

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM COMPUTAÇÃO APLICADA**

DIEGO BRAGA SANTI

**ANÁLISE METATAXONÔMICA DE COMUNIDADES MICROBIANAS
DA RIZOSFERA DO MILHO APÓS APLICAÇÃO DE NITROGÊNIO E
INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS**

**PONTA GROSSA
2019**

DIEGO BRAGA SANTI

**ANÁLISE METATAXONÔMICA DE COMUNIDADES MICROBIANAS
DA RIZOSFERA DO MILHO APÓS APLICAÇÃO DE NITROGÊNIO E
INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Computação Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientação: Prof. Dr. Rafael Mazer
Etto

Coorientadora: Prof Dra. Carolina
Weigert Galvão

**PONTA GROSSA
2019**

Santi, Diego Braga

S234 Análise metataxonômica de comunidades microbianas da rizosfera do milho após aplicação de nitrogênio e inoculação com bactérias / Diego Braga Santi. Ponta Grossa, 2019.
55 f.

Dissertação (Mestrado em Computação Aplicada - Área de Concentração: Computação para Tecnologias em Agricultura), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Mazer Etto.
Coorientadora: Profa. Dra. Carolina Weigert Galvão.

1. Inoculante. 2. Nitrogênio. 3. Azospirillum. 4. Metagenômica. 5. 16S rRNA. I. Etto, Rafael Mazer. II. Galvão, Carolina Weigert. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Computação para Tecnologias em Agricultura. IV.T.

CDD: 004

TERMO DE APROVAÇÃO

Diego Braga Santi

ANÁLISE METATAXONÔMICA DE COMUNIDADES MICROBIANAS DA RIZOSFERA DO MILHO APÓS APLICAÇÃO DE NITROGÊNIO E INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Computação Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Rafael Mazer Etto

Presidente



Prof. Dr. Gabriel Barth

FUNDAÇÃO ABC -



Prof. Dr. Daniel Ruiz Potma Gonçalves

UEPG

Ponta Grossa, 18 de setembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida.

Agradeço a minha mãe Neila e minha avó Marli que sempre me apoiaram desde o início da minha jornada nos estudos e em toda minha vida. Sem vocês eu não poderia fazer o que amo e não teria o apoio, cuidado e amor que recebo todos os dias mesmo estando longe de casa. Você é minha razão de viver e eu tenho orgulho de ter a melhor mãe do mundo. Palavras não são suficientes para agradecer, mas você sabe o quanto eu te amo e o quanto me sinto protegido e incentivado por você, para que eu me torne sempre uma pessoa melhor a cada dia que passa. Obrigado por tudo. Espero que, com este novo passo da minha vida que está sendo concluído, você se orgulhe de mim e perceba que todo o esforço valeu a pena.

Agradeço a minha família, meu pai, irmãos e sobrinhos.

Agradeço ao meu falecido avô Joel, que também sempre me apoiou em toda a minha vida e deixou muitas saudades.

Agradeço a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a todos os professores que me ajudaram e me ensinaram tanto durante este processo.

Agradeço ao meu Professor e orientador Rafael Mazer Etto pelo apoio em todas as etapas, mesmo nas horas difíceis estive ao meu lado me apoiando e foi um verdadeiro amigo que sempre levarei com carinho em meu coração.

Agradeço a minha co-orientadora Professora Carolina Weigert Galvão por toda a ajuda e ensinamentos.

Agradeço a todos os pesquisadores do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio da UFPR e do Laboratório de Biologia Molecular Microbiana da UEPG, LABMOM, pelo espaço cedido para a realização da pesquisa, pelos dados cedidos que possibilitou a realização do presente trabalho, pela oportunidade de conhecer e compartilhar conhecimentos com outros pesquisadores e por todo o apoio.

Agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A utilização de bactérias promotoras do crescimento vegetal como alternativa ao uso de fertilizante mineral é uma realidade cada vez mais presente no âmbito agrícola. A utilização de fertilizante mineral com quantidade inadequada gera custos desnecessários e coloca em evidência a necessidade de uma solução prática e sustentável. As bactérias têm um papel fundamental no crescimento e produção da planta, pois fornecem substratos e nutrientes necessários para um crescimento saudável. Sabe-se que existem bactérias presentes no solo e na rizosfera das plantas que têm a capacidade de fixar nitrogênio naturalmente, assim como outros processos complexos que são pouco documentados devido a dificuldade em cultivar tais bactérias através de técnicas laboratoriais tradicionais. Nesta pesquisa foram analisados dados de metagenômica a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA da rizosfera do milho. Os dados foram gerados por meio de um experimento prévio onde foram plantadas sementes de milho com diferentes doses de nitrogênio e inoculadas com diferentes bactérias, totalizando 11 tratamentos em triplicata. A presente pesquisa tem como objetivo determinar a taxonomia dos microrganismos e investigar o impacto nas comunidades bacterianas presentes na rizosfera do milho em relação a quantidade de nitrogênio aplicado e bactérias inoculadas. Foram encontrados 28 filos, 62 classes, 83 ordens, 183 famílias e 582 gêneros. As bibliotecas que foram aplicadas doses de 30 kg de N/ha sem inoculante, 160 kg de N/ha sem inoculante, e 30 kg de N/ha + Azototal inoculado com A. Brasilense AbV5 + AbV6 apresentaram maior riqueza de microrganismos. As bibliotecas que foram aplicadas doses de 160 kg de N/ha sem inoculação e 30kg de N/ha + 8121 inoculado com Rhizobium apresentaram maior diversidade de microrganismos. Em nível de gênero, as bactérias que são capazes de promover o crescimento vegetal encontram-se nas bibliotecas que receberam dose de 0kg, 30kg e 160kg de N/ha, sem inoculantes.

Palavras-chave: Inoculante, Nitrogênio, Azospirillum, Metagenômica, 16S rRNA.

ABSTRACT

The use of plant growth promoting bacteria as an alternative to the use of mineral fertilizer is a growing reality in agriculture. Using inadequate mineral fertilizer generates unnecessary costs and highlights the need for a practical and sustainable solution. Bacteria play a key role in plant growth and production by providing the substrates and nutrients needed for healthy growth. Bacteria present in the soil and rhizosphere of plants are known to have the ability to naturally fix nitrogen, as well as other complex processes that are poorly documented due to the difficulty in cultivating such bacteria through traditional laboratory techniques. In this research, we analyzed metagenomic data from the sequencing of the 16S rRNA gene from the maize rhizosphere. The data were generated through a previous experiment where maize seeds with different nitrogen doses were planted and inoculated with different bacteria, totaling 11 treatments in triplicate. This research aims to determine the taxonomy of microorganisms and investigate the impact on bacterial communities present in the maize rhizosphere comparing to the amount of nitrogen applied and inoculated bacteria. We found 28 phyla, 62 classes, 83 orders, 183 families and 582 genus. Libraries that applied 30 kg N / ha without inoculant, 160 kg N / ha without inoculant, and 30 kg N / ha + Azototal inoculated with A. Brasilense AbV5 + AbV6 showed higher richness of microorganisms. Libraries that applied 160 kg N / ha without inoculation and 30kg N / ha + 8121 inoculated with Rhizobium showed higher diversity of microorganisms. At the genus level, the bacteria that are able to promote plant growth are found in libraries that received 0kg, 30kg and 160kg N / ha without inoculants.

Keywords: Inoculant, Nitrogen, Azospirillum, Metagenomic, 16S rRNA.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - SEQUÊNCIAS ALINHADAS.....	28
FIGURA 2 - ABUNDÂNCIA DE FILO.....	29
FIGURA 3 - ABUNDÂNCIA DE CLASSES.....	31
FIGURA 4 - ABUNDÂNCIA DE ORDENS.....	32
FIGURA 5 - ABUNDÂNCIA DE FAMÍLIAS.....	34
FIGURA 6 - ABUNDÂNCIA DE GÊNEROS.....	35
FIGURA 7 - DISTRIBUIÇÃO DE ABUNDÂNCIA DE ESPÉCIES EM OTU.....	36
FIGURA 8 - DISTRIBUIÇÃO DE ABUNDÂNCIA DE ESPÉCIES DA OTU 118.	37
FIGURA 9 - DISTRIBUIÇÃO DE ABUNDÂNCIA DE ESPÉCIES DA OTU 161.	37
FIGURA 10 - DISTRIBUIÇÃO DE ABUNDÂNCIA DE ESPÉCIES DA OTU 265....	38
FIGURA 11 - PERFIS DE DIVERSIDADE DE RENYI.....	40
FIGURA 12 - ANÁLISE DE CORRELAÇÃO E TAXONOMIA A NÍVEL DE FILO.	41
FIGURA 13 - CORRELAÇÃO DE PCOA E TAXONOMIA A NÍVEL DE GÊNERO.	43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - TRATAMENTO E INOCULAÇÃO DO MILHO	18
TABELA 2 - DETECÇÃO DE QUIMERAS.....	24
TABELA 3 - QUANTIDADE E NORMALIZAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS.....	25
TABELA 4 - PRINCIPAIS GRUPOS TAXONÔMICOS.....	27
TABELA 5 - PORCENTAGEM DE FILOS MAIS ABUNDANTES	30
TABELA 6 - PORCENTAGEM DE CLASSES MAIS ABUNDANTES	31
TABELA 7 - PORCENTAGEM DE ORDENS MAIS ABUNDANTES	32
TABELA 8 - PORCENTAGEM DE FAMÍLIAS MAIS ABUNDANTES.....	34
TABELA 9 - PORCENTAGEM DE GÊNEROS MAIS ABUNDANTES	35
TABELA 10 - ÍNDICE DE CHAO E ÍNDICE DE SHANNON (H).....	38

LISTA DE SIGLAS

rRNA	ÁCIDO RIBONUCLEICO RIBOSSOMAL
16S	SUBUNIDADE MAIOR DE UM RIBOSSOMO EM PROCARIOTOS
DNA	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO
NCBI	NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION
OTU	OPERATIONAL TAXONOMIC UNIT
PCOA	ANÁLISE DE COORDENADAS PRINCIPAIS
PCR	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
RNA	ÁCIDO RIBONUCLEICO
RDP	RIBOSSOMAL DATABASE PROJECT

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1	DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	18
4.2	FERRAMENTAS UTILIZADAS	21
4.2.1	Mothur.....	21
4.2.2	Vsearch.....	21
4.2.3	Uchime	21
4.2.4	RDP.....	22
4.2.5	Infernal	22
4.2.6	Mcclust.....	22
4.2.7	Software R.....	22
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5.1	PRÉ-PROCESSAMENTO DAS SEQUÊNCIAS	23
5.1.1	Detecção e Remoção de Quimeras	23
5.1.2	Normalização das Sequências	25
5.1.3	Classificação Taxonômica Através do <i>RDP Classifier</i>	26
5.1.4	Alinhamento das Sequências.....	27
5.1.5	Clusterização das Sequências em OTU.....	28
5.2	ANÁLISE DE ABUNDÂNCIA DE GRUPOS TAXONÔMICOS	28
5.2.1	Análise de Abundância de Filo.....	28
5.2.2	Análise de Abundância de Classe.....	30
5.2.3	Análise de Abundância de Ordem	32
5.2.4	Análise de Abundância de Família	33
5.2.5	Análise de Abundância de Gênero.....	35
5.3	ANÁLISE DE ABUNDÂNCIA DE OTU	36
5.4	ANÁLISE DE RIQUEZA E DIVERSIDADE.....	38
5.5	ANÁLISE DE COORDENADAS PRINCIPAIS.....	40

5.5.1	Análise de Correlação e Taxonomia a Nível de Filo	41
5.5.2	Análise de Correlação e Taxonomia a Nível de Gênero	43
6	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

Microrganismos na agricultura desempenham um papel fundamental para o fornecimento de nutrientes para as plantas, contribuindo para o aumento da produtividade. As rizobactérias habitam a rizosfera, área de encontro entre a raiz da planta e solo, e têm a capacidade de promover o crescimento vegetal, contribuindo para a diminuição da aplicação de fertilizantes químicos e aumento dos níveis de nitrogênio, potássio e outros elementos importantes (EGAMBERDIYEVA, 2005). Estas rizobactérias desempenham um papel importante na composição, qualidade e fertilidade do solo, porém a sua abundância e diversidade são afetadas por fatores externos como o clima e a quantidade de fertilizantes (JANGID et al., 2008).

A população e composição microbiana do solo é pouco explorada pois existem problemas que impedem o desenvolvimento de pesquisas na área. A maior dificuldade é a incapacidade de cultivar a maioria dos microrganismos através de técnicas laboratoriais tradicionais, devido a complexidade em reproduzir fatores que simulem as condições naturais para o seu desenvolvimento, sendo assim, menos de 1% deles são conhecidos e cultiváveis (TORSVIK et al., 2002). Outro problema é descobrir quais microrganismos estão presentes em determinado tipo de solo e quais funções eles desempenham na sua composição (VOGEL et al., 2009).

Neste contexto, a metataxonomica apresenta-se como uma poderosa ferramenta de análise da diversidade microbiana do solo. Esta técnica permite estudar o DNA extraído diretamente de uma amostra do solo (HANDELSMAN et al., 1998). A partir de uma amostra de solo e do material genético purificado, são amplificados milhões de fragmentos do gene 16S rRNA que é considerado um gene presente em todos os procariotos e definido como ideal para análises filogenéticas (TURNBAUGH et al., 2009). Estes fragmentos precisam ser analisados e tratados através de softwares específicos da área de bioinformática (SEGATA et al., 2013).

O nitrogênio é um dos principais nutrientes utilizados pelo milho, porém deve-se avaliar a quantidade aplicada para que não ocorram aplicações em quantidades insuficientes para suprir as necessidades da planta e aplicações com doses desnecessárias que resultam em mais gastos (SCHRÖDER et al., 2000). O impacto nas comunidades bacterianas com a aplicação de diferentes doses de nitrogênio e da inoculação de diferentes bactérias ainda não é bem documentada

Na pesquisa de Ozturk e colaboradores (2003), foram inoculadas bactérias em sementes de trigo com 3 níveis de fertilização com nitrogênio (0, 40 e 80kg ha) para avaliar o impacto

em vários aspectos como rendimento dos grãos, número de grãos por espiga e concentração de proteína bruta. Foi possível observar que a maioria dos resultados foram influenciados de acordo com a dose de nitrogênio aplicada e os efeitos positivos foram diminuindo conforme a dose de nitrogênio aplicado aumentava. Assim como no estudo de (ZEFFA et al., 2008).

A presente pesquisa investigou o impacto nas comunidades bacterianas presentes na rizosfera do milho em relação a quantidade de nitrogênio aplicado e bactéria inoculada em cada um dos 11 tratamentos, a partir de resultados estatísticos e da definição da taxonomia dos dados que foram gerados a partir do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a influência dos diferentes inoculantes e diferentes doses de nitrogênio sobre as comunidades microbianas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I) Realizar a análise das sequências do gene 16S rRNA através de softwares da área de bioinformática.
- II) Determinar os principais grupos taxonômicos das comunidades microbianas: filo, classe, ordem, família e gênero.
- III) Identificar e analisar o impacto nas comunidades microbianas após a aplicação das diferentes doses de nitrogênio e diferentes inoculantes para determinar riqueza, diversidade e de que maneira estas comunidades contribuem para a saúde do milho e composição do solo.
- IV) Identificar quais tratamentos possuem maior riqueza de bactérias promotoras do crescimento vegetal a nível de gênero.

3 REVISÃO DE LITERATURA

O milho é uma das culturas mais importantes do mundo, junto com o trigo e arroz (PEREIRA et al., 2011). Além de ser um cereal consumido mundialmente provendo nutrientes para seres humanos e animais, o milho é utilizado como matéria-prima para a produção de óleo, bebidas, amido e combustível (CHAUHAN et al., 2011).

O cultivo do milho difere dependendo da região e do clima característico. A produção no Brasil exige até 50% do custo total com fertilizantes, visto que esta cultura precisa de grande quantidade de nitrogênio (SPAGNOLLO et al. 2002). A fixação de nitrogênio através de bactérias pode ser uma alternativa para a não-utilização ou redução de fertilizante mineral (SPRENT, 2009).

Diferentes bactérias podem ser utilizadas para auxiliar no crescimento e saúde da planta, contribuindo principalmente com a fixação biológica do nitrogênio, a partir da transformação de nitrogênio atmosférico em nitrogênio assimilável e benéfico para as plantas e o meio ambiente (ASHRAF et al., 2011). O nitrogênio é o principal composto para o crescimento saudável do milho (MALAVOLTA et al., 1997) e as plantas aproveitam menos de 50% deste componente quando disponibilizado na forma de fertilizante (CANTARELLA et al., 2004). Os solos encontrados no Brasil possuem baixas concentrações de nitrogênio, por isso é necessário adubação química (HUNGRIA et al., 2007).

Independente do tipo de cultivo, o milho pode ser caracterizado como um ecossistema onde o exsudato da raiz provê açúcares, nutrientes, enzimas e determina as populações microbianas que promovem o crescimento da planta (PEIFFER et al., 2013). A partir do estudo das comunidades microbianas da rizosfera, que compreende a região do solo que esta em contato direto com raiz da planta, onde há maior diversidade de microrganismos, é possível acelerar o crescimento da planta, controlar possíveis patógenos e avaliar o impacto do uso de diferentes bactérias fixadoras de nitrogênio, denominadas inoculantes, na comunidade bacteriana nativa (BLOEMBERG et al., 2001).

A análise microbiana teve seu início com o estudo através de amostras coletadas no ambiente e cultivadas em laboratório, porém esta técnica é considerada inviável pois existem dificuldades em recriar o habitat natural e as condições para crescimento das bactérias (NANNIPIERI et al., 2008), sendo assim, a microbiota da rizosfera permanece pouco conhecida, e as funções que ela desempenha no desenvolvimento e interações com o milho deve ser estudada. Não há conhecimento sobre quais condições e fatores devem ser fornecidos neste

processo, por isso o cultivo através de técnicas laboratoriais tradicionais consegue determinar menos de 1% das bactérias presentes na amostra estudada (TORSVIK et al., 2002).

Esta dificuldade pode ser contornada através de técnicas moleculares independentes de cultivo, onde o gene 16S rRNA da comunidade bacteriana é sequenciado e permite a identificação dos táxons bacterianos que compõe a comunidade (CHAUHAN et al., 2012).

O sequenciamento do 16S rRNA realizado por meio de sequenciadores de alto rendimento produz dados cada vez mais rápido e com menor custo, como é o caso do Illumina Miseq. Esta plataforma tem uma taxa menor de erros e custa significativamente menos que o pirossequenciamento 454 da Roche, que é uma plataforma comumente utilizada no processo de sequenciamento (NELSON et al., 2014).

As ferramentas computacionais para realizar a análise dos arquivos que contém as sequências de nucleotídeos dos microrganismos possuem diversas funcionalidades e tipos diferentes de algoritmos. O software Mothur é gratuito e disponível para diversos sistemas operacionais. Este software implementou algoritmos de outras ferramentas e aperfeiçoou-as incluindo novas funcionalidades, como a utilização de múltiplos processadores, aproveitamento mais eficiente de memória RAM, agrupamento de sequências similares com maior precisão e cálculos adicionais (SCHLOSS et al., 2009).

Existem dificuldades no desenvolvimento de ferramentas computacionais para a análise de comunidades microbianas, pois o tamanho e número de arquivos aumenta com o desenvolvimento de novos estudos, necessitando de ferramentas que possam realizar as análises de maneira rápida através de cálculo e algoritmos, requerendo menor poder computacional para completar tais tarefas, e o Mothur se mostra eficiente nestes quesitos, pois é um software flexível, com comandos documentados e práticos, sendo constantemente atualizado e incrementado com novas funcionalidades (SCHLOSS et al., 2009).

Outra ferramenta utilizada durante as análises de sequências é o RDP - The Ribosomal Database Project II, que oferece diversas ferramentas para a comunidade de pesquisadores. Segundo o Registro de Repositórios de Dados de Pesquisa (2017), o RDP armazena cerca de 3.356.809 milhões de sequências do gene 16S rRNA. Estas sequências são provenientes de estudos onde as sequências foram classificadas e os autores destas pesquisas depositaram no banco de dados. Os autores do projeto desenvolveram um classificador Bayesiano que não requer alinhamento prévio e processa sequências parciais. O classificador de sequências do gene 16S rRNA é chamado de RDP Classifier e compara duas bibliotecas de sequências para estimar através de resultados estatísticos a probabilidade de semelhança entre elas (WANG et al. 2007).

O estudo de Pereira e colaboradores (2011), investigou a diversidade bacteriana da rizosfera do milho do solo de uma região da Argentina, utilizando primers para amplificar o gene 16S rRNA, onde foram encontrados em maior quantidade os filos Actinobacteria e Proteobacteria com um total de 26% cada, porém na análise das sequências não foram realizados pré-tratamentos para filtrar as sequências e retirar possíveis erros e fatores que poderiam influenciar no resultado final. Um exemplo dos pré-tratamentos seria a retirada de quimeras, que são sequências artificiais geradas durante a amplificação do gene 16S rRNA.

Já o estudo de Chauhan e colaboradores (2011) realizou o pré-tratamento das sequências obtidas e retirou as sequências quiméricas e outras indefinidas, totalizando cerca de 9,2% do total analisado. Este estudo teve como objetivo explorar a diversidade de bactérias na rizosfera do milho tropical do solo da Índia, também utilizando a amplificação do gene 16S rRNA. Como resultado apresentou 48% do filo Proteobacteria seguido do filo Actinobacteria com 10,3%. Mas os autores utilizaram o software Dotur que tem como função designar sequências em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU), construir curvas de amostras e estimar riqueza e diversidade (SCHLOSS et al. 2005).

Peiffer e colaboradores (2013), caracterizou a riqueza e diversidade microbiana da rizosfera do milho em cinco solos diferentes com regiões climáticas diferentes, sendo plantadas as sementes em Nova York na região Norte em três solos diferentes e no Centro-Oeste em dois solos diferentes. Os solos da região Norte se mostraram similares em sua composição microbiana, porém os solos da região Centro-Oeste não se mostraram tão similares quando comparados. Os autores dizem que trabalhos anteriores mostram que a latitude e a distância geográfica não influenciam de maneira significativa a diversidade, mas o pH do solo se mostrou o fator que mais influencia neste aspecto.

Segundo a lei 6.894 de 13 de Julho de 1981 da Legislação Brasileira, a definição de inoculante é “substância que contenha microrganismos com a atuação favorável ao desenvolvimento vegetal”.

Alguns estudos mostram que existe estímulo de crescimento e produção em espécies de plantas com o uso da bactéria *Azospirillum*. O estudo de Hungria e colaboradores (2010), avaliou a utilização de baixas doses de nitrogênio e inoculante com a bactéria *Azospirillum* para avaliar seus efeitos na cultura do milho e obteve como resultado um aumento de 25% na produtividade.

Kappes e colaboradores (2013), também avaliou a utilização de inoculante utilizando a bactéria *Azospirillum* na cultura do milho e percebeu um aumento de 9,4% na produtividade de grãos.

Mas em contrapartida alguns estudos mostram que não há diferença estatística significativa na utilização desta bactéria, como é possível observar no estudo de Dartora e colaboradores (2013), que comparou sementes inoculadas e sem inoculação, e não obteve diferenças e interações significativas referentes a porcentagem de germinação das sementes.

Sangoi e colaboradores (2015), avaliou o efeito do *Azospirillum* em sementes de milho com aplicação de doses de nitrogênio para avaliar o seu desempenho na agricultura. Os resultados mostraram que não houveram diferenças significativas em relação ao rendimento em grãos que foram inoculados e sem inoculação, utilizando todas as doses de nitrogênio propostas. Fukami e colaboradores (2016), utilizou diferentes doses de nitrogênio e inoculantes contendo *Azospirillum* para inocular via vaporização de spray na semeadura e na área foliar em comparação com a inoculação das sementes. Como resultado, na estufa a maioria dos parâmetros mensurados se mostrou positivo em relação as doses utilizadas na aplicação foliar, porém, o autor conclui que são necessários mais estudos para refinar a quantidade aplicada para estimular o crescimento em vez de inibi-lo. Em campo, a inoculação permitiu diminuição de 25% da necessidade de fertilizantes de nitrogênio. Os autores concluem que existem outras possibilidades para realizar a inoculação em vez da maneira tradicional de inoculação de sementes, contribuindo para a correção de incompatibilidade entre inoculantes contendo bactérias e pesticidas que são aplicados para tratamento das sementes.

É possível notar que os trabalhos encontrados na literatura investigam o solo e rizosfera de determinadas regiões do planeta para determinar a riqueza e diversidade bacteriana para entender melhor de que maneira estes microrganismos atuam na planta e quais benefícios podem produzir. A importância de se estudar a microbiota da rizosfera do milho que foi coletada previamente através de um projeto da Universidade Estadual de Ponta Grossa em parceria com a Universidade Federal do Paraná, dá-se perante o pouco conhecimento sobre quais microrganismos habitam a rizosfera, levando em consideração que a comunidade bacteriana difere dependendo da região onde é cultivado o milho, quantidade de fertilizantes e insumos utilizados, clima, entre outros fatores.

Diante da necessidade de melhorar a produtividade do milho de forma sustentável o presente projeto visa determinar o efeito da aplicação de diferentes doses de nitrogênio e da inoculação de diferentes bactérias sobre a estrutura das comunidades bacterianas da rizosfera do milho através da metataxonomia.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo mostra o desenvolvimento do trabalho e metodologia utilizada. A seção 4.1 demonstra a origem dos dados analisados e o desenvolvimento do trabalho. A seção 4.2 apresenta as ferramentas que foram utilizadas durante a realização deste trabalho.

4.1 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

No presente trabalho foram analisados dados provenientes do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA da rizosfera do milho. As análises foram realizadas por meio de softwares de bioinformática e as análises estatísticas por meio de ferramentas para este fim. Os dados relacionados ao sequenciamento do DNA parcial da rizosfera do milho foram obtidos através de um experimento previamente realizado, onde a inoculação das sementes do milho e o plantio foram realizados no campo experimental da Fundação ABC, Paraná, Brasil.

Foram utilizadas as sementes de milho (*Zea mays*) genótipo 30F53H (Pioneer) e as bactérias diazotróficas testadas utilizadas na inoculação foram: (i) as estirpes de *Azospirillum* brasilense AbV5 ou HM053; e (ii) quatro diferentes isolados bacterianos (L26, L27, 8.1.2.1 ou 4.3.3.1).

Foram aplicadas três concentrações de N na forma de uréia (0 kg, 30 kg e 160 kg) e o solo da rizosfera de milho foi coletado aproximadamente 12 semanas após o plantio. Foram realizados 11 tratamentos em triplicata. A tabela 1 ilustra os tratamentos e a aplicação de nitrogênio e bactéria inoculada.

TABELA 1 – TRATAMENTO E INOCULAÇÃO DO MILHO

(continua)

	Tratamentos	Inoculante	N dose (kg/ha)
1	0N	-	0
2	30N	-	30
3	160N	-	160
4	30N + Azototal	<i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	30
5	160N + Azototal	<i>A. brasilense</i> AbV5 + AbV6	160
6	30N + L26	<i>Azospirillum</i>	30
7	30N + L27	<i>Herbaspirillum</i>	30

TABELA 1 – TRATAMENTO E INOCULAÇÃO DO MILHO

	Tratamentos	Inoculante	(conclusão) N dose (kg/ha)
8	30N + 8121	<i>Rhizobium</i>	30
9	30N + 4331	<i>Enhydrobacter</i>	30
10	30N + HM053	<i>A. brasilense</i>	30
11	30N + AbV5	<i>A. brasilense</i>	30

Legenda: Os 11 tratamentos representados com o inoculante utilizado e dose de nitrogênio aplicada.

Fonte: o autor.

A extração do DNA total da rizosfera do milho foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular Microbiana da UEPG e o sequenciamento do gene 16S rRNA foi realizado no Núcleo de Fixação de Nitrogênio/UFPR. Este experimento resultou em uma biblioteca com 33 arquivos, sendo 11 tratamentos em triplicata: T1R1; T1R2; T1R3; T2R1; T2R2; T2R3; T3R1; T3R2; T3R3; T4R1; T4R2; T4R3; T5R1; T5R2; T5R3; T6R1; T6R2; T6R3; T7R1; T7R2; T7R3; T8R1; T8R2; T8R3; T9R1; T9R2; T9R3; T10R1; T10R2; T10R3; T11R1; T11R2; T11R3; gerando um total de 941.117 sequências.

Para realizar a análise e processamento destas sequências, o primeiro software utilizado foi o Mothur (item 4.2.1, Materiais e Métodos) (Schloss et. al., 2009) um software orientado a objetos, livre e independente. Este software é escrito na linguagem de programação C++ e permite realizar a análise de grandes quantidades de sequências com menor tempo de processamento em comparação a ferramentas existentes antes do seu lançamento.

As sequências analisadas que são idênticas são consideradas duplicadas, por este motivo foram unidas com o propósito de diminuir o tempo e processamento de dados. (SCHLOSS et. al., 2009).

Para detectar e retirar sequências quiméricas foram utilizados dois algoritmos implementado no mothur: Vsearch (item 4.2.2, Materiais e Métodos) (ROGNES et. al., 2016) e Uchime (item 4.2.3, Materiais e Métodos) (EDGAR et. al., 2011).

As sequências foram submetidas e classificadas no RDP (Ribosomal Database Project), (item 4.2.4, Materiais e Métodos) utilizando a ferramenta Classifier, (WANG et. al., 2007) para determinar a taxonomia das sequências e apresentar os principais grupos taxonômicos. A partir disso foi possível realizar análise de abundância de cada grupo.

Foi realizado normalização dos arquivos através do software Paqta (Registro BR5120170013-4, INPI) e os que apresentavam menos de 5.815 sequências foram retirados a fim de preservar dados para realizar análises de diversidade e riqueza.

Dos 11 tratamentos restaram 26 replicatas com 5.815 sequências cada, totalizando 151.190. Estes arquivos foram alinhados através do algoritmo INFERNAL do inglês (Inference of RNA Alignments) (item 4.2.5, Materiais e Métodos) (Nawrocki et. al., 2009), que está hospedado no RDP Pipeline, do inglês (Ribosomal Database Project) (COLE et. al., 2013).

As sequências alinhadas foram submetidas ao RDP Pipeline para clusterização em OTU, do inglês (*Operational Taxonomic Unit*), em português, (Unidade Taxonômica Operacional) com percentual de confiança de 97%, utilizando o algoritmo mcClust (item 4.2.6, Materiais e Métodos) (COLE et. al., 2013).

Com o software Eliquare (Número BR512018051888-5, INPI), desenvolvido pelo autor da presente pesquisa e outros pesquisadores do Laboratório de Biologia Molecular Microbiana da UEPG, foi possível filtrar os dados para colocar em arquivos separados cada nível da hierarquia de taxonomia dos microrganismos.

As OTU foram convertidas em matriz através do RDP Pipeline para serem analisadas no software R (item 4.2.7, Materiais e Métodos) versão 3.5.3 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

No software R Studio foram utilizados o pacote BiodiversityR versão 2.11-1 e Vegan versão 2.5-3 para estimar índice de riqueza Chao, índice de diversidade Shannon, perfis de diversidade de Renyi, distribuição de abundância de OTU e realizar análises multivariadas.

As sequências foram enviadas ao National Center for Biotechnology Information (NCBI); em português: Centro Nacional de Informação Biotecnológica para serem depositadas em um banco de dados de anotações de sequências de nucleotídeos chamado Genbank, sob número de acesso KCKH00000000. Este número de acesso corresponde a primeira versão descrita nesta pesquisa, KCKH01000000. Bioproject sob número PRJNA503472. Biosample números SAMN10360478, SAMN10360479, SAMN10360480, SAMN10360481, SAMN10360482, SAMN10360483, SAMN10360484, SAMN10360485, SAMN10360486, SAMN10360487, SAMN10360488, SAMN10360489, SAMN10360490, SAMN10360491, SAMN10360492, SAMN10360493, SAMN10360494, SAMN10360495, SAMN10360496, SAMN10360497, SAMN10360498, SAMN10360499, SAMN10360500, SAMN10360501, SAMN10360502, SAMN10360503. Retiradas de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KCKH000000000>.

4.2 FERRAMENTAS UTILIZADAS

Nesta seção são apresentadas as ferramentas utilizadas para o desenvolvimento do trabalho.

4.2.1 Mothur

Mothur é um software livre escrito na linguagem de programação C++. Oferece a possibilidade de utilizar algoritmos para realizar diversos processos de análise de sequenciamento, como a detecção e retirada de quimeras, alinhamento de sequências, clusterização em OTU, cálculo de matriz de distância e análises de diversidade (SCHLOSS et. al., 2009).

4.2.2 Vsearch

Vsearch apresenta funcionalidades para processamento de dados de sequenciamento. A detecção de quimeras acontece de duas maneiras: comparando as sequências com um banco de dados ou no modo “de novo” como no algoritmo uchime (EDGAR et al. 2011).

O vsearch começa a partir de um modelo heurístico baseado em palavras que são comparadas entre as sequências submetidas e sequências-alvo. É realizado um filtro heurístico baseado em palavras compartilhadas, onde cada letra representa um nucleotídeo das sequências submetidas e por padrão possui tamanho 8 onde uma sequência com tamanho n contém $n - k + 1$ palavras únicas. Estas palavras são comparadas a partir de uma divisão de cada sequência em quatro segmentos, e a partir disso o algoritmo procura similaridades entre cada segmento e prováveis quimeras. Para contar as palavras de maneira rápida é criado um índice com palavras únicas e em quais sequências elas aparecem (ROGNES et al. 2016).

4.2.3 Uchime

O algoritmo uchime realiza a detecção de quimeras pelo modo “de novo” ou confrontando as sequências submetidas com um banco de dados livre de quimeras. A sequência é dividida em quatro segmentos e cada um é comparado ao banco de dados que é livre de quimeras. É realizado um alinhamento entre as duas sequências do banco e a sequência

submetida. Um alinhamento é realizado entre estas três sequências e a equação $H = HL * HR \geq h$ é utilizada para determinar se a sequência submetida é quimérica, onde h é o score mínimo (padrão valor de 0.28) entre os segmentos esquerdo HL e direito HR. Se o valor da equação ultrapassar o valor de h , ela é considerada uma quimera (EDGAR et al. 2011).

4.2.4 RDP

Armazena um banco de dados público com todas as sequências do gene 16S rRNA que são alimentadas por meio do banco de dados do NCBI (COLE et al. 2014).

A ferramenta Classifier classifica a taxonomia de sequências do gene 16S rRNA por meio de um classificador Bayesiano que mostra resultados baseados no manual de taxonomia de Bergey's. As sequências são classificadas de domínio à gênero com limiar de confiança definido pelo pesquisador (COLE et al. 2014). Em 2019 o banco de dados do gene 16S rRNA do RDP possui 3,356,809 sequências e está disponível em: <https://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>.

4.2.5 Infernal

Pacote de ferramentas onde é possível realizar o alinhamento de sequências baseado em modelos de covariância. O algoritmo constrói uma estrutura chamada de modelo de covariância onde contém informações da estrutura do RNA e utiliza este modelo para procurar homologia entre as sequências (NAWROCKI et al. 2009).

4.2.6 Mcclust

Este algoritmo realiza cálculo de distância entre as sequências e cria um cluster em forma de hierarquia a partir da matriz de distância calculada. O arquivo necessário é o de alinhamento gerado anteriormente. As sequências são agrupadas de acordo com a distância definida pelo usuário (FISH et al. 2013).

4.2.7 Software R

É uma linguagem e um software para realização de análise estatística, construção de gráficos e análise de dados (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados e discussões obtidos a partir do processamento de sequências do gene 16S rRNA da rizosfera do milho que inicialmente totalizavam 941.117 sequências divididas entre 11 tratamentos em triplicata. A utilização de ferramentas de bioinformática permitiu que estas sequências fossem manipuladas e filtradas para atingir os objetivos da presente pesquisa. Após os procedimentos de manipulação destes dados foram mantidos os 11 tratamentos e pelo menos duas replicatas de cada, totalizando 26 replicatas com 5.815 sequências cada, que totaliza 151.190 sequências. O termo “biblioteca” será utilizado para se referir às replicatas de cada tratamento.

A seção 5.1 apresenta o pré-processamento das sequências onde foram detectadas e retiradas sequências quiméricas de cada biblioteca antes da classificação através do RDP Classifier e normalização das sequências.

5.1 PRÉ-PROCESSAMENTO DAS SEQUÊNCIAS

A primeira etapa deste processo foi analisar as 33 bibliotecas para unir as sequências que são idênticas a fim de diminuir o tempo de processamento e poupar recursos computacionais. Foi utilizado o software Mothur para manipular os arquivos. Das 941.117 sequências foi possível reduzir 63% do total. O total de sequências diminuiu para 351.537.

Após a união de sequências idênticas foi realizada a detecção e remoção de sequências quiméricas. Os resultados podem ser observados na tabela 2.

5.1.1 Detecção e Remoção de Quimeras

As quimeras são sequências geradas durante o processo de amplificação das moléculas de DNA, conhecido como PCR (Polymerase chain reaction), em português RCP (Reação em cadeia da polimerase). Estas sequências podem ser confundidas com novas espécies de microrganismos e afetar análises de diversidade e estudos sobre a população microbiana da amostra analisada (EDGAR, et. al., 2011).

Por isso é imprescindível a utilização de algoritmos que realizem a detecção de quimeras. A detecção e remoção foram realizadas através do software Mothur por meio dos algoritmos Vsearch (ROGNES, et. al., 2016) e Uchime (EDGAR, et. al., 2011). A tabela 2

mostra a quantidade de sequências quiméricas encontradas utilizando os dois algoritmos.

TABELA 2 – DETECÇÃO DE QUIMERAS

Biblioteca	Vsearch	Uchime	Sequências quiméricas retiradas
T1R1	1310	319	1629
T1R2	2410	471	2881
T1R3	5529	1261	6790
T2R1	6142	1056	7198
T2R2	740	230	970
T2R3	3141	684	3825
T3R1	2042	499	2541
T3R2	134	81	215
T3R3	795	296	1091
T4R1	4640	1016	5656
T4R2	145	84	229
T4R3	669	216	885
T5R1	885	290	1175
T5R2	206	104	310
T5R3	860	272	1132
T6R1	1003	259	1262
T6R2	973	310	1283
T6R3	89	58	147
T7R1	822	268	1090
T7R2	703	205	908
T7R3	685	196	881
T8R1	664	239	903
T8R2	604	176	780
T8R3	125	68	193
T9R1	513	171	684
T9R2	967	261	1228
T9R3	370	140	510
T10R1	1253	411	1664
T10R2	4467	1180	5647
T10R3	3158	786	3944
T11R1	1914	496	2410
T11R2	1235	390	1625
T11R3	861	336	1197

Legenda: A coluna Vsearch e Uchime mostram quantas sequências quiméricas foram encontradas utilizando o algoritmo Vsearch e Uchime, respectivamente. Ao lado está o total encontrado para cada biblioteca.

Fonte: o autor.

Um total de 62.883 sequências químéricas que correspondem a 6,68% do total foram encontradas e retiradas das bibliotecas, restando 288.654 sequências.

5.1.2 Normalização das Sequências

A quantidade de sequências em cada biblioteca variava entre 1.717 a 35.471 como mostra a tabela 3. Foi necessário realizar normalização das sequências através do software Paqta. Como resultado sete bibliotecas foram retiradas e o restante foi normalizado de acordo com a biblioteca que possuía a menor quantidade de sequências.

TABELA 3 – QUANTIDADE E NORMALIZAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

(continua)

Biblioteca	Quantidade
T6R3	1717
T8R3	1852
T4R2	2224
T3R2	2419
T5R2	2861
T2R2	4149
T9R3	4159
T1R1	5815
T9R1	5910
T8R2	6220
T7R2	6331
T7R3	6702
T4R3	6711
T8R1	7246
T7R1	7704
T5R3	7880
T3R3	8300
T9R2	8339
T5R1	8389
T11R3	8552
T6R1	9029
T6R2	9368
T11R2	11341
T1R2	11365
T10R1	11513

TABELA 3 – QUANTIDADE E NORMALIZAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

(conclusão)	
Biblioteca	Quantidade
T2R3	14778
T11R1	15238
T3R1	16079
T2R1	21065
T10R3	22591
T10R2	29401
T4R1	30819
T1R3	35471

Legenda: A tabela mostra a quantidade de sequências em cada biblioteca. As bibliotecas em **negrito** foram retiradas das amostras e a normalização ocorreu em todas as restantes com o menor valor encontrado que foi na biblioteca T1R1 com 5.815 sequências.

Fonte: o autor.

Neste processo de normalização foi escolhido pelo autor um valor referente a partir da análise da quantidade de sequências em cada biblioteca. Foi estabelecido que todas as bibliotecas que apresentassem valor menor que 5.815 fossem retiradas das futuras análises e as restantes seriam normalizadas neste valor a fim de preservar pelo menos 2 bibliotecas de cada tratamento. Este processo deve ocorrer pois um padrão deve ser definido para efetuar a análise de diversidade e riqueza das amostras. Caso contrário os resultados seriam divergentes e inconclusivos pois uma biblioteca apresentaria maior diversidade e riqueza devido ao maior número de sequências contidas nela em relação a outra com menor quantidade.

Após normalização restaram 26 bibliotecas com 5.815 sequências cada, totalizando 151.190. A partir deste processo foi possível realizar a classificação taxonômica que será apresentada na próxima seção.

5.1.3 Classificação Taxonômica Através do *RDP Classifier*

O RDP (*Ribosomal Database Project*) Classifier é um classificador Bayesiano que tem por objetivo classificar sequências do gene 16S rRNA. Esta ferramenta está disponível online e realiza a classificação a partir da submissão de um arquivo com sequências e a comparação com um banco de dados que possui cerca de 3,356,809 sequências do gene 16S rRNA que foram depositadas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

A tabela 4 mostra os principais grupos taxonômicos que foram encontrados nas 151.190

sequências do gene 16S rRNA após classificação através da ferramenta RDP Classifier. Os arquivos de saída do RDP Classifier no formato de texto foram filtrados através do software Elicquare.

TABELA 4 – PRINCIPAIS GRUPOS TAXONÔMICOS

Grupo Taxonômico	Quantidade
Filo	28
Classe	62
Ordem	83
Família	183
Gênero	582

Legenda: Grupos taxonômicos e a quantidade que foram encontrados após classificação através do *SDS Classifier*.

Fonte: o autor.

5.1.4 Alinhamento das Sequências

O alinhamento das sequências tem o objetivo de identificar homologia entre elas. Desta maneira é possível agrupar sequências similares e que possam ter relações evolucionárias e filogenéticas. A representação gráfica é dada através de uma matriz onde cada coluna e linha contém uma letra que representa um nucleotídeo da sequência analisada. São inseridos gaps em forma de traço ou ponto onde não há correspondência entre bases naquela determinada posição, ou pelo fato da região não ter sido sequenciada (DESANTIS, et. al., 2006).

O gene 16S rRNA faz parte da subunidade do ribossomo procarioto, estando presente em todas as bactérias, sendo considerado uma região conservada e adequada para estudos filogenéticos e evolucionários, além de ser considerado um gene com tamanho ideal com cerca de 1.500 pares de bases com regiões variáveis e regiões conservadas (PATEL, 2001).

As regiões sequenciadas do gene 16S rRNA foram V4 e V5. Desta maneira o alinhamento irá ocorrer na região onde os dados foram sequenciados. A figura 1 ilustra o alinhamento das sequências que foi realizado através do RDP Pipeline (COLE et al. 2013) utilizando o algoritmo INFERNAL (NAWROCKI et. al., 2009), do inglês, Inference of RNA alignments.

FIGURA 1 – SEQUÊNCIAS ALINHADAS

```

---GGAATTCCGAGTGTAGAGGT-GAAA---TTCGTAGATATTTCGGAAGAACACCA-G---T---G---
---GGAATTCCGAATGTAGCGGT-GAAA---TGCGTAGATATTGGGAGGAACACCG-G---T---G---
---GGAATATGTCATGTAGCGGT-GAAA---TGCTTAGAGATGACACAGAACACCG-A---T---A---
---GGAATCCCCGGTGTAGTGGT-GAAA---TGCGTAGATATCGGGAGGAACACCA-G---T---G---
---GGAATTCCGAGTGTAGCGGT-GAAA---TGCGTAGATATTGGGAGGAACACCA-G---T---G---
---GGAATTGCAGGTGTAGCGGT-GAAA---AGCGTAGATATCTGCAGGAGCACCC-G---T---G---

```

Legenda: Exemplo de alinhamento de sequências pelo INFERNAL.

Fonte: o autor.

5.1.5 Clusterização das Sequências em OTU

Existem diversos métodos para realizar o agrupamento de sequências em OTU (Unidade Taxonômica Operacional, do inglês *Operational Taxonomic Unit*), com o objetivo de realizar análises de diversidade e riqueza de microrganismos (Schloss et. al., 2005; Schloss et. al., 2006; Westcott et. al., 2015). O melhor método de agrupamento deve ser avaliado pelo pesquisador de acordo com os dados que estão sendo manipulados.

Este processo foi realizado através do RDP Pipeline por meio da ferramenta mcClust (Cole et. al., 2013) onde as sequências com identidade de 97% foram clusterizadas a partir do envio dos arquivos contendo todas as sequências alinhadas.

Como resultado foram geradas 49.982 OTU em um arquivo que posteriormente foi convertido para uma matriz que pudesse ser lida pelo software R, que possibilitou realizar testes estatísticos.

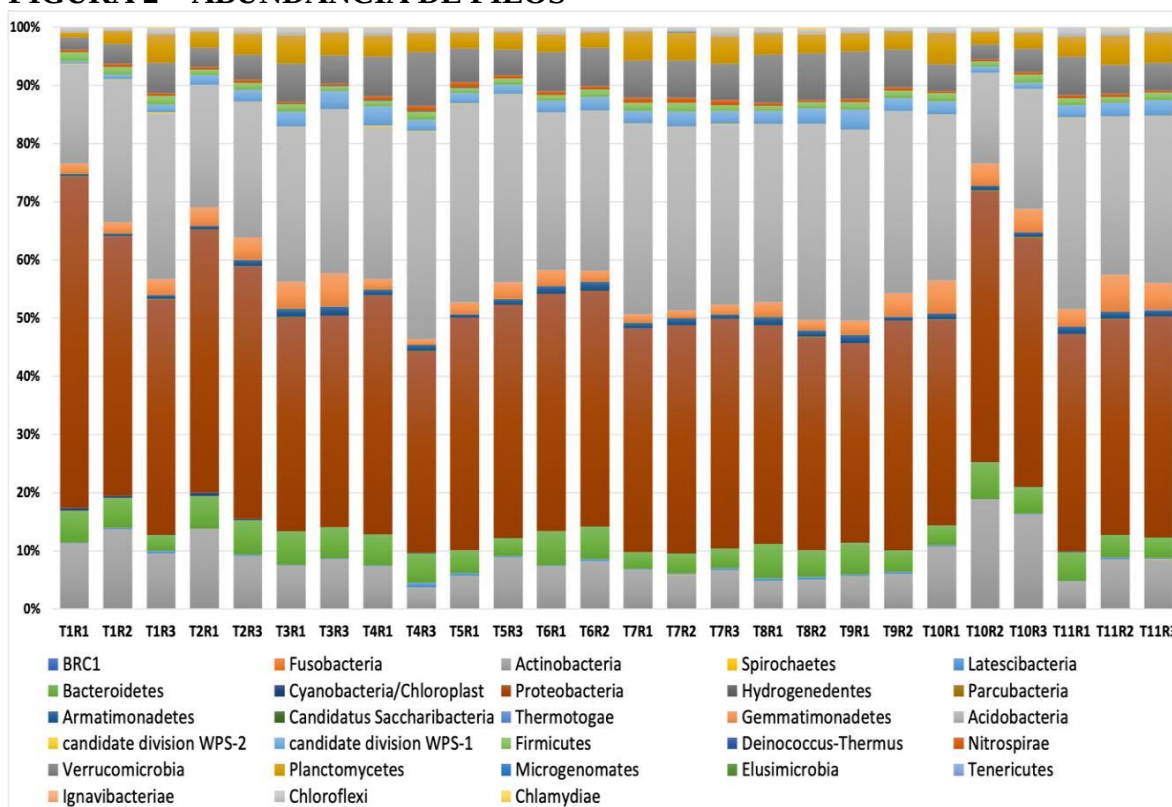
5.2 ANÁLISE DE ABUNDÂNCIA DE GRUPOS TAXONÔMICOS

A partir da classificação das sequências através do RPD Classifier, foi possível realizar uma análise de abundância de cada grupo. Os resultados serão apresentados a partir da próxima subseção.

5.2.1 Análise de Abundância de Filo

A figura 2 ilustra os 28 filós encontrados nas 26 bibliotecas dos 11 tratamentos e a abundância. É possível observar que houve diferentes resultados de acordo com o tratamento e biblioteca. Os filós *Acidobacteria*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Verrucomicrobia* foram os mais abundantes nesta análise.

FIGURA 2 – ABUNDÂNCIA DE FILOS



Legenda: O eixo y corresponde à porcentagem de abundância de filos. O eixo x corresponde ao nome da biblioteca analisada. Abaixo estão os 28 filos encontrados.

Fonte: o autor.

Os filos *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria* e *Verrucomicrobia* são filos comumente encontrados em abundância no solo e na rizosfera (LI et al. 2014; CHAUHAN et al. 2011; JANSSEN, 2006; JANGID et. al, 2008).

No trabalho de Johnston-Monje e colaboradores (2016) o filo *Proteobacteria* teve a maior abundância após análise de comunidades microbianas da rizosfera do milho com 52%, seguido do filo *Actinobacteria* com 13%.

Na pesquisa de Barriuso e colaboradores (2010) a população de *Proteobacteria* na rizosfera do milho também foi maior em relação à população de *Actinobacteria* que juntas somaram de 40% a 49% do total das sequências analisadas.

Genes do filo *Acidobacteria* estão ligados ao ciclo do carbono e ciclo do nitrogênio pois auxiliam na redução de nitrato e nitrito, além de utilizar substratos de carbono, degradar açúcares, aminoácidos e utilizar compostos complexos como a pectina e quitina (WARD et. al, 2009). Estes fatos demonstram algumas atividades que este filo desempenha no solo.

A redução de nitrato por meio de bactérias do filo *Acidobacteria* também pode ser observada no estudo de Jiménez e colaboradores (2012), onde a taxonomia das sequências estudadas revelou que este processo de redução de nitrato foi executado principalmente por

bactérias pertencentes à este filo.

A tabela 5 mostra os filos mais abundantes e a porcentagem encontrados nas 151.190 sequências analisadas.

TABELA 5 – PORCENTAGEM DE FILOS MAIS ABUNDANTES

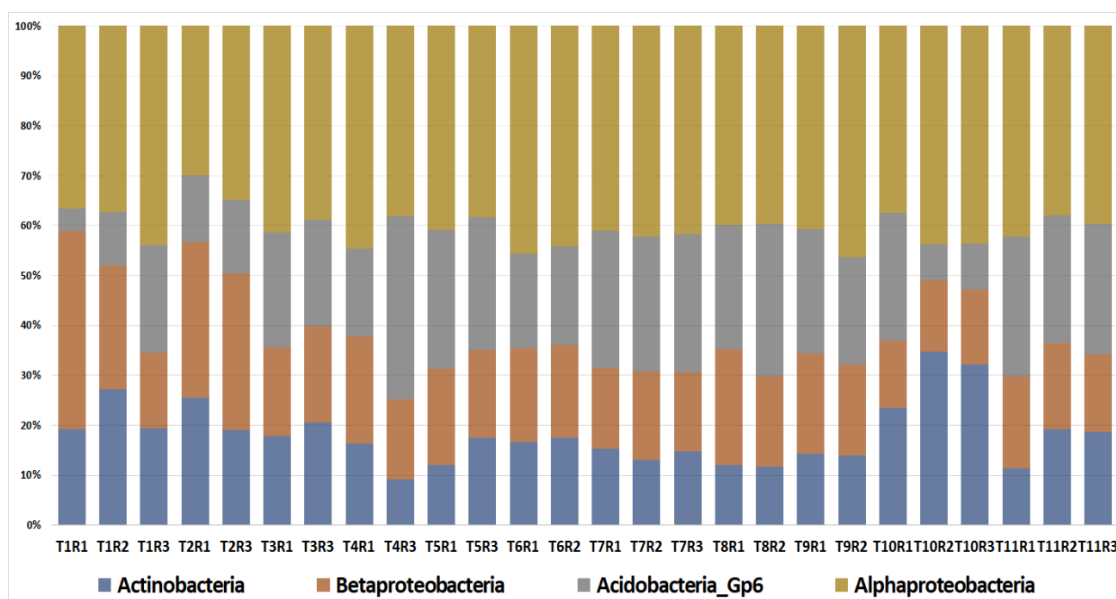
Filos mais abundantes	Total
<i>Proteobacteria</i>	40,13%
<i>Acidobacteria</i>	28,10%
<i>Actinobacteria</i>	8,55%
<i>Verrucomicrobia</i>	5,64%

Legenda: A tabela mostra os filos mais abundantes encontrados nas 26 bibliotecas e a porcentagem.
Fonte: o autor.

No trabalho de Tao e colaboradores (2016), os filos *Proteobacteria* e *Acidobacteria* foram os mais abundantes. Os filos *Acidobacteria* e *Verrucomicrobia* tiveram correlação positiva em relação a produção do milho.

5.2.2 Análise de Abundância de Classe

Foram selecionadas 4 classes, das 62 encontradas, que apresentaram os maiores percentuais de presença entre as 26 bibliotecas dos 11 tratamentos. A figura 4 mostra a distribuição das classes entre as bibliotecas.

FIGURA 3 – ABUNDÂNCIA DE CLASSES

Legenda: A figura mostra as 4 classes que tiveram maior participação em todas as 26 bibliotecas.
 Fonte: o autor.

A tabela 6 mostra as classes mais abundantes e a porcentagem encontrados nas 151.190 sequências analisadas.

TABELA 6 – PORCENTAGEM DE CLASSES MAIS ABUNDANTES

Classes mais abundantes	Total
<i>Alphaproteobacteria</i>	25,37%
<i>Acidobacteria_Gp6</i>	14,34%
<i>Betaproteobacteria</i>	10,81%
<i>Actinobacteria</i>	10,82%

Legenda: A tabela mostra as classes mais abundantes encontradas nas 26 bibliotecas e a porcentagem.
 Fonte: o autor.

A classe Alphaproteobacteria também foi encontrada em maior abundância no solo no estudo de Fierer e colaboradores (2007), seguido de Betaproteobacteria.

Houve um incremento na concentração de nitrogênio e carbono em solos com predominância de Alphaproteobacteria, e especula-se que esta predominância afetou positivamente a respiração do solo, processo de trocas gasosas por meio do metabolismo dos microrganismos (THOMSON et al. 2010).

Acidobacteria_Gp6 foi uma das mais abundantes no estudo de Jones e colaboradores (2009) que buscou investigar a abundância e diversidade de comunidades de acidobacteria em alguns tipos de solo.

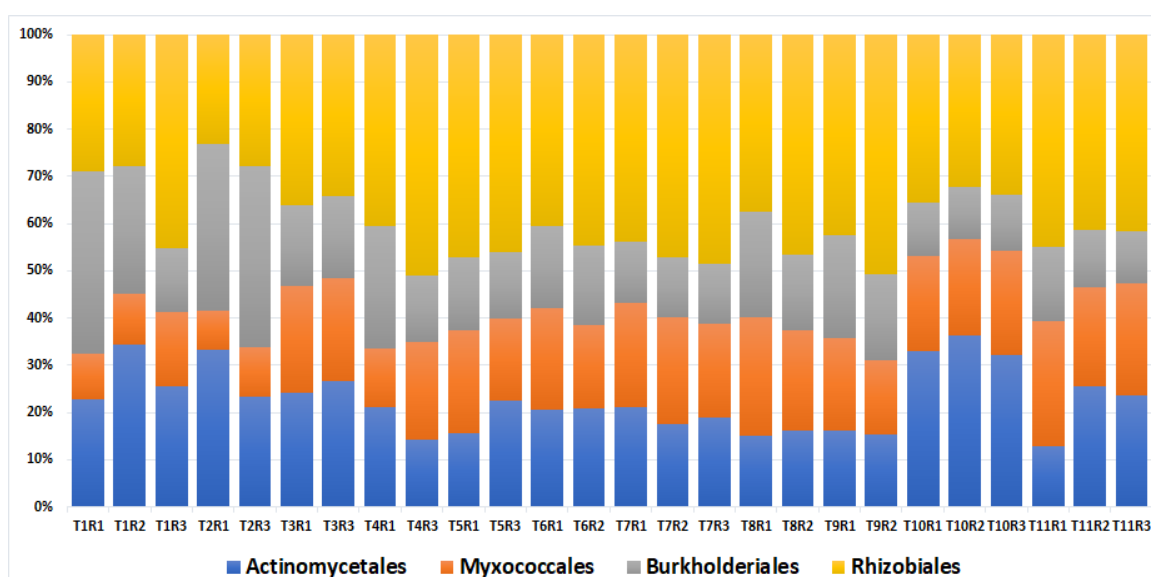
Quatro tipos de solo foram analisados para identificar a diversidade bacteriana e as classes com maior predominância foram *Betaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* e *Bacteroidetes* (ROESCH et al. 2007).

A classe Actinobacteria habita solo e rizosfera em grande quantidade e apresenta bactérias capazes de metabolizar contaminações no solo (GREMION et al. 2003). Além de ser considerada como potencial para o processo de biorremediação (POLTI et al. 2014).

5.2.3 Análise de Abundância de Ordem

Foram selecionadas 4 ordens, das 83 encontradas, que apresentaram os maiores valores percentuais de presença entre as 26 bibliotecas dos 11 tratamentos. A figura 5 exibe a distribuição entre as bibliotecas.

FIGURA 4 – ABUNDÂNCIA DE ORDENS



Legenda: A figura mostra as 4 ordens que tiveram maior participação em todas as 26 bibliotecas.

Fonte: o autor.

A tabela 7 mostra as ordens mais abundantes e a porcentagem encontrados nas 151.190 sequências analisadas.

TABELA 7 – PORCENTAGEM DE ORDENS MAIS ABUNDANTES

(continua)

Ordens mais abundantes	Total
<i>Myxococcales</i>	17,44%

TABELA 7 – PORCENTAGEM DE ORDENS MAIS ABUNDANTES

(conclusão)	
Ordens mais abundantes	Total
<i>Actinomycetales</i>	10,24%
<i>Rhizobiales</i>	8,49%
<i>Burkholderiales</i>	8,16%

Legenda: A tabela mostra as ordens mais abundantes encontradas nas 26 bibliotecas e a porcentagem.
 Fonte: o autor.

Bactérias da ordem *Myxococcales* são comumente encontradas em solos e possuem capacidades metabólicas anaeróbicas e assimilam celulose (DAWID et al. 2000).

Também são conhecidas por reduzir a toxicidade em solos da cultura do arroz. A toxicidade pelo ferro em arroz é considerado uma disfunção nutricional causado pelo excesso de íons de ferro (TREUDE et al. 2003). Esta ordem também é encontrada na raiz do milho (BOUFFAUD et al. 2012).

A ordem *Actinomycetales* foi encontrada em abundância em solo do milho (RAMIREZ-VILLANUEVA et al. 2015) e na rizosfera do milho (DA et al. 2008).

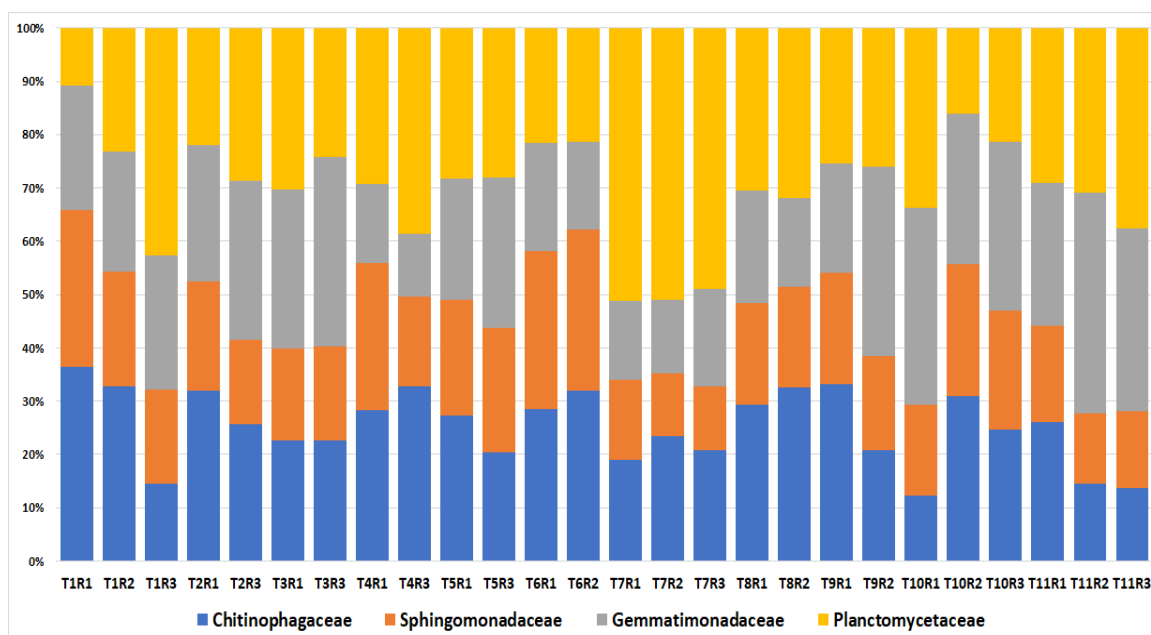
Bactérias da ordem *Rhizobiales* são capazes de fixar nitrogênio em plantas leguminosas (FAN et al. 2014).

No estudo de Marra e colaboradores (2012) bactérias da ordem *Rhizobiales* mostraram resultados positivos em relação a capacidade de solubilizar fosfato e realizar a fixação biológica de nitrogênio.

A ordem *Burkholderiales* mostrou predominância na rizosfera do milho no estudo de Li e colaboradores (2014) e no trabalho de Peiffer e colaboradores (2013).

5.2.4 Análise de Abundância de Família

Foram selecionadas 4 famílias, das 183 encontradas, que apresentaram os maiores valores percentuais de presença entre as 26 bibliotecas dos 11 tratamentos. A figura 5 exibe a distribuição entre as bibliotecas.

FIGURA 5 – ABUNDÂNCIA DE FAMÍLIAS

Legenda: A figura mostra as 4 famílias que tiveram maior participação em todas as 26 bibliotecas.
 Fonte: o autor.

A tabela 8 mostra as 4 famílias mais abundantes e a porcentagem encontrados nas 151.190 sequências analisadas.

TABELA 8 – PORCENTAGEM DE FAMÍLIAS MAIS ABUNDANTES

Famílias mais abundantes	Total
<i>Planctomycetaceae</i>	10,45%
<i>Gemmatimonadaceae</i>	8,67%
<i>Chitinophagaceae</i>	8,41%
<i>Sphingomonadaceae</i>	6,63%

Legenda: A tabela mostra as 4 famílias mais abundantes encontradas nas 26 bibliotecas e a porcentagem.
 Fonte: o autor.

A família *Planctomycetaceae* possui microrganismos com grande resistência a ambientes extremos e possui estrutura com características de células eucariotas. Suas funções são pouco conhecidas, mas indicam características genômicas únicas (GUO et al. 2014).

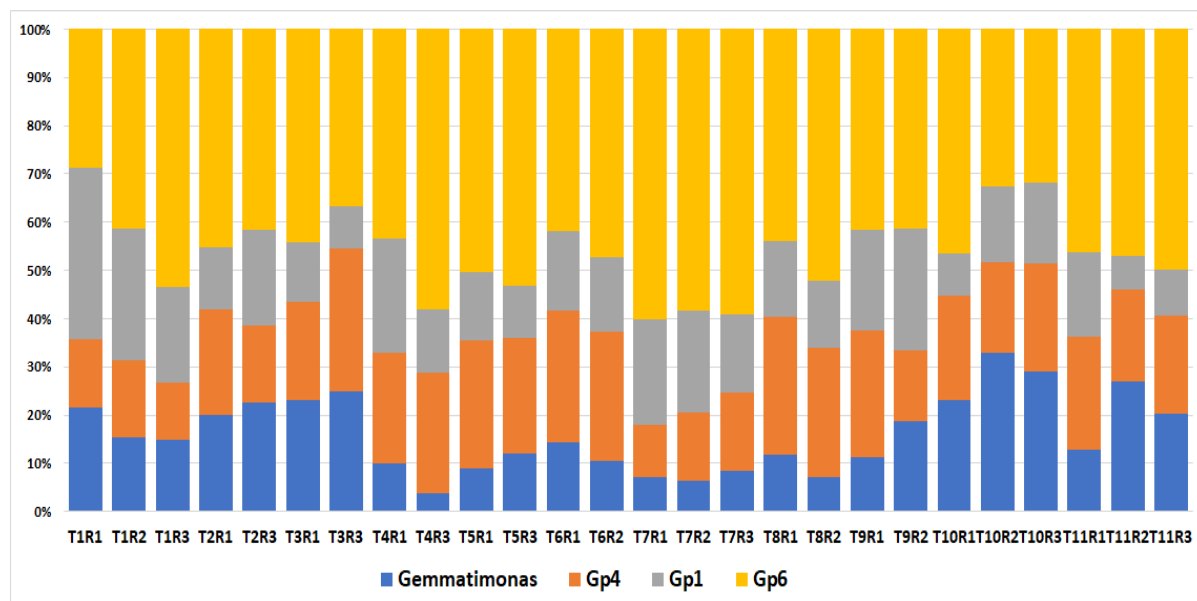
Bactérias da família *Planctomycetaceae* e *Gemmatimonadaceae* foram encontradas na rizosfera do milho no estudo de Liu e colaboradores (2019) e a família *Planctomycetaceae* aumentou de modo expressivo quando foi aplicado material rico em carbono no solo.

No estudo de Li e colaboradores (2014) as famílias *Chitinophagaceae* e *Sphingomonadaceae* foram encontradas na rizosfera e solo do milho, havendo um aumento de *Sphingomonadaceae* na rizosfera em estágios avançados.

5.2.5 Análise de Abundância de Gênero

Foram selecionados 4 gêneros, dos 582 encontrados, que apresentaram os maiores valores percentuais de presença entre as 26 bibliotecas dos 11 tratamentos. A figura 6 exibe a distribuição entre as bibliotecas.

FIGURA 6 – ABUNDÂNCIA DE GÊNEROS



Legenda: A figura mostra os 4 gêneros que tiveram maior participação em todas as 26 bibliotecas.

Fonte: o autor.

A tabela 9 mostra os gêneros mais abundantes e a porcentagem encontrados nas 151.190 sequências analisadas.

TABELA 9 – PORCENTAGEM DE GÊNEROS MAIS ABUNDANTES

Gêneros mais abundantes	Total
<i>Gp6</i>	16,27%
<i>Gp4</i>	7,42%
<i>Gp1</i>	5,56%
<i>Gemmatimonas</i>	5,40%

Legenda: A tabela mostra os 4 gêneros mais abundantes encontrados nas 26 bibliotecas e a porcentagem.

Fonte: o autor.

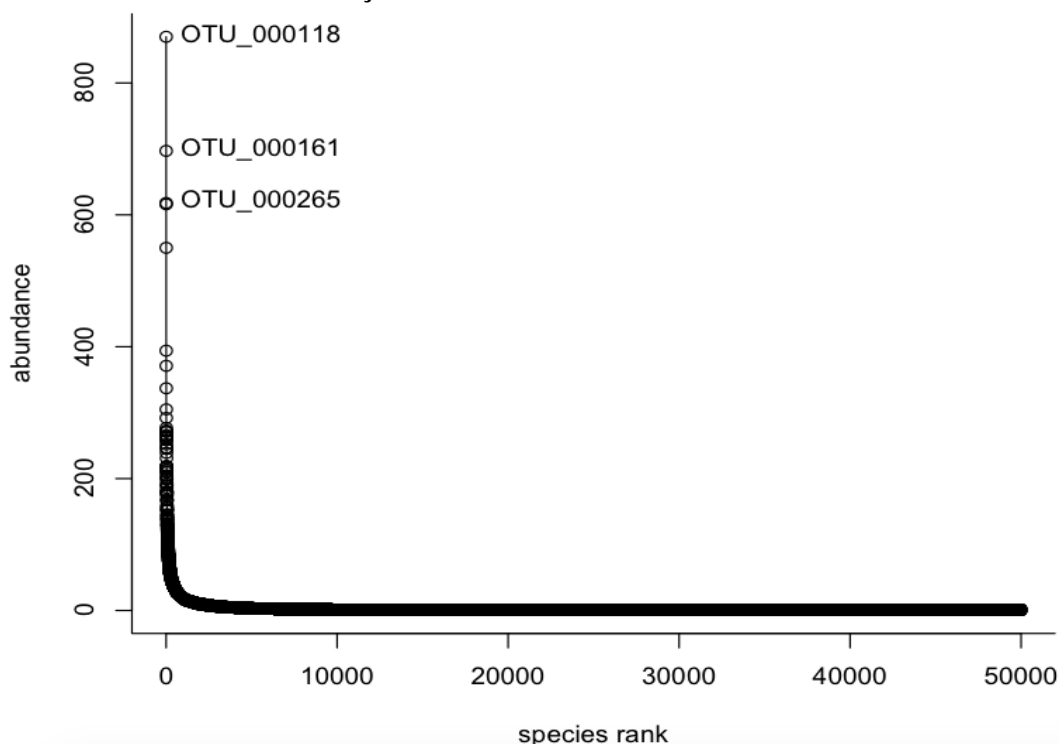
O gênero *Gemmatimonas* e *Acidobacteria* subdivisões *Gp1*, *Gp4* e *Gp6* foram encontrados na rizosfera e solo do milho, como mostra o estudo de Li e colaboradores (2014). No estudo de Ramirez-Villanueva e colaboradores (2015) os gêneros *Gp1*, *Gp4* e *Gp6* também estavam presentes em abundância no manejo convencional do milho e no manejo

conservacionista.

5.3 ANÁLISE DE ABUNDÂNCIA DE OTU

As OTU que foram geradas através do RDP por meio do algoritmo mcClust foram analisadas utilizando o software R e o pacote BiodiversityR. A figura 7 mostra o resultado da distribuição de abundância de espécies presentes nas 49.982 OTU encontradas.

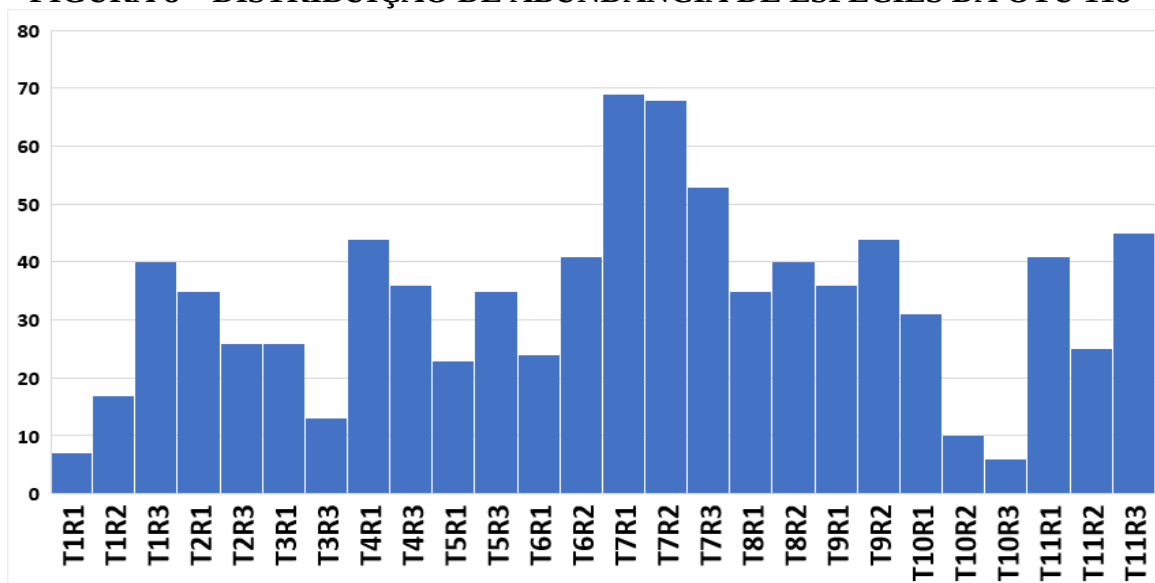
FIGURA 7 – DISTRIBUIÇÃO DE ABUNDÂNCIA DE ESPÉCIES EM OTU



Legenda: Os valores em “abundance” mostram a quantidade de sequências presentes nas OTU. Os valores em “species rank” mostram o valor total de OTU geradas através do software R.

Fonte: o autor.

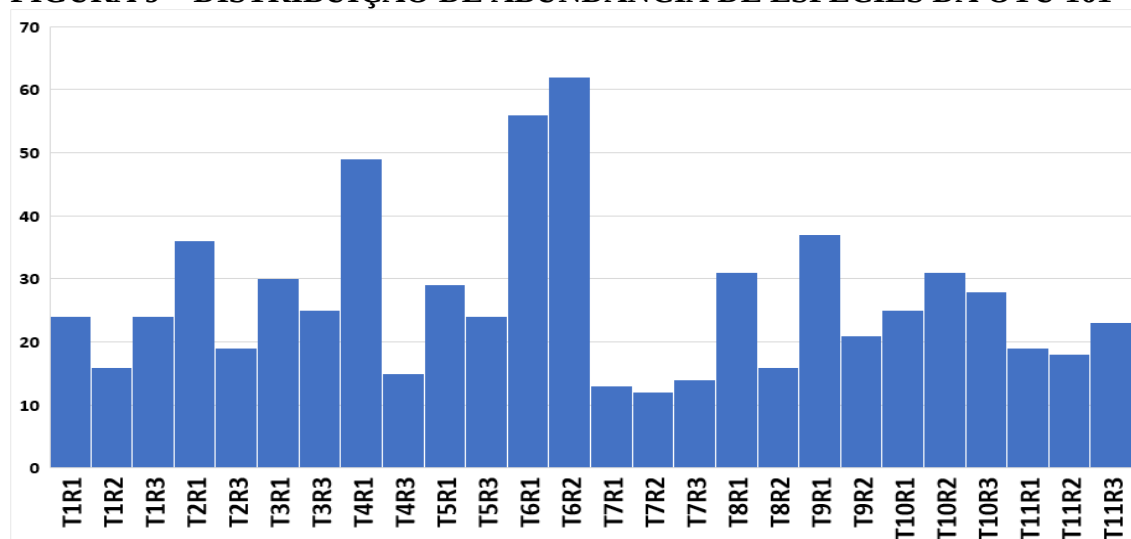
A figura 8 mostra que a OTU número 118 possui a maior abundância de espécies, seguido da OTU 161 e 265. A OTU 118 distribuídas entre as bibliotecas pode ser visualizada na figura 8.

FIGURA 8 – DISTRIBUIÇÃO DE ABUNDÂNCIA DE ESPÉCIES DA OTU 118

Legenda: O eixo y corresponde ao número de representantes dentro da OTU número 118. O eixo x corresponde a cada biblioteca.

Fonte: o autor.

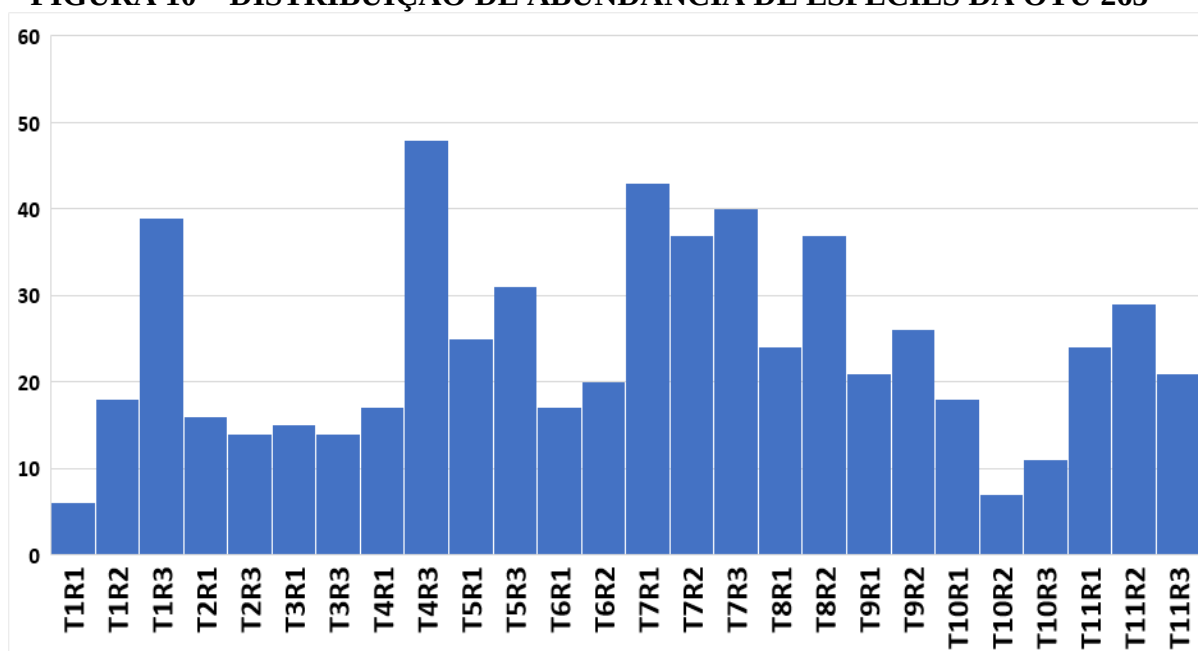
O tratamento 7 tem os maiores valores dentro da OTU 118. A biblioteca T7R1 tem o maior valor com 69, que corresponde a 7,93% do total da OTU 118. Seguido da biblioteca T7R2 com 68, que corresponde a 7,82% e T7R3 com 53, que corresponde a 6,09%.

FIGURA 9 – DISTRIBUIÇÃO DE ABUNDÂNCIA DE ESPÉCIES DA OTU 161

Legenda: O eixo y corresponde ao número de representantes dentro da OTU número 161. O eixo x corresponde a cada biblioteca.

Fonte: o autor.

O tratamento 6 tem os maiores valores dentro da OTU 161. A biblioteca T6R2 com valor 62 que corresponde a 8,90% do total da OTU 161. Seguido da biblioteca T6R1 com 56 que corresponde a 8,03% do total.

FIGURA 10 – DISTRIBUIÇÃO DE ABUNDÂNCIA DE ESPÉCIES DA OTU 265

Legenda: O eixo y corresponde ao número de representantes dentro da OTU número 265. O eixo x corresponde a cada biblioteca.

Fonte: o autor.

Nesta OTU é possível destacar a biblioteca T4R3 com o valor de 48, que corresponde a 7,77% do total. Seguido da biblioteca T7R1 com 43, que corresponde a 6,96% e T7R3 com 40, que corresponde a 6,47%.

5.4 ANÁLISE DE RIQUEZA E DIVERSIDADE

Para determinar a riqueza e diversidade das bibliotecas, uma análise de diversidade Shannon e riqueza Chao foi realizada através do software R. Os resultados são exibidos na tabela 10.

TABELA 10 – ÍNDICE DE CHAO E ÍNDICE DE SHANNON (H)

Biblioteca	Índice de riqueza Chao	(continua)
		Índice de diversidade Shannon (H)
T1R1	12119.05426	7.55647
T1R2	14177.11675	7.86291
T1R3	14057.38667	7.83927
T2R1	15536.55728	7.69008
T2R3	15641.83621	7.83822
T3R1	16656.19303	8.01736
T3R3	14182.04895	8.00127

TABELA 10 – ÍNDICE DE CHAO E ÍNDICE DE SHANNON (H)

Biblioteca	Índice de riqueza Chao	(conclusão)
		Índice de diversidade Shannon (H)
T4R1	15645.18612	7.76501
T4R3	11080.7298	7.70769
T5R1	13570.38889	7.84471
T5R3	14891.33426	7.87711
T6R1	12800.400	7.87487
T6R2	13210.63959	7.85141
T7R1	12151.17109	7.67588
T7R2	12426.29651	7.72092
T7R3	12524.3775	7.82901
T8R1	12478.79263	7.89534
T8R2	12298.57568	7.74462
T9R1	11453.38221	7.79366
T9R2	11913.92308	7.74153
T10R1	13695.57068	7.87423
T10R2	14622.33071	7.92419
T10R3	15326.94118	8.00352
T11R1	15580.71714	7.87607
T11R2	14156.8392	7.95353
T11R3	13254.30446	7.90251

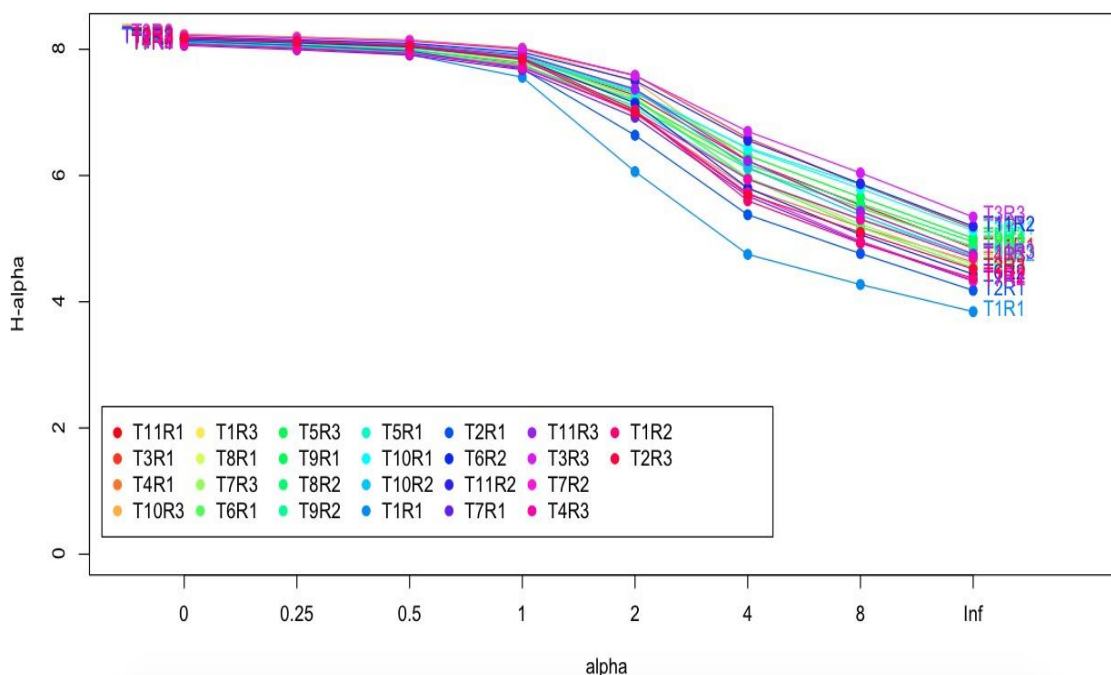
Legenda: Valores do índice de riqueza Chao e índice de diversidade Shannon (H).

Fonte: o autor.

As bibliotecas que apresentaram maior riqueza foram T3R1, T4R1 e T2R3. As que apresentaram a menor riqueza foram T4R3, T9R1 e T9R2.

As que apresentaram maior diversidade foram T3R1, T3R3 e T10R3. Menor diversidade foram T1R1, T7R1 e T2R1.

A comparação de perfis de diversidade de Renyi também foi realizada através do software R. Os resultados são mostrados na figura 11.

FIGURA 11 – PERFIS DE DIVERSIDADE DE RENYI

Legenda: Os valores apresentados em $\alpha = 0, 1, 2$ e (inf) mostram respectivamente a riqueza das espécies, índice de diversidade de Shannon, logaritmo da recíproca do índice de diversidade de Simpson e índice de diversidade de Berger Parker.

Fonte: o autor.

É possível notar que os resultados dos perfis de diversidade de Renyi são similares às análises de riqueza Chao e diversidade Shannon. Os resultados de diversidade demonstraram que conforme o aumento da dose de N, houve aumento da diversidade das comunidades bacterianas da rizosfera.

A biblioteca T1R1 to tratamento T1 que foi aplicado dose de 0N Kg/ha e demonstrou a menor diversidade de espécies entre todas as bibliotecas e testes efetuados. Seguido da biblioteca T2R1 do tratamento T2 que foi aplicado dose de 30N Kg/ha e apresentou também um dos menores índices de diversidade.

Os maiores índices de diversidade foram encontrados nas bibliotecas T3R1 e T3R3 que compõem o tratamento T3 que foi aplicado dose de 160N Kg/ha.

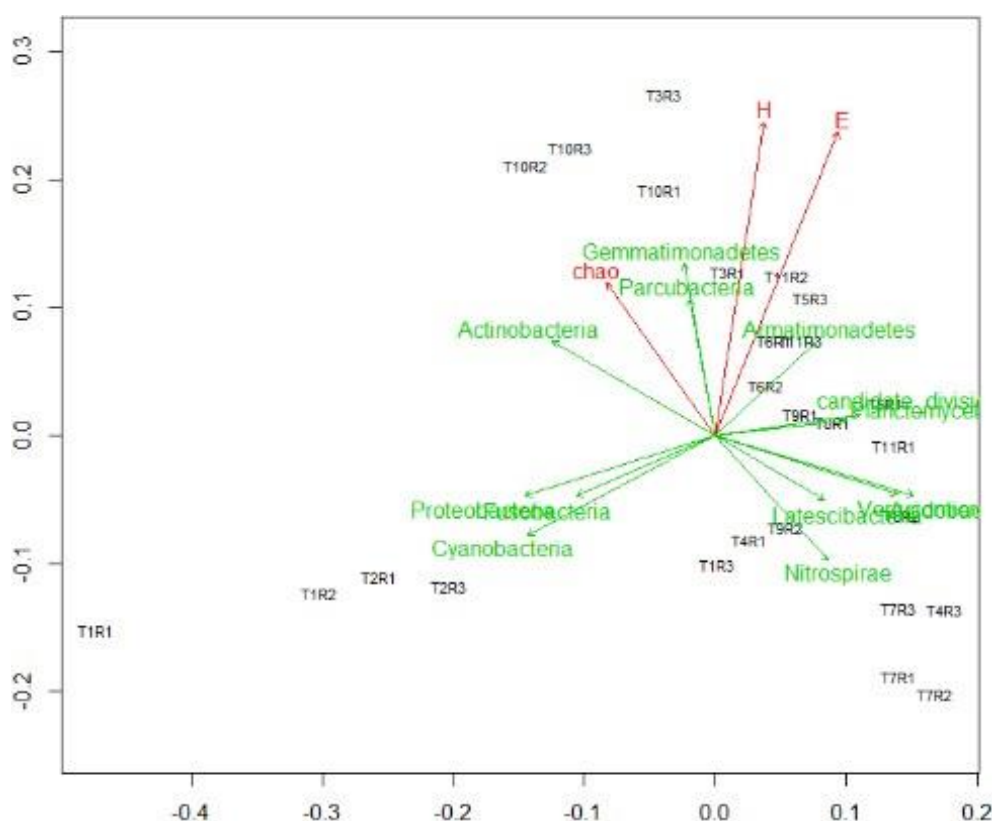
5.5 ANÁLISE DE COORDENADAS PRINCIPAIS

Nesta seção serão apresentados os resultados de correlação de PCoA (Análise de Coordenadas Principais, do inglês, *Principal Coordinates Analysis*) das porcentagens taxonômicas classificadas com a matriz de OTU.

5.5.1 Análise de Correlação e Taxonomia a Nível de Filo

Nesta seção são apresentados os resultados da correlação de PCoA da matriz de OTU com as porcentagens de taxonomia a nível de filo. A figura 12 mostra o resultado da correlação realizada através do software R por meio do pacote BiodiversityR.

FIGURA 12 – ANÁLISE DE CORRELAÇÃO E TAXONOMIA A NÍVEL DE FILO



Legenda: As bibliotecas e filotaxonomia com valor de $p < 0.05$. Os vetores apontam para a direção em que há aumento da variável. O comprimento do vetor representa a força da correlação da variável. Somente os vetores com valores de $p < 0,05$ com 999 permutações são exibidas no gráfico. H: índice de diversidade de Shannon, Chao: índice de riqueza Chao, E: índice de equitabilidade.

Fonte: o autor.

A partir da figura 12 é possível observar que as bibliotecas T1R1, T1R2, T2R1 e T2R3, possuem um aumento na população dos filotaxonomia *Fusobacteria*, *Cyanobacteria* e *Proteobacteria*.

As bibliotecas T10R1, T10R2, T10R3, T3R1 e T3R3 apresentam aumento na população dos filotaxonomia *Parcubacteria* e *Gemmatimonadetes*. A biblioteca T3R1 mostra aumento de diversidade Shannon. As bibliotecas T10R2 e T10R3 mostram aumento de riqueza Chao.

Uma forte correlação é observada no filo *Cyanobacteria* ($r^2=0.8228$, $p=0.001$) que tem maior presença nas bibliotecas que não foram inoculadas com bactérias. As bibliotecas T1R1 e

T1R2 que foi aplicado dose de 0KG de N Kg/Ha apresentam 36,54% deste filo. Já no tratamento T2 que foi aplicado dose de 30N Kg/Ha o percentual aumentou para 37,98%. Porém no tratamento T3 onde a dose de N aplicada foi de 160Kg/Ha o percentual diminuiu para 0,96%.

A pesquisa de Singh e colaboradores (2014), mostraram que a utilização de isolados bacterianos do filo *Cyanobacteria* aumentou a porcentagem de germinação de sementes de milho, além de elevar o nível de atividade da nitrogenase, uma enzima responsável pelo processo de fixação biológica do nitrogênio, capaz de reduzir o azoto gasoso atmosférico (N₂) em amoníaco (NH₃) na presença de hidrogênio.

O filo *Cyanobacteria* apresenta um grupo importante de microrganismos capazes de contribuir para o crescimento e aumento da produtividade de diversas culturas agrícolas, sendo considerado um biofertilizante importante que contribui para a diminuição de fertilizantes químicos aos níveis mínimos estabelecidos (VAISHAMPAYAN et al. 2001).

Alguns tipos de solos contêm grande quantidade de bactérias pertencentes a este filo, o que contribui para a utilização de N pela planta sem a necessidade da aplicação de grandes quantidades de fertilizantes. Sementes de milho foram plantadas e inoculadas com rizobactérias do filo *cyanobacteria* no estudo de Prasanna e colaboradores (2015), onde mostrou que além de economizar 40kg N ha⁻¹, também aumentou cerca de 40 - 50kg N ha⁻¹ no solo.

A pesquisa de Mohan e colaboradores (2015), avaliou os efeitos da inoculação de diferentes isolados de *Cyanobacteria* em sementes de milho e os resultados revelaram que houve um aumento significativo no total de N através do aumento do processo de nitrogenase.

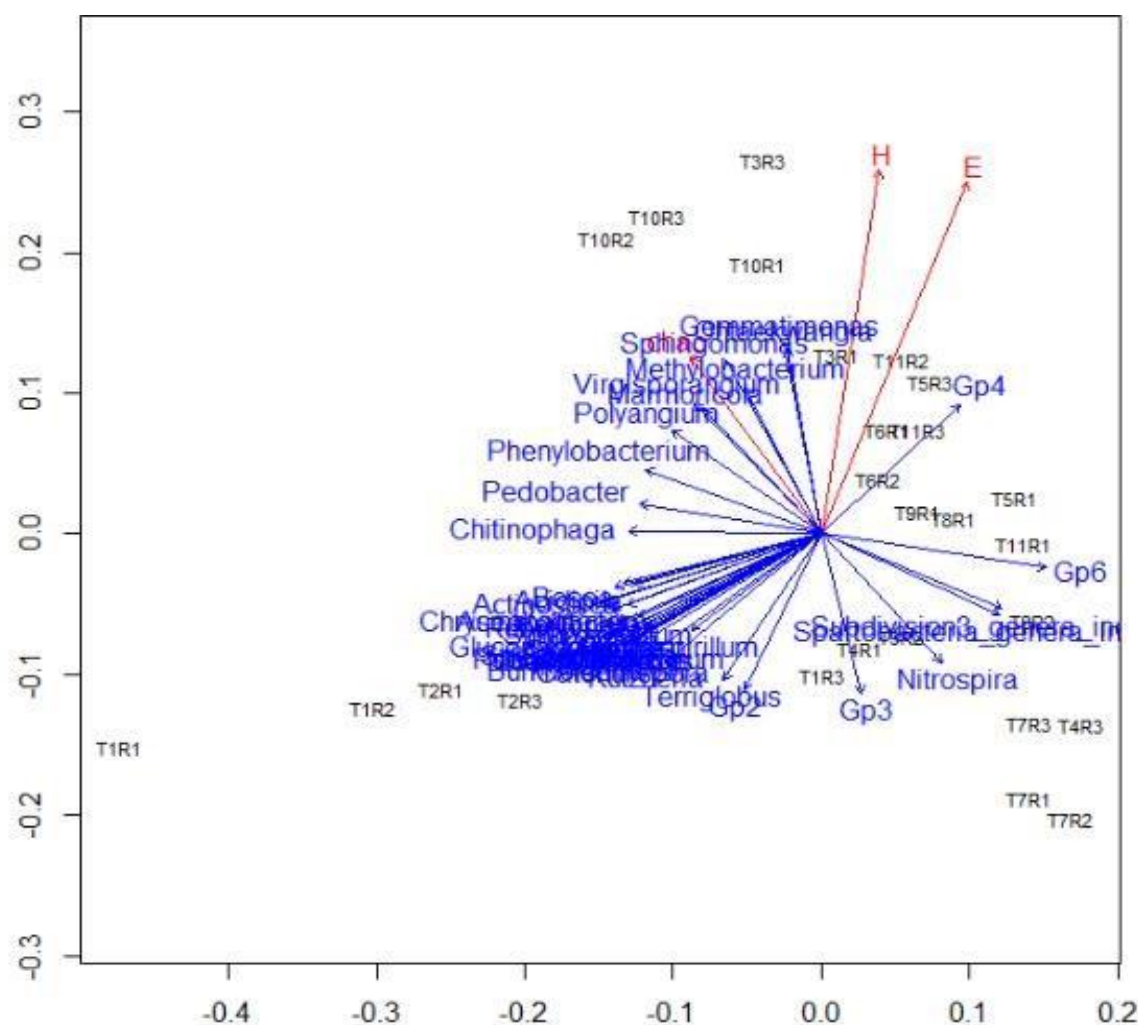
Na pesquisa de Shaharoona e colaboradores (2008), foram inoculadas rizobactérias sozinhas e inoculadas em associação com diferentes doses de N, P e K para avaliar os efeitos no crescimento, produção e uso de nutrientes na cultura do trigo. Foi possível observar que a capacidade de crescimento e aumento da produção foi reduzida com o aumento da aplicação de NPK, que segundo os autores foi por causa do aumento nos níveis de etileno, pelo fato da enzima 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC)-deaminase reduzir a síntese de etileno por meio da hidrólise de ACC em NH₃ e α -ketobutyrate em solos que recebem poucas doses de fertilizantes.

O etileno apresenta diversos mecanismos como a regulação do desenvolvimento da folha, estimulação da germinação, e outros fatores que contribuem para a saúde da planta (DUBOIS et al. 2018). Segundo Ecker e Davis (1987) quando a planta apresenta stress devido a uma infecção por bactérias, fungos ou vírus, há um aumento de etileno. Quando este hormônio gasoso aumenta, a planta ativa mecanismos de defesa para combater o stress, causando a inibição do crescimento e produtividade da planta.

5.5.2 Análise de Correlação e Taxonomia a Nível de Gênero

Nesta seção são apresentados os resultados da correlação de PCoA da matriz de OTU com as porcentagens de taxonomia a nível de gênero. A figura 13 mostra o resultado da correlação realizada através do software R por meio do pacote BiodiversityR.

FIGURA 13 – CORRELAÇÃO DE PCOA E TAXONOMIA A NÍVEL DE GÊNERO



Legenda: As bibliotecas e gêneros com valor de $p < 0.05$. Os vetores apontam para a direção em que há aumento da variável. O comprimento do vetor representa a força da correlação da variável. Somente os vetores com valores de $p < 0,05$ com 999 permutações são exibidas no gráfico. H: índice de diversidade de Shannon, Chao: índice de riqueza Chao, E: índice de equitabilidade.

Fonte: o autor.

A figura 13 mostra um agrupamento que será referenciado de agora em diante como “grupo 1” formado pelas bibliotecas T1R1, T1R2, T2R1 e T2R3 onde há aumento de diversos gêneros. Este grupo englobou a maioria dos gêneros que contém bactérias promotoras do crescimento vegetal. As bibliotecas T1R1 e T1R2 receberam dose de 0N sem inoculante. As

bibliotecas T2R1 e T2R3 receberam dose de 30N sem inoculante. O grupo 1 possui correlação negativa com outro grupo que contem as bibliotecas T5R3 que foi aplicado 160N (kg/ha) + Azototal e inoculado com *A. brasilense* AbV5 + AbV6. Também as bibliotecas T6R1 e T6R2 que foi aplicado 30N (kg/ha) e inoculado com *Azospirillum*. E T11R2 e T11R3 que foi aplicado 30N + AbV5 e inoculado com *A. brasilense*.

O gênero *Gluconacetobacter* está presente no grupo 1 e mostrou correlação positiva e significância ($r^2=0.8033$, $p=0.001$). Conforme a dose de N aumentou, a presença de bactérias deste gênero diminuiu, e a partir do tratamento 4 até o tratamento 11 onde todas as bibliotecas receberam doses de N e inoculantes, este gênero se mostrou ausente. As bibliotecas que possuem bactérias deste gênero são todas que estão no grupo 1 e a biblioteca T3R3. Em T1R1 e T1R2 teve 0,42% e 0,30%, respectivamente. Em T2R1 e T2R3 teve 0,18% e 0,04%. Em T3R3 teve 0,04%.

Bactérias diazotróficas deste gênero foram isoladas originalmente da cana-de-açúcar e mostraram capacidade de fixar nitrogênio em plantas (FUENTES-RAMÍREZ et. al., 2001), produzir hormônios de crescimento e solubilizar fosfato (MUTHUKUMARASAMY et. al., 2002).

No estudo de Fuentes-Ramírez et. al. (1999) as comunidades de bactérias diazotróficas foram afetadas negativamente conforme a aplicação de N aumentava.

Na pesquisa de Roesch et. al. (2006) as bactérias diazotróficas do gênero *Gluconacetobacter* diminuíram quando a aplicação de N aumentou. Isolados bacterianos deste gênero aumentaram o tamanho da raiz do milho, mostraram atividades antifúngicas e capacidade de produzir o fitormônio ácido indolacético (AIA) que é responsável por regular o crescimento de plantas (MEHNAZ e LAZAROVITS, 2006). Bactérias deste gênero também produzem altos níveis de celulose, um substrato da celulase que tem um papel importante na estrutura da parede vegetal das plantas (NGUYEN et. al., 2008).

Isolados bacterianos pertencentes ao gênero *Burkholderia* que está presente no grupo 1 com correlação positiva e significativa ($r^2=0.9375$, $p=0.001$), são conhecidos pela capacidade de fixar nitrogênio no milho, podendo ser encontrados em grande quantidade na rizosfera (PERIN et. al., 2006). Também apresenta características de biorremediação, podendo degradar contaminantes presentes no meio ambiente (EL-BANNA et. al., 1998) e pode contribuir para o crescimento da planta através da fixação de nitrogênio por meio do aumento da atividade de nitrogenase (GILLIS, et. al., 1995).

O gênero *Rhizobium* também foi encontrado no grupo 1 com valor de ($r^2=0.6468$, $p=0.001$). A capacidade de solubilizar fosfato, fixar nitrogênio e produzir fitormônios são

algumas características de bactérias pertencentes a este gênero (CHABOT e CESCAS, 1996).

No estudo de Paudyal e Gupta (2018) foi realizado um experimento utilizando N em forma de ureia e inoculação com *Rhizobium*. A partir da verificação de acumulação de biomassa foi possível constatar que a inoculação foi similar à aplicação de 80kg de ureia/ha e a produtividade de biomassa mostraram resultados similares em relação aos dois métodos testados. Isso contribui para a economia da aplicação de fertilizantes e introdução de rizobactérias como alternativa econômica e sustentável.

Bactérias do gênero *Rhizobium* mostraram aumento do crescimento de leguminosas, aumento na absorção de N e P, incremento no tamanho da raiz e aumento na produção de matéria fresca e seca. Resultados obtidos por meio da capacidade de produção de fitormônios, solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio (ZAFAR et. al., 2012).

No estudo de Peng e colaboradores (2002), a inoculação com bactérias do gênero *Rhizobium* no arroz aumentou consideravelmente a produção de matéria seca e produtividade da planta.

O crescimento do milho e aumento de N e P na rizosfera foi possível por meio das atividades que bactérias do gênero *Rhizobium* desempenharam na rizosfera, além de aumentar a produtividade de grãos do milho (LATATI et. al., 2016).

Outro gênero presente no grupo 1 é o *Herbaspirillum* com valor de ($r^2=0.3973$, $p=0.001$). Conhecido por ser um gênero que solubiliza fosfato, produz fitormônios e fixa nitrogênio (JAMES et al., 2000).

No estudo de Alves e colaboradores (2015), a associação de bactérias deste gênero aumentou em 34% a produção da planta. Em relação ao processo de fixação de nitrogênio, 37% de N acumulado foi através da fixação biológica de um isolado deste gênero.

No estudo de Curá e colaboradores (2017), a inoculação com um isolado bacteriano do gênero *Herbaspirillum* foi testado no milho em duas condições: em estado de deficiência de água e estado normal de suprimento de água para avaliar se a inoculação ajudaria quando uma crise seca afetasse a cultura. Os tratamentos inoculados mostraram resultados positivos em relação a condições de seca, e houve aumento de biomassa, nitrogênio, carbono e diminuição do hormônio de estresse conhecido como etileno.

Bactérias deste gênero mostraram resultados positivos ao colonizar folhas do milho e diminuir a produção de acetileno, gás responsável por inibir o processo de nitrificação e desnitrificação, sugerindo que há atividade de nitrogenase e desta maneira demonstra a capacidade de fixar nitrogênio de maneira eficiente (BRUSAMARELLO-SANTOS et. al., 2017).

A capacidade de fixar nitrogênio e contribuir para o crescimento do milho por meio da inoculação de bactérias do gênero *Rhizobium* pode ser observada também no estudo de Ribaud e colaboradores (2006) onde as plantas inoculadas apresentaram um aumento de 13 a 30% e o nitrogênio foi incrementado de 10 a 53%.

Na figura 13 observa-se um grupo formado pelas bibliotecas T1R3, T4R1 e T9R2 onde há aumento do gênero Gp3, uma subdivisão de Acidobacteria, com valor de ($r^2=0.4343$, $p=0.001$). Este gênero é encontrado em abundância em diferentes tipos de solo e na rizosfera de plantas (LEE et. al., 2008), porém pouco se sabe sobre as funções morfológicas e ecológicas das subdivisões devido ao fato de a análise ser realizada por meio de sequenciamento de DNA ribossomal e da dificuldade de se cultivar estes isolados em laboratório (ARAUJO et. al., 2012).

Há evidências da capacidade de produzir nitrito e nitrato, componentes que fazem parte do processo de fixação de nitrogênio, além de evidenciar contribuições no processo de ciclo do carbono, na transformação de açúcares simples em substratos complexos que são utilizados pela planta, como a celulose e quitina (WARD et. al., 2009)

Há um grupo formado pelas bibliotecas T7R1, T7R2, T7R3 e T4R3 apresenta menor riqueza de Chao e aumento do gênero Nitrospira, que apresentou valor ($r^2=0.4767$, $p=0.001$). Este grupo tem correlação negativa com T10R1, T10R2, T10R3 e T3R3 que apresentaram aumento dos gêneros *Gemmatimonas*, *Virgisporangium*, *Methylobacterium*, *Virgisporangium*, *Marmoricola*, *Sphingomonas* e *Polyangium*.

6 CONCLUSÃO

Na rizosfera do milho por meio da análise metataxonômica do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA foram encontrados 28 filos, 62 classes, 83 ordens, 183 famílias e 582 gêneros.

O filo com maior predominância foi *Proteobacteria*. A classe dominante foi *Alphaproteobacteria*. A ordem dominante foi *Myxococcales*. A família dominante foi *Planctomycetaceae*. O gênero dominante foi *Gp6*.

As bibliotecas que apresentaram maior riqueza foram aplicadas doses de 30 kg/ha de N sem inoculação, 160 kg/ha de N sem inoculação e 30 kg de N + Azototal inoculado com *A. Brasilense* AbV5 + AbV6. As que apresentaram a menor riqueza foram aplicadas doses de 30 kg/ha de N + 4331 inoculado com *Enhydrobacter*.

As que apresentaram maior diversidade receberam dose de 160 kg/ha de N sem inoculação e 30 kg/ha de N + HM053 inoculado com *A. Brasilense*. Menor diversidade foram as bibliotecas com dose de 0 kg/ha de N sem inoculação, 30 kg/ha de N + L27 inoculado com *Herbaspirillum* e 30 kg/ha de N sem inoculação.

A maioria dos gêneros que contém bactérias promotoras do crescimento vegetal encontram-se nas bibliotecas que receberam dose de 0N kg/h e 30N kg/h sem inoculantes.

REFERÊNCIAS

- ALVES, Gabriela Cavalcanti et al. Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. **Plant and soil**, v. 387, n. 1-2, p. 307-321, 2015.
- ARAUJO, Janaina F. et al. Characterization of soil bacterial assemblies in Brazilian savanna-like vegetation reveals acidobacteria dominance. **Microbial ecology**, v. 64, n. 3, p. 760-770, 2012.
- ASHRAF, Muhammad Arslan; RASOOL, Mahmood; MIRZA, Muhammad Sajjad. Nitrogen fixation and indole acetic acid production potential of bacteria isolated from rhizosphere of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Adv Biol Res**, v. 5, n. 6, p. 348-355, 2011.
- BAKKER, Matthew G. et al. Impacts of bulk soil microbial community structure on rhizosphere microbiomes of *Zea mays*. **Plant and Soil**, v. 392, n. 1-2, p. 115-126, 2015.
- BARRIUSO, Jorge; MARÍN, Silvia; MELLADO, Rafael P. Effect of the herbicide glyphosate on glyphosate-tolerant maize rhizobacterial communities: a comparison with pre-emergency applied herbicide consisting of a combination of acetochlor and terbuthylazine. **Environmental microbiology**, v. 12, n. 4, p. 1021-1030, 2010.
- BOUFFAUD, MARIE-LARA et al. Is diversification history of maize influencing selection of soil bacteria by roots?. **Molecular ecology**, v. 21, n. 1, p. 195-206, 2012.
- BRUSAMARELLO-SANTOS, Liziane Cristina et al. Metabolic profiling of two maize (*Zea mays* L.) inbred lines inoculated with the nitrogen fixing plant-interacting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense*. **PloS one**, v. 12, n. 3, p. e0174576, 2017.
- BLOEMBERG, Guido V.; LUGTENBERG, Ben JJ. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current opinion in plant bi-ology**, v. 4, n. 4, p. 343-350, 2001.
- CANTARELLA, H.; DUARTE, A. P. Manejo da fertilidade do solo para a cultura do milho. **Tecnologia de produção de milho. Viçosa: UFV**, v. 5, p. 139-182, 2004.
- CAPORASO, J. Gregory et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010.
- CHAUHAN, Puneet Singh et al. Uncultured bacterial diversity in tropical maize (*Zea mays* L.) rhizosphere. **Journal of basic microbiology**, v. 51, n. 1, p. 15-32, 2011.
- COHEN, Jacques. Bioinformatics—an introduction for computer scientists. **ACM Computing Surveys (CSUR)**, v. 36, n. 2, p. 122-158, 2004.
- CORREA-GALEOTE, David et al. Bacterial communities in the rhizosphere of amilaceous maize (*Zea mays* L.) as assessed by pyrosequencing. **Frontiers in plant science**, v. 7, 2016.

CHABOT, Rock; ANTOUN, Hani; CESCAS, Michel P. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar. phaseoli. **Plant and soil**, v. 184, n. 2, p. 311-321, 1996.

COLE, James R. et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. D633-D642, 2013.

CURÁ, José et al. Inoculation with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum* sp. bacteria increases the tolerance of maize to drought stress. **Microorganisms**, v. 5, n. 3, p. 41, 2017.

DA, FF Mota et al. Bacterial and fungal communities in bulk soil and rhizospheres of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive maize (*Zea mays* L.) lines cultivated in unlimed and limed Cerrado soil. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 805-814, 2008.

DAWID, Wolfgang. Biology and global distribution of myxobacteria in soils. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 4, p. 403-427, 2000.

DESANTIS, T. Z. et al. NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. **Nucleic acids research**, v. 34, n. suppl_2, p. W394-W399, 2006.

DUBOIS, Marieke; VAN DEN BROECK, Lisa; INZÉ, Dirk. The pivotal role of ethylene in plant growth. **Trends in plant science**, v. 23, n. 4, p. 311-323, 2018.

ECKER, Joseph R.; DAVIS, Ronald W. Plant defense genes are regulated by ethylene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 15, p. 5202-5206, 1987.

EDGAR, Robert C. et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, v. 27, n. 16, p. 2194-2200, 2011.

EL-BANNA, N.; WINKELMANN, Günther. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, n. 1, p. 69-78, 1998.

FAN, Fenliang et al. Probing potential microbial coupling of carbon and nitrogen cycling during decomposition of maize residue by ¹³C-DNA-SIP. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 70, p. 12-21, 2014.

FURLONG, Michelle A. et al. Molecular and culture-based analyses of prokaryotic communities from an agricultural soil and the burrows and casts of the earthworm *Lumbricus rubellus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1265-1279, 2002.

FUKAMI, Josiane et al. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 3, 2016.

FIERER, Noah; BRADFORD, Mark A.; JACKSON, Robert B. Toward an ecological classification of soil bacteria. **Ecology**, v. 88, n. 6, p. 1354-1364, 2007.

FISH, Jordan A. et al. FunGene: the functional gene pipeline and repository. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 291, 2013.

FUENTES-RAMÍREZ, Luis E. et al. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 29, n. 2, p. 117-128, 1999.

FUENTES-RAMÍREZ, Luis E. et al. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1305-1314, 2001.

GILLIS, Monique et al. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 274-289, 1995.

GREMION, Fabienne; CHATZINOTAS, Antonis; HARMS, Hauke. Comparative 16S rDNA and 16S rRNA sequence analysis indicates that Actinobacteria might be a dominant part of the metabolically active bacteria in heavy metal-contaminated bulk and rhizosphere soil. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 10, p. 896-907, 2003.

GUO, Min et al. Genomic evolution of 11 type strains within family Planctomycetaceae. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e86752, 2014.

HERMANS, Syrie M. et al. Bacteria as emerging indicators of soil condition. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 83, n. 1, p. e02826-16, 2017.

HANDELSMAN, Jo et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & biology**, v. 5, n. 10, p. R245-R249, 1998.

HUNGRIA, Mariangela et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1-2, p. 413-425, 2010.

IGNJATOVIC-MICIC, Dragana et al. Grain nutrient composition of maize (*Zea mays* L.) drought-tolerant populations. **J Agric Food Chem**, v. 63, p. 1251-1260, 2015.

JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field crops research**, v. 65, n. 2-3, p. 197-209, 2000.

JANGID, Kamlesh et al. Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 2843-2853, 2008.

JANSSEN, Peter H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 3, p. 1719-1728, 2006.

JIMÉNEZ, Diego Javier et al. Structural and functional insights from the metagenome of an acidic hot spring microbial planktonic community in the Colombian Andes. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e52069, 2012.

JOSHI, Mohini; DESHPANDE, J. D. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. **International Journal of Biomedical Research**, v. 2, n. 1, p. 81-97, 2010.

JOHNSTON-MONJE, David et al. Bacterial populations in juvenile maize rhizospheres originate from both seed and soil. **Plant and Soil**, v. 405, n. 1-2, p. 337-355, 2016.

JONES, Ryan T. et al. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. **The ISME journal**, v. 3, n. 4, p. 442, 2009.

KAPPES, Claudinei et al. Inoculação de sementes com bactéria diazotrófica e aplicação de nitrogênio em cobertura e foliar em milho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, 2013.

LATATI, Mourad et al. The intercropping common bean with maize improves the rhizobial efficiency, resource use and grain yield under low phosphorus availability. **European Journal of Agronomy**, v. 72, p. 80-90, 2016.

LEE, Sang-Hoon; KA, Jong-Ok; CHO, Jae-Chang. Members of the phylum Acidobacteria are dominant and metabolically active in rhizosphere soil. **FEMS microbiology letters**, v. 285, n. 2, p. 263-269, 2008.

LI, Xiangzhen et al. Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 68, p. 392-401, 2014.

LIU, Huixue et al. Insight into the correlation between biochar amendment and shifts in bacterial community 4 years after a single incorporation in soybean-and maize-planted soils in northeastern China. **Canadian journal of microbiology**, v. 65, n. 5, p. 353-364, 2019.

LÜCKER, Sebastian et al. A Nitrospira metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 30, p. 13479-13484, 2010.

MARRA, Leandro Marciano et al. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and soil**, v. 357, n. 1-2, p. 289-307, 2012.

MALAVOLTA, Eurípides. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações/Eurípedes Malavolta, Godofredo Cesar Vitti, Sebastião Alberto de Oliveira.—2. ed., ver. e atual. Piracicaba: **Potafos**, 1997.

MOUTIA, Jean-Francois Yvan et al. Plant growth promotion by Azospirillum sp. in sugarcane is influenced by genotype and drought stress. **Plant and soil**, v. 337, n. 1-2, p. 233-242, 2010.

MEHNAZ, Samina; LAZAROVITS, George. Inoculation effects of Pseudomonas putida, Gluconacetobacter azotocaptans, and Azospirillum lipoferum on corn plant growth under greenhouse conditions. **Microbial Ecology**, v. 51, n. 3, p. 326-335, 2006.

MUTHUKUMARASAMY, R. et al. Gluconacetobacter diazotrophicus (syn. Acetobacter diazotrophicus), a promising diazotrophic endophyte in tropics. **Current Science**, p. 137-145, 2002.

MOHAN, Anand; KUMAR, Baidyanath. Growth performance and yield potential of cereal crops (wheat, maize and barley) in association with cyanobacteria. **Int J Curr Microbiol App Sci**, v. 6, n. 10, p. 744-758, 2017.

NANNIPIERI, P. et al. Effects of root exudates in microbial diversity and activity in rhizosphere soils. In: Molecular mechanisms of plant and microbe coexistence. **Springer Berlin Heidelberg**, 2008. p. 339-365.

NELSON, Michael C. et al. Analysis, optimization and verification of Illumina-generated 16S rRNA gene amplicon surveys. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e94249, 2014.

NAWROCKI, Eric P.; KOLBE, Diana L.; EDDY, Sean R. Infernal 1.0: inference of RNA alignments. **Bioinformatics**, v. 25, n. 10, p. 1335-1337, 2009.

NGUYEN, Vu Tuan et al. Characterization of cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha. **Current Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 449, 2008.

ÖZTÜRK, Lokman; DEMIR, Yavuz. Effects of putrescine and ethephon on some oxidative stress enzyme activities and proline content in salt stressed spinach leaves. **Plant Growth Regulation**, v. 40, n. 1, p. 89-95, 2003.

PATEL, Jean Baldus. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. **Molecular Diagnosis**, v. 6, n. 4, p. 313-321, 2001.

PAUDYAL, Som Prasad; GUPTA, V. N. P. Substitution of chemical fertilizer nitrogen through *Rhizobium* inoculation technology. **Our Nature**, v. 16, n. 1, p. 43-47, 2018.

PEIFFER, Jason A. et al. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 16, p. 6548-6553, 2013.

PENG, Shaobing et al. Influence of rhizobial inoculation on photosynthesis and grain yield of rice. **Agronomy Journal**, v. 94, n. 4, p. 925-929, 2002.

PERIN, L. et al. Diazotrophic Burkholderia species associated with field-grown maize and sugarcane. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 5, p. 3103-3110, 2006.

POLTI, Marta A. et al. Simultaneous bioremediation of Cr (VI) and lindane in soil by actinobacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 88, p. 48-55, 2014.

PEREIRA, Paola et al. Analysis of the bacterial diversity associated with the roots of maize (*Zea mays* L.) through culture-dependent and culture-independent methods. **ISRN Ecology**, v. 2011, 2011.

PEIFFER, Jason A. et al. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 16, p. 6548-6553, 2013.

PRASANNA, Radha et al. Cyanobacterial inoculation elicits plant defense response and enhanced Zn mobilization in maize hybrids. **Cogent Food & Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 998507, 2015.

re3data.org: RDP; editing status 2017-05-26; re3data.org - Registry of Research Data Repositories. <http://doi.org/10.17616/R3C087>. Acesso em: 13-11-2017.

RAMIREZ-VILLANUEVA, Daniel A. et al. Bacterial community structure in maize residue amended soil with contrasting management practices. **Applied soil ecology**, v. 90, p. 49-59, 2015.

ROSSELLÓ-MORA, Ramon; AMANN, Rudolf. The species concept for prokaryotes. **FEMS microbiology reviews**, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001.

RIBAUDO, C. M. et al. Effect of *Herbaspirillum seropedicae* inoculation on maize nitrogen metabolism. **Maydica**, v. 51, n. 3, p. 481, 2006.

ROESCH, Luiz FW et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME journal**, v. 1, n. 4, p. 283, 2007.

ROGNES, Torbjørn et al. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. **PeerJ**, v. 4, p. e2584, 2016.

SANGOI, Luís et al. Desempenho agrônômico do milho em razão do tratamento de sementes com *azospirillum* sp. e da aplicação de doses de nitrogênio mineral. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 4, 2015.

SCHLOSS, Patrick D.; HANDELSMAN, Jo. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 3, p. 1501-1506, 2005.

SCHLOSS, Patrick D.; HANDELSMAN, Jo. Introducing SONS, a tool for operational taxonomic unit-based comparisons of microbial community memberships and structures. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 10, p. 6773-6779, 2006.

SCHLOSS, Patrick D. et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009.

SCHRÖDER, J. J. et al. Does the crop or the soil indicate how to save nitrogen in maize production?: Reviewing the state of the art. **Field Crops Research**, v. 66, n. 2, p. 151-164, 2000.

SEGATA, Nicola et al. Computational meta9omics for microbial community studies. **Molecular systems biology**, v. 9, n. 1, p. 666, 2013.

Secretaria da agricultura e do abastecimento - SEAB, 2017. Produção Agropecuária. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=137>. Acesso em: 21/10/2017.

SHAHAROONA, Baby et al. Fertilizer-dependent efficiency of Pseudomonads for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Applied microbiology and biotechnology**, v. 79, n. 1, p. 147-155, 2008.

SINGH, Jay Shankar et al. Cyanobacteria: a precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 529, 2016.

SPAGNOLLO, E. et al. Leguminosas estivais intercalares como fonte de nitrogênio para o milho, no Sul do Brasil. **Revista brasileira de ciência do solo**, v. 26, n. 2, 2002.

SPRENT, Janet I. Global distribution of legumes. **Legume Nodulation: A Global Perspective**, p. 35-50, 2009.

SZILAGYI-ZECCHIN, Vivian Jaskiw. Microrganismos endofíticos de milho (*Zea Mays* L.). 2012.

TEELING, Hanno; GLÖCKNER, Frank Oliver. Current opportunities and challenges in microbial metagenome analysis—a bioinformatic perspective. **Briefings in bioinformatics**, v. 13, n. 6, p. 728-742, 2012.

TORSVIK, Vigdis; ØVREÅS, Lise. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current opinion in microbiology**, v. 5, n. 3, p. 240-245, 2002.

TURNBAUGH, Peter J. et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 480, 2009.

TAO, Jiemeng et al. Maize growth responses to soil microbes and soil properties after fertilization with different green manures. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, n. 3, p. 1289-1299, 2017.

THOMSON, Bruce C. et al. Vegetation affects the relative abundances of dominant soil bacterial taxa and soil respiration rates in an upland grassland soil. **Microbial ecology**, v. 59, n. 2, p. 335-343, 2010.

TREUDE, Nicole et al. Strain FAc12, a dissimilatory iron-reducing member of the Anaeromyxobacter subgroup of Myxococcales. **FEMS microbiology ecology**, v. 44, n. 2, p. 261-269, 2003.

VAISHAMPAYAN, A. et al. Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. **The Botanical Review**, v. 67, n. 4, p. 453-516, 2001.

VOGEL, Timothy M. et al. TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 252, 2009.

WANG, Qiong et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, n. 16, p. 5261-5267, 2007.

WARD, Naomi L. et al. Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 7, p. 2046-2056, 2009.

WARD, Naomi L. et al. Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 75, n. 7, p. 2046-2056, 2009.

WESTCOTT, Sarah L.; SCHLOSS, Patrick D. De novo clustering methods outperform reference-based methods for assigning 16S rRNA gene sequences to operational taxonomic units. **PeerJ**, v. 3, p. e1487, 2015.

YANG, Yi et al. Comparative analysis of bacterial community structure in the rhizosphere of maize by high-throughput pyrosequencing. **PLoS One**, v. 12, n. 5, p. e0178425, 2017.

ZAFAR, M. et al. Effect of plant growth-promoting rhizobacteria on growth, nodulation and nutrient accumulation of lentil under controlled conditions. **Pedosphere**, v. 22, n. 6, p. 848-859, 2012.

ZEFFA, Douglas Mariani et al. The influence of topdressing nitrogen on *Azospirillum* spp. inoculation in maize crops through meta-analysis. **Bragantia**, n. AHEAD, 2018.