescimento da cultura da soja. O milho foi semeado após o cultivo de aveia preta, no espaçamento de 0,5 m entre as linhas, para uma

população entre 7,5 e 7,8 plantas por m². A soja foi semeada após o trigo, no espaçamento de 0,45 m entre as linhas, para uma população de entre 26 e 30 plantas por m².

4.2 PREPARO DO MATERIAL

O solo aderido às raízes foi retirado e seco ao ar em uma temperatura de 28 a 30°, protegido da luz, poeira e ventos. Após aproximadamente dez dias, foram peneirados, sendo a partir de então denominadas de terra fina seca ao ar (TFSA) e armazenadas em pacotes de papel craft, à 20 a 25°C e ao abrigo da luz até o momento das análises (adaptado de DONAGEMA, 2011).

As raízes foram lavadas em água corrente e desinfestadas com água destilada autoclavada (dH₂O) por 30 segundos, etanol 95% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 6% por 15 minutos, etanol absoluto por 30 segundos e H₂O MiliQ autoclavada por 30 segundos (MANter et al., 2010), secas com papel germitest autoclavado e trituradas com 90 mL de solução salina, na proporção 1:1, conforme DOBEREINER et al. (1995).

4.3 CONTAGEM DE MICRORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS

Do triturado de raízes 1,0 mL foi retirado e adicionado a um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina (NaCl 0,85%) e foram obtidas diluições seriadas até diluição 10⁻⁵ sendo feitas em 2 baterias denominadas A e B. Alíquotas 0,1 mL de cada diluição foram inoculadas em 3 mL em 4 meios semi sólidos: JNFb, NFb, JMV e LGI (tabela 01), em triplicatas para cada diluição (DOBEREINER, et al., 1995; MAPA, 2010).

Os meios semi sólido são livres de N para que os isolados consigam fixar N do ambiente e são semi seletivos para alguns diazotrofos: o meio JNFb é para efetuar o isolamento de *Herbaspirillum spp*, o meio NFb é semi seletivo para efetuar o isolamento *Azospirillum spp*, o meio JMV é utilizado para o isolamento e purificação de bactérias diazotróficas principalmente *Burkholderia brasilensis* e o meio LGI é semi seletivo para isolamento de *Azospirillum amazonense*.

Das amostras de solo 10 g de TFSA foram pesadas e acondicionadas em placas de Petri esterilizadas, sendo adicionados 2 mL de dH_2O , e incubadas a 28°C por 48 horas. Após o período de incubação as amostras foram transferidas para frascos e adicionado 90 mL de solução salina (NaCl 0,85%), agitado por 20min, e foram obtidas diluições seriadas até a diluição 10^{-6} sendo 0,1 mL de cada diluição inoculado em 3 mL de cada um dos meios semi sólidos (tabela 01), em triplicatas para cada diluição (DOBEREINER, et al., 1995; MAPA, 2010).

Para a contagem de diazotrofos foi aplicada a metodologia descrita por Dobreiner et al. (1999), através do Número Mais Provável (NMP), para bactérias diazotróficas associativas promotoras do crescimento de plantas, endofíticas e rizosféricas, o qual implica que a formação de película característica de organismos diazotróficos associativos atribui caráter positivo ao teste (figura 05), enquanto que a ausência da película aponta para um caráter negativo a este teste, e para verificar a sua eficácia a última diluição tem de apresentar todas as replicatas negativas, evitando a subestimação do resultado (MAPA, 2010), determinando assim a atividade da FBN, e estes foram selecionados para as demais caracterizações bioquímicas.

Figura 5- Película formada pelos organismos diazotrofos



Fonte: a autora

A partir da inoculação, o teste demanda cinco a dez dias para sua conclusão. Para avaliação desse teste utilizamos a tabela de MacCrady (DOBEREINER et al., 1995), que se baseia na quantidade de triplicatas que formaram películas por diluição (D1, D2 e D3) e atribui valores para essa quantidade através de uma tabela (ex: 3 frascos positivos da diluição -2, 2 frascos positivos da diluição -3, 1 frasco positivo da diluição -4 = 321, verifica esse valor na tabela= 15,0) para estimar o valor real de células por grama se utiliza da seguinte fórmula:

$$\text{n}^\circ \text{ de células/g de solo/raiz} = n \times d \times f$$

No qual **n** é o NMP tabelado, **d** a menor diluição da série empregada e **f** o fator da diluição, de acordo MAPA, 2010.

Tabela 1 - Composição dos meios de culturas

Composto	Quantidade (mL,g)/Litro				
	Nfb	JMV	JNfb	LGI	DIGS
Ácido Málico	5 g	-	5 g	-	2 g
Ácido Glutâmico	-	-	-	-	1,5 g
Glicose	-	-	-	-	2 g
Açúcar cristal	-	-	-	5 g	-
Manitol	-	5 g	-	-	-
Fosfato de Potássio Dibásico	-	-	-	-	0,5 g
Sulfato de Magnésio Hidratado	-	-	-	-	0,5 g
Solução de Magnésio Hidratado a 10%	-	2 mL	-	-	-
Solução de Sulfato de Magnésio Heptahidratado a 10%	2 mL	-	2 mL	2 mL	-
Solução de Fosfato de Potássio Monobásico a 10%	-	18 mL	18 mL	6 mL	-
Solução de Fosfato de Potássio Dibásico a 10%	5 mL	6 mL	6 mL	2 mL	-
Solução de Cloreto de Sódio a 10%	-	1 mL	1 mL	-	-
Solução de Cloreto de Cálcio Dihidratado a 1%	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	-
Solução de Molibdato de Sódio Dihidratado	-	-	-	2 mL	-
Azul de Bromotimol a 0,5% em 0,2 de KOH4	2 mL	2 mL	2 mL	5 mL	-
Solução de Cloreto Férrico Hex hidratado	-	-	-	1 mL	-
Solução de Micronutrientes para Meio de Cultura*	2 mL	2 mL	2 mL	-	-
Solução EDTA de Ferro a 1,64%	4 mL	4 mL	4 mL	-	-
Solução de Vitaminas para meio de cultura**	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	-
Nitrato de Potássio	-	-	-	1 g	-
Hidróxido de Potássio	4,5 g	-	4,5 g	-	-
Extrato de Levedura para meio sólido	50 mg	100 mg	20 mg	0,02 g	2 g
Peptona Bacteriológica	-	-	-	-	2 g
Ágar para meio sólido	15g	25 g	17 g	15 g	15 g
Ágar para meio semi sólido	1,8 g	2,1 g	1,9 g	1,8 g	-
pH	6,5	4,2-4,5	5,8	6,0-6,2	6,0 -6,8

* De acordo com a Tabela 2

** **Solução de Vitaminas para meio de cultura:** Biotina 100 mg/L.

Tabela 2 - Solução de Micronutrientes para meio de cultura

Composto	Concentração na solução (g/L)	Volume 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

4.4 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS

O isolamento foi feito seguindo as técnicas descritas por Döbereiner et al. (1999), na qual, as amostras que demonstraram caráter positivo para a formação de película foram repicadas para novos frascos contendo meios semi sólidos que apresentaram crescimento. Após a 2ª repicagem, estas foram riscadas em placas de petri com meio sólido específico para cada diazotrófico.

Para estocagem, uma colônia isolada de cada placa de petri foi crescida separadamente em frascos contendo meio DIGS líquido, e após 24hs de crescimento, 1 mL de cada frasco foi transferido para diferentes micro tubos, que após separação e retirada do meio foi acrescentado 0,5 mL de glicerol 50% e acondicionadas no freezer a -20°C.

4.5 CONTAGEM DE RIZÓBIOS DO SOLO

Para a contagem de Rizóbios pelo NMP foi utilizada como planta-isca: Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) segundo Dall'Angol (2016). As sementes foram desinfestadas com etanol absoluto por 30 segundos, hipoclorito de sódio comercial à 1% por 3 minutos e lavagem com dH₂O por aproximadamente 20 vezes, e foram colocadas para germinação em placa contendo ágar 0,5% e colocado na estufa à 28°C por 4 dias.

As plantas pré germinadas foram colocadas em sacos de polipropileno em uma abertura destinada, contendo papel germitest autoclavado e acrescentado 250 mL de solução nutritiva de Norris (figura 04) (BROUGHTON e DILWORTH, 1971). Foram dispostos em uma caixa e colocados em casa de vegetação

Os sacos de polipropileno tem uma espessura em torno de 0,12 mm, e as dimensões médias de base e altura de, aproximadamente, 130 x 140 mm, o papel

para germinação tem comprimento e largura de, aproximadamente, 230 x 120 mm e foi dobrado e perfurado para abrigar as sementes pré-germinadas. O solo foi incubado e diluído, após 2 dias da colocação dos saquinhos na casa de vegetação, alíquotas de 1,0 mL das diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} foram inoculadas em quadriplicata, nas plantas pré germinadas nos sacos (HUNGRIA e ARAUJO, 1994; MAPA, 2010), o controle positivo utilizado foi inoculando 1 mL do crescido da bactéria *Rhizobium tropici*.

A contagem pelo NMP foi feita a partir do aparecimento de nódulos, os quais conferem positividade ao teste seguindo a tabela adaptado de Andrade e Hamakawa, 1994, modificado de Cochran, 1950 (MAPA, 2010).

Figura 6- Sacos de polipropileno com planta pré- germinada e solução nutritiva



Fonte: a autora

4.6 CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS TOTAIS

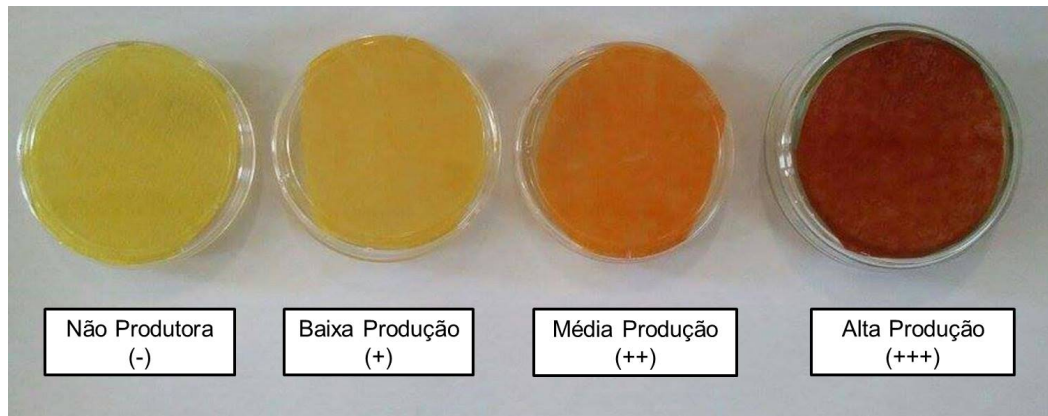
Alíquotas de 10 μ das diluições de solo e das raízes foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio NFb e DIGS em microgota, com três repetições cada, segundo Miles et. al, 1938. Porém como não houve isolamento em maiores diluições utilizamos da técnica de espalhamento em placa, segundo Mapa (2010), que consiste em uma alíquota de 100 μ L espalhadas uniformemente sobre a placa contendo meio de cultura (NFb e DIGS) e fungicida Vitavax 0,002M com o auxílio de um bastão de vidro, da diluição 10^{-3} para contagem e da diluição 10^{-5} , para isolamento das colônias bacterianas.

4.7 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS ISOLADOS

Após a seleção das bactérias diazotróficas, os isolados que se encontravam em estoque foram submetidos à análises bioquímicas, os quais foram cultivados em meio DIGS líquido à 30°C sob agitação de 180 rpm.

4.7.1 Produção de Ácido Cianídrico

Para a avaliarmos da produção de cianeto utilizamos a metodologia descrita por Lorck (1948), no qual os inóculos dos isolados bacterianos foram crescidos em DIGS líquido, em seguida foram inoculados em placas de 49x12mm em triplicata, no qual continha 10 mL de meio ágar nutriente enriquecido com solução de glicina (concentração final 4,4 g/L) (tabelas 03, 04 e 05). Em seguida as placas foram invertidas e colocado o papel germitest autoclavado sem qualquer contato com o meio de cultura, e posteriormente umedecido com 500 μ L de solução ácido pícrico (0,5%) filtrada. As placas foram incubadas por 48h a 30°C. A presença de HCN foi indicada pela alteração da coloração do papel germitest que indica a formação do ácido isopurpúrico no papel. A produção de colorações obtidas do amarelo para o vermelho tijolo indicam a intensidade da produção de cianeto (figura 06).

Figura 7- Produção de Cianeto. Produção de Cianeto

Fonte: a autora

Nota: Padrão de coloração sugere a formação de ácido isopurpúrico. Ausência de produção: amarelo claro (-); baixa produção: amarelo escuro (+); média produção: laranjado (++); alta produção: vermelho tijolo (+++).

Tabela 3 - Composição do meio para Cianeto

Composto	Quantidade (mL, g)/L
Ágar	15 g
Extrato de carne	5 g
Peptona bacteriológica	10 g
Cloreto de Sódio	5 g
Solução de Glicina*	4,4 g

* De acordo com a tabela 4;

Tabela 4 - Composição da solução de glicina

Componente	Quantidade	Volume da solução adicionado ao meio (p/ uma placa com 10 mL)
Glicina	1,32 g	0,33 µL
H ₂ O ultrapura	100mL	

Tabela 5 - Composição da solução de ácido pícrico

Componente	Quantidade
ácido pícrico	0,5g
NaCO ₃	2g
H ₂ O Milli-Q	100mL

4.7.2 Produção de Protease

A produção de protease foi testada como descrito por Smibert e Krieg (1994), utilizando ágar e leite desnatado autoclavado. As duas soluções foram misturadas e distribuídas em placas de petri na proporção 1:1, os isolados foram inoculados nas placas as quais foram mantidas em estufa à 30 °C por 2 dias, em seguida foi realizada a leitura que se baseia no princípio de que a protease produzida pelas bactérias degrada as proteínas presentes no leite formando halo claro contra o fundo branco (figura 08). As bactérias que apresentaram essa característica foram consideradas positivas para produção de protease.

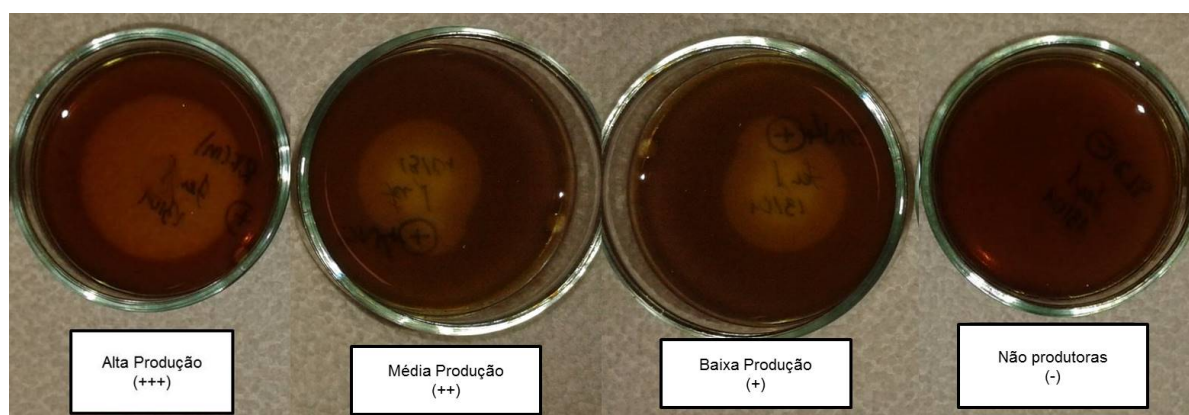
Figura 8- Produção de Protease

Fonte: a autora

Nota: Bactérias que apresentaram caráter positivo para produção de protease formam halo claro ao redor das colônias.

4.7.3 Produção de Celulase

Para a determinação da produção de celulase, utilizamos a metodologia descrita por Kasana et al. (2008) adaptada, utilizando como corante o iodo de Gram. Os isolados crescidos foram inoculados em placas (150x15mm) em triplicata contendo meio enriquecido com celulose (tabela 06). As placas foram incubadas por 5 dias e após esse período foram vertidos sobre o meio de cultivo com colônias crescidas 5 mL de solução corante iodo de Gram. Após 20 minutos a solução corante foi descartada e a degradação de celulose pode ser evidenciada pela presença de halos claros ao redor das colônias (figura 09).

Figura 9- Produção de celulase

Fonte: a autora

Nota: Não Produtoras (-); baixa produção (+); média produção (++); alta produção (+++).

Tabela 6 - Composição do meio para produção de Celulase

Composto	Quantidade (mL, g)/L
Ágar	17 g
Peptona bacteriológica	0,2 g
Nitrato de sódio	0,20 g
Sulfato de Magnésio	0,5 g
Cloreto de Potássio	0,5 g
Fosfato de Potássio Di-básico	0,10 g
H2O Milli-Q	1000 ml
Celulose	0,20 g

4.7.4 Solubilização de Minerais

A capacidade de solubilizar minerais foi analisada utilizando a metodologia descrita por Pikoskaya (1948), enriquecido com óxido de zinco 12%. Os isolados foram inoculados em placa contendo ágar Pikovskaya adicionado 0,25ml de óxido de zinco. Após plaqueadas, as bactérias foram incubadas a 30°C por 7 dias. Os organismos solubilizadores foram detectados pelo aparecimento de um halo claro em torno das colônias, contra um fundo opaco (figura 10). O diâmetro do halo de solubilização e das colônias foram medidos afim de fazer uma análise qualitativa do grau de solubilização, sendo observados ao terceiro e sétimo dia para obter o Índices de Solubili-

zação (IS) para cada isolado através da fórmula: $IS = \text{diâmetro do Halo (mm)} / \text{diâmetro da Colônia (mm)}$, e referente ao dia em que apresentaram crescimento precoce ou tardio (figura 05) (BERRAQUERO; BAYA; CORMENZANA, 1976).

Figura 10- Solubilizadores



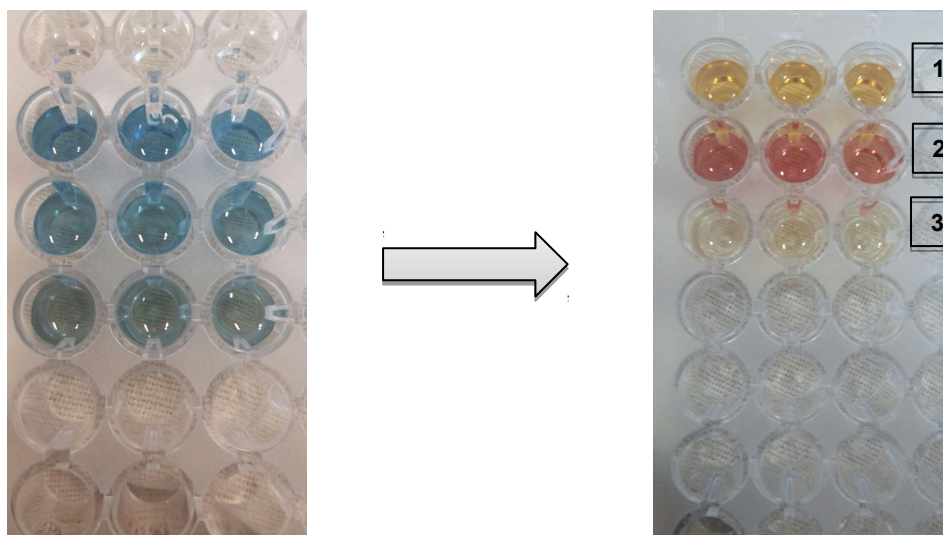
Fonte: a autora

Nota: Halo formado pelos isolados com capacidade de solubilizar minerais (fosfato e zinco).

4.7.5 Produção e Quantificação do Ácido Indol Acético (AIA)

A análise para a determinação dos isolados capazes de produzir AIA foi realizada conforme descrito por Glickmann e Dessaux (1995). Essa análise foi feita em 2 etapas: a quantificação para mensuração da atividade do AIA e a quantificação de proteínas totais (BRADFORD, 1976).

A quantificação para mensuração da atividade do AIA foi feita através de uma curva padrão (zero a 200µM) a partir de uma solução estoque de AIA (5 mM). A reação de uma solução de AIA com o reagente de Salkowski resulta coloração amarelada para o teste negativo e rosa avermelhado para o teste positivo (figura 11).

Figura 11- Reagente de Salkowski**Fonte:** a autora

Nota: Amostras dispostas na placa de ELISA (esquerda) e adicionado reagente de Salkowski com mudança de coloração (direita): 1 positivo; 2 negativo; 3 branco;

As bactérias foram inoculadas em meio Digs (tabela 01) com triptofano (0,5 g/L), e cultivadas à 30°C, por 24 horas, sob agitação de 180 rpm. Uma alíquota de 1,5 mL de cada amostra foi transferida para 1 micro tubo e centrifugada à 13000 rpm por 1 minuto. 1 mL do sobrenadante foram transferidos para novos micro tubos e adicionado 1 mL do reagente R1 (tabela 07), e reservado a 30 min em ambiente protegido da luz. O precipitado foi guardado para posterior quantificação do teor de proteínas.

A leitura da absorbância foi feita em seguida em 540 nm; o resultado foi obtido em uM de AIA produzido. Foi utilizado como branco 1mL de meio digs + 1 mL de reagente R1.

Para a curva de calibração utilizamos AIA comercial, diluído em etanol Merk absoluto para concentração de 50K (50.000 µM). Foram adicionados aos tubos de ensaio meio Digs + AIA + R1 (tabelas 01 e 07) e realizado a leitura da absorbância à 540 nm.

A quantificação de proteínas foi realizada utilizando o reagente de Bradford filtrado e NaOH 0,2 M. O precipitado do micro tubo foi ressuspendido em vortex e adicionado a placa de Elisa 20 µL desse material, 80 µL de água MiliQ autoclavada e 100 µL de NaOH 0,2 M. O tubo foi incubado por 1 hora à temperatura ambiente, e transferido 20 µL da reação anterior a uma nova placa de Elisa na qual foi

adicionado 200 µL do reagente de bradford (filtrado). A leitura foi realizada em 595 nm. O resultado foi medido em µg de proteína.

A concentração de proteína das amostras foi determinada conforme BRADFORD (1976), adaptado para condições de realização do teste em placas de ELISA de 96 poços descritas por SCHWAB (2006). A determinação da concentração de proteína produzida pelas bactérias foi feita através de curva padrão (zero a 50ug/mL) de BSA (albumina de soro bovino) a partir de uma solução de estoque de 500 µg/mL. As amostras foram descongeladas e homogeneizadas o conteúdo celular em agitador vortex, do qual 20 µl foram adicionados na placa com 80 µl de água MiliQ autoclavada e 100 µl de NaOH 0,2 M, deixando decorrer a lise celular, por 1h, à temperatura ambiente, realizado em quadriplicata. Em seguida, 20 µl deste material foram transferidos para outra placa de elisa e adicionado 200 µl do reagente de Bradford filtrado, a mistura foi levada a homogeneização e feita a leitura em comprimento de onda de 595 nm.

O resultado final foi através da divisão do resultado obtido com a quantificação do AIA pelo valor da quantificação de proteínas em µM de AIA/µg de proteína.

Tabela 7 - Reagente R1 AIA

Componente	Quantidade
H ₂ SO ₄ 7,9M	43,65 mL
H ₂ O Milli-Q	56,35 mL
FeCl ₃	1,2 g

***Deve ser preparado dentro da capela e acondicionado em frasco coberto com papel alumínio e em geladeira.

4.7.6 Produção de Sideróforos

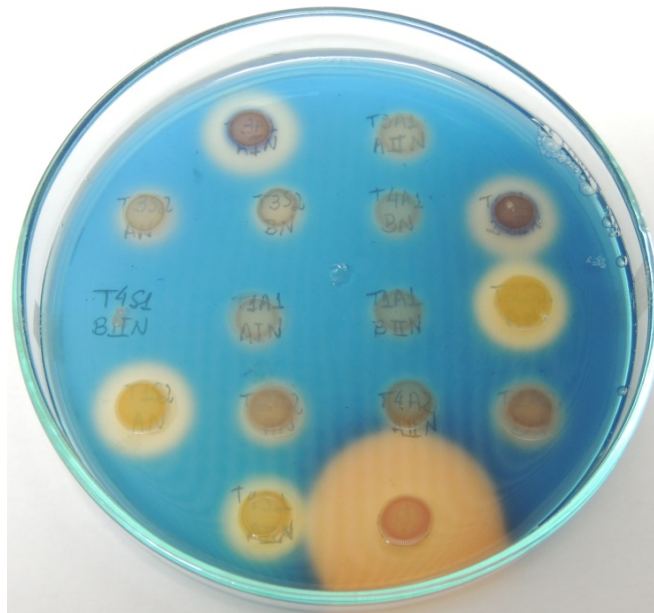
A metodologia utilizada para a detecção de sideróforos foi aquela descrita por Schwyn e Neilands (1987), em placas contendo meio *Chrome Azurol S* (CAS-Ágar contendo Ferro III) (tabelas 08 e 09), no qual a produção de sideróforos foi detectada pela formação de halos amarelos em torno das colônias (figura 12).

O teste CAS se baseia na quelação do ferro por sideróforos e é detectado pela mudança de cor do complexo CAS-ferro após a quelação de ferro atrelada pelos sideróforos (SCHWYN; NEILANDS, 1987), sendo que quando um agente quelante,

como o sideróforo, retira o Fe (III) do complexo indicador universal de sideróforos (CAS), ocorre mudança na coloração de azul para púrpura, ou de azul para cor de laranja.

As soluções foram mantidas aquecidas em banho maria, o meio foi agitado e distribuído cuidadosamente e imediatamente após seu preparo, em placas de petri. Foram inoculado 5µL dos isolados nas placas preparadas e observado a formação de halos ao redor das colônias.

Figura 12- Produção de Sideróforos



Fonte: a autora

Nota: Halo formado pelos isolados produtores de sideróforos.

Tabela 8 - Composição do meio para Sideróforos

Composto	Quantidade (mL, g)/L p/ 4 placas
Ágar + PI- PES**	7,5 mL
Solução Mg- SO ₄ **	0,2 mL
Solução Ca- Cl ₂ **	0,01 mL
Solução Su- crose**	1 mL
Sais MM9 10x**	10 mL
CAS+Solução FeCl HCl**	6 mL
CTAB**	4 mL

** De acordo com a tabela 8;

Tabela 9 - Composição das soluções para Sideróforo

	FeCl₃ 6H₂O + HCl	MgSO₄ 1M	CaCl₂ 1M	Sucrose 20%	10 x MM9 salts	CAS+FeCl₃	CTAB	Meio Base
Componente	Quantidade							
FeCl ₃ 6H ₂ O *	0.0027 g	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ O destilada	9.917mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	50 mL	40 mL	1000 mL
HCL 12.1 M	0.083	-	-	-	-	-	-	-
MgSO ₄ 1M	-	12.037 g	-	-	-	-	-	-
CaCl ₂ 2H ₂ O	-	-	14.7 g	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	20 g	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄	-	-	-	-	3 g	-	-	-
NaCl	-	-	-	-	5 g	-	-	-
NH ₄ Cl	-	-	-	-	1 g	-	-	-
Chrome Azurol S	-	-	-	-	-	0.6050 g	-	-
FeCl ₃ 6H ₂ O + HCl	-	-	-	-	-	10 ml	-	-
CTAB	-	-	-	-	-	-	0.729 g	-
Ágar	-	-	-	-	-	-	-	15 g
PIPES	-	-	-	-	-	-	-	30.24 g
NaOH 50% w/w	-	-	-	-	-	-	-	0.8 ml

* Solução FeCl₃ 6H₂O armazenar em frasco de polietileno
pH_{final} = 6.8 (pKa de solubilização do Pipes).

4.8 ESPECTROMETRIA DE MASSA DO TIPO MALDI-TOF

A análise de espectrometria de massa foi adaptada da metodologia descrita por Stets, et al. (2013). Os isolados que apresentaram 3 atividades bioquímicas ou mais foram selecionados para esta análise. Foram cultivados em meio DIGS líquido (tabela 01), à 30°C sob agitação de 180 rpm. Após 24hs de cultivo, as bactérias foram inoculadas em placa com meio DIGS sólido (tabela 01) e incubadas em estufa a 30°C. Uma pequena quantidade uniforme da massa celular foi coletada e colocada em um micro tubo de 1,5 µL em triplicata.

A massa bacteriana passou por 2 lavagens consecutivas com 1 mL de água ultrapura esterilizada, e centrifugadas a 13.500rpm por 2 minutos. Foram adicionados 5 µL de ácido fórmico 70% e 5 µL de acetonitrila e ressuspensão o precipitado centrifugados a 13.500rpm por 2 minutos e passados 8µL para o um novo micro tubo. As amostras foram congeladas amostras até o momento de leitura.

Para leitura das amostras, 1 µL do tubo foi adicionado na placa metálica para análise no espectrômetro de massa e seca à temperatura ambiente. Em seguida, 1

μL da matriz (solução saturada contendo aproximadamente 10 mg/mL de α -ciano-4-ácido hidroxicinâmico em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 2,5%) foi depositada sobre a amostra. Após a secagem a placa foi adicionada ao espectrômetro de massa.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística, os valores de NMP utilizados foram da inoculação inicial do solo da rizosfera e das raízes do trigo, os dados foram transformados em $\text{LOG} + 1$ (JAHNEL, et al., 1999) e utilizado o programa estatístico ASSISTAT (SILVA, 2009), através do teste de variância ANOVA com análise de experimento em parcelas subdivididas, seguido do teste de Tukey quando houve significância.

5 RESULTADOS

5.1 DIVERSIDADE FUNCIONAL DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ISOLADAS DO TRIGO TRATADO COM BIOFERTILIZANTE E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FERTILIZANTE NITROGENADO

Resumo

Bactérias Promotoras do crescimento vegetal possuem a capacidade de estimular o crescimento vegetal e promover proteção a planta hospedeira, reduzindo o uso de fertilizantes nitrogenado e o impacto ambiental causado pelas práticas agrícolas. Foram analisados se diferentes doses de nitrogênio e a presença ou ausência do inoculante contendo *Azospirillum brasilense*, podem interferir na população diazotrófica, NMP, presente na rizosfera e na raiz do trigo em sistema de rotação de cultura. Os 80 isolados obtidos a partir da raiz do trigo e os 193 obtidos a partir da rizosfera a partir da utilização dos meios NFb, JNFb, JMV e LGI, foram submetidos a testes bioquímicos para verificar a capacidade de produção de sideróforos, protease, AIA, cianeto e celulase e solubilização de fosfato para avaliarmos o potencial de promotor do crescimento vegetal dessas bactérias. Os diferentes tratamentos não interferiram no NMP encontrado tanto na rizosfera quanto nas raízes de trigo. A presença do inoculante se mostrou mais elevada no isolamento do meio JMV dos endofíticos e no NFb e LGI rizosféricos. As diferentes doses de N não interferiram na população nos diferentes meios. Dos isolados endofíticos destacamos 25 que apresentaram 3 atividades bioquímicas ou mais, dentre esses 2 realizam todas as atividades bioquímicas. Estes foram submetidos a quantificação do AIA em que 01 isolado se destacou por ser alto produtor deste indólito. Quanto aos rizosféricos, 43 se destacaram por realizar 3 atividades bioquímicas ou mais, e submetidos a quantificação do AIA 5 eles apresentaram alta produção. Os isolados que se destacaram foram submetidos a espectrometria de massa (MALDI-TOF). O dendograma dos isolados mostrou que isolados de mesmo meio e tratamento apresentam melhor agrupamento os quais serão futuramente identificados.

Palavras-chave: Inoculante, doses de Nitrogênio, NMP.

5.1.1 Introdução

O trigo (*Triticum* sp) é um cereal de grande importância, utilizado diariamente visando a grande demanda desse grão, tem-se a necessidade de produção em escalas cada vez maiores. Levando os agricultores a fazerem uso de agroquímicos, como a fertilização nitrogenada. Porém, o uso contínuo desses fertilizantes trazem consequências não benéficas, causando grandes danos ambientais além de aumentar significativamente os custos de plantio (PASINATO et. al, 2014; FOLEY et al., 2011).

Uma alternativa viável para solucionar ambas as situações é a utilização de bactérias que realizam a promoção do crescimento vegetal. O uso dessas bactérias, além de suprir as necessidades das plantas, diminui consideravelmente a utilização de fertilizantes nitrogenados, o que, por consequência minimiza os danos ambientais e reduz os custos de produção.

As bactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPBs) podem ser encontradas na rizosfera, no *bulk soil* e nos interior de tecido das plantas e contribuem para o desenvolvimento da planta através da fixação biológica do nitrogênio (FBN) e sua capacidade de produzir hormônios, compostos e enzimas que fornecem ações benéficas (HUNGRIA, 2010).

São capazes de produzir cianeto, o qual é eficaz na ação contra patógenos; de produzir sideróforos que complexa metais como o ferro, o qual faz parte de uma enzima auxiliar na conversão do nitrogênio em amônia. São capazes de solubilizar fosfato e produzir AIA, que afetam diretamente o crescimento das plantas, produzir enzimas como a celulase que decompõe resíduos celulósicos e a protease, que combate os microrganismos fitopatógenos (FALESTRINO, 2013).

Apesar da imensa diversidade de PGPBs, poucos são utilizados na agricultura, e embora os avanços nessa área sejam constanes, ainda se conhece pouco sobre a identidade, diversidade e densidade populacional destes microrganismos em diferentes plantas (VIDEIRA, et al., 2007).

Considerando a gama de diversidade e aplicações em que os microrganismos estão envolvidos, cada vez mais havendo a necessidade de estudá-los e explorá-los, e através da utilização de metodologias com o objetivo de caracterizar e identificar bactérias, mesmo sendo um grande desafio, tendo em vista a grande diversidade existente.

Perante o grande potencial das PGPBs como alternativa viável de desenvolvimento da produção agrícola sem aumentar as áreas de produção ou o uso de agroquímicos, é indispensável a compreensão do papel dessas bactérias no solo e na raiz de plantas de alto consumo, como o trigo. Dessa forma, o isolamento, a caracterização bioquímica e a identificação dessas PGPBs são de extrema importância para compreender seu papel no ecossistema.

Assim, esse estudo teve por objetivos: (i) Avaliar o impacto da introdução de N e de *Azospirillum brasilense* na comunidade rizosférica e endofítica do trigo ou estrutura populacional microbiana; (ii) Isolar PGPBs da rizosfera e das raízes do trigo; (iii) Avaliar a densidade populacional de diazotrofos associativos e simbióticos; (iv) Caracterizar a diversidade funcional das bactérias isoladas quanto à capacidade de solubilizar minerais e produzir protease, ácido indol acético, sideróforo, cianeto e celulase; (vi) Identificar taxonomicamente os isolados por Perfis de espectrometria de massa (MALDI-TOF).

5.1.2 Material e Métodos

Material

Plantas de trigo TBIO Iguaçu na fase de início do perfilhamento cultivadas em condições de campo na Fazenda Santa Cruz (25°13' S; 50°07' W), Ponta Grossa/Pr, na presença de quatro condições de nitrogênio (0, 40, 80 e 120 kg/ha de N) e na presença ou ausência do inoculante comercial Azototal®, contendo *A. brasilense* AbV5/ AbV6.

O solo aderido às raízes foi retirado e seco em uma temperatura de 28 a 30°, protegido da luz, poeira e ventos peneirados, sendo a partir de então denominadas de terra fina seca ao ar (TFSA) e armazenadas até o momento das análises (adaptado de DONAGEMA, 2011). As raízes foram lavadas em água corrente e desinfestadas segundo Manter et al., 2010, secas com papel germitest autoclavado e trituradas com 90 mL de solução salina, conforme DOBEREINER et al. (1995).

Contagem de Microrganismos Diazotróficos

Do triturado de raízes 1,0 mL foi retirado e adicionado a um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina (NaCl 0,85%) e foram obtidas diluições seriadas até diluição 10^{-5} sendo feitas em 2 baterias denominadas A e B. Alíquotas 0,1 mL de cada

diluição em triplicata foram inoculada em 3 mL nos meios semi sólidos JNFb, NFb, JMV e LGI (DOBEREINER, et al., 1995; MAPA, 2010).

Das amostras de solo 10 g de TFSA foram pesadas e acondicionadas em placas de Petri esterilizadas, sendo adicionados 2 mL de dH_2O , e incubadas a 28°C por 48 horas. As amostra foram transferida para frascos e adicionado 90 mL de solução salina (NaCl 0,85%), e realizada diluição seriada até a diluição 10^{-6} sendo 0,1 mL de cada diluição inoculado em 3 mL dos meio, em triplicatas para cada diluição (DOBEREINER, et al., 1995; MAPA, 2010).

A contagem do diazotrofos pelo Número Mais Provável (NMP) conforme descrito por DOBEREINER et al. (1999) no qual se baseia na formação de película característica de organismos diazotróficos associativos (MAPA, 2010), determinando assim a atividade da FBN, os quais serão selecionados para demais atividades bioquímicas. Para avaliação desse teste utilizamos a tabela de MacCrady (DOBEREINER et al., 1995), conforme MAPA, 2010.

O isolamento foi feito seguindo as técnicas descritas por Döbereiner et al. (1999), na qual, as amostras que apresentaram a formação de película foram repicadas para novos frascos contendo meios semi sólidos que apresentaram crescimento. Após a 2ª repicagem, estas foram riscadas em placas de petri com meio sólido específico para cada diazotrófico.

Contagem de Rizóbios do solo

Para a contagem de Rizóbios pelo NMP foi utilizada como planta-isca: Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). As sementes foram desinfestadas com etanol absoluto por 30 segundos, hipoclorito de sódio comercial à 1% por 3 minutos e lavagem com dH_2O por aproximadamente 20 vezes, e foram colocadas para germinação em placa contendo ágar 0,5% e colocado na estufa à 28°C por 4 dias.

As plantas pré germinadas foram colocadas em sacos de polipropileno em uma abertura destinada, contendo papel germitest autoclavado e acrescentado 250 mL de solução nutritiva de Norris (BROUGHTON e DILWORTH, 1971). Foram dispostos em uma caixa e colocados em casa de vegetação

O solo foi incubado e diluído, após 2 dias da colocação dos saquinhos na casa de vegetação, alíquotas de 1,0 mL das diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} foram inoculadas em quadriplicata, nas plantas pré germinadas nos sacos (HUNGRIA e ARAUJO, 1994; MAPA, 2010), o controle positivo utilizado foi inoculando 1 mL do crescido da

bactéria *Rhizobium tropici*.

A contagem pelo NMP foi feita a partir do aparecimento de nódulos, os quais conferem positividade ao teste seguindo a tabela adaptado de Andrade e Hamakawa, 1994, modificado de Cochran, 1950 (MAPA, 2010). Após o aparecimento dos nódulos, estes foram coletados e desinfestados conforme Hungria e Araújo (1994), estocados.

Crescimento de Bactérias Totais

Foi utilizado a técnica de espalhamento em placa, segundo Mapa (2010), que consiste em uma alíquota de 100 µL espalhadas uniformemente sobre a placa contendo meio de cultura (NFb e DIGS) e Vitavax 0,002M com o auxílio de um bastão de vidro, da diluição 10^{-3} para contagem e da diluição 10^{-5} , para isolamento das colônias bacterianas.

Caracterização bioquímica dos isolados

Após a seleção das bactérias diazotróficas, os isolados que se encontravam em estoque foram submetidos à análises bioquímicas, os quais foram crescidos em meio DIGS líquido à 30°C sob agitação de 180 rpm.

Produção de Ácido cianídrico

A produção de cianeto foi avaliada utilizando a metodologia descrita por Lorck (1948), no qual os inóculos dos isolados bacterianos foram crescidos em DIGS líquido, em seguida foram inoculados em placas contendo meio ágar nutriente enriquecido com solução de glicina. Em seguida foi colocado papel germitest umedecido com 500 µL de solução ácido pícrico (0,5%). As placas foram incubadas por 48h a 30°C. A presença de HCN foi indicada pela alteração da coloração do papel germitest que indica a formação do ácido isopurpúrico no papel. As diferentes colorações obtidas do amarelo para o vermelho tijolo indicam a intensidade da produção de cianeto.

Produção de protease

A atividade da produção de protease foi testada como descrito por Smibert e Krieg (1994), utilizando ágar e leite desnatado autoclavado. As duas soluções foram misturadas e distribuídas em placas de petri, os isolados foram inoculados nas placas e mantidas em estufa à 30 °C por 2 dias, em seguida observado a formação de um halo claro ao redor das colônias.

Produção de Celulase

Para a determinação da produção de celulase, utilizamos a metodologia descrita por Kasana et al. (2008) adaptada, utilizando como corante o iodo de Gram. Os isolados crescidos foram inoculados em placas contendo meio de cultura enriquecido com celulose e incubadas por 5 dias e após esse período foi vertido sobre o meio com colônias crescidas 5 mL de solução corante iodo de Gram e observado a presença de halos claros ao redor das colônias.

Solubilização de Minerais

Os isolados com capacidade de solubilizar minerais foi utilizando a metodologia descrita por Pikoskaya (1948), enriquecido com óxido de zinco 12%. Os isolados crescidos foram inoculados em placa contendo a mistura de ágar Pikovskaya com 0,25 ml de óxido de zinco e observado o aparecimento de um halo claro em torno das colônias, contra um fundo opaco. O diâmetro do halo de solubilização e das colônias foram medidos para obter o Índices de Solubilização (IS) para cada isolado de acordo com Berraquero; Baya; Cormenzana, 1976.

Produção e quantificação do Ácido indol acético (AIA)

A análise para a determinação dos isolados capazes de produzir AIA foi realizada conforme descrito por Glickmann e Dessaux (1995), utilizando reagente de Salkowski, que resulta em mudança de coloração de amarela (negativo) e rosa avermelhado (positivo). Os isolados foram inoculadas em Digs com triptofano (0,5 g/L), e uma alíquota de 1,5 mL de cada amostra foi transferida para micro tubos e centrifugadosos quais 1 mL do sobrenadante foram transferidos para novos micro

tubos e adicionado 1 mL do reagente R1 e reservado por 30 min. O precipitado foi guardado para posterior quantificação do teor de proteínas. A leitura da absorbância foi feita em seguida em 540 nm

Para a curva de calibração utilizamos AIA comercial, diluído em etanol Merk absoluto para concentração de 50K (50.000 uM). Foram adicionados aos tubos de ensaio meio Digs + AIA + R1 e realizado a leitura da absorbância à 540 nm.

A concentração de proteína das amostras foi determinada conforme BRADFORD (1976), adaptado para condições de realização do teste em placas de ELISA de 96 poços (SCHWAB, 2006). 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 AIA / proteína (µM / µg).

Produção de Sideróforos

A metodologia utilizada para a detecção de sideróforos utilizada foi a partir do método descrito por Schwyn e Neilands (1987), em placas contendo meio *Chrome Azurol S* (CAS-Ágar contendo Ferro III), no qual a produção de sideróforos foi detectados pela formação de halos amarelos em torno das colônias.

Espectrometria de Massa do tipo MALDI-TOF

A análise de espectrometria de massa foi adaptado da metodologia descrita por Stets, et al., (2013). Os isolados que apresentaram 3 atividades bioquímicas ou mais foram selecionados para esta análise. Foram cultivados em meio DIGS líquido e após, foram inoculadas em placa com meio DIGS sólidas quais uma pequena quantidade uniforme da massa celular foi coletada e colocada em um micro tubo de 1,5 µL em triplicata.

A massa bacteriana passou por 2 lavagens consecutivas com 1 mL de água MilliQ esterilizada, e centrifugadas a 13.500rpm por 02 minutos, e adicionados 05 µL de ácido fórmico 70% e 05 µL de acetonitrila centrifugados a 13.500rpm por 02 minutos dos quais 08µL foram transferidos para o um novo micro tubo. As amostras foram congeladas amostras até o momento de leitura.

Para leitura das amostras 1 µL do tubo foi adicionado à placa metálica para análise no espectrômetro de massa e seca à temperatura ambiente. Em seguida, 1

µL da matriz foi depositada sobre a amostra que logo após a secagem a placa foi adicionada ao espectrômetro de massa.

Análise estatística

Para análise estatística, os valores de NMP utilizados foram da inoculação inicial do solo da rizosfera e das raízes do trigo, os dados foram transformado em LOG + 1 (JAHNEL, et al., 1999) e utilizado o programa estatístico ASSISTAT (SILVA, 2009), através do teste de variância ANOVA com análise de experimento em parcelas subdivididas, seguido do teste de Tukey quando houve significância.

5.1.3 Resultados

5.1.3.1 NMP das bactérias isoladas da rizosfera e da raiz do trigo nos diferentes tratamentos

A partir da inoculação dos solos coletados da rizosfera do trigo foi encontrada uma densidade total de bactérias diazotróficas de $1,5 \times 10^7$ células/g de solo e da inoculação do triturado de raízes do trigo foi encontrada uma população diazotrófica de $5,41 \times 10^5$ células/g de raiz. Sendo assim, a população rizosférica se mostrou maior que a população endofítica.

Com a inoculação das bactérias da rizosfera e do interior das raízes do trigo utilizando os 4 diferentes meios (JNFb, JMV, NFb e LGI) nos diferentes tratamentos (com e sem inoculante e 4 doses de N -0, 40, 80 e 120 Kg/ha de N- em 3 blocos, totalizando 24 amostras), através da análise estatística, foi possível verificar que nos meios NFb e LGI dos endofíticos, houve diferença de NMP nos tratamentos com inoculação de *Azospirillum brasilense*. Assim como no meio JMV das bactérias rizosféricas, onde encontramos uma maior densidade de diazotrofos, em contrapartida, nas diferentes doses de N não houve diferença nos valores de NMP (tabela 10).

Com relação ao coeficiente de variação (CV%) dos endofíticos (tabela 10), os tratamentos com e sem inoculação, nos meios JMV e JNFb, apresentaram um valor de CV% alto, o que faz com que a dispersão dos dados seja muito alta. Um CV% menor que 10% foi encontrado nos meios NFb e LGI, isso mostra que a diferença

entre os tratamentos com e sem inoculação, apresenta uma baixa dispersão dos dados, conforme classificação proposta por Gomes, 1985 e Ferreira, 1991.

Quanto o CV% referente as doses de N endofíticos, independente do meio analisado, todos os valores foram acima de 25%, considerados valores altos. Nos rizosféricos também foram encontrados valores altos, acima de 15% (tabela 10).

Tabela 10 - Efeito dos diferentes tratamentos no NMP em cada meio de cultivo

ENDOFITICOS				
Inoculação	NFb	JMV	LGI	JNFb
Com	4,1 a	4,5	3,8 a	4,4
Sem	3,4 b	3,7	3,3 b	3,2
CV%	9,9	32,3	4,7	20,3
Doses de N				
0	4,1	4,4	3,5	4,2
40	2,99	3,7	3,4	3,2
80	4,38	4,9	4,5	4,1
120	3,54	3,3	2,7	3,7
Efeito	Ns	Ns	Ns	Ns
R ²	-	-	-	-
CV%	27,2	32,9	43,9	27,6
RIZOSFÉRICOS				
Inoculação	NFb	JMV	LGI	JNFb
Com	5,3	6,5 a	4,6	4,8
Sem	5,07	6,9 b	3,9	5,1
CV%	14,89	2,42	22,76	11,16
Doses de N				
0	5,3	5,9	4,06	5,3
40	5,5	6,4	4,6	5,2
80	5,1	6,01	4,3	5,2
120	4,5	6,4	3,9	4,2
Efeito	Ns	Ns	Ns	Ns
R ²	-	-	-	-
CV%	17,86	10,49	23,62	20,91

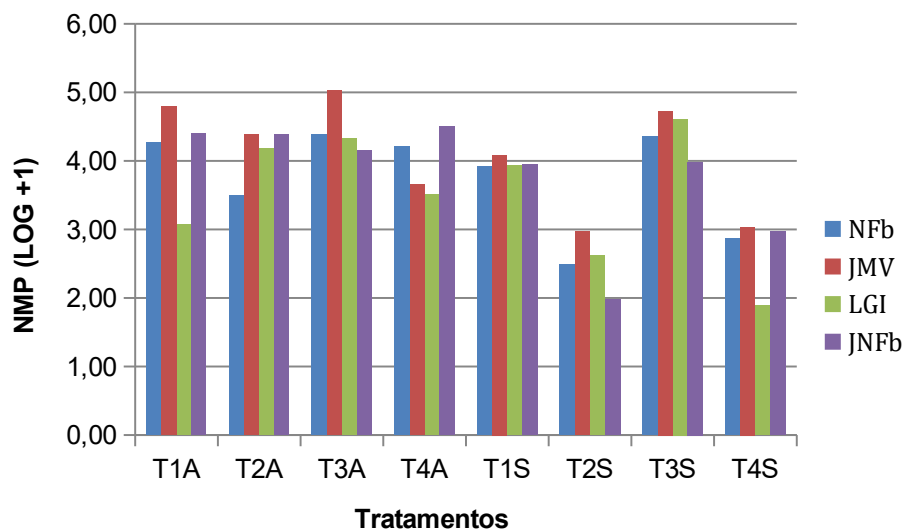
CV%= coeficiente de variação

R²= regressão

Quanto ao CV% das bactérias rizosféricas em relação a inoculação (tabela 10) o meio JMV apresentou a diferença do NMP com os tratamentos contendo inoculante. Esse valor de CV% é considerado baixo de 2,42%, e o ideal, com baixa dispersão dos dados. Já os encontrados nos meios JNFb e NFb estão entre 10 e 15% sendo considerados médios, mas com valores não suficiente para que apresentem diferença. O CV% do meio LGI foi o maior encontrado sendo maior que 20%, considerado alto.

O desvio padrão indicado na representação gráfica desses resultados (figura 12) mostra que os valores de NMP em qualquer um dos meios não foi influenciada pela variável N. Porém houve uma diferença entre os tratamentos com e sem a inoculação do *Azospirillum brasilense*, se destacando nesse caso os meios JMV e JNFb, e os tratamentos com inoculante.

Figura 13- Visão geral dos isolados Endofíticos onde os meios NFb e LGI se diferenciam nos tratamentos com inoculação



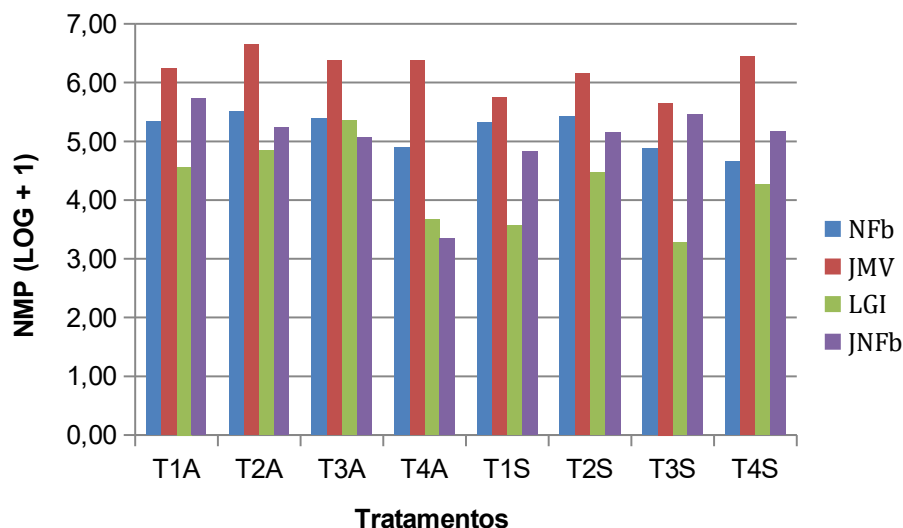
Fonte: a autora

Nota: NMP encontrado na raiz do trigo nos diferentes tratamentos isolados nos diferentes meios. Eixo Y se encontra os valores de NMP (LOG + 1), eixo X os diferentes tratamentos (T1A- 0N + Azo; T2A- 40N + Azo; T3A- 80 N + Azo; T4A- 120N + Azo; T1S- 0N sem Azo; T2S- 40N sem Azo; T3S- 80 N sem Azo; T4S- 120N sem Azo).

Através da análise estatística, foi possível observar que uma maior densidade de diazotrofos rizosféricos (figura 14) foi obtida através do meio JMV nos tratamentos com inoculante. Nos endofíticos (figura 13), destacamos meios NFb e LGI a partir dos tratamentos com inoculante um NMP de diazotrofos

Na figura 14 do NMP da rizosfera, foi possível observar o destaque do meio JMV na presença do inoculante. Já os outros meios, NFb, LGI e JNFb, independente do tratamento (inoculação ou doses de N) não houve diferença de NMP entre eles.

Figura 14- NMP dos isolados Rizosféricos onde se destaca o meio JMV com maior densidade de diazotrofos



Fonte: a autora

Nota: NMP dos isolados a partir dos solos da rizosfera em cada meio de cultivo. Eixo Y se encontra os valores de NMP (LOG + 1), eixo X os diferentes tratamentos (T1A- 0N + Azo; T2A- 40N + Azo; T3A- 80 N + Azo; T4A- 120N + Azo; T1S- 0N sem Azo; T2S- 40N sem Azo; T3S- 80 N sem Azo; T4S- 120N sem Azo)

Em contrapartida, fazendo uma análise comparativa entre o NMP de bactérias rizosféricas e endofíticas independente dos tratamentos a campo, a fim de comparar os 4 meios entre si, verificamos que há diferenças e semelhanças de NMP entre eles (tabela 11). A maior diferença foi detectada entre os valores de NMP nos meio JMV e LGI no caso dos endofíticos. E nos rizosféricos, a diferença ocorreu entre os meios NFb, JMV e LGI, enquanto no meio JNFb foram obtidos valores semelhantes ao meio LGI e NFb. O meio JMV apresenta os maiores números de NMP nas duas populações analisadas.

Tabela 11 - Comparação entre o NMP de bactérias rizosféricas e endofíticas

Meios	ENDO	RIZO
NFb	4,11 ab	5,18 b
JMV	4,22 a	6,2 a
LGI	3,24 b	4,25 c
JNFb	3,55 ab	4,99 bc
CV%	32,82	21,42

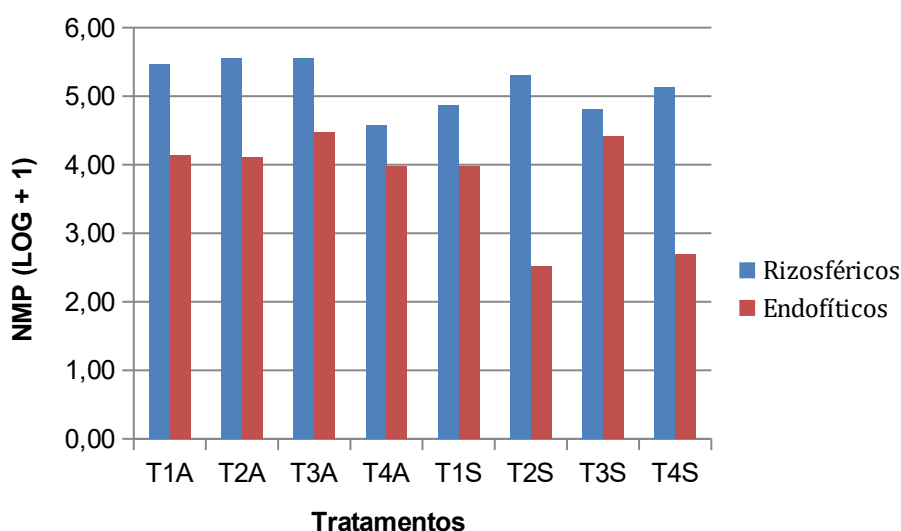
CV%= coeficiente de variação

Endo= Isolados Endofíticos

Rizo= Isolados Rizosféricos

Analizando os diferentes tratamentos para verificar se há uma população diazotrófica predominante, sem levar em conta os meios utilizados para isolamento, verificamos no desvio padrão dos rizosféricos que não houve diferença entre os tratamentos (figura 15), ou seja, independente do tratamento (dose de N ou inoculação), a mesma densidade de diazotrofos foi encontrada. Já nos endofíticos, a figura mostra uma diferença nos tratamentos T2S e T4S, possivelmente devido a ausência de película na análise de um dos 4 blocos desses tratamentos. Fato esse que deve ter contribuído para a redução da média.

Figura 15- Visão geral dos isolados por tratamento onde os tratamentos com inoculante apresentaram maior NMP



Fonte: a autora

Nota: Eixo Y se encontra os valores de NMP (LOG + 1), eixo X os diferentes tratamentos (T1A- 0N + Azo; T2A- 40N + Azo; T3A- 80 N + Azo; T4A- 120N + Azo; T1S- 0N sem Azo; T2S- 40N sem Azo; T3S- 80 N sem Azo; T4S- 120N sem Azo)

Quanto a uma visão geral da inoculação para verificarmos se esse tratamento influenciou na densidade diazotrófica, verificamos que nos endofíticos a análise estatística apontou para uma maior população nos tratamentos que possuíam a inoculação com *Azospirillum brasilense* (tabela 12), lembrando que os tratamentos que não apresentaram crescimento dos endofíticos (T2S e T4S) faziam parte dos que não possuíam inoculação, justificando essa diferença. Enquanto que nos rizosféricos não houve diferença nos tratamentos com e sem inoculação (tabela 12).

Tabela 12 – Análise geral da influência dos tratamentos

Inoculação	RIZO	ENDO
Com	5,3	4,2a
Sem	5,02	3,4b
CV%	7,9	17,49
Doses de N		
0	5,16	4,05
40	5,43	3,31
80	5,18	4,45
120	4,85	3,32
Efeito	ns	ns
R ²	-	-
CV%	13,48	26,93

CV%= coeficiente de variação

R²= regressão

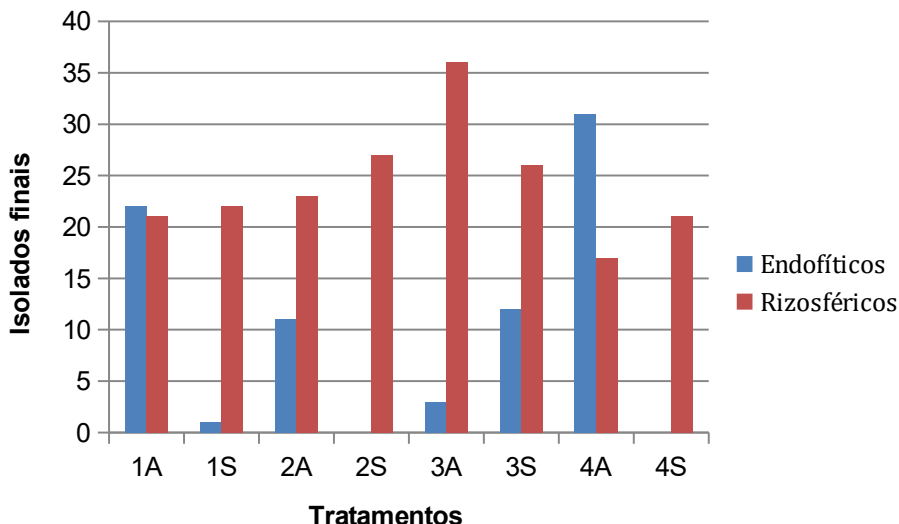
Endo= Isolados endofíticos

Rizo= Isolados Rizosféricos

5.1.3.2 Isolamento

A partir da inoculação inicial de diazotrofos, os frascos com meios semi sólidos que apresentaram película, característica de diazotrofos, foram plaqueados e estocados. Ao final das análises de NMP, foi obtido um número total de isolados a partir da raiz de 80 isolados bacterianos e 193 isolados obtidos a partir da rizosfera, nos diferentes meios de culturas e nas diferentes condições. Destacamos a diferença entre a quantidade de isolados da Rizosfera em relação aos Endofíticos (figura 16).

Quanto às diferentes condições foi possível observar um maior número de isolados a partir dos tratamentos com inoculante comercial contendo *Azospirillum brasiliense*: 163 isolados no total na presença do inoculante nos tratamentos 1A, 2A, 3A e 4A (67 endofíticos e 96 rizosféricos). Já os tratamentos que não continham o inoculante, obtivemos e 110 isolados em 1S, 2S, 3S e 4S (13 endofíticos e 97 rizosféricos) (figura 16).

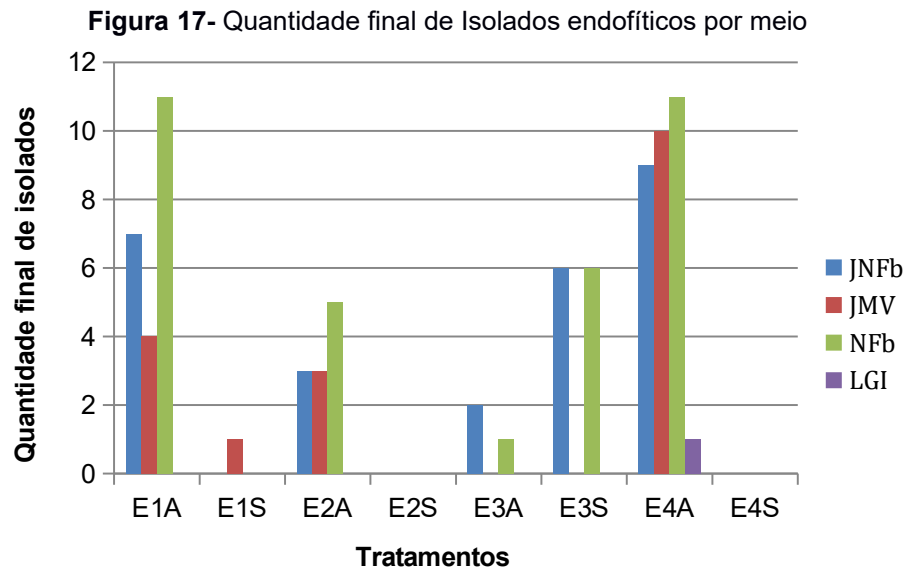
Figura 16- Isolados finais onde nos tratamento com inoculante obtivemos maior NMP

Fonte: a autora

Nota: Eixo Y se encontra os valores total de isolados, eixo X os diferentes tratamentos (T1A- 0N + Azo; T2A- 40N + Azo; T3A- 80 N + Azo; T4A- 120N + Azo; T1S- 0N sem Azo; T2S- 40N sem Azo; T3S- 80 N sem Azo; T4S- 120N sem Azo)

Ao realizar a última repicagem, afim de isolamento, obtivemos 273 isolados (80 Endofíticos e 193 rizosféricos), dos quais um maior número de isolados foram a partir do isolamento no meio NFb 113 no total (34 endofíticos e 79 rizosféricos) e no meio JNFb foi obtido 118 isolados (27 endofíticos e 91 rizosféricos), sendo o meio em que mais obteve isolados. O meio JMV isolou 40 bactérias (18 endofíticos e 22 rizosféricos) enquanto o meio LGI somente 2 (1 endofítico e 1 rizosférico) (figuras 16 e 17).

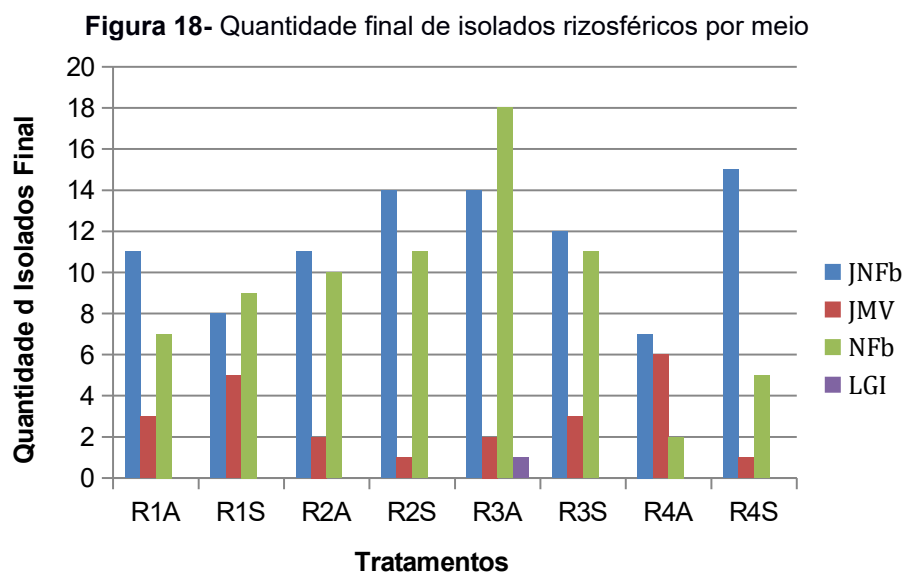
A partir do isolamento final foi possível avaliar a abundância de diazotrofo presente nos meios utilizados para isolamento de bactérias das raízes do trigo em cada meio de cultivo. Foi possível observar que os meios NFb se mostrou com maior eficiência nos isolados endofíticos (figura 17), resultando em uma maior quantidade de isolados, seguido pelo meio JNFb, com um valor representativo de isolados. O meio JMV apresentou isolados somente em alguns dos tratamentos, se destacando principalmente no tratamento E4S. O meio LGI apresentou o menor índice de isolamento, com somente 1 isolado no tratamento E4S..



Fonte: a autora

Nota: Eixo Y se encontra os valores total de isolados, eixo X os diferentes tratamentos (E1A- 0N + Azo; E2A- 40N + Azo; E3A- 80 N + Azo; E4A- 120N + Azo; E1S- 0N sem Azo; E2S- 40N sem Azo; E3S- 80 N sem Azo; E4S- 120N sem Azo)

A figura 18 apresenta os meios com maior índice de isolamento a partir dos solos da rizosfera, do qual se destaca o meio JNFb com maior índice de isolados, seguido pelos meio NFb com grande destaque de isolamento. O JMV apresentou isolados em todos os crescimentos. O meio LGI apresentou o menor índice de isolamento, com 1 único diazotrofo no tratamento R3A.



Fonte: a autora

Nota: Eixo Y se encontra os valores total de isolados, eixo X os diferentes tratamentos (E1A- 0N + Azo; E2A- 40N + Azo; E3A- 80 N + Azo; E4A- 120N + Azo; E1S- 0N sem Azo; E2S- 40N sem Azo; E3S- 80 N sem Azo; E4S- 120N sem Azo)

5.1.3.3 Caracterização bioquímica dos isolados

Os isolados bacterianos diazotróficos foram submetidos a testes bioquímicos, para avaliar seu potencial como promotores do crescimento vegetal. A atividade da fixação biológica do nitrogênio, foi o parâmetro utilizado para isolamento através da inoculação dos solos da rizosfera e das raízes do trigo em meios semi sólidos, seletivos de bactérias diazotróficas, ou seja, todos os frascos que apresentaram película foram considerados positivo para a FBN, assim todos os isolados possuíam essa característica.

Quanto os demais testes bioquímicos realizados nos isolados, somente 3 dos isolados endofíticos e 10 dos isolados rizosféricos não apresentaram nenhuma das atividades bioquímicas testadas, ou seja, somente 4% dos isolados endofíticos e 5% dos isolados rizosféricos não apresentam potencial bioquímico o restante realizou ao menos uma das atividades bioquímicas testadas.

Analisando isoladamente os testes bioquímicos, destacamos a produção de sideróforos que obteve um alto índice de produtores desse metabólito, 75% dos isolados endofíticos e rizosféricos foram capazes de produzir sideróforos (tabela 13).

Já outras atividades bioquímicas testadas foram encontradas em percentual mais baixo, como a produção de celulase e cianeto, onde somente 20% dos endofíticos e 5% dos rizosféricos produziram celulase e 17% dos endofíticos e 11% dos rizosféricos produziram cianeto (tabela 13).

Dos isolados bacterianos obtidos da rizosfera 58% foram capazes de solubilizar minerais (Fosfato e Zinco) e 52% de produzir protease, dos endofíticos 52% dos isolados endofíticos produziram essa enzima e 49% solubilizaram minerais, conforme observado na Tabela 13.

Tabela 13 - Atividades bioquímicas realizadas por tratamento onde a atividade de produção de sideróforos teve maior índice

Atividade bioquímica	Endofíticos 80 isolados	Rizosféricos 193 isolados	
Solubilização de minerais	39 (49%)	112 (58%)	
Produção de Protease	42 (52%)	80 (42%)	
Produção de Cianeto	14 (17%)	10 (5%)	
Produção de Celulase	16 (20%)	19 (11%)	
Produção de Sideróforos	60 (75%)	140 (75%)	

Avaliando separadamente os isolados solubilizadores, tanto endofíticos quanto rizosféricos, foi possível observar que de uma maneira geral o índice de solubilização (IS), expressaram valores baixos, indicando que apesar de conseguirem apresentar positividade a esse teste, sua intensidade de solubilização em meio sólido é baixa, apenas 02 isolados rizosféricos apresentaram um IS alto (R2SJ14, R4AN2). Quanto aos isolados que apresentaram um IS médio foram 01 endofítico (E1AN7) e 10 rizosféricos (R1AN8, R3AN3, R3AN18, R1SJ8, R2AJ1, R3SJ10, R4SJ2, R4AV5, R4SV1 e R3AL1).

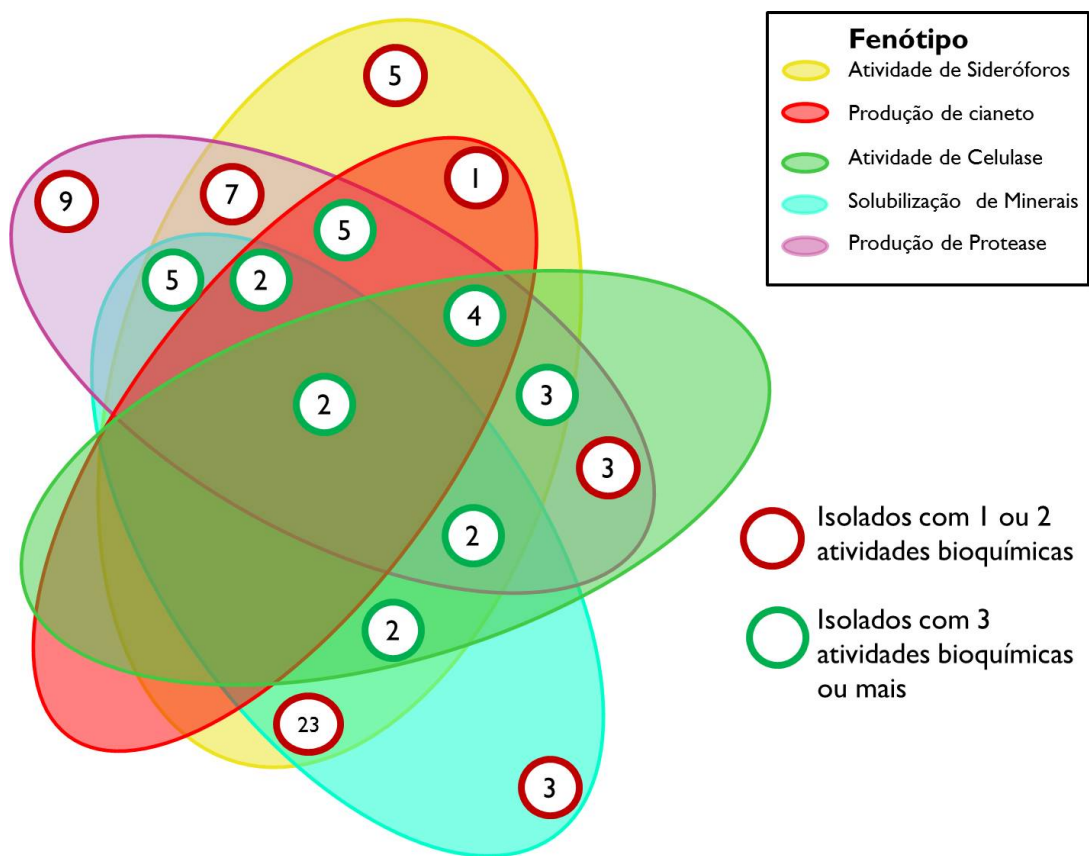
Dentre os resultados obtidos nos testes bioquímicos, destacamos 25 isolados dos 80 endofíticos que realizaram três ou mais atividades bioquímicas além da fixação do nitrogênio. Dentre esses, 2 apresentam um grande potencial para PGPB por realizarem todas as atividades bioquímicas (E1AJ2 e E1AJ6).

Dos isolados em destaque foi possível observar que um maior número de isolados foi obtido a partir do isolamento do meio JNFb, 16 isolados, e 9 a partir do isolamento no meio NFb.

Na figura 19 encontra-se uma visão geral das atividades bioquímicas realizadas pelos isolados, e indica quantos isolados realizaram tais atividades. Quanto mais interno os números nas elipses, mais atividades bioquímicas os isolados realizam. Dos 25 isolados destacados em verde por realizarem 3 atividades bioquímicas ou mais, podemos verificar quantos e quais atividades realizaram.

Foi possível verificar que todos os 25 isolados destacados são capazes de produzir sideróforos, variando nas outras atividades (figura 19).

Figura 19- Diagrama de Venn das atividades bioquímicas dos isolados Endofíticos.



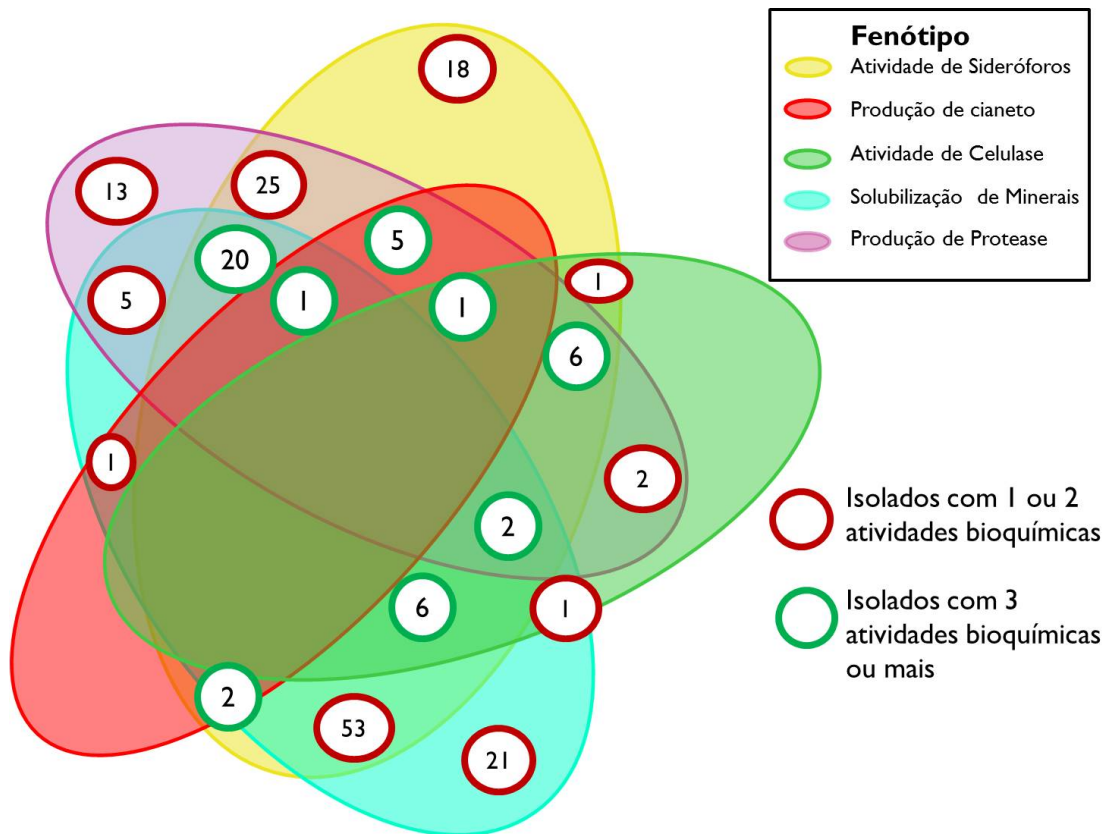
Fonte: a autora

Na figura 20 encontramos as atividades bioquímicas realizadas pelos 193 isolados rizosféricos. E a partir desses testes bioquímicos, observamos 43 isolados rizosféricos que realizaram 3 atividades bioquímicas ou mais, podendo classifica-los com grande potencial de promotor de crescimento vegetal (destacados com o círculo verde na imagem). Porém, não foi obtido nenhum isolado que realizasse todas as atividades bioquímicas, como ocorreram nos isolados endofíticos. Desses isolados

destacados foi possível verificar que 27 foram obtidos a partir do isolamento do meio JNFb, 13 do meio NFb, 2 do meio JMV e o único isolados do meio LGI apresentou potencial para promotor do crescimento vegetal.

Dentre os diazotrofos que realizaram 3 atividades bioquímicas ou mais, foi verificado que 63,2% foram isolados a partir do meio JNFb e 36,8% foram isolados a partir do meio NFb.

Figura 20- Diagrama de Venn das atividades bioquímicas dos isolados Rizosféricos

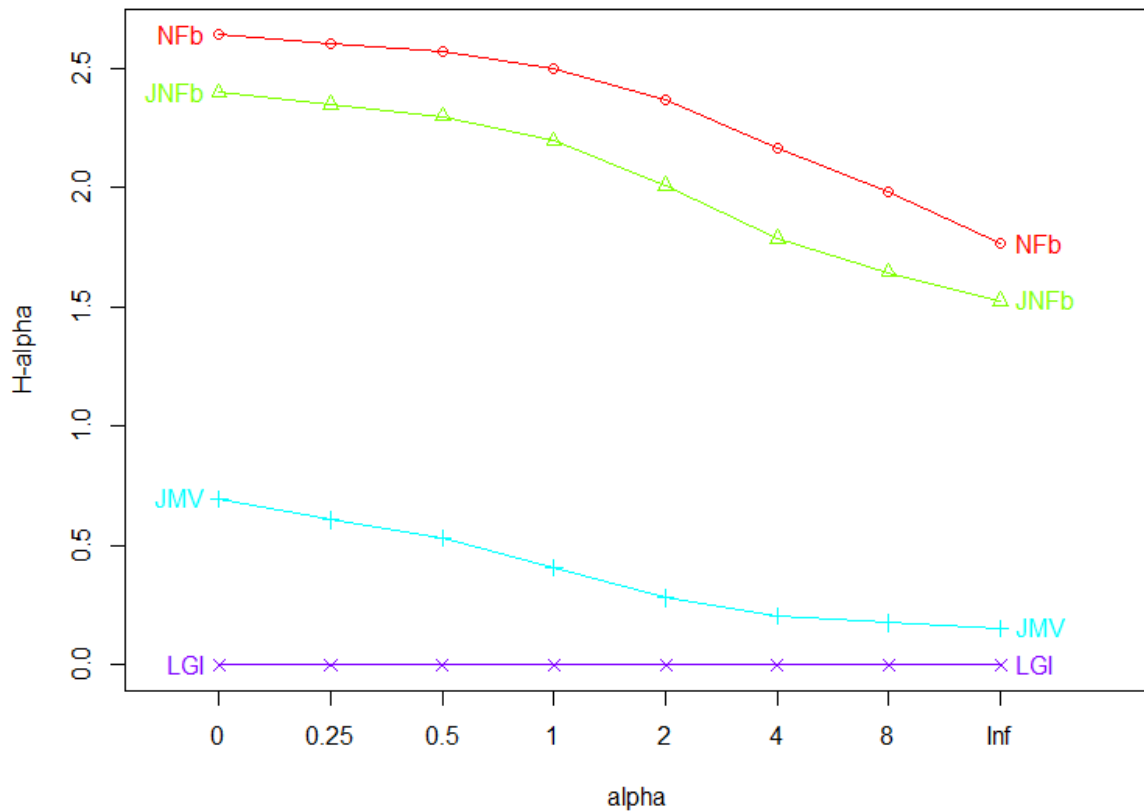


Fonte: a autora

Os meios utilizados para isolamento de diazotrofos endofíticos nos possibilitou analisar através de um perfil de diversidade bioquímica conforme figura 21. Na qual foi possível observar que o meio NFb apresentou uma maior diversidade de atividades bioquímicas realizadas pelos isolados rizosféricos. O meio JNFb se apresentou como o segundo meio mais diverso em relação as atividades

bioquímicas. O JMV se apresentou com baixa diversidade e o LGI com o menor índice.

Figura 21- Perfil de Renyi da diversidade bioquímica em cada meio dos isolados Endofíticos



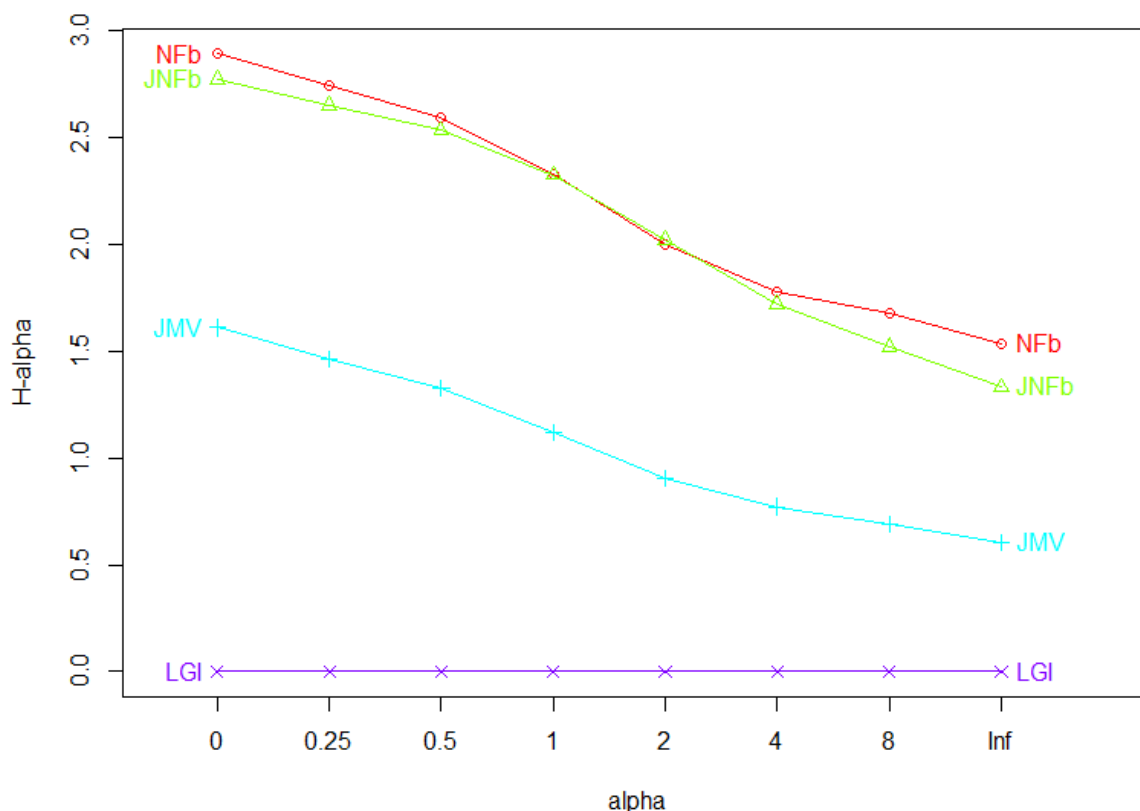
Fonte: a autora

Nota: A comparação dos perfis de diversidade Renyi dos diferentes meios de cultivo utilizados para as atividades bioquímicas. 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 considerado mais diversificada.

Quanto a análise dos isolados rizosféricos em relação a diversidade de atividades bioquímicas dos meios (figura 22), foi possível observar que o meio NFb e JNFb estão bem próximos no índice de diversidade, se encontrando no ponto 2. Porém no ponto do infinito eles se separam mostrando uma diferença entre eles de que o meio NFb possui um índice de diversidade de atividades bioquímicas maior.

O meio JMV apresenta uma diversidade funcional dos isolados bem abaixo ao NFb e JNFb. O meio LGI apresentou o menor índice de diversidade funcional dos isolados.

Figura 22- Perfil de Renyi da diversidade bioquímica em cada meio dos isolados Rizosféricos



Fonte: a autora

Nota: A comparação dos perfis de diversidade Renyi dos diferentes meios de cultivo utilizados para as atividades bioquímicas. 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 considerado mais diversificada.

A quantificação da produção de AIA foi realizada nos 25 isolados endofíticos, dos quais apresentaram uma média total de produção de 4,481 μg de AIA/mg de proteína. Dentre os isolados testados, a menor produção foi do isolado E3AN1 com o valor de produção de 0,121 de AIA/mg de proteína, destacado na tabela 12, em contrapartida o isolado E2AJ1 apresentou a maior produção com 14,678 μg de AIA/mg de proteína destacado na Tabela 14:

Tabela 14 - Produção de AIA pelos 25 isolados endofíticos

Isolados	AIA (µg/mg)	Isolados	AIA (µg/mg)
E1A J1	3,905 (± 0,716)	E4A J2	3,050 (± 0,074)
E1A J2	2,395 (± 0,476)	E4A J3	43,692 (± 8,225)
E1A J3	4,071(± 0,378)	E4A J4	2,023 (± 0,541)
E1A J4	2,657(± 0,093)	E1A N1	3,260 (± 0,295)
E1A J5	2,439 (± 0,001)	E1A N2	14,141 (± 0,139)
E1A J6	3,562 (± 1,381)	E1A N3	1,465 (± 1,221)
E2A J1	14,678 (± 1,424)	E1A N4	2,714 (± 0,570)
E2A J2	1,407 (± 0,088)	E1A N5	1,205 (0,556)
E3A J1	12,502 (± 1,616)	E2A N1	3,159 (± 0,702)
E3A J2	3,683 (± 0,512)	E3A N1	0,121 (± 0,035)
E3S J1	2,068 (± 0,541)	E3S N1	13,749 (± 4,937)
E3S J2	5,532 (± 0,348)	E4A N1	1,557 (± 0,018)
E4A J1	2,100 (± 0,602)		

±: Desvio padrão

Os 43 isolados rizosféricos apresentaram uma média de quantificação de AIA de 6,568 µg de AIA/mg de proteína. Dentre esses, alguns se destacaram por apresentarem alta produção de AIA (isolados em destacados em negrito tabela 15), que são eles R1SJ1 como maior produtor com 19,433 µg de AIA/mg de proteína, seguido pelos isolados R3AJ2 13,242 µg de AIA/mg de proteína, R4AJ1 15,084 µg de AIA/mg de proteína, R4SJ5 15,631 µg de AIA/mg de proteína e R4AV1 14,111 µg de AIA/mg de proteína. Sendo possível verificar que 4 dos 5 isolados com maiores produções foram obtidos a partir do isolamento do meio JNFb e 1 do meio JMV.

O menor produtor de AIA encontrado foi isolado a partir do meio NFb com um valor de 0,808 µg de AIA/mg de proteína.

Tabela 15- Produção de AIA pelos 43 isolados Rizosféricos

Amostra	AIA (µg/mg)	Amostra	AIA (µg/mg)
R1A N1	5,141 (± 0,638)	R2A J1	10,122 (±0,907)
R1A N2	10,633 (± 1,734)	R2A J2	4,912 (± 1,090)
R1A N3	8,899 (± 3,455)	R2A J3	12,593 (± 0,806)
R1S N1	4,157 (± 0,875)	R2S J1	2,621 (± 0,470)
R1S N2	3,936 (± 0,777)	R2S J2	4,548 (± 1,473)
R2S N1	0,808 (± 0,027)	R2S J3	8,056 (± 1,999)
R3A N1	2,777 (± 1,527)	R2S J4	4,712 (± 0,451)
R3A N2	7,263 (± 0,507)	R3A J1	5,553 (±0,686)
R3A N3	2,256 (± 0,271)	R3A J2	13,242 (± 2,366)
R3S N1	7,021 (± 1,541)	R3A J3	7,244 (± 2,933)
R3S N2	3,246 (± 0,939)	R3A J4	8,461 (± 1,140)
R4A N1	2,118 (± 0,421)	R4A J1	15,084 (± 3,740)
R4A N2	7,046 (± 2,873)	R4S J1	4,646 (± 2,815)
R1A J1	1,739 (± 1,015)	R4S J2	5,589 (± 0,752)
R1A J2	4,641 (± 2,269)	R4S J3	7,495 (± 2,586)
R1A J3	8,362 (±2,910)	R4S J4	9,194 (± 6,261)
R1A J4	3,934 (± 1,481)	R4S J5	15,631 (± 6,062)
R1A J5	5,651 (± 0,534)	R4S J6	0,987 (± 0,207)
R1A J6	6,885 (± 1,417)	R4A V1	14,111 (± 4,404)
R1S J1	19,433 (± 3,755)	R4S V1	2,408 (± 0,203)
R1S J2	1,519 (± 0,339)	R3A L1	2,512 (±0,863)
R1S J3	5,234 (± 0,360)		

±: Desvio padrão

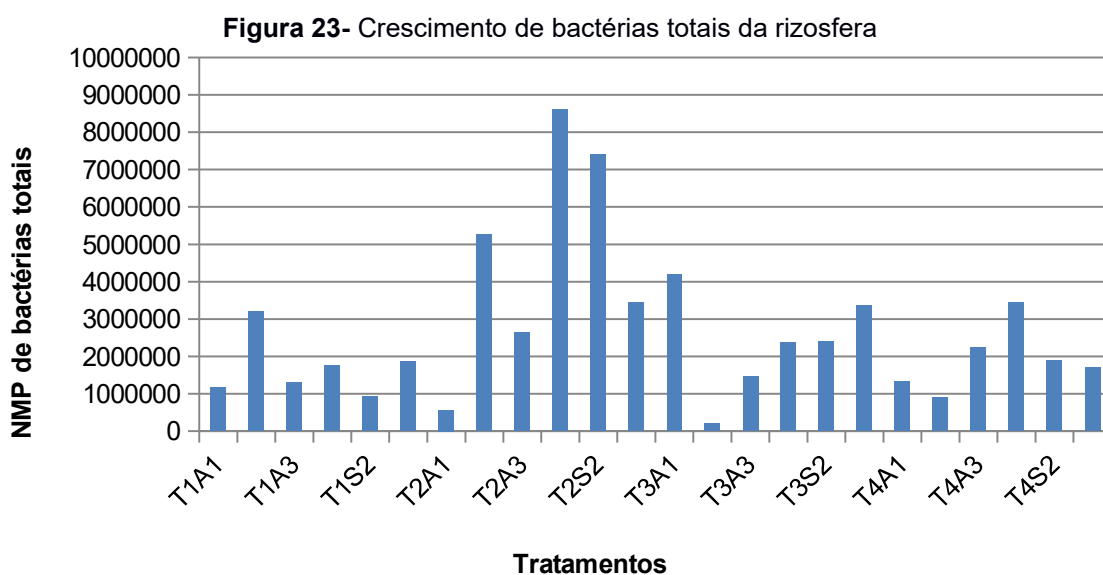
5.1.3.4 Contagem de rizóbios do solo e de bactérias totais do solo

A contagem de rizóbios do solo não pôde ser realizada, pois não houve nodulação das plantas de feijoeiro.

Não pode ser realizada a contagem de bactérias totais das raízes do trigo porque a técnica da contagem de microgotas não foi eficiente.

Para a contagem de bactérias totais da rizosfera utilizamos a técnica por espalhamento em triplicata da diluição 10^3 , e foi possível verificar que o desvio padrão mostra a discrepância encontrada entre as triplicatas. Não foi possível realizar o isolamento na diluição 10^5 , pois não houve crescimento.

Uma justificativa para esses valores discrepantes é que o fungicida utilizado interferiu no crescimento bacteriano, porém testes realizados sem o fungicida apresentaram muita contaminação por fungos.



Fonte: a autora

Nota: Eixo Y se encontra os valores de média NMP, eixo X os diferentes tratamentos (T1A- 0N + Azo- triplicata 1,2 e 3; T2A- 40N + Azo- triplicata 1,2 e 3; T3A- 80 N + Azo- triplicata 1,2 e 3; T4A- 120N + Azo- triplicata 1,2 e 3; T1S- 0N sem Azo- triplicata 1,2 e 3; T2S- 40N sem Azo- triplicata 1,2 e 3; T3S- 80 N sem Azo- triplicata 1,2 e 3; T4S- 120N sem Azo- triplicata 1,2 e 3)

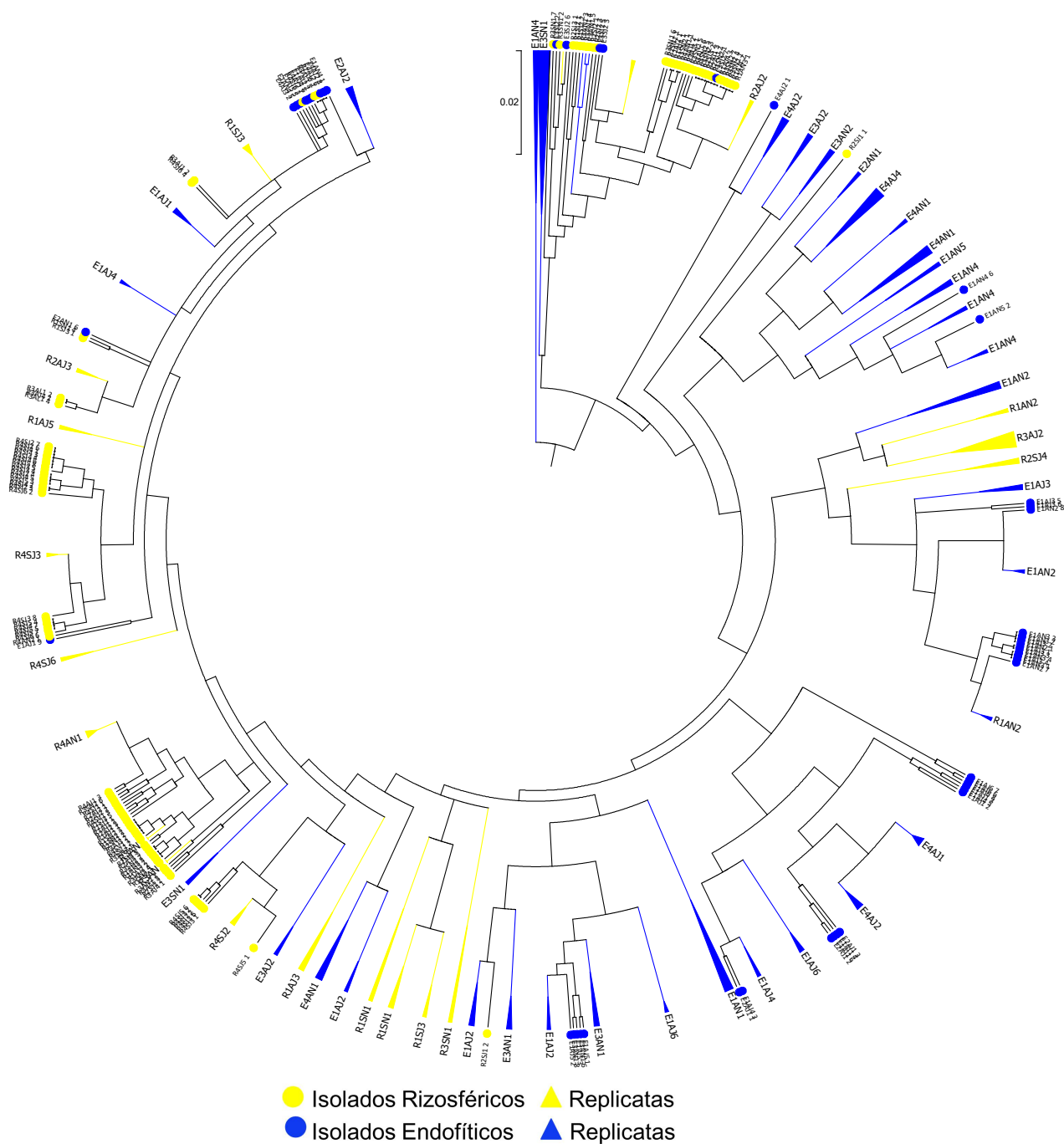
5.1.3.5 Espectrometria de massa- MALDI-TOF

O agrupamento resultante da espectrometria de massa dos isolados com 3 atividades bioquímicas ou mais das bactérias diazotróficas obtidas do isolamento do solo da rizosfera e das raízes do trigo nos proporcionou verificar a disposição de cada isolado em relação ao outro.

Analisando o posicionamento dos isolados endofíticos em relação aos rizosféricos (figura 24), foi possível verificar que a grande maioria se agrupa de acordo com o seu local de isolamento (rizosfera ou raiz), Grupos de isolados rizosféricos e de grupos de isolados endofíticos intercalam uns com os outros.

A figura 24 nos permitiu também verificar que algumas replicatas dos isolados se encontravam agrupadas (triângulos), enquanto outras se agrupam com diferentes isolados.

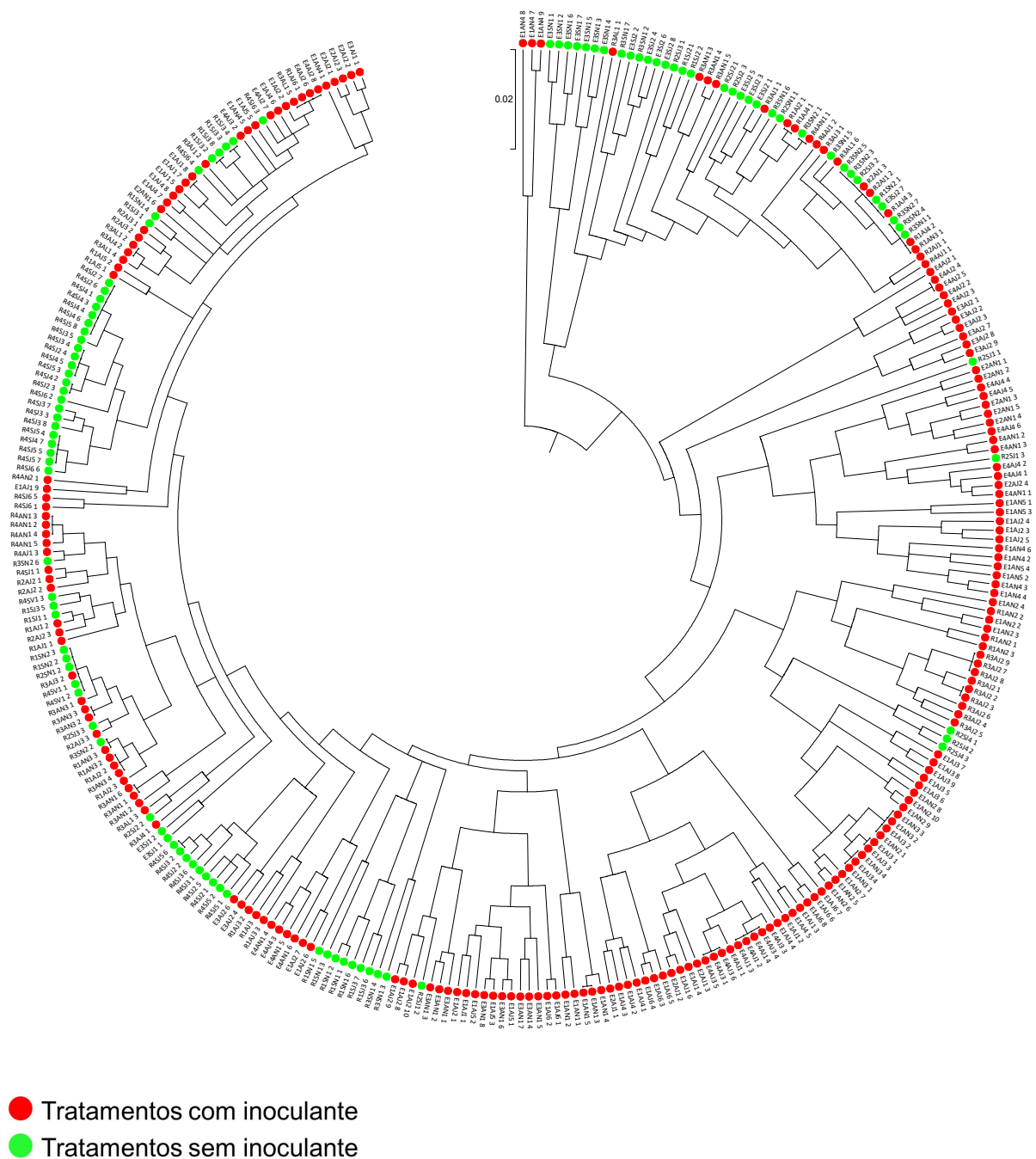
Figura 24- Dendrograma comparativo entre o agrupamento dos isolados rizosféricos e endofíticos



Fonte: a autora

Quanto ao agrupamento dos isolados de acordo com o tratamento com inoculante e sem inoculante, observou-se que a grande maioria dos isolados se agrupou de acordo com cada tratamento (figura 25).

Figura 25- Dendograma comparativo entre o agrupamento dos isolados quanto a presença e ausência do inoculante

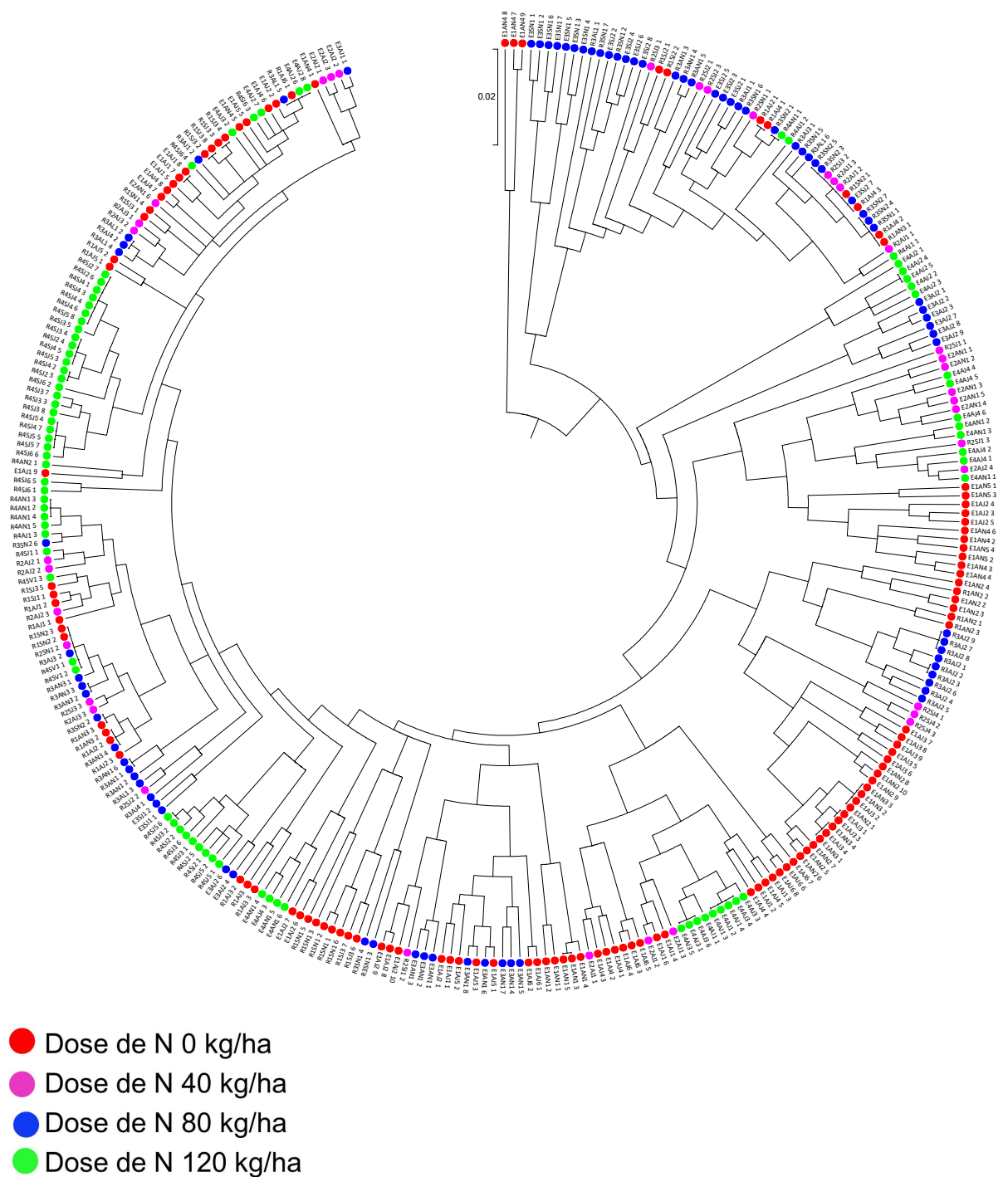


Fonte: a autora

O dendograma originado para comparar o agrupamento dos isolados com relação as diferentes doses de N (figura 26) mostrou que algumas doses se agruparam melhor que outras. A dose 0 de N apresentou vários grupos pelo dendograma, assim

como os isolados com dose de 80N. Os isolados com dose 120 N, em sua grande maioria, se encontraram agrupados. Já os isolados com se apresentaram desagrupados dispersos pelo dendograma.

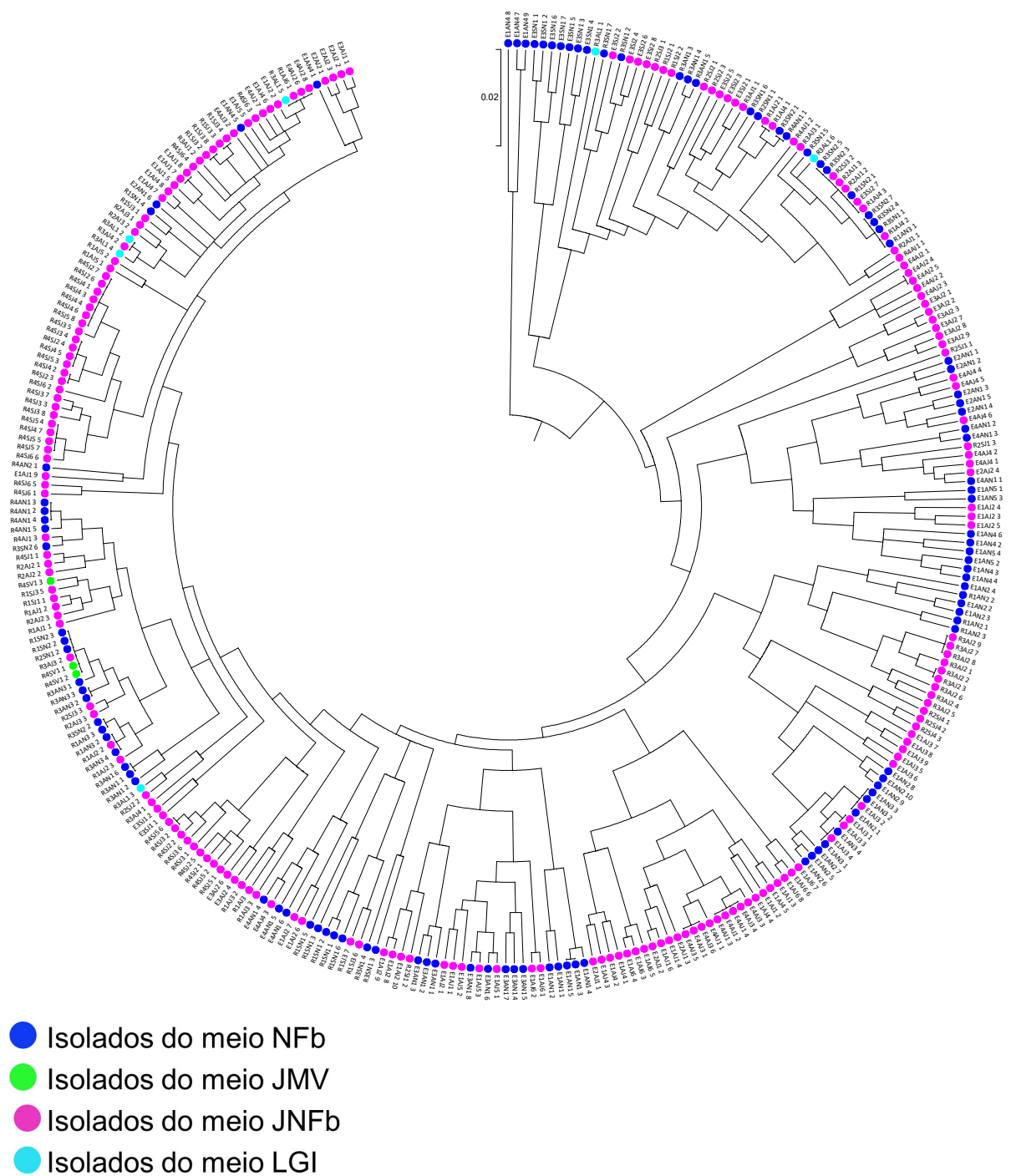
Figura 26- Dendrograma comparativo entre o agrupamento dos isolados de acordo com as doses de N



Fonte: a autora

Na figura 27 foi possível verificar que os isolados do meio JNfb se apresentaram melhor agrupado do que os outros meios utilizados no isolamento. Os isolados do meio NFb se mostraram dispersos pelo dendrograma.

Figura 27- Dendrograma comparativo entre o posicionamento dos isolados de acordo como meio



Fonte: a autora

5.1.4 Discussões

NMP DE DIAZOTROFOS E INFLUENCIA DOS DIFERENTES TRATAMENTOS NESSA COMUNIDADE

A contagem de bactérias pelo método do Número Mais Provável (NMP) é considerada uma técnica antiga, rápida e de baixo custo, a qual permite avaliar estatisticamente o número de bactérias presentes numa amostra e estimar a proporção viável metabolicamente ativa (JONES, 1977 *apud* RIBAS et al., 2009).

Essa técnica permite estimar a densidade da população em diferentes meios de cultivo, analisando-se o crescimento celular microbiano, estimando aproximadamente o número de microrganismos presentes na amostra original (RIBAS et al., 2009; MARQUEZI, 2010).

O NMP pode ser utilizado para estimar a população total das bactérias diazotróficas, nesse estudo os valores de bactérias diazotróficas cultiváveis encontrados nos solos rizosfera de $1,5 \times 10^7$ células/g de solo é condizente com os descritos na literatura. Jahnel et al. (1999) e Magalhães et al. (1979) que verificaram uma densidade de bactérias diazotróficas na rizosfera de plantas de até 10^7 células/g solo. Já Schoenborn et al. (2004), encontrou cerca de 10^8 a 10^9 células/g solo e que o número de células cultiváveis no solo é geralmente apenas cerca de 1% do número total. As células endofíticas encontradas nesse trabalho de $5,41 \times 10^5$ células/g de raiz condizem com os resultados encontradas por Whitman, (1998) e Spaepen et al., (2009) na concentração de 10^4 a 10^8 células/g de raiz e na rizosfera os valores estão entre 10^6 a 10^9 células/g de solo de acordo.

Embora grande quantidade de N possa existir na parte aérea das culturas utilizadas para cobertura, a quantidade real de N que será aproveitada pela planta em sucessão irá depender do sincronismo entre a decomposição da biomassa e a taxa de demanda da cultura, dependendo esse aproveitamento, a população bacteriana pode ser afetada ou não (BRAZ et al., 2005).

A rotação de cultura pode induzir um aumento de algumas bactérias do solo rizosféricas funcionais, sugerindo uma relação potencial entre o aumento do rendimento de culturas intercalares e micróbios quando comparados com culturas únicas (YANG et al., 2015).

Quanto as diferentes doses de nitrogênio, o NMP não apresentou diferença significativa segundo as análises estatísticas, independente da dose de nitrogênio que foram isolados (tabela 10). Sala (2002) afirma que os genótipos da planta se comportam diferente quanto ao número destes diazotrofos em relação à adubação nitrogenada, e que o aumento na dose de N adicionada como adubo pode diminuir a quantidade de diazotróficos na raiz, assim como observado por Kirchhof et al. (1997) que afirma que a quantidade de diazotrofos era menor, ou mesmo, indetectável em altos níveis de N, contradizendo o encontrado nesse trabalho, na qual foi possível observar que as doses de N não interferiram na comunidade diazotrófica.

Na primeira bateria do NMP não foi possível observar diferença na densidade bacteriana diazotrófica nas diferentes doses de N, porém na segunda repicagem foi observado que os blocos 2 dos tratamentos E2S e E4S dos isolados endofíticos não apresentou nenhum isolado (figura 15). Não foi possível afirmar que o nitrogênio ou a ausência do inoculante tiveram interferência, pois os outros blocos apresentaram crescimento de bactérias diazotróficas.

SALA, (2002) justifica que a igualdade de NMP dos isolados endofíticos entre as diferentes doses de N, pode ser devido ao macerado das raízes utilizado para obtenção das diluições, apesar da desinfestação, poderia possuir resíduos de nitrogênio, que acabou sendo acrescentado ao meio de cultivo, o que possibilitou também o crescimento de microrganismos que não são diazotróficos, mas se comportam da mesma forma. Pode-se notar na fase de isolamento que as bactérias obtidas foram originárias, na maioria das vezes, das maiores diluições (SALA, 2002).

O CV%, coeficiente de variação, é definido também como desvio padrão, o qual é expresso em porcentagem de média, é a medida mais utilizada para medir a instabilidade relativa de uma característica ou variável (SAMPAIO, 1998). É considerado que quanto menor o CV encontrado, mais homogeneidade os dados terão e menor a variação do acaso segundo Garcia, (1989).

O CV% encontrado nas análises estatísticas (tabelas 10, 11 e 12) feita para verificar se a presença de diferente doses de N interferiam no NMP de diazotrofos tanto da raiz quanto da rizosfera do trigo assim como a presença ou ausência do inoculante foram classificados por Pimentel Gomes, (1985) quando encontrados inferior a 10% sendo baixo, com baixa dispersão dos dados considerados por Ferreira, (1991) com ótima precisão. Os que se encontravam entre 10 e 20% seu CV era considerado médio, com média dispersão dos dados e boa precisão, assim os

que possuíam um CV alto entre 20% e 30% possuem alta dispersão de dados tendo uma precisão regular. CV com mais de 30% são considerados muito altos com alta dispersão de dados tendo uma precisão ruim.

O CV% encontrado nos tratamentos que apresentaram diferença estatística estão dentro dos valores especificados por Pimentel Gomes (1985) e Ferreira (1991), considerados bons. Nos isolados endofíticos no geral (tabela 12), os tratamentos com e sem inoculação apresentaram diferenças entre si, em que nos tratamentos com a presença do inoculante se obteve um maior NMP assim como na análise por meios em que os meios NFb e LGI obteve diferença nos tratamentos e com e sem o inoculante (tabela 10). Na rizosfera o quadro geral não apresenta diferença entre os tratamentos (tabela 12), apenas na análise separada por meio verificou no meio JMV diferença entre os tratamentos com e sem a presença do *Azospirillum brasilense*.

Já, nos tratamentos com as diferentes doses de N, não houve diferença significativa entre os valores de NMP, apresentando tanto individual quanto geral CV % alto (tabelas 10, 11 e 12).

Quanto ao efeito da inoculação de *Azospirillum brasiliense*, Basi, (2013) afirma que o efeito da inoculação pode ser positivo, nulo ou até mesmo negativo, o que explica esse tratamento não ter afetado a comunidade diazotrófica (figura 15). A inoculação apresentou efeito positivo relacionado a produtividade de gramíneas, cana de açúcar, trigo, milho, entre outras, estando ou não na presença de doses de N (ROSARIO, 2013; REIS, 2015; DARTORA et al, 2013; SILVA; MELLONI, 2011; LEMOS, 2011), porém não interfere a população de bactérias diazotróficas presentes na raiz e na rizosfera do trigo.

Foi possível verificar, tanto no NMP (figura 15) quanto na quantidade final de isolados (tabela 13), uma grande diferença entre a população endofítica e rizosférica, que condiz com o descrito por Freitas (2011), que afirma que normalmente, a densidade de bactérias endofíticas é menor que a de bactérias da rizosfera, e que não é bem esclarecido se as plantas se beneficiam mais da presença de um endofítico ou de uma bactéria da rizosfera ou, ainda, se é mais vantajoso para a bactéria tornar-se endofítica, em comparação com as da rizosfera.

Não está claro qual dessas comunidades de microrganismos (endófitos ou rizosféricos) pode promover maior crescimento vegetal, porém endófitos são um grupo promissor para aumentar o rendimento das culturas, remover contaminantes,

inibir a presença de patógenos, e produzir nitrogênio fixado ou substâncias novas (ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006). Mas devido aos resultados obtidos *in vitro*, os testes apontam que ambas as comunidades, rizosféricas e endofíticas, são necessárias.

No isolamento de diazotrofos é possível verificar que a atividade da nitrogenase em algumas espécies de diazotróficos endofíticos pode ser prejudicada quando há altas concentrações de NO_3 no meio de cultivo (BODDEY ; DÖBEREINER, 1988). Na pesquisa realizada, a seleção e contagem de diazotrofos foi utilizando 4 meios semi seletivos livres de nitrogênio semi seletivo, e apenas 2 se destacaram.

Dentre os isolamentos, os meios em que obtivemos maior quantidade de isolados foram no NFb e JNFb (tabela 13), sendo os meios com maiores índice de isolamento, mesmos resultados verificado por Silva e Meloni, (2011), que destacaram esses meios com um efeito marcante no número obtido de isolados em amostras do solo. Roesch, (2003) em seu estudo verificou que entre esses dois meios, não houve diferença entre quantidades de isolados, considerando sua quantidade de isolamento como igual.

Kuss et al. (2007) verificou que em diversos cultivares de arroz a resposta para cada meio usado era diferente, com relação a outras populações, pois em alguns cultivares houve crescimento no meio NFb e outros não, assim ele observou também nos meios JNFb, JMV e LGI.

Perin et al., (2006) identificou que a maioria das amostras de raiz e de solo da rizosfera cresceram no meio JMV, o que observamos diferente nos nossos resultados, visto que o meio JMV apresentou diferença no NMP no tratamento com inoculante, porém não se destacou no isolamento.

Já o meio LGI apresentou um índice quase nulo de isolados (tabela 13), não sendo compatível com os resultados encontrados por Souza e Brasil (2009), que mostram um maior número de isolados de gramínea no meio LGI.

Atualmente já temos conhecimento que os meio semi sólidos NFb, JNFb, JMV e LGI são semi seletivos para algumas bactérias diazotróficas, conforme Dobereiner et al., descreveram em 1999, em que o meio NFb é semi seletivo para isolamento de *Azospirillum* spp., o JNFb para *Herbaspirillum* spp., o LGI para *Azospirillum amazonense* e o meio JMV para isolamento de *Burkholderia brasilensis*. A figura 13 retrata o NMP nos 4 meios, que apresentam diferenças, como no meio JMV da rizosfera

(tabela 10) e igualdades, como ocorreram nos meios usados para isolamentos dos endofíticos (tabela 10). Já na tabela 12 o número de isolados obtidos ao final por meio, diferem entre si, destacando os meios NFb e JNFb.

Em um experimento realizado por Baldani e Dobereiner (1980), foram testadas diferentes estirpes de bactéria em trigo com origens diversas. Os pesquisadores concluíram que estirpes isoladas da própria espécie vegetal (homólogas) possuem uma maior tendência a ser mais eficientes do que as isoladas de plantas de outras espécies. O trabalho realizado por Baldani et al. (1983), também apresenta resposta positiva de bactérias isoladas da própria planta de trigo, e ausência de resposta, quando utilizou-se estirpes isoladas de milho.

Söderberg, (2002) e Marschner, (2001), verificaram que as comunidades bacterianas presentes no solo podem ser afetadas diretamente pela mudança da fisiologia da planta hospedeira ou indiretamente pela alteração dos padrões de exsudação radicular.

O uso de bactérias que fixam nitrogênio é justificado pela sua capacidade de sobreviver em ambientes com baixa disponibilidade de nitrogênio, e sua presença enriquecer o habitat (DOBBELAERE *et al.*, 2003). O sucesso da associação entre essas bactérias e as plantas, o N fixado pode suprir as necessidades desse nutriente e como consequência a redução do uso de fertilizantes nitrogenados e oferecendo, vantagens econômicas e ecológicas (HUNGRIA, 2011). O que nos dá base para afirmar que o uso de PGPB é uma melhor opção para ser usada na agricultura, para melhoramento das culturas, redução de custos e de danos ambientais.

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS ISOLADOS

As bactérias diazotróficas exercem um importante papel na sustentabilidade dos ecossistemas agrícolas, contribuindo para o desenvolvimento das plantas por meio da fixação biológica do nitrogênio, e fornecendo nutrientes através da produção e liberação de substâncias reguladoras do crescimento vegetal (VIDEIRA, et al., 2007).

A inoculação pode causar impactos sobre grupos taxonômicos específicos de bactérias diazotróficas, resultando em efeitos sobre as capacidades funcionais, e

pode um causar efeito transitório dependendo do estágio de desenvolvimento da planta, ou não ocasionar nenhum efeito (TRABELSI; MHAMDI, 2013).

A partir do isolamento e as atividades bioquímicas, futuros testes *in vivo* serão realizados, e poderemos confirmar o quanto as bactérias diazotróficas podem contribuir para o crescimento vegetal, não apenas pela FBN, mas também por outros processos produção de fitormônios, substâncias indólicas entre outras.

A análise histórica dos estudos sobre FBN em gramíneas demonstra avanços significativos em vários aspectos da interação planta- bactéria (BALDANI ; BALDANI, 2005).

Bhattara e Hess (1998) concluíram que além da FBN, o efeito de estimulação do crescimento pela bactéria pela produção de diversas substâncias contribuem no desenvolvimento das raízes, nos primeiros estágios de crescimento da planta, e pode ser a justificativa do impacto positivo da inoculação em trigo segundo Sala (2002). Essa afirmação nos leva a crer, que os isolados obtidos do trigo apresentam potencial para promover o crescimento vegetal, pois além da fixação, realizam mais atividades bioquímicas, porém ainda é discutível quais atividades seriam mais vantajosas para bactérias endofíticas.

Dentre os grupos de bactérias diazotróficas estão os gêneros: *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* sp., *Burkholderia* sp., *Azotobacter* sp., *Beijerinckia* sp., *Gluconacetobacter* sp., *Acetobacter* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Rhizobium* sp., *Pseudomonas*, *Derxia* sp., *Bacillus* sp., etc (MOREIRA, et al., 2010).

As bactérias diazotróficas podem desempenhar um papel importante na reabilitação e sustentabilidade de diferentes ecossistemas através da produção e liberação de substâncias que regulam o crescimento das plantas, tais como auxinas, giberelinas e citocininas (NERONI; CARDOSO, 2007).

Foram observados em outros estudos que vários efeitos na morfologia das raízes, como aumento no comprimento e volume radicular, pode aumentar a absorção mineral, e podem estar relacionados a substâncias promotoras de crescimento secretadas pela bactéria (MARTIN et al., 1989), como a produção de AIA que age no crescimento radicular.

As bactérias com maior potencial, além de apresentarem diversas atividades bioquímicas, também são produtoras de AIA. A produção de fitohormônios por bactérias diazotróficas pode influenciar positivamente no crescimento e desenvolvimento de plantas. Dentre as substâncias de crescimento produzidas por

estes microrganismos estão as auxinas. O ácido indolacético (AIA) é a auxina mais ativa e promove respostas rápidas como o aumento da elongação celular ou respostas lentas, como a divisão e diferenciação celular. A produção dessa auxina por bactérias associativas pode ser responsável pelo estímulo de crescimento da planta e pela proliferação de raízes secundárias (FREITAS, 2011).

Pedraza et al. (2004) perceberam que algumas estirpes de *Azospirillum*, que já se conhecia como promotoras do crescimento vegetal, tiveram altas produções de AIA que variaram de 16,5 a 38 µg de AIA/mg de proteína. Kuss et al. (2007), identificaram bactérias endofíticas com produção de AIA com valores de 2,79 a 13,47 µg/mL⁻¹, assim como observado neste trabalho, onde o isolado E2AJ1 apresentou 14,678 µg de AIA/mg de proteína (tabela 14) e o isolado R1SJ1 com 19,433 14,678 µg de AIA/mg de proteína (tabela 14), destacado por ser o maior produtor encontrado nos isolados endofíticos e rizosféricos respectivamente.

Observamos que os isolados com maiores produção de AIA foram obtidos a partir do isolamento do meio JNFb, em tratamentos com doses de N diferentes assim como inoculante. Já os isolados com menores produção de AIA, os isolados R2SN1 com 0,808 µg de AIA/mg de proteína (tabela 15) e o isolado E3AN1 com 0,1211 µg de AIA/mg de proteína (tabela 14), sendo esses isolados a partir do meio NFb, com tratamentos também diferenciado.

Em um estudo realizado por Majeed et al. (2015), foram encontrados 4 isolados com capacidade de solubilizar fosfato, assim como detectado por Hameeda et al. (2006) que relatou um número muito limitado de solubilizadores, sendo controverso com os resultados obtidos nesse trabalho onde verificamos uma alta quantidade de organismos solubilizadores (tabela 13).

A capacidade das PGPR para solubilizar o fósforo insolúvel e convertê-lo em forma disponível da planta é uma característica importante em condições em que fósforo é um fator limitante no solo e a presença bactérias que possuem característica solubilizadora pode ser considerada um indicador positivo de utilização de PGPR como biofertilizantes para a produção de culturas e benéfica para a agricultura sustentável (MAJEED, et al., 2015).

Gêneros como *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter* e *Paenibacillus*, já são descritos como solubilizadores de fosfato (TAHIR, et al., 2015). O aumento da solubilização leva a uma maior entrada de nutrientes, sendo

indiretamente pela eliminação de patógenos, através da produção de sideróforos ou antibióticos (FREITAS, 2011).

A atividade antifúngica dos isolados é uma característica que pode ser devido à produção de sideróforos e HCN ou até mesmo pela interação sinérgica dos dois ou com outros metabolitos (AHMAD, et al., 2008). Mas como se tratam de processos independentes, os resultados encontrados apresentaram uma grande discrepância entre quantidades de isolados que produzem sideróforos e de isolados que produzem cianeto, sendo a quantidade de produtores de sideróforos muito superior a quantidade de produtores de HCN.

Pseudomonas possui um grande destaque em produção de HCN (BLUMER; HAAS, 2000). Observamos que nos isolados obtidos, foi uma atividade restrita a poucos isolados (tabela 13), e sabemos que a produção de cianeto compreende uma papel importante no combate contra patógenos (KREMER, 2001). Assim como os produtores de HCN, os isolados que possuíam a capacidade de degradar celulose (tabela 13) o que discorda dos resultados obtidos por Falestrino, 2013, onde 30 isolados foram capazes de produzir celulase.

As bactérias capazes de degradar celulose desempenham um papel importante 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). No presente trabalho uma baixa quantidade de isolados apresentaram essa atividade. Maki et al. (2011) identificou bactérias do gênero *Bacillus* sp., *Paenebacillus* sp., *Microbacterium* sp. e *Streptomyces* sp como sendo capazes de degradar celulose.

A atividade da protease é muito encontrada e descrita na literatura no gênero *Bacillus*, e atua no controle de patógenos conferindo proteção à planta (GIONGO, 2002; SOUZA, 2012; RAWLINGS; BARRETT, 1993). No presente estudo a protease esteve presente em boa parte dos isolados (tabela 13) contrariando o encontrado por Saha e Santra, (2014), onde apenas 6 isolados se mostraram produtores dessa enzima.

Já a atividade de produção de sideróforos recebeu grande destaque por estar presente em 75% dos isolados (tabela 13), corroborando com os dados obtidos por Ambrosini et al., 2012, que obtiveram 78,2% dos isolados positivo para essa atividade, dos quais são pertencentes a gêneros como *Burkholderia* sp., *Pseudomonas* sp. e *Enterobacter* sp. Bactérias que produzem sideróforos influenciam indiretamente no 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 dos mesmos (BENEDUZI et al., 2008; RAAIJMAKERS et al., 2009; GLICK, 2012).

Foi possível observar que as atividades bioquímicas realizadas pelos isolados, possui grande potencial para o crescimento vegetal e para proteção da planta o que justifica a seleção do isolados que foram positivos para mais de 3 testes bioquímicos (imagem 19 e 20).

Os testes bioquímicos são de fundamental importância para determinar bactérias promotoras do crescimento vegetal (produção de sideróforos, cianeto, celulase, etc), pois através deles verificamos qual é o potencial do isolado, pois esses processos bioquímicos realizados por bactérias agem de diversas formas benéficas nas plantas. A inibição do crescimento de patógenos por bactérias PCVBs pode ocorrer por mecanismos diversos, como a competição por nutrientes, produção de substâncias nocivas aos patógenos (MARIANO et al., 2004).

A seleção de isolados que inibiram o crescimento de mais de um patógeno, juntamente com outros efeitos benéficos como a FBN e produção de AIA, pode servir de subsídio para utilização de endofíticos na supressão de doenças e promoção de crescimento de vegetal (FREITAS, 2011).

Análise de diversidade funcional aos quais os isolados do trigo foram submetidos foi verificada em cada um dos meios, o perfil de Renyi foi utilizado para avaliar de forma comparativa a diversidade funcional dos meios utilizados para isolamento (figuras 21 e 22).

Apesar do meio JNFb apresentar maior número de isolados endofíticos, o meio NFb apresentou maior diversidade funcional dos isolados, assim verificado também na análise de diversidade dos isolados rizosféricos, sendo esse meio com maior índice de riqueza. Já os isolados dos meios JMV e o LGI apresentaram uma baixa diversidade funcional, podendo ser justificada pelo baixo número de isolados obtidos através desses meios.

Moreira et al, (2010) afirma que o conhecimento da diversidade das populações presentes na rizosfera podem auxiliar na compreensão de como as variações no ambiente podem estar influenciando na funcionalidade destas populações.

IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS COM MAIOR POTENCIAL DE PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL

O fertilizante nitrogenado pode modificar o estado fisiológico da planta e por consequência afetar as populações bacterianas associadas à planta (MUTHUKUMARASAMY et al., 1999). Geralmente a aplicação de altas doses de N influenciam negativamente a colonização e diversidade dos microrganismos diazotrofos presentes na raiz e na rizosfera das culturas (PERIN *et al.*, 2004; BARBOSA *et al.*, 2006).

A diversidade microbiana da rizosfera foi hipotetizada como sendo significativamente diferente dependendo de diferentes culturas, bem como em diferentes sistemas de plantio, direto ou com rotação de culturas (YANG et al., 2015). Estudos já postulados mostraram também que a diversidade bacteriana da rizosfera pode ser influenciada por muitos fatores, como tipo de solo, nutrição, práticas de manejo, propriedades do solo, idade da planta, espécie vegetal e genótipo vegetal (TEAUMROONG, et al., 2010; PIROMYOU, et al., 2011).

A rotação de cultura promoveu aumento significativo da população microbiana da rizosfera e aumentou a atividade enzimática e a nutrição do solo no subsolo (TAHIR, et al., 2015).

No estudo realizado por Yang et al. (2015), foi verificado que, as estruturas da comunidade bacteriana do solo da rizosfera e os índices de diversidade apresentaram diferenças entre as culturas de primavera em campos de trigo, indicando que as populações bacterianas do solo da rizosfera variam significativamente como resposta a diferentes culturas e diferentes espécies de culturas, comprovando que a rotação de cultura é uma alternativa viável para preservação da comunidade bacteriana, podendo induzir um aumento de algumas bactérias rizosféricas funcionais do solo e não cultivadas, sugerindo uma relação potencial entre o aumento do rendimento de culturas intercalares e bactérias quando comparados com culturas feitas em sistema de plantio direto.

A biodiversidade desses microrganismos refere-se tanto ao número (riqueza) de diferentes categorias biológicas (ou unidades taxonômicas) quanto à abundância relativa dessas categorias. A biodiversidade inclui, assim, a totalidade dos recursos vivos, ou biológicos, e dos recursos genéticos, e seus componentes. O primeiro passo para o entendimento completo da biodiversidade das comunidades bacterianas é a

identificação e classificação taxonômica das distintas populações microbianas (VINHAL-FREITAS; RODRIGUES, 2010).

O agrupamento dos isolados obtido através da espectrometria de massa mostrou que os isolados endofíticos se agrupam, mas intercalam com grupos de isolados rizosféricos (figura 24). Assim como as triplicatas, que foi observado que algumas triplicatas não se agruparam, para isso, uma análise dos picos será feita para verificar os picos que estão discrepantes entre si e verificar se esses isolados fazem parte de um mesmo grupo ou não assim como outros trabalhos que já utilizaram critérios para refinamento dos picos presentes nos espectros, com o objetivo de selecionar os picos mais representativos da amostra (DIECKMANN et al, 2005; CARBONNELLE et al., 2007).

Quanto ao agrupamento dos isolados por meio (figura 27), observamos que o meio JNFb se mostrou mais eficiente para agrupar os isolados. Já os isolados nas diferentes doses de N (figura 26) tiveram um melhor agrupamentos nos isolados com doses de 0 e 120 N/ha. No perfil gerado para visualiza o agrupamento dos isolados com a presença ou ausência do inoculante, foi possível observar que os tratamentos contendo *Azospirillum brasilense* (figura 25) se agruparam em diversos momentos, formando grandes grupos, já os tratamentos sem inoculante formaram pequenos grupo pelo dendograma, e alguns isolados dispersos entre os grupos.

A espectrometria de massa MALDI-TOF é uma técnica utilizada para identificação dos microrganismos através da detecção do peso molecular das proteínas. É uma técnica rápida, de baixo custo, porém com banco de dados de referência são poucos (STETS, et a., 2013).

Visto que as 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 (DIECKMANN et al., 2005)

5.1.5 Conclusão

Os resultados apresentados nesse trabalho mostra uma grande densidade de bactérias diazotróficas endofíticas e rizosféricas associados ao trigo. As diferentes doses de N, desde a nula (0 N kg/ha) até a mais alta dose (120 N kg/ha) não interferiram na densidade populacional encontrada, tanto na raiz quanto na rizosfera do trigo. Assim como os tratamentos com e sem inoculante também não tiveram interferência na quantidade de diazotrofos encontrados.

Dentre os diferentes meios utilizados, os meios NFb e JNFb se mostraram mais eficiente, tanto para a contagem de NMP quanto no isolamento dos diazotrofos, apresentando os maiores índices de isolados.

Os organismos em destaque por realizarem 3 atividades bioquímicas ou mais (43 rizosféricos e 25 endofíticos), se mostraram, *in vitro*, com alto potencial para promoção do crescimento vegetal e também com produção de AIA sendo considerada boa. Dentre esses isolados percebemos que a maior parte resultou do isolamento dos meios JNFb e NFb respectivamente, sendo esses os mais eficientes para isolamento de diazotrofos.

O agrupamento gerado pelo MALDI-TOF se mostrou um agrupamento mais eficiente por meio, análises posteriores poderão nos confirmar a identificação desses isolados.

5.1.6 Perspectivas

Os isolados encontrados nesse trabalho com grande potencial para promoção do crescimento vegetal serão testados futuramente, *in vivo*, para verificar seu efeito na planta.

Uma análise de diversidade, através do sequenciamento parcial do 16S, está sendo realizada para verificarmos a riqueza desses diazotrofos presentes nos diferentes tratamentos e nos diferentes meios utilizados para isolamento.

REFERÊNCIAS

ACOSTA-MARTÍNEZ V, Burow G, Zobeck TM, Allen VG. Soil microbial communities and function in alternative systems to continuous cotton. **Soil Sci. Soc. Am. J.** 2010; 74: 1181–1192.

; . Mass spectrometry-based proteomics. Mar 13;422(6928):198-207. 2003.

AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University-Science**, v. 26, n. 1, p. 1-20, 2014.

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiol. Res.**, v. 2, p.173–181, 2008

ALM, R.; JOHANSSON, P.; HJERNØ, K.; EMANUELSSON, C.; RINGNÉR, M.; HÄKKINEN, J. Detection and identification of protein isoforms using cluster analysis of MALDI-MS mass spectra. **Journal of Proteome Research** v. 5, p. 785-792, 2006.

ALVES, H. C. R.; AMARAL, R. F. do; Produção, área colhida e produtividade do milho no nordeste. **Banco do Nordeste Informe Rural ETENE, AEPa, COERG.** Ano V. nº 16, 2011.

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

ANANDHAM, R. P. et al. Thiosulfate oxidation and mixotrophic growth of ethylobacterium goesingense and *Methylobacterium fujisawaense*. **J. Microbiol. Biotechnol.** 19: 17-22, 2009.

ANTOUN H e PREVOST, D. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: Siddiqui ZA (ed) PGPR: biocontrol and biofertilization. **Springer**, Netherlands, pp 1–38. (2005).

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29, p.924-929, 1983.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, R.S.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non legumes plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.922-928, 1997.

BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. Host-plant especificity in infection of cereal with *Azospirillum* spp. **Soil Biology and Biochemistry**, v.12, p.433-440, 1980.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Bulkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, p.485-491, 2000.

BALDANI, J. I., BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil, Eurípedes Malavolta, **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 77(3): 549-579 2005.

BAKHTIAR, R.; NELSON, R.W. Mass Spectrometry of the Proteome. **Molecular Pharmacology**, v. 60, n. 3, p. 405-415, 2001.

BASHAN, Yoav et al. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant and Soil**, v. 378, n. 1-2, p. 1-33, 2014.

BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, v.36, p.591-605, 1990.

BASI, S. Associação de *Azospirillum brasilense* e de nitrogênio em cobertura na cultura do milho. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do centro-oeste, Unicentro-pr. Guarapuava-pr 2013

BERG, G., et. al. The rhizosphere effect on bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus *Verticillium* differs depending on plant species and site. **FEMS Microbiol Ecol** 56:250–261. 2006.

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.

BERGAMASCHI, C. Ocorrência de Bactérias diazotróficas associadas a raízes e colmos de cultivares de sorgo. Dissertação de mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade do Rio Grande do Sul. Faculdade de Agronomia. Porto Alegre 2006.

BHATTARAI, T. & HESS, D. Yield responses of Nepalese spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to inoculation with *Azospirillum* spp. of Nepalese origin. **Plant Soil**, 151:67- 76, 1993.

BHATTARAI, T.; HESS, D. Growth and yield responses of a Nepalese spring wheat cultivar to the inoculation with Nepalese *Azospirillum* spp at various levels of N fertilization. **Biology and Fertility of Soils**, v.26, p.72-77, 1998.

BISSOTO, V. Algumas considerações sobre a cultura do trigo. In: REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO, 36., Passo Fundo. **Anais**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2004. Disponível em: <<http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/rcsbpt04/index.htm>>. Acesso em: 04/08/2015

BLUMER, C.; HAAS, D. Iron regulation of the hcnABC genes encoding hydrogen cyanide synthase depends on the anaerobic regulator ANR rather than on the global activator GacA in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. **Microbiology**, v. 146, n. 10, p. 2417-2424, 2000.

BODDEY, R.M.; DOBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for the future research. **Plant and Soil**, v.108, p.53-65, 1988.

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.

BROUGHTON, W. J. e DILWORTH, M. J. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. **Biochem. J.** **125**, 1075–1080. 1971.

, et al. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Plant Biol.** 2013.

BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and Discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, n. 3, p. 573-606, 2000.

BÜRGMANN, H. Activity and diversity of nitrogen-fixing microorganisms: novel tools to characterize populations in soil. 167p. Dissertation (Doctor in Science) - Swiss Federal Institut of Technology Zurich, Zurich, 2003.

CAIERAO, E. **Dados Sistema de Produção**, Embrapa Trigo, Sistema de Produção, 4 ISSN 18092985 4 Versão Eletrônica 2ª edição, Apr/2014

CARBONNELLE, E.; BERETTI, J.L.; COTTYN, S.; QUESNE, G.; BERCHE, P.; NASSIF, X.; FERRONI, A. Rapid identification of Staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 45, p. 2156–2161, 2007.

CARDOSO, E.J.B.N. & FREITAS, S.S. A rizosfera. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. & NEVES, M.C.P., eds. **Microbiologia do solo**. **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, p.41-57. 1992.

CASSÁN, F. E DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **soilbio. Review paper..2016.**

CASTRIC, P. A., Glycine Metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: Hydrogen Cyanide Biosynthesis. **The Journal of Bacteriology**, 130 (Supl 2): 826-831. 1977.

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

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento.** Conjuntura Semanal Período de 27 a 30/07/2015. Brasília, DF, 2015. Disponível em: >. Acesso em: 10/08/2015.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento.** Acompanhamento da safra brasileira de grãos. –v. 2, n.210. Safra 2014/15, Décimo levantamento, julho 2015 – Brasília: Conab, 2013- v. Mensal Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_08_18_10_30_18_boletim_graos_agosto_2015.pdf

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento.** Acompanhamento da safra brasileira: grãos, safra 2010/2011, décimo segundo levantamento, setembro 2011. Brasília, DF, 2011. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_09_19_09_49_47_boletim_setembro2011.pdf>. Acesso em: 07/08/2015

DALL'AGNOL, R. F. *Paraburholderia nodosa* é a principal espécie de fixação de N₂ capturada por feijão comum promissivo (*Phaseolus vulgaris* L.) no cerrado brasileiro. FEMS Microbiol Ecol. 2016.

DARTORA, J. et al. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum* brasileiro e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. Campina Grande, PB, UAEA/UFCG – v.17, n.10, p.1023–1029, 2013.

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

DOBBELAERE S., et al. Phytostimulatory effect of *Azospirillum* brasileiro wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, 212: 155–164. 1999.

DOBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganism and nitrogen- fixing sites. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION, 1., Washington, 1976. **Proceedings.** Washington: Washington State University, 1974. p.518- 538.

DOBEREINER, J.; MARRIEL, I.E.; NERY, M. Ecological distribution of *Azospirillum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.22, p.1464-1473, 1976.

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).

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

DOBERMANN, A. **Nitrogen Use Efficiency – State of the Art**. University of Nebraska - Lincoln, Agronomy & Horticulture -- Faculty Publications. Paper 316, 2005.

DONAGEMA, G.K.; CAMPOS, D.V.B. de; CALDERANO, S.B.; TEIXEIRA, W.G.; VIANA, J.H.M. (Org.). **Manual de métodos de análise de solos**. 2.ed. rev. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2011. 230p. (Embrapa Solos. Documentos, 132).

EMBRAPA **Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, Planaltina, Relatório Técnico Anual**, Brasília, 1976. 150p.

FALESTRINO, E. B. **Isolamento e Caracterização Bioquímica e Molecular de Microrganismo Associados à Interação *Langsdorffia hypogaea*-Hospedeira-Rizosfera**. Dissertação Do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, 2013.

FEDATTO, L. M. Caracterização de proteases extracelulares produzidas por *Xylella fastidiosa* de citros e videira. Dissertação de mestrado Interunidades ESALQ/CENA-USP, Piracicaba. 2004.

FERREIRA, F. V. Estatística experimental aplicada à agronomia. Maceió, EDUFAL. 437p. 1991.

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

FREITAS, R. Bactérias diazotróficas endofíticas associadas à cana-de-açúcar. Dissertação de mestrado instituto agrônomo curso de pós-graduação em agricultura tropical e subtropical. Campinas. 2011.

GARCIA, C.H. Tabelas para classificação de coeficientes de variação. Piracicaba: IPEF, 1989. 12 p. (Circular Técnica, 171).

GILKES, N.R., HENRISSAT, B., KILBURN, D.G., MILLER, R.C., & WARREN, R.A.J. Domains in microbial /3-1,4-glycanases: Sequence conservation, function and enzyme families. *Microbiol. Rev.* 55,. 305-315. 1991.

GIONGO, J. L. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp. Universidade Federal do Rio Grande do Sul Faculdade de Agronomia Programa de Pós-graduação em microbiologia agrícola e do ambiente

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.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E.K.; MATHAN, N.; REDDY, P.M.; REINHOLD-HUREK, B.; LADHA, J.K. Endophytic colonization of rice by diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.2634-2645, 2001.

GOMES, N. C.M., et al. Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. *Appl Environ Microbiol* 69:3758–3766. 2003

HALLMAN J., QUADT-HALLMAN A., MAHAFFEE W.F., KLOEPPER J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology** 43: 895-914. 1997.

HAMEEDA, B., RUPELA, O. P., REDDY, G., AND SATYAVANI, K. Application of plant growth-promoting bacteria associated with composts and macrofauna for growth promotion of pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.). *Biol. Fertil. Soils* 43, 221–227. 2006.

HEYDARI S, MOGHADAM PR, Arab SM, Hydrogen Cyanide Production Ability by *Pseudomonas Fluorescence* Bacteria and their Inhibition Potential on Weed. *In* Proceedings “Competition for Resources in a Changing World: New Drive for Rural Development”:, Tropentag, Hohenheim. 7- 9 October 2008

HILTNER, L. About new experiences and problems in the field of Bodenbakteriologie. **Works Ger Agric Soc**, v.98, p. 59–78, 1904.

HINSINGER P, BENGOUGH AG, VETTERLEIN D, YOUNG IM. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry, and ecological relevance. *Plant Soil* **321**: 117–152. 2009.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. Manual de métodos empregados em microbiologia agrícola. Brasília: **Embrapa**, 1994. 542p.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária **Embrapa Soja** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2011.

HUNGRIA, M; et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**. 331:413–425. 2010.

HUNGRIA, M; et al. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biol Fertil Soils** 49:791–801. 2013.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A. Importância do sistema de semeadura na população microbiana do solo. Comunicado Técnico/Embrapa-Soja, Londrina, Paraná, no 56, 1997, p.1-9.

HUNGRIA, M; et al. Tecnologia de Coinoculação da Soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*: Incrementos no Rendimento com Sustentabilidade e Baixo Custo. Resumos da **XXXIII Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil** - Londrina, PR, agosto de 2013

ISLAM, M.S. et al. Effects of coating on the release profile of drug combination from hydrophilic matrix pellets. **S. J. Pharm. Sci**, v.2, p.53-58. 2009.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. **Clin Microbiol**. Sep; 45(9): 2761–2764. 2007.

JAHNEL, M.C.; CARDOSO, E.J.B.N. & DIAS, C.T.S. Determinação do número mais provável de microrganismos do solo pelo método de plaqueamento por gotas. **R. Bras. Ci. Solo**, 23:553-559, 1999.

KASANA, R.C. et al. A rapid and easy method for detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. **Curr. Microbiol.**, 57:503-507, 2008.

KIRCHHOF, G.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I., ECKERT, B.; DÖBEREINER, J.; HARTMANN, A. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. **Plant and Soil**, v.194, p.45-55, 1997.

KLOEPPER, J. W., SCHROTH, M. N., MILLER, T. D. Effects of Rhizosphere Colonization by Plant Growth Promotion Rhizobacteria on Potato Plant Development and Yield. **Phytopathology** v. 70, p. 1078-1082, 1980.

KREMER, R. J.; SOUISSI, T. Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth. **Current microbiology**, v. 43, n. 3, p. 182-186, 2001.

KUSS, A. V. et al. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1459–1465. 2007.

LADHA, J.K.; et al. Efficiency of fertilizer nitrogen in cereal production: retrospects and prospects. **Advances in Agronomy**, v.87, p.85-156, 2005.

LEITE, L.F.C. & ARAÚJO, A.S. Ecologia microbiana do solo. Teresina, **Embrapa Meio Norte**, 24p. 2007.

LOPES, BASTOS e DAHER. Produção e demanda de fertilizantes nitrogenados e sulfatados: evolução, tendências e desafios. ANDA. Universidade Estadual de Lavras. Piracicaba/SP. **Livro IPNI International plant nutrition institute - BRASIL**. 2008.

LORCK, H. Production of hydrocyanic acid by bacteria. **Physiologia Plantarum**, v. 1, n. 2, p. 142-146, 1948.

LUGTENBERG, B. E KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, 63, 541-556, 2009.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MADHAIYAN, M. et al. Characterization of Plant Growth-Promoting Traits of Free-Living Diazotrophic Bacteria and Their Inoculation Effects on Growth and Nitrogen Uptake of Crop Plants. v. 19, n. July, p. 1213–1222, 2009.

MAFOLETTI, R; MARTINS, G; TURRA, F. Agrianual 2012 Anuário da Agricultura Brasileira. **Mercado desanima o produtor de trigo brasileiro**. Informa Economics FNP, São Paulo 2012.

MAGALHÃES, F.M.M., PATRIQUIN, D., DÖBEREINER, J. Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. *Revista Brasileira de Biologia* 39: 587-596. 1979.

MAJEED, A. et al. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015

MANTER, D. K. et al. Pyrosequencing Reveals a Highly Diverse and Cultivar-Specific Bacterial Endophyte Community in Potato Roots. p. 157–166, 2010.

MAPA. Ministério da Agricultura. 2015. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/trigo>

MARRA, L. M. Bactérias diazotróficas em sempre-viva. Biosci. J., Uberlândia, v. 28, supplement 1, p. 17-24, Mar. 2009.

MARSCHNER P, YANG CH, LIEBEREI R. CROWLEY D. E. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. **Soil Biol. Biochem.** 2001; 33: 1437–1445.

MARTIN, P.; GLATZLE, A.; KOLB, W.; OMay, H.; SCHMIDT, W. N₂ fixing bacteria in the rizosphere: quantification and hormonal effects on root development. **Zeitschrift Pflanzenernährung Bodenkunde**, v.152, p.237- 245, 1989.

MATIAS, G. C. S. Eficiência agrônômica de fertilizantes fosfatados em solos com diferentes capacidades de adsorção de fósforo e teores de matéria orgânica. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba-SP. 2010

MEDIE, F. M. et al. Genome analyses highlight the different biological roles of cellulases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 227-234, 2012.

MENDES, R. et al. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiol Rev**, v.37, p. 634–663, jul, 2013.

MELONI, R. Quantificação Microbiana da Qualidade do Solo. In: **Microbiota do solo e qualidade Ambiental**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2007: p. 1-299.

MILES, A. A., MISRA, S. S. e IRWIN, J. O. The estimation of the bactericidal power of the blood. J Hyg (Lond) 38, 732–749. 1938.

MOREIRA, F. M. de S.; et al.; Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae** 1(2): 74-99, 2010

MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2.ed. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2006. 729p.

MUTHUKUMANASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMAHAN. Influence of N fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp.

From Indian sugar cane varieties. **Biology and Fertility of Soil**, v.29, p.157-164, 1999.

NEILANDS, J. B. A Crystalline Organo-iron pigment from a Rust Fungus (*Ustilago sphaerogena*). **Journal of the American Chemical Society**, 74 (Suppl 19): 4846–4847. 1952

NEILANDS, J. B. Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. **The Journal of Biological Chemistry**, 270 (Suppl 45): 26723–26726. 1995

NERONI, R. D. E CARDOSO, E. J. B. N., Occurrence of diazotrophic bacteria in *Araucaria angustifolia*. **Sci Agri**, 64 (2007), pp. 303–304

NIE M., et al. Rhizosphere effects on soil bacterial abundance and diversity in the Yellow river deltaic ecosystem as influenced by petroleum contamination and soil salinization. **Soil Biol Biochem** 41:2535–2542. 2009.

OLIVEIRA, A. L. M., STOFFELS, M., SCHMID, M., REIS, V. M., BALDANI, J. I., HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 106-113, 2009.

O'SULLIVAN, D. J. e O'GARA, F. Traits of Fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens,"**Microbiological Reviews**, vol. 56, no. 4, pp. 662–676, 1992.

PASINATO A; et al. **Dados Sistema de Produção**, Embrapa Trigo, Sistema de Produção, 4 ISSN 18092985 4 Versão Eletrônica 2ª edição, Apr/2014

PATTERN, C. L., GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* in lactic acid in development of the host plant root system. **Environ. Microbiol.** 68, 3795-3801. 2002.

PEDRAZA, R.O.; RAMIREZ-MATA, A.; XIQUI, M.L.; BACA, B.E. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. **FEMS Microbiol Lett.** v.233(1), p.15-21, 2004.

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

PERIN, L.; et al. Diversidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolada de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.39, n.8, p.763-770, ago. 2004.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: *Microbial Ecology of Leaves* (eds) Andrews, J.H. and Hirano, S.S. Springer-Verlag, New York, New York, USA, 179-197. 1991.

PIMENTEL GOMES, F. *Curso de Estatística Experimental*. São Paulo: **Nobel**, 1985. 467 p

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

PIROMYOU P., et al. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. *Eur. J. Soil Biol.* 47: 44–54. 2011.

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.

RAO, M.B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 62:597-635. 1998

REIS JUNIOR, et al. F. B. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo**. Embrapa Cerrados. Planatina- DF. 2002. 33p.

REIS, D. P. dos. Produtividade de milho e ecologia microbiana da rizosfera de plantas sob diferentes métodos de inoculação e níveis de nitrogênio, Universidade Federal de São João Del-Rei Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia, SÃO JOÃO DEL REI MINAS GERAIS – BRASIL, 2015.

ROESCH, L. F. W. **Ocorrência e distribuição de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de milho**. 2003, 77 f. Tese (Mestrado em Ciência do Solo) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. v. 19, n. 8, p. 827–837, 2006.

RODRÍGUEZ, H. e FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnol. Adv.** 17: 319-339. 1999.

RUFINO, C. Pesquisa e indústria discutem utilização de microrganismo na agricultura. **Embrapa**. 2013. Disponível em: http://www.cnpso.embrapa.br/noticia/ver_noticia.php?cod_noticia=822

RYAN, R. P. et al. Bacterial endophytes : recent developments and applications. v. 278, p. 1–9, 2008.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p.487-491, 1988.

SALA, V. M. R. et al. **Ocorrência e efeito de bactérias Diazotróficas em genótipos de trigo**. R. Bras. Ci. Solo, 29:345-352, 2005

SALA, V. M. R. et al. **Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo**. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.42, n.6, p.833-842, jun. 2007

SALA, V. M. R.; SILVEIRA, A. P. D.; CARDOSO, E. J. B. N. Bactérias Diazotróficas Associadas a Plantas Não-leguminosas, In: **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2007: p. 1-299.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221 p

SANTI, C. et al. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. p. 743–767, 2013.

SARAVANAN, V. S., et al. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Chemosphere** 66: 1794-1798. 2007.

SCHIPPERS B, et al. Beneficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere interactions. **Plant and Soil**, 129 (Suppl 1): 75-83. 1990.

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

SILVA, F. DE A. S. E. e AZEVEDO, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: **World Congress on Computers in**

Agriculture, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SILVA, T. F.; MELLONI, R. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas não simbióticas em solos da reserva biológica serra dos toledos, itajubá (MG). *R. Bras. Ci. Solo*, 35:359-371, 2011

SILVEIRA, E. L. **Identificação de comunidades bacterianas de solo por seqüenciamento do gene 16S rRNA**. Dissertação de Mestrado em Microbiologia. Universidade Estadual Paulista “Julio De Mesquita Filho” Faculdade De Ciências Agrárias E Veterinárias. Jaboticabal/SP. 2004.

SMIBERT, R. M; KRIEG, N. R. **Phenotypic characterization**. In Gerharelt 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.

SÖDERBERG, K.H.; OLSSON, P. A.; BÅÅTH, E. Structure and activity of the bacterial community in the rhizosphere of different plant species and the effect of arbuscular mycorrhizal colonisation. **FEMS Microbiol. Ecol.** 2002; 40: 223–231.

SOMERS, J. D.; ISAAC, P.; EDWARDS, K. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.) **Theor Appl Genet.** 2004.

SOUZA, A.M. Isolamento e caracterização de bactérias diazotróficas de campos de milho. Trabalho de Conclusão de Curso. (Agronomia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2013.

SOUZA, W. P. et al. Desenvolvimento inicial de trigo sob doses de nitrogênio em Latossolo Vermelho de Cerrado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina Grande, PB, UAEA/UFCG . v.17, n.6, p.575–580, 2013.

SPAEPEN S, VANDERLEYDEN J, OKON Y. Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. In **Plant Innate Immunity**, Adv. Bot. Res. 51, ed. LC van Loon, pp. 283–320. London: Academic. 2009

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

STABEN, M. L., D. F. BEZDICEK, J. L. SMITH, AND M. F. FAUCI. Assessment of soil quality in conversation reserve program and wheat–fallow soils. **Soil Sci. Soc. Am. J.** 61:124–130. 1997.

STAHL, D. A. Molecular approaches for the measurement of density, diversity, and phylogeny. In: HURST, C.J.; et al. **Manual of environmental microbiology**. Washington: ASM Press, p. 102-114, 1997.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogenfixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.487-506, 2000.

STETS, M.I et al. Rapid identification of bacterial isolates from wheat roots by high resolution whole cell MALDI-TOF MS analysis. **J Biotechnol**, v.165(3-4), p.167-74, Jun, 2013.

SUN, L. et al. Endophytic Bacterial Diversity in Rice (*Oryza sativa* L .) Roots Estimated by 16S rDNA Sequence Analysis. p. 415–424, 2008.

TRIPLETT, E.W.; ROBERTS, G.P.; LUDDEN, P.W.; HANDELSMAN, J. What's new in nitrogen fixation. **ASM News**, Washington, v. 55, p. 15-21, 1989.

TEAUMROONG, N, et al. Production and application of bioorganic fertilizers for organic farming systems in Thailand: a case study. In: Insam H, Franke-Whittle I, Goberna M.(Eds.), *Microbes at Work*. **Springer**, Berlin Heidelberg; pp. 293– 312. 2010.

TAHIR, M., et al. Cultivation-based and molecular assessment of bacterial diversity in the rhizosphere of wheat under different crop rotations. *PloS one*, 10(6), e0130030.

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.

USDA. **Foreign Agricultural Service - United States Department of Agriculture, 2015**. Disponível em: > > acesso em: 19/08/2015.

VACHERON, J. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. n. SEPTEMBER, 2013.

VIDEIRA, S. S., ARAUJO, J. L. S., BALDANI, V. L. D. Metodologia para Isolamento e Posicionamento Taxonômico de Bactérias Diazotróficas Oriundas de Plantas Não-Leguminosas. Doc 234. **Seropédica** – RJ 2007

VINHAL-FREITAS, C. I.; RODRIGUES, M. B. Fixação biológica do nitrogênio na cultura do milho. **Agropecuária Técnica**, Areia, PB – CCA-UFPB. v. 31, n. 2, 2010

WHIPPS, J. M., Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, 52 (Suppl 1): 487-511. 2001.

WHITMAN, W. B., COLEMAN, D. C., WIEBEW, J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 95:6578–83. 1998

WHITAKER, J. R. Principles of Enzymology for the Food Sciences; 2° ed, New York: Marcel Dekker, Inc. 625p. Cap.: **Indroduction to the hydrolases**, p.387-389. 1994.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbial Rev.**, v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.

YAO, H. Y., BOWMAN, D., WEI S. Soil microbial community structure and diversity in a turfgrass chronosequence: land-use change versus turfgrass management. **Appl. Soil Ecol.** 2006; 34: 209–218.

YANG, Z., et al. Variation of bacterial community diversity in rhizosphere soil of sole-cropped versus intercropped wheat field after harvest. **PloS one**, 11(3), e0150618. 2016.

YANG, Q. et al. Structure and function of soil microbial community in artificially planted *Sonneratia apetala* and *S. caseolaris* forests at different stand ages in Shenzhen Bay , China. v. 85, p. 754–763, 2014.

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, Y. et al. Row ratios of intercropping maize and soybean can affect agro-nomic efficiency of the system and subsequent wheat. **PLOS One**. Jun 10; 2015.