



UNIVERSIDADE FEDERAL  
DE ALAGOAS

CAMPUS DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**SAUL DE CAMPOS DE MELO ALMEIDA**

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NÃO  
SIMBIÓTICAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS**

**Maceió**

**2022**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias**  
Bibliotecária Responsável: Myrtes Vieira do Nascimento

A447s Alemida, Saul de Campos de Melo  
Seleção de bactérias diazotróficas não simbióticas solubilizadoras  
de fosfatos. / Saul de Campos de Melo Almeida. – 2022.  
42 f.; il.

Monografia de Graduação em Agronomia (Trabalho de Conclusão  
de Curso) – Universidade Federal de Alagoas, Campus de  
Engenharias e Ciências Agrárias. Rio Largo, 2022.

Orientação: Dr<sup>a</sup>. Tânia Marta Carvalho dos Santos

Inclui bibliografia

1. Bactérias. 2. Fosfato. 3. Biologia. I. Título

CDU: 57

**SAUL DE CAMPOS DE MELO ALMEIDA**

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NÃO SIMBIÓTICAS  
SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
submetida ao corpo docente do Curso de  
Graduação em Agronomia da  
Universidade Federal de Alagoas e  
aprovada em 19 de agosto de 2022

Documento assinado digitalmente  
 **TANIA MARTA CARVALHO DOS SANTOS**  
Data: 30/08/2022 11:11:48-0300  
Verifique em <https://verificador.itl.br>

---

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Tania Marta Carvalho Dos Santos**  
**Orientadora**

**Banca Examinadora:**

Documento assinado digitalmente  
 **JOAO MANOEL DA SILVA**  
Data: 30/08/2022 11:19:56-0300  
Verifique em <https://verificador.itl.br>

---

**Prof. Dr. JOÃO MANOEL DA SILVA**  
**Examinador Externo**

Documento assinado digitalmente  
 **YAMINA COENTRO MONTALDO**  
Data: 31/08/2022 09:27:54-0300  
Verifique em <https://verificador.itl.br>

---

**Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Yamina Coentro Montaldo**  
**Examinadora Interna**

**SAUL DE CAMPOS DE MELO ALMEIDA**

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NÃO  
SIMBIÓTICAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Agronomia , como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tania Marta Carvalho dos Santos

Maceió  
2022

Dedico primeiramente aos meus pais, por proporcionarem boa educação , me incentivar, e me auxiliar em todo os momentos de minha vida até hoje.

A minha amiga, parceira, companheira de laboratório e namorada ,Bruna Brasil , por trilhar este caminho desde o começo.

A todos professores pelo qual passei durante minha graduação, pois, sem eles nenhum aprendizado seria possível.

Em especial, dedico à minha professora e orientadora, Tânia Marta, por me acolher em seu laboratório e me guiar, com toda paciência e sabedoria, durante esse caminho na graduação.

## **Agradecimentos**

Os agradecimentos pela conclusão deste trabalho vão para:

Gostaria de agradecer a minha mãe e meu pai, Suely e Marcio, por todo apoio quando decidi iniciar o curso, além de todo apoio financeiro, e nunca impor empecilhos quanto a minha decisão profissional, amo vocês.

Agradecimentos especiais a minha parceira Bruna Brasil, por estar presente em toda jornada acadêmica, passar por apertos e barrancos durante esse processo, e tornar meus dias de faculdade mais animados e divertidos, te amo xuxu.

Aos meus amigos de graduação Irvin Lucena, Carlos Henrique e Matus Nascimento, por diversas vezes formar grupos e passar por várias matérias que sozinhos estaríamos com dificuldades..

À todos os amigos do laboratório que deixaram as manhãs e as tardes mais animadas, principalmente aos meus professores/amigos Jakes Halan, João Manoel, Ubaldo e Yamina Coentro..

Agradeço cordialmente a Dr<sup>a</sup>. e professora Tânia Marta por me passar seus conhecimentos e me acolher como seu estagiário, e tornar possível a construção deste trabalho.

Agradeço a todos professores por seu tempo e estresses diários ao passar seus conhecimentos.

Grato!

“Se você não gosta do seu destino, não o aceite.  
Em vez disso, tenha a coragem para transformá-  
lo naquilo que você quer que ele seja.”

Naruto Uzumaki

## Resumo

ALMEIDA, S. C. M. **SELEÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NÃO SIMBIÓTICAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS**. Rio Largo: CECA/UFAL, 2022, 45 p. (Trabalho de Conclusão de Curso)

Uma das principais fontes de nitrogênio no solo é o processo de fixação biológica de  $N_2$  atmosférico, assim com o nitrogênio, o fósforo tem papel indispensável na biosfera, já que faz parte dos ácidos nucleicos, os quais armazenam o código genético. Muitas das substâncias intermediárias da fotossíntese e da respiração celular estão combinadas com fósforo, além disso, este faz parte da moeda energética da vida, o ATP. Com este estudo, objetivou-se isolar e selecionar rizobactérias diazotróficas não simbióticas, capazes de solubilizar fosfatos e avaliar sua eficiência em estabelecer interação com plântulas de milho (*Zea mays* L) *in vitro*. 57 isolados cresceram nos meios NFB e JM, (livres de nitrogênio), dos quais 11 apresentaram formação de um halo transparente ao redor da colônia cultivada em meio sólido, indicando a capacidade de solubilizar fosfato de cálcio ( $Ca_5(PO_4)_3OH$ ) adicionado ao NBRIP. Dos onze isolados três apresentaram baixa solubilização com IS variando de 1,140 a 1,417; um obteve índice médio (IS 2,735), e 7 obtiveram um alto índice de solubilização (IS variando de 3,102 a 12,750). Oito isolados colonizaram totalmente o sistema radicular e a região do colo, um colonizou parcialmente (DBSF47) e dois colonizaram apenas a região do colo (DBSF40 e DBSF58). As análises de variância detectaram significância (Teste F  $p < 0,05$ ) para os parâmetros: altura de planta (AP), do comprimento de raiz (CR), diâmetro do coleto (DC), área foliar (AF), número de folhas (NF) e de peso de matéria seca total (PMST). Para AP, apenas o isolado DBSF40, não diferiu significativamente do controle, enquanto os demais promoveram aumento significativo com destaque para DBSF21 (16,970cm) e DBSF33 (16,767cm). Com relação a CR também se verificou diferenças significativas entre o controle e os isolados, os maiores comprimentos foram com os isolados DBSF30, DBSF37, DBSF40, DBSF47 e DBSF58. Para DC, as médias observadas para os isolados DBSF30, DBSF37, DBSF42, DBSF47 e DBSF64 não apresentaram diferença significativa em relação ao controle. O maior valor foi verificado para DBSF20 que não apresentou diferenças significativas em relação aos isolados DBSF33, DBSF40, DBSF41 e DBSF58. Quanto ao número de folhas apenas o isolado DBSF58 diferiu do controle apresentando 3 folhas. Com relação a AF todos os isolados promoveram incremento significativo comparando-se ao controle sendo os melhores resultados verificados para DBSF58, DBSF40 e DBSF20 (16,763, 15,950 e 15,950  $cm^2$  respectivamente). Na produção de massa de PMS pelas plântulas, todos os isolados diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do controle, a maior média foi verificada para DBSF40 (1,00g). Todos os isolados selecionados como diazotróficos, apresentaram características para a promoção do crescimento vegetal.

**Palavras-chave:** bactérias, promotoras de crescimento, diazotróficas, não simbióticas

## Abstract

ALMEIDA, S. C. M. **SELECTION OF DIAZOTROPHIC NON-SYMBIOTIC PHOSPHATE SOLUBILIZING BACTERIA**. Rio Largo: CECA/UFAL, 2022, 45 p. (Course Conclusion Monograph)

One of the most important resources of nitrogen present on the soil are biological fixation process of atmospheric N<sub>2</sub>, as nitrogen the phosphorus has a important role on biosphere, since he is part of nucleic acids that stock de genetic code. A lot of photosynthesis and cellular respiration intermediaries substancies are combined with phosphorus, besides, this one is part of the energetic coin of life, the ATP. With this study, the objective was to isolate and select diazotrophics rhizobacteria, not simbiotics that are capable of solubilizing phosphates and evaluate the efficient of interacting with corn (*Zea mays* .L) seedlings in vitro. 57 strains grew in Nfb and JmV (nitrogen-free) solutions, 11 showed formation of a transparent halo around the colony cultivated on solid solution, indicating the ability to solubilize calcium phosphate (Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>OH) added to NBRIP. among the eleven isolated bacterias 3 presentes low solubilization with IS ( solubilization indice) ranging between 1,140 to 1,417. One of then reach medium level ( IS 2,735), and 7 bacterias present hight level of solubilization ( IS ranging between 3.102 to 12,750). 8 of these isolated colonized all the radicular system and the region of the lap , one colonized just a part (DBSF47), and two colonized just the region of the lap (DBSF40 and DBSF58). The analyzes of variance detected a significance (test F p<0,05) for the parameters: plant height (PH), root length (RL), stalk diameter (SD), foliar area (FA), number of leafs (NL) and total weigth of dry matter (TWDM) .PH, only the isolated DBSF40, do not differed significantly of control, while the oders promote a significant increase with emphasis on DBSF21 (16.970 cm) e DBSF33 (16,767 cm), in RL has noted significantly diferences between control and strains, the greatest lengths were with the strains DBSF30, DBSF37, DBSF40, DBSF47 e DBSF58. For SD the observed results to DBSF30, DBSF37, DBSF42, DBSF47 e DBSF64 do not differed significantly of control. the highest value has been checked was found for the strain DBSF20 which did not show significant differences in relation to DBSF33, DBSF40, DBSF41 e DBSF58. as for the NL only the strain DBSF58 differed from the control with 3 leaves. Regarding FA, all isolates promoted a significant increase compared to the control, with the best results being verified for DBSF58, DBSF40 and DBSF20 (16,763, 15,950 and 15,950 cm<sup>2</sup> respectively).In the highest mass production of TWDM by seedlings, all isolates differed statistically (p<0.05) from the control, the average was verified for DBSF40 (1.00g). All isolates selected as diazotrophic showed characteristics to promote plant growth.

**Keywords: bacterias, non simbyotic, growth promotion, diazotrophs**

## Lista de ilustrações

Figura 1 – Metodologia utilizada para observação da colonização radicular de plantas <i>in vitro</i> . . . . .	19
Figura 2 – Crescimento de isolados de bactérias diazotróficas em meios de cultivo NFB e JMV. . . . .	21
Figura 3 – Solubilização de fosfato pelos isolados bacterianos que cresceram em meio livre de nitrogênio . . . . .	22
Figura 4 – Frequência de isolados bacterianos quanto a solubilização de fosfato tricalcico em meio NBRIP, sob cultivo por quinze dias, de acordo com o índice: baixa solubilização ( $IS < 2$ ), média solubilização ( $2 < IS < 3$ ) e alta solubilização ( $IS > 3$ ). . . . .	23
Figura 5 – Colonização <i>in vitro</i> de plântulas de milho por bactérias diazotróficas não simbióticas solubilizadoras de fosfato . . . . .	25
Figura 6 – Legenda . . . . .	42

## Lista de tabelas

Tabela 1 – Eficiência da solubilização de fosfato em meio NBRIP sólido indicada pelo índice de solubilização (IS) calculado pela razão entre a média do diâmetro dos halos e a média dos diâmetros das colônias de cada isolado após 15 dias de incubação. Médias obtidas de quatro repetições. . . . .	24
Tabela 2 – Colonização do sistema radicular e na região do colo de plântulas de milho in vitro. . . . .	26
Tabela 3 – Médias de altura de planta (AP), comprimento de raiz (CR), diâmetro do coleto (DC), área foliar (AF), número de folhas (NF) e peso de matéria seca total (PMST) de plântulas de milho. . . . .	27

## Sumário

1	<b>INTRODUÇÃO</b> . . . . .	11
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> . . . . .	13
2.1	<b>Fixação Biológica de Nitrogênio</b> . . . . .	13
2.2	<b>Bactérias solubilizadoras de fosfato</b> . . . . .	15
2.3	<b>Bactérias Diazotróficas na Cultura do Milho</b> . . . . .	16
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> . . . . .	18
3.1	<b>Local de Investigação</b> . . . . .	18
3.2	<b>Isolamento e caracterização de bactérias diazotróficas não simbióticas</b>	18
3.3	<b>Avaliação qualitativa da solubilização de fosfatos inorgânicos</b> . . . .	18
3.4	<b>Colonização de raízes de milho <i>in vitro</i></b> . . . . .	19
3.5	<b>Colonização de radículas</b> . . . . .	19
3.5.1	Eficiência da interação, entre os isolados selecionados e o milho nos seus estádios iniciais de desenvolvimento. . . . .	20
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> . . . . .	21
4.1	<b>Isolamento Caracterização de Bactérias Diazotróficas não Simbióticas</b>	21
4.2	<b>Avaliação qualitativa da solubilização de fosfatos inorgânicos</b> . . . .	22
4.3	<b>Colonização <i>in vitro</i> de plântulas de milho</b> . . . . .	25
4.4	<b>Eficiência da interação, entre os isolados selecionados e o milho nos seus estádios iniciais de desenvolvimento</b> . . . . .	27
5	<b>CONCLUSÃO</b> . . . . .	29
	<b>Referências</b> . . . . .	30
	<b>APÊNDICES</b>	35
	<b>APÊNDICE A – Quadrados médios obtidos da análise de variância da eficiência da solubilização de fosfato em meio NBRIP sólido indicada pelo índice de solubilização (IS) calculado pela razão entre a média do diâmetro dos halos e a média dos diâmetros das colônias de cada isolado após 5 10 e 15 dias de incubação</b> . . . .	36

<b>APÊNDICE B – Quadrados médios obtidos das análises de variância de altura de planta (AP), do comprimento de raiz (CR) do diâmetro do coleto (DC) área foliar (AF) número de folhas (NF) e de peso de matéria seca total (PMST), peso de matéria seca total (PMST) de plântulas de milho. . . . .</b>	<b>37</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>38</b>
<b>ANEXO A – Meios de cultura semissólidos, livre de nitrogênio para isolamento de bactérias diazotróficas não simbióticas</b>	<b>39</b>
<b>ANEXO B – Meio de batata para conservação de bactérias diazotróficas não simbióticas . . . . .</b>	<b>40</b>
<b>ANEXO C – NBRIP sólido (NAUTIYAL, 1999) . . . . .</b>	<b>41</b>
<b>ANEXO D – Solução de Hoagland &amp; Arnon para crescimento de plantas . . . . .</b>	<b>42</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio é um elemento essencial presente em muitas biomoléculas necessárias para sustentar a vida. Esse elemento está presente na atmosfera na forma de dinitrogênio ( $N_2$ ), compondo cerca de 78% da atmosfera. Apesar desta abundância os organismos não são capazes de metabolizar  $N_2$  diretamente. Uma das principais fontes de nitrogênio no solo é o processo de fixação biológica de  $N_2$  atmosférico, assim com o nitrogênio.

O fósforo tem papel indispensável na biosfera, já que faz parte dos ácidos nucleicos, os quais armazenam o código genético. Muitas das substâncias intermediárias da fotossíntese e da respiração celular estão combinadas com fósforo, além disso, este faz parte da moeda energética da vida. O fósforo é um elemento essencial para o crescimento das plantas e aplicações contínuas são necessárias, já que uma pequena porcentagem do fósforo aplicado fica disponível às plantas. Porém, os fertilizantes fosfatados mais usados, como os superfosfatos ou fosfatos de amônio, são extraídos de rochas fosfáticas em minas, causando despesas consideráveis de energia advindas de fontes não renováveis para seu processamento, transporte e sua distribuição. Para prevenir a deficiência deste nutriente é necessária a aplicação de grande quantidade de fósforo devido à fixação deste elemento ao solo, tornando-o pouco solúvel e não prontamente disponível às plantas (AMARAL, 2014)

Um dos grandes desafios da agricultura moderna é desenvolver sistemas de produção que melhorem rendimentos de forma sustentável, buscando eficiência de insumos, controle de pragas e doenças por meio de ferramentas biológicas e resistência a estresses ambientais (ROSENBLUETH et al., 2018).

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) consistem em um amplo grupo de micro-organismos, habitando qualquer parte da planta (filosfera e tecidos internos) e rizosfera sem provocar prejuízos ao seu hospedeiro, desenvolvendo algum mecanismo direto e/ou indireto que promova melhorias no crescimento e desenvolvimento das plantas. Nos últimos anos, o aumento no interesse de uma agricultura sustentável e ecológica levou os produtores a reduzir o uso de fertilizantes químicos e ao aumento do uso de compostos naturais e práticas como a inoculação das culturas com BPCPs (GARCÍA et al., 2017), já que o uso indiscriminado de fertilizantes pode provocar problemas ambientais, como a eutrofização de águas superficiais e subterrâneas, poluição do solo e emissão de gases de efeito estufa (XIA et al., 2020)

Inoculação de culturas com cepas bacterianas capazes de aumentar o crescimento das plantas, promover a fixação biológica de N e solubilizar fosfato, surge como uma tecnologia promissora para a agricultura sustentável. A inoculação de sementes com cepas selecionadas de bactérias promotoras de crescimento de plantas é relatada ao aumento do crescimento das plantas e rendimento das culturas.

Deste modo, objetivou-se isolar e selecionar rizobactérias diazotróficas não simbióticas, capazes de solubilizar fosfatos e avaliar sua eficiência em estabelecer interação com

plântulas de milho (*Zea mays* L) *in vitro*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) constituem um grupo funcionalmente diverso de micro-organismos com grande potencial como bioestimulantes e biopesticidas. O microbioma associado a planta agora foi reconhecido como o fitomicrobioma, contendo uma diversidade de espécies que são essenciais para o bem-estar de suas plantas hospedeiras (SMITH; GRAVEL; YERGEAU, 2017; FAN; SMITH, 2021).

Plantas e micro-organismos rizosféricos (na rizosfera ou na superfície da raiz) e endofíticos (dentro dos tecidos vegetais) têm associações complexas uns com os outros, e estas são críticas para plantas e micro-organismos em termos de absorção de nutrientes, sobrevivência, desenvolvimento, crescimento e reprodução (FAN; SMITH, 2021). Bactérias benéficas colonizadoras de raízes, como RPCP, são conhecidas por incluir espécies de *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligen*, *Arthobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* e *Serratia*, que demonstraram auxiliar no crescimento das plantas: por controlar fitopatógenos (BAI; SOULEIMANOV; SMITH, 2002; ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006), fixação do nitrogênio (MOREIRA et al., 2010; REPKE et al., 2013), melhorando as respostas das plantas a estresses abióticos, (VURUKONDA et al., 2016; SILVA et al., 2019; MONTALDO et al., 2021) alteração/produção de fitohormônios e mobilização de nutrientes do solo (MELDAU; LONG; BALDWIN, 2012; RAMOS et al., 2022).

Recentemente, alguns mecanismos de promoção de crescimento adicionais foram descobertos, como produção de bacteriocina, produção de sinais do micro-organismos para planta e alívio da deficiência de enxofre (MELDAU; LONG; BALDWIN, 2012; SUBRAMANIAN; SMITH, 2015; FAN; SMITH, 2021)

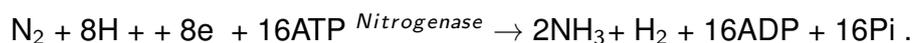
### 2.1 Fixação Biológica de Nitrogênio

Nitrogênio é um elemento essencial presente em muitas biomoléculas necessárias para sustentar a vida. Este elemento está presente na atmosfera na forma de dinitrogênio ( $N_2$ ), compondo cerca de 78% da atmosfera. Apesar desta abundância os organismos não são capazes de metabolizar  $N_2$  diretamente (SOUZA, 2017).

As formas fixadas, como amônia ( $NH_3$ ) e nitrato ( $NO_3^-$ ), são as mais utilizadas pelos seres vivos (HOFFMAN et al., 2014). Os mecanismos para reduzir  $N_2$  a  $NH_3$  são: descargas elétricas na atmosfera, através do processo industrial Haber–Bosch e pelo processo de redução enzimática, chamado de fixação biológica de  $N_2$  (FBN) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é um dos processos naturais mais importantes do planeta, assim como a fotossíntese. A maior parte do nitrogênio fixado no ambiente terrestre é originada da FBN. Esse processo é intermediado por micro-organismos que reduzem o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) a amônia ( $NH_3$ ), por meio do complexo enzimático

nitrogenase, segundo a reação:



As bactérias que realizam esse processo são chamadas de diazotróficas, e são as principais fontes naturais de N dos solos agrícolas. Os micro-organismos diazotróficos são capazes de crescer em ambientes isentos de nitrogênio combinado (DIXON; KAHN, 2004), utilizando como fonte de nitrogênio a forma gasosa ( $\text{N}_2$ ), a qual é reduzida a amônia e assimilada na forma de aminoácidos pelas plantas.

Bactérias fixadoras de nitrogênio são geralmente classificadas como simbióticas e não-simbióticas. O grupo das simbióticas inclui os actinomicetos que formam actinorrizas, as cianobactérias que formam simbioses com diatomáceas fungos e plantas, além de membros da família *Rhizobiaceae*, os quais podem formar simbioses com plantas leguminosas. O grupo das não-simbióticas é representado por bactérias de vida-livre ou associativas, as quais podem colonizar a rizosfera, filosfera ou ocorrer endofiticamente em diversas espécies vegetais (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Bactérias diazotróficas de vida livre ou associativas são um vasto grupo com a capacidade de colonizar um grande número de famílias de plantas, isolados de raízes e partes aéreas de planta de importância agrônômica ou de espécies arbóreas de diferentes biomas. Os primeiros diazotróficos de vida livre identificados, *Beijerinckia fluminensis* e *Beijerinckia indica*, foram isolados da superfície da cana-de-açúcar (DÖBEREINER; RUSCHEL, 1958). Vários gêneros foram identificados como diazotróficas não simbióticas (BDNS) (KENNEDY; CHOUDHURY; KECSKÉS, 2004) *Acetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Herbaspirillum*, *Glucenobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* (MOREIRA et al., 2010).

O efeito positivo de algumas espécies bacterianas diazotróficas na produção de plantas não leguminosas pode não ser apenas devido à fixação de nitrogênio, mas outros mecanismos também podem contribuir para as respostas de crescimento observadas em plantas não leguminosas (BERTHRONG et al., 2014; VESSEY, 2003).

Algumas bactérias diazotróficas, incluindo as dos gêneros: *Pantoea*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter*, *Brevundimonas* e *Burkholderia* foram encontradas associadas a plantas de milho (MONTAÑEZ et al., 2012). Uma cepa de *Bacillus* com múltiplas características promotoras de crescimento isolada da rizosfera de milho, foram inoculadas em sementes de plantas, e observou-se maior germinação de sementes, biomassa, aumento do teor de nitrogênio e clorofila nas plântulas (ABIALA et al., 2015).

As associações entre BDNS e plantas não leguminosas são denominadas comumente de simbiose associativa ou fixação de nitrogênio associativa (SILVA et al., 2017), apresentam a capacidade de colonizar as raízes e outros tecidos internos das plantas sem, causarem sintomas de doenças. A contribuição da FBN associativa à nutrição vegetal não é tão significativa como as simbioses, entretanto, se for considerada a grande extensão de terras recobertas por gramíneas e cereais, esta se torna importante, em termos globais

(MOREIRA et al., 2010). As bactérias diazotróficas associativas são encontradas em diferentes espécies vegetais, incluindo representantes da família Poaceae, tais como arroz, milho e cana-de-açúcar (MOREIRA et al., 2010)

As bactérias diazotróficas não simbióticas (BDNS) podem desempenhar importante papel no crescimento e desenvolvimento das plantas, pois além de incorporarem nitrogênio por meio da fixação biológica (KENNEDY; CHOUDHURY; KECSKÉS, 2004), produzem e liberam substâncias reguladoras do crescimento vegetal (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003), atuam na solubilização de fosfatos (SHUKLA et al., 2008), podem aumentar os teores de C orgânico e do N do solo, além de contribuírem com a retenção de nutrientes na rizosfera das plantas (YADAV et al., 2009). BDNS como *Herbaspirillum* e *Burkholderia* têm grande potencial de fixação biológica de nitrogênio em associação com plantas não leguminosas, como arroz, milho, cana-de-açúcar, entre outras (FERREIRA; GUIMARÃES; BALDANI, 2011).

## 2.2 Bactérias solubilizadoras de fosfato

O fósforo é um elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, sua disponibilidade nos solos geralmente é baixa devido aos diferentes processos de imobilização que ocorrem neste. Para suprir as necessidades das plantas é necessário colocar grandes quantidades de fósforo no solo (SILVA FILHO; VIDOR, 2000a).

Depois do nitrogênio, o fósforo é o segundo elemento mais requerido pelas plantas para seu crescimento e produção. O fósforo faz parte das moléculas essenciais para a vida das plantas e animais como adenosina trifosfato (ATP), ácido desoxirribonucleico (DNA) e fosfolipídeos (ANTOUN, 2012).

O fósforo (P) tem um ciclo complexo no ambiente terrestre, composto por alta diversidade de formas. O ciclo é compreendido pelas adições e perdas; as adições podem ocorrer de diferentes formas: 1) pela via do P que está presente nas plantas e animais liberado na matéria orgânica, 2) pela liberação das rochas ao solo e 3) pelas adições feitas com adubações (GONZÁLEZ et al., 2014)

Bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) com habilidade de solubilizar fosfatos e fixar nitrogênio atmosférico são de grande interesse agrícola, pois melhoram o fornecimento de dois nutrientes essenciais para o crescimento das plantas. Apesar de existir uma grande reserva de fósforo no solo, apenas uma pequena porção do total está disponível para as plantas. BPCPs podem intermediar a conversão de formas insolúveis de fósforo mineral para as solúveis através da liberação de ácidos orgânicos (cítrico e oxálico, por exemplo) ou inorgânicos ( $H_2SO_4$ , etc). Podem também desfosforilar formas orgânicas de fosfato através de fosfatases, aumentando a disponibilidade do nutriente na solução do solo (BASHAN; DE-BASHAN, 2010).

As bactérias transformam fosfatos insolúveis em formas solúveis pela ação de

diferentes mecanismos diretos ou indiretos. Dentre eles, destacam-se: i) ação de ácidos orgânicos produzidos por micro-organismos ii) quelação dos elementos responsáveis pela insolubilidade dos fosfatos presentes e iii) assimilação direta de fosfatos insolúveis por micro-organismos que os acumulam em suas células e os liberam posteriormente (RESTREPO-FRANCO et al., 2015)

Estudo realizado com bactérias solubilizadoras de fosfato (BSP) *Pseudomonas* sp. e *Klebsiella* sp, associadas com doses de superfosfato triplo (SPT), resultaram em percentuais de fósforo total na parte aérea do trigo maiores nos tratamentos com inoculante e 15 kg P ha<sup>-1</sup> do que nos tratamento com dose de 30 kg P ha<sup>-1</sup>, sem adição do inoculante (HOSSAIN; SATTAR, 2014) .

Avaliando-se a solubilização de P por *Burkholderia gladioli*, *Enterobacter aerogenes* e *Serratia marcescens*, na presença de rocha fosfática Mussoorie, verificou-se aumentos na disponibilidade de fósforo no solo entre 86 e 576%, comparando solos inoculados com não-inoculados (GUPTA et al., 2011). Já os aumentos de fósforo absorvido pelas plantas em solo inoculado com BSP, variaram de 64 a 273%. Resultados semelhantes foram observados utilizando-se rocha fosfática, e a bactéria solubilizadora de fosfato *Bacillus megaterium* na cultura do milho, onde foram obtidos aumentos na absorção de fósforo na ordem de 89%, em relação aos tratamentos usando apenas a rocha fosfática sem adição do inoculante, melhorando a disponibilidade e absorção de fósforo nas plantas (ABOU-EL-SEOUD; ABDEL-MEGEED, 2013).

### 2.3 Bactérias Diazotróficas na Cultura do Milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma espécie que pertence à família Gramineae/Poaceae, com origem no teosinto, *Zea mays*, subespécie mexicana (*Zea mays* ssp. mexicana (Schrad.) Iltis, há mais de 8000 anos e que é cultivada em muitas partes do Mundo (Estados Unidos da América, República Popular da China, Índia, Brasil, França, Indonésia, África do Sul, etc.)(GUIMARÃES et al., 2021a). A sua grande adaptabilidade, representada por variados genótipos, permite o seu cultivo desde o Equador até ao limite das terras temperadas e desde o nível do mar até altitudes superiores a 3600 metros, encontrando-se, assim, em climas tropicais, subtropicais e temperados (GUIMARÃES et al., 2021a).

O milho é o cereal mais cultivado no Brasil e no mundo. Apresenta grande relevância no contexto econômico e produtivo no Brasil. Com isso, para fortalecer ainda mais a cultura no país, novas técnicas surgem com a finalidade de contribuir com aumento de produtividade de forma sustentável (GUIMARÃES et al., 2021b) .

O cultivo de cereais demanda grandes quantidades de nutrientes para atingir altos rendimentos. A adição de fertilizantes sintéticos é a principal via utilizada pela agricultura convencional. Os nutrientes adicionados em cultivos de larga escala estão sujeitos a grandes perdas principalmente por lixiviação, volatilização e erosão do solo. Cerca de 50% do nitro-

gênio (N) adicionado como fertilizante é perdido pela lixiviação e volatilização (GUIMARÃES et al., 2021a).

Especialmente em solos intemperizados, como ocorrem em grande parte das áreas cultivadas no Brasil, o fósforo (P) possui forte grau de interação com o solo. Isto requer recomendação de altas doses deste nutriente em função de sua baixa eficiência de aproveitamento que está relacionada à elevada capacidade de adsorção pelo solo, notadamente sob culturas de ciclo curto, como o milho (GUIMARÃES et al., 2021a).

Na família Poaceae, a FBN é conhecida desde que a bactéria *Beijerinckia fluminensis* foi isolada da rizosfera de cana-de-açúcar. Contudo, foi somente após a redescoberta de bactérias do gênero *Azospirillum* que aumentou o interesse pelo estudo da FBN em gramíneas (BALDANI; BALDANI, 2005). Várias bactérias diazotróficas foram isoladas da cultura de milho, destacando-se as espécies *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* (REIS et al., 2004)

Tem sido relatado que a FBN pelas BPCP contribui de 12 a 70% da absorção total de N em cultivo no campo ou 26,7 kg N ha<sup>-1</sup> (70% da absorção total de N) em milho, bem como aumento na captação de fósforo como resultado da inoculação de *B. subtilis* e *Azospirillum brasilense*, com um aumento de 100% e 54,6% na eficiência do uso do fósforo, respectivamente (PEREIRA et al., 2020)

Em condições de casa de vegetação, a inoculação de *Bacillus pumilus* S1r1, *Klebsiella pneumoniae* Fr1, *Bacillus subtilis* UPMB10 e *Acinetobacter* sp. S3r2 aumentou significativamente a absorção de N pela planta, a biomassa seca e o rendimento de espigas de milho (KUAN et al., 2016). Estes incrementos foram atribuídos, principalmente, à habilidade dessas linhagens em fixar nitrogênio, onde *B. pumilus* S1r1 é capaz de fixar até 304 mg N<sub>2</sub> fixado planta<sup>-1</sup> na colheita da espiga e, possivelmente, outras habilidades, como produção de auxinas e solubilização de fosfato (MENDONÇA et al., 2020)

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local de Investigação**

O estudo foi realizado no laboratório de Microbiologia do Centro de Engenharias e Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas. Foram utilizados isolados de bactérias com capacidade de crescer em meio com reduzida atividade de água, previamente obtidos de amostras de solo da Caatinga do semiárido do estado de Alagoas.

#### **3.2 Isolamento e caracterização de bactérias diazotróficas não simbióticas**

Tubos de ensaio com 10 mL dos meios de cultura NFb e JMV (anexo A) foram inoculados em triplicata com 100  $\mu$ L de inóculo bacteriano ( $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> (DO550=0,1)) (espectrofotometro Biospectro modelo SP22) o resultado positivo foi caracterizado pela presença de um halo de crescimento no interior do meio de cultura, ou pela mudança de cor do meio para o azul, o que indica fixação do nitrogênio, após sete dias de incubação a 28 °C. Dez dias após a incubação, as películas foram retiradas com uma alça de platina, e transferidas para um novo meio semi-sólido até que uma nova película fosse formada. Após esse período, as películas foram transferidas para placas de Petri com meio sólido específico para cada diazotrófico, acrescido de 20 mg de extrato de levedura por litro. Para purificação final, as películas foram transferidas para placa de Petri contendo meios de batata (anexo B).

#### **3.3 Avaliação qualitativa da solubilização de fosfatos inorgânicos**

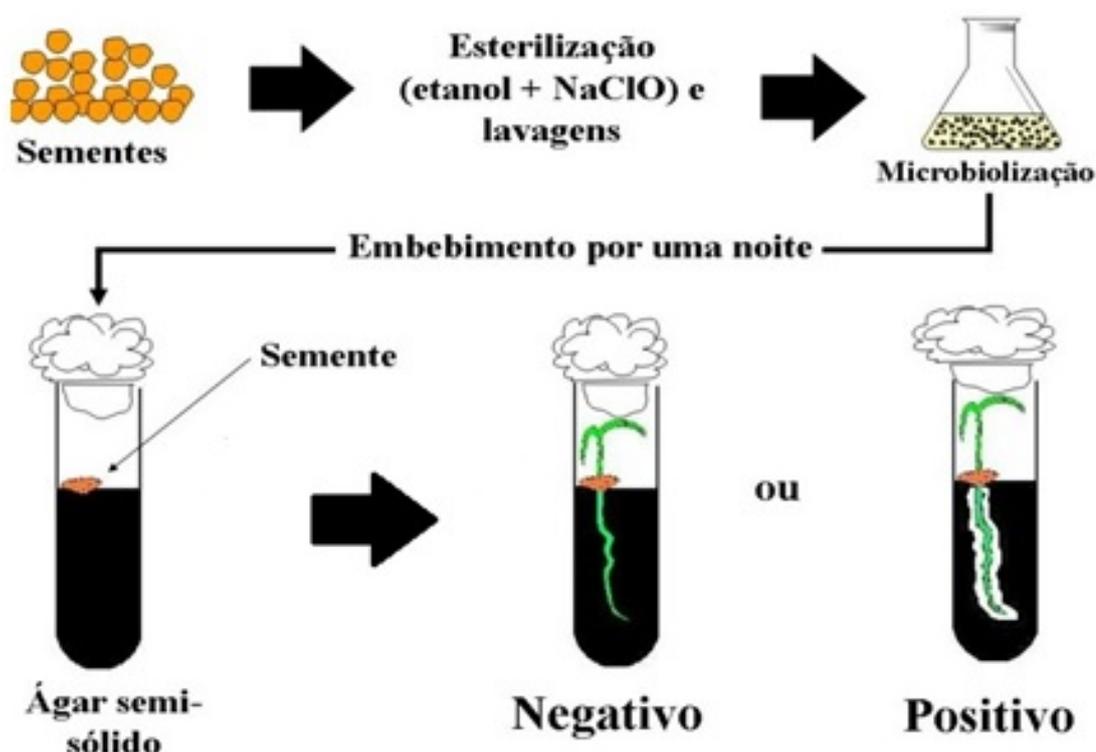
Os isolados foram submetidos a avaliação em meio NBRIP sólido (anexo C) antes da autoclavagem e pH ajustado para 7,0. A inoculação constou de um repique no centro da placa, foi mensurado o diâmetro do halo da colônia a cada cinco dias, durante 15 dias. Foi calculado o índice de solubilização (IS) por meio da razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia, a solubilização pode ser classificada em baixa solubilização ( $IS < 2$ ), média solubilização ( $2 < IS < 3$ ) e alta solubilização ( $IS > 3$ ) (SILVA FILHO; VIDOR, 2000b). Foram selecionados os isolados que obtiverem um índice maior ou igual a três, no 15º dia após a inoculação. De acordo com o início da solubilização, os isolados foram classificados ainda como “precoce”, cujo início da solubilização ocorreu a partir do terceiro dia, “tardio” com início da solubilização a partir do sexto dia, e “não solubilizador” aqueles que não apresentaram solubilização visível até o décimo quinto dia de avaliação. O ensaio foi realizado em delineamento experimental inteiramente casualizado em desenho fatorial com 4 repetições.

### 3.4 Colonização de raízes de milho *in vitro*

### 3.5 Colonização de radículas

Sementes de milho (variedade Crioula) foram desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio a 2,5 % por um minuto e depois, lavadas com água destilada e esterilizada. Em seguida, as sementes foram colocadas para germinar em germbox preto, sobre papel filtro umedecido e incubadas a temperatura entre 28-30 °C. Após sete dias foi feita a primeira contagem das sementes germinadas, e estas colocadas em suspensões bacterianas, correspondentes aos tratamentos de inoculação, por 10 minutos, e após colocadas em tubos de ensaio contendo Ágar água a 0,6 % (Figura 1).

Figura 1 – Metodologia utilizada para observação da colonização radicular de plantas *in vitro*.



Fonte: (SILVA; ROMEIRO; MOUNTEER, 2003)

A observação da colonização radicular foi feita visualmente 15 dias após a semeadura. Considerando-se que a presença de colônia turva de aspecto esbranquiçado ao longo e em volta da raiz, demonstra a formação de colônia das bactérias. Para o registro desses resultados, foi considerado como positivo, o crescimento em quatro ou cinco dos tubos de ensaio, e como negativo a ausência do crescimento em quatro ou cinco dos tubos.

O registro como colonização parcial foi feito quando houve crescimento em dois ou três tubos. As duas formas de presença da névoa – em todo o sistema radicular ou apenas na região do colo – foram registradas em separado. Para verificar se a colonização da região do colo já indicaria a possibilidade de interação da bactéria com a planta ou se, para ocorrer alguma interação, foi necessário a presença da bactéria em todo o sistema radicular da plântula. Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições.

### 3.5.1 Eficiência da interação, entre os isolados selecionados e o milho nos seus estádios iniciais de desenvolvimento.

As bactérias selecionadas foram inoculadas separadamente em Erlenmeyers com meio TSB (Trip-case Soy Broth)(anexo D) e submetidas à agitação a 28°C por 24 horas. Decorrido o tempo de incubação, as concentrações bacterianas foram ajustadas para  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> (DO550=0,1)(espectrofotometro Biospectro modelo SP22) com solução salina a 0,85% esterilizada. As sementes desinfestadas foram imersas por duas horas nas suspensões bacterianas. As sementes do tratamento controle, sem bactérias, foram imersas pelo mesmo período em solução salina (0,85%) esterilizada. Em seguida, as sementes foram colocadas para germinar no escuro, em placas de Petri com algodão e papel de filtro umedecido com água destilada esterilizada.

Após 24 horas, as sementes germinadas foram colocadas em tubos de ensaio (uma semente por tubo) contendo solução de Hoagland & Arnon (HOAGLAND; ARNON, 1950)() sem N e  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  como fonte inorgânica de fosfato e 0,6 % de ágar. O ensaio foi conduzido em condições artificiais de luminosidade por um período de 15 dias. A observação da colonização radicular foi feita visualmente, considerando-se que a presença de colônia turva de aspecto esbranquiçado ao longo e em volta da raiz demonstra a formação de colônia das bactérias. O ensaio foi disposto em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições.

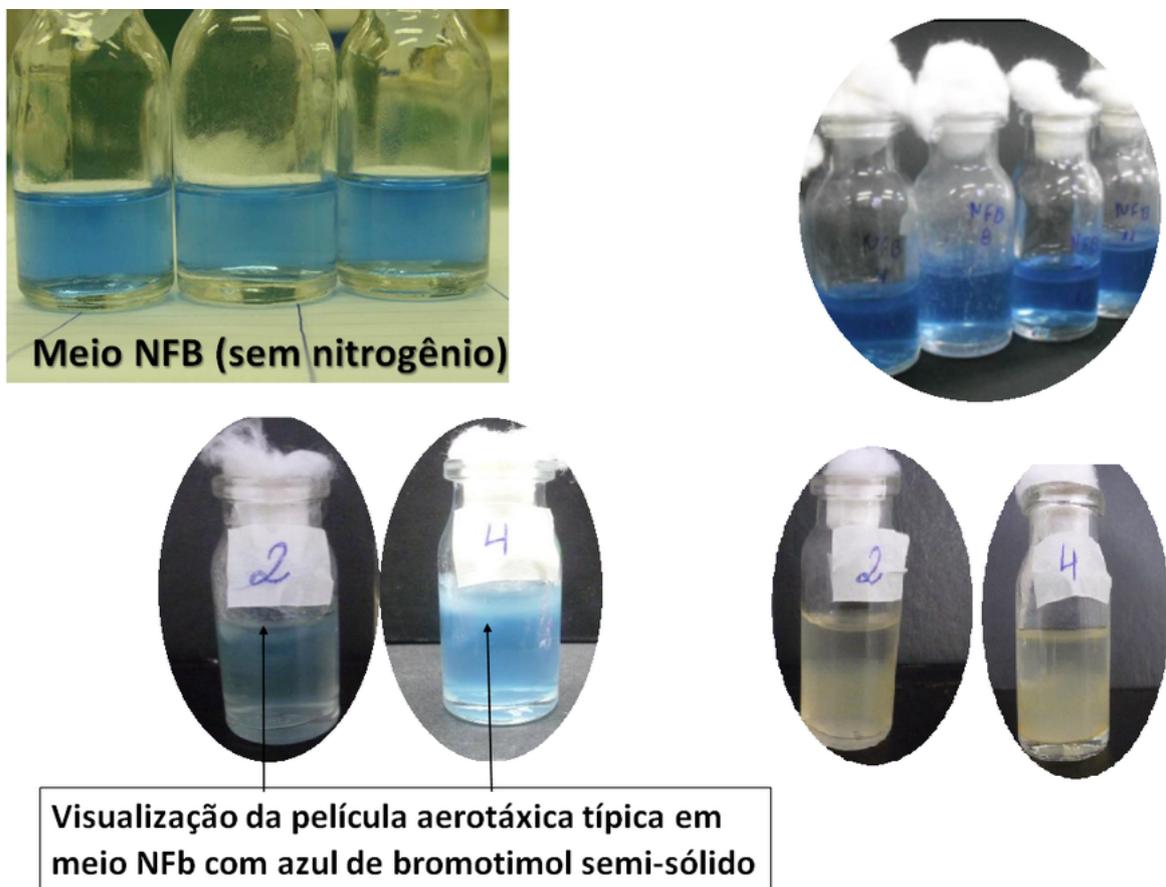
A avaliação morfométrica, foi realizada, decorrido 15 dias de cultivo. Foram avaliados: a) altura de planta (AP); b) área foliar, expressa em  $\text{cm}^2$ , estimada por meio da medição de largura (L) de cada folha e o comprimento (C) da nervura principal; c) número de folhas (NF); d) comprimento de raiz (CR); e) diâmetro do coleto, expresso em mm, utilizando-se um paquímetro com precisão de 0,01mm (DC); f) peso de matéria foi obtida seca total em estufa de circulação forçada a 60°C até peso constante e expressa em gramas.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Isolamento Caracterização de Bactérias Diazotróficas não Simbióticas

Foram obtidos 57 isolados, os quais foram mantidos na coleção do Laboratório de Microbiologia Agrícola do Centro de Ciências Agrárias/UFAL. A capacidade dos microorganismos em crescerem em meio livre de nitrogênio é um método fácil de comprovar sua capacidade de fixar nitrogênio (Figura 2).

Figura 2 – Crescimento de isolados de bactérias diazotróficas em meios de cultivo NFB e JMV.



Fonte: Autor, 2022

O nitrogênio é necessário para a síntese de clorofila, aminoácidos, ácidos nucleicos e ATP que são necessários para o crescimento e sobrevivência das plantas. Embora seja o elemento mais abundante no planeta, as plantas não podem utilizar o  $N_2$  diretamente, que precisa ser reduzido a forma de  $NH_3$ .

Um grupo especializado de bactérias chamado “diazotróficos” pode converter  $N_2$  em  $NH_3$ , usando o complexo enzimático “nitrogenase” (HOFFMAN; DEAN; SEEFELDT, 2009). Esta amônia pode ser ainda oxidada a nitrato pela ação de bactérias nitrificantes. Como

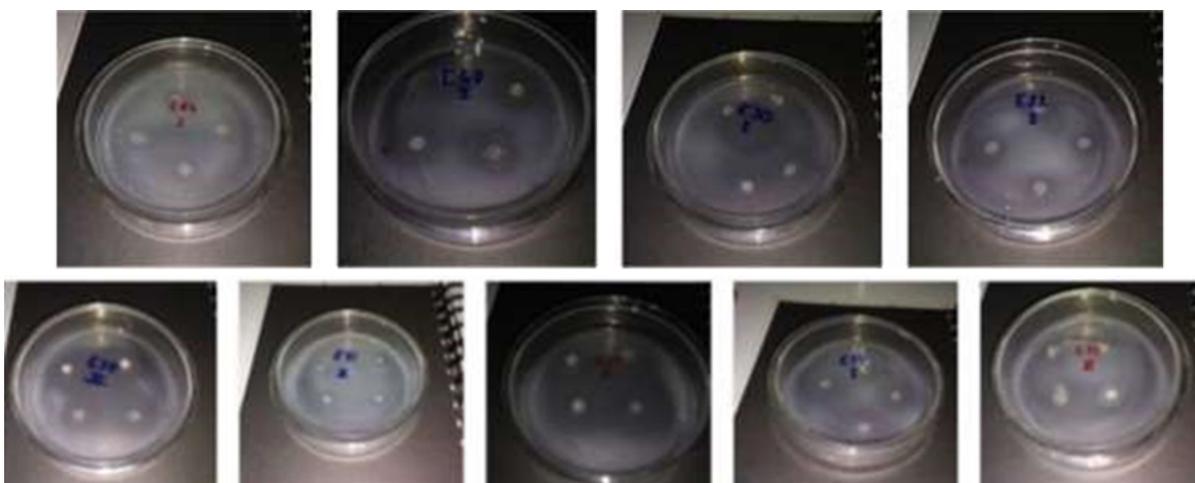
as plantas não possuem a enzima nitrogenase, elas são incapazes de sintetizar amônia a partir do nitrogênio aéreo, assim, usam amônia fixada microbianamente para produzir as biomoléculas nitrogenadas acima mencionadas para seu crescimento e sobrevivência. O isolamento e a triagem de possíveis bactérias diazotróficas são passos importantes para a descoberta de isolados eficientes na fixação de nitrogênio.

Nas gramíneas a FBN é realizada pelas BDNS, avanços significativos ocorreram nas pesquisas sobre o processo, com a elaboração do meio semi-sólido NFb. Sem fonte nitrogenada, a condição de semi-sólido cria um ambiente com baixo nível de oxigênio, semelhantemente ao que ocorre no solo ou na planta, onde estão localizadas bactérias diazotróficas microaerófilas associadas a raízes de plantas (KUSS et al., 2007). A formulação desse meio facilitou o isolamento de bactérias do gênero *Azospirillum* e, após essa descoberta, muitas outras espécies de bactérias diazotróficas foram isoladas no Brasil, pertencentes aos gêneros *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*. Essas bactérias têm sido detectadas em altos números entre  $10^4$  e  $10^7$  células  $g^{-1}$  de peso fresco, e muitos estudos têm sido conduzidos para avaliar o suprimento de N fornecido às plantas hospedeiras.

#### 4.2 Avaliação qualitativa da solubilização de fosfatos inorgânicos

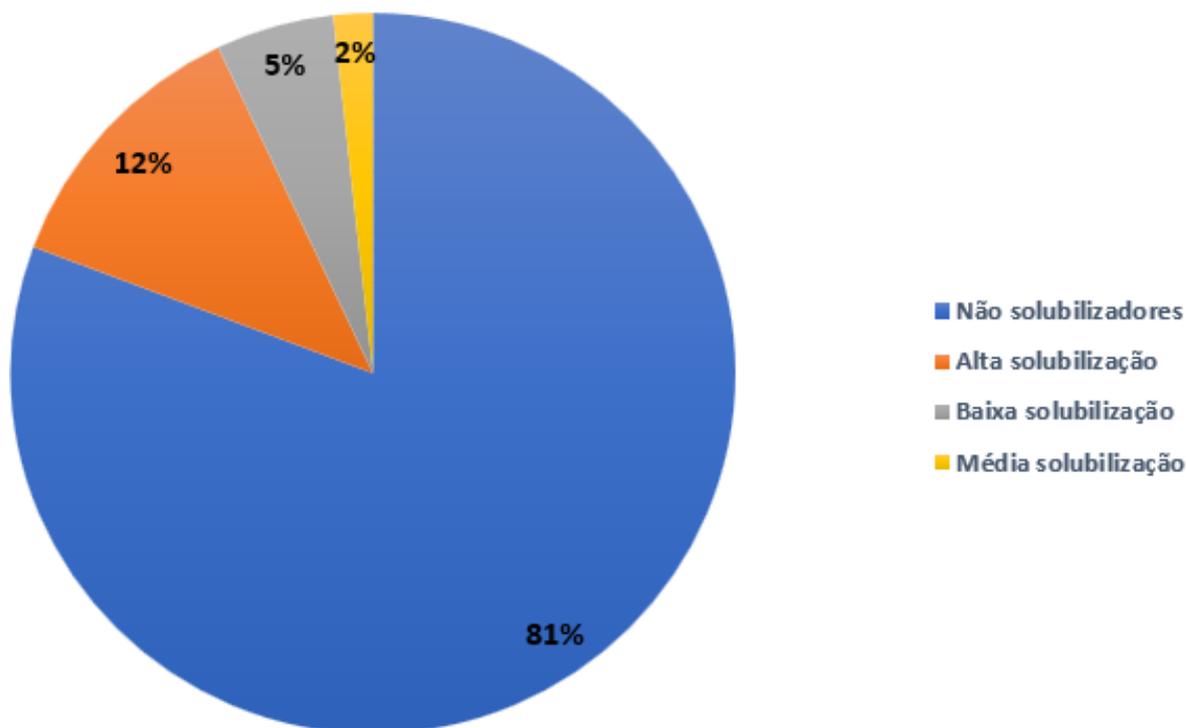
Dos 57 isolados de BNDS, 11 (19%) apresentaram formação de um halo transparente ao redor da colônia cultivada em meio sólido, indicando a capacidade de solubilizar fosfato de cálcio ( $Ca_5(PO_4)_3OH$ ) adicionado ao NBRIP. A maioria dos isolados (46) não apresentou solubilização com diâmetro suficiente para ultrapassar o limite de crescimento da colônia, esses receberam valor zero para o IS.

Figura 3 – Solubilização de fosfato pelos isolados bacterianos que cresceram em meio livre de nitrogênio



Dos onze isolados selecionados na triagem em meio sólido, três apresentaram baixa solubilização com IS variando de 1,140 a 1,417; um obteve índice médio (IS 2,735), e 7 obtiveram um alto índice de solubilização (IS variando de 3,102 a 12,750) (Figura 4).

Figura 4 – Frequência de isolados bacterianos quanto a solubilização de fosfato tricalcico em meio NBRIP, sob cultivo por quinze dias, de acordo com o índice: baixa solubilização (IS < 2), média solubilização (2 < IS < 3) e alta solubilização (IS > 3).



Dados da pesquisa, 2022

O teste F detectou diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre isolados bacterianos, tempo de incubação e para interação, indicando dependência entre os entre dois fatores (Apêndice A). As médias obtidas estão apresentadas na Tabela 1.

O maior índice de solubilização foi encontrado para o isolado DBSF30 (IS 12,750) seguido por isolado DBSF20 (IS 11,450) aos 15 dias. DBSF30, DBSF20, DBSF40, DBSF37 e DBSF,58 aos quinze dias apresentaram índices que diferiram significativamente dos demais tempos de incubação. Para DBSF21, DBSF33, DBSF41, DBSF42, DBSF47 e DBSF64 não foram detectados aumentos significativos aos 5, 10 e 15 dias.

Os isolados DBSF41, DBSF47 e DBSF42, solubilizaram fosfato, porém, não com capacidade de produzir um halo maior que o crescimento da colônia, indicando baixa capacidade de solubilização com IS inferior a 2. Também observou-se que a todos os isolados apresentaram o halo de solubilização aos cinco dias, sendo, portanto, classificados como precoces.

Tabela 1 – Eficiência da solubilização de fosfato em meio NBRIP sólido indicada pelo índice de solubilização (IS) calculado pela razão entre a média do diâmetro dos halos e a média dos diâmetros das colônias de cada isolado após 15 dias de incubação.

Isolados	Índice de Solubilização*		
	Tempo de incubação (dias)		
	5	10	15
DBSF30	4,105aC	11,620aB	12,750aA
DBSF20	3,007bB	3,204cB	11,450bA
DBSF40	2,140cB	3,107cB	8,388cA
DBSF37	2,834bB	7,600bA	8,090cA
DBSF33	3,592aA	3,592aA	3,592dA
DBSF58	1,383cB	2,003dB	3,109dA
DBSF47	2,852bA	2,852cA	3,102dA
DBSF21	1,828cA	2,000dA	2,733dA
DBSF41	1,100dA	1,287eA	1,417eA
DBSF64	1,008dA	1,080eA	1,177eA
DBSF42	0,300dA	0,300eA	1,140eA

\*IS <2 baixa solubilização; IS entre 2 e 3 média solubilização; IS >3 alta solubilização)

\*\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, Teste de Scott-Knott (p < 0,05). Colunas - letras minúsculas; linhas - letras maiúsculas

Dados da pesquisa, 2022

Os micro-organismos afetam diretamente a habilidade das plantas em adquirir P do solo por meio de vários mecanismos. Esses mecanismos incluem: aumento da área superficial das raízes pela extensão do sistema radicular ou pela promoção do crescimento de raízes laterais e pelos radiculares (promoção de crescimento por meio de fitormônios); deslocamento do equilíbrio de adsorção, o que resulta numa transferência de íons fosfato para a solução do solo ou incrementa a mobilidade de formas orgânicas de P e estímulos de processos metabólicos que são efetivos na solubilização e mineralização do P a partir de formas pouco disponíveis de fósforo inorgânico e orgânico (RAMPIM et al., 2020).

Solubilizar grandes quantidades em pouco tempo no meio NBRIP, além de manter a capacidade de solubilização constante no período avaliado, é uma característica importante

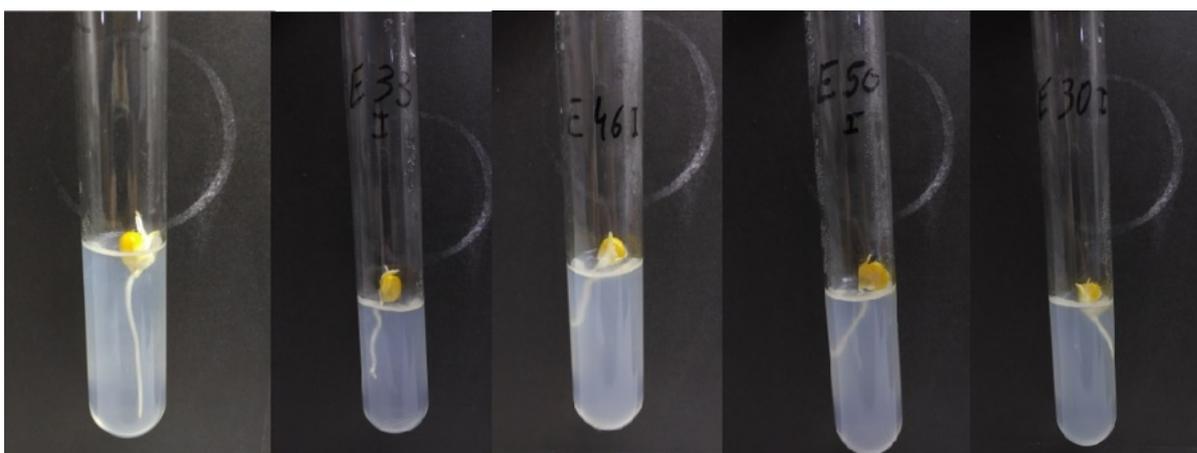
para seleção de isolados. Alguns isolados podem ser capazes de solubilizar fosfato, porém, muitas vezes não o fazem em meio sólido (NAUTIYAL, 1999). O estado físico do meio de cultura e a agitação podem ser fatores que influenciam esses resultados.

Isolados com pouca capacidade de solubilização em meio sólido, podem apresentar uma maior melhor capacidade de solubilizar fósforo quando inoculados em meio líquido. O coeficiente de difusão em meio sólido dos ácidos produzidos pelas bactérias é diferente de acordo com o ácido produzido e com meio de cultura (DELVASTO et al., 2006)

### 4.3 Colonização *in vitro* de plântulas de milho

Oito isolados colonizaram totalmente o sistema radicular e a região do colo (Figura 5), um colonizou parcialmente (DBSF47) e dois colonizaram apenas a região do colo (DBSF40 e DBSF58) (Tabela 2).

Figura 5 – Colonização *in vitro* de plântulas de milho por bactérias diazotróficas não simbióticas solubilizadoras de fosfato



Fonte: Autor, 2022

A avaliação da colonização *in vitro* permite a avaliação rápida de um grande número de isolados. A colonização, pode ocorrer tanto nas raízes com na região do colo, dependendo dos isolados bacterianos. A colonização competitiva da rizosfera é crucial para que, as bactérias benéficas possam exercer seus muitos mecanismos de ação. O processo compreende uma série de passos: migração em direção as raízes, ataque, distribuição ao longo das raízes, crescimento e estabelecimento da população. A colonização é a etapa inicial e fundamental na interação benéfica. Após o contato inicial, vem a fase crucial que é a manutenção ou persistência, onde a bactéria utiliza os exsudatos liberados pela planta (MELO, 1998) e, em troca, produz e fornece uma série de substâncias bioativas para beneficiar o crescimento vegetal direta ou indiretamente.

Tabela 2 – Colonização in vitro de plântulas de milho por bactérias diazotróficas não simbióticas solubilizadoras de fosfato

Isolados	Colonização	
	Sistema radicular	Região do colo
DBSF30	++	-
DBSF20	++	-
DBSF40	-	+
DBSF37	++	-
DBSF33	++	-
DBSF58	-	+
DBSF47	+	-
DBSF21	++	-
DBSF41	++	-
DBSF64	++	-
DBSF42	++	-

(1) ++ = colonização total; += colonização parcial; - ausência de colonização

Dados da pesquisa, 2022

Os mecanismos de reconhecimento são mediados por exsudatos vegetais específicos que atraem as bactérias para a rizosfera do hospedeiro sendo que, esses exsudatos podem servir como fonte de carbono e atuar como moléculas sinalizadoras (ALBAREDA et al., 2006)). Assim, as bactérias promotoras de crescimento devem ter a capacidade de adesão às sementes ou raízes das plantas para posterior colonização e um processo competitivo que é afetado pelas características genótípicas das RPCP e da variedade da planta hospedeira ((MUÑOZ-ROJAS; CABALLERO-MELLADO, 2004)

A colonização do colo em meio de cultura pode ser suficiente para considerar a bactéria capaz de se associar à planta. A colonização parcial do sistema radicular pode ser indicadora da capacidade das bactérias em colonizarem o colo, o estabelecimento bacteriano na rizosfera é fundamental para que o micro-organismo possa interagir com a planta. A concentração de bactérias na região próxima ao colo da planta, mas sem nenhuma colonização ao longo das raízes, pode indicar um isolado bacteriano que, por ter maiores necessidades de O<sub>2</sub>, desloca-se para a superfície em busca de O<sub>2</sub>, resultando em falha na colonização geral das raízes (SOTTERO et al., 2006).

#### 4.4 Eficiência da interação, entre os isolados selecionados e o milho nos seus estádios iniciais de desenvolvimento

As análises de variância detectaram significância (Teste F  $p \leq 0,05$ ) para os parâmetros: altura de planta (AP), do comprimento de raiz (CR) do diâmetro do coleto (DC) área foliar (AF) número de folhas (NF) e de peso de matéria seca total (PMST), peso de matéria seca total (Apêndice B). A comparação de médias está apresentada na Tabela 3

Tabela 3 – Médias de altura de planta (AP), comprimento de raiz (CR), diâmetro do coleto (DC), área foliar (AF), número de folhas (NF) e peso de matéria seca total (PMST) de plântulas de milho.

Isolados*	AP(cm)	CR(cm)	DC(cm)	AF(cm <sup>2</sup> )*	NF	PMS (g)
Controle	8,157f	9,670c	0,317 b	5,110f	2,000b	0,039f
DBSF20	14,700b	16,500b	0,750a	15,910a	2,000b	0,087b
DBSF21	16,970a	15,867b	0,523b	14,081b	2,000b	0,076d
DBSF30	13,733c	22,367a	0,280c	13,220b	2,000b	0,099a
DBSF33	16,767a	16,733b	0,727a	11,997c	2,000b	0,063e
DBSF37	15,410b	21,500a	0,230c	10,987c	2,000b	0,099a
DBSF40	7,670f	22,500a	0,730a	15,950a	2,000b	0,100a
DBSF41	9,580e	15,430b	0,680a	8,280e	2,000b	0,059e
DBSF42	15,600b	16,610b	0,260c	11,974c	2,333b	0,082c
DBSF47	15,160b	19,767a	0,263c	11,137c	2,000b	0,056e
DBSF58	13,953b	20,067a	0,730a	16,763a	3,000a	0,099a
DBSF64	11,890d	15,143b	0,197c	9,430d	2,000b	0,072d

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ )

Dados da pesquisa, 2022

Para AP, apenas o isolado DBSF40 não diferiu significativamente do controle, enquanto os demais promoveram aumento significativo com destaque para DBSF21 (16,970cm) e DBSF33 (16,767cm). Com relação a CR também se verificou diferenças significativas entre o controle e os isolados, os maiores comprimentos foram com os isolados DBSF30, DBSF37, DBSF40, DBSF47 e DBSF58.

O comprimento de raízes primárias é um dos parâmetros importantes para avaliar o desenvolvimento de plantas (VEJAN et al., 2016). Raízes com maior área de superfície absorvem mais água e nutrientes dos solos e os translocam para a parte aérea das plantas, resultando em um maior crescimento e aumento de produção de biomassa e produção de grãos. A produção de hormônios como citocinina por bactérias diazotróficas, possibilita maior desenvolvimento do sistema radicular, inicialmente detectado pelo incremento da densidade e comprimento dos pêlos radiculares, que resulta em aparecimento de raízes laterais e aumento do volume da superfície radicular; mais especificamente devido ao aumento da diferenciação das células epidérmicas (MOREIRA et al., 2010)

Para DC, as médias observadas para os isolados DBSF30, DBSF37, DBSF42, DBSF47 e DBSF64 não apresentaram diferença significativa em relação ao controle. O maior valor foi verificado para DBSF20 que não apresentou diferenças significativas em relação aos isolados DBSF33, DBSF40, DBSF41 e DBSF58. Maiores diâmetros de colmo são importantes por apresentarem maior resistência ao acamamento, o aumento no diâmetro do colmo favorece o transporte de água, nutrientes e seiva elaborada entre raiz e folhas, portanto, uma planta com maiores diâmetros de colmo em ambientes adequados será favorecida ao expressar seu potencial produtivo (KAPPES et al., 2011).

Quanto ao número de folhas apenas o isolado DBSF58 diferiu do controle apresentando 3 folhas. Com relação a AF todos os isolados promoveram incremento significativo comparando-se ao controle sendo os melhores resultados verificados para DBSF58, DBSF40 e DBSF20 (16,763, 15,950 e 15,950 cm<sup>2</sup> respectivamente). Na produção de PMS pelas plântulas, todos os isolados diferiram estatisticamente ( $p < 0,5$ ) do controle, a maior média foi verificada para DBSF40 (1,00g).

A área foliar é um parâmetro que reflete o crescimento significativo da planta, pois, as folhas são órgãos que captam a energia luminosa do sol e a produção de matéria orgânica por meio do processo fotossintético da absorção de minerais do solo. Também, está diretamente relacionada à produção final de massa seca, pois durante o ciclo de desenvolvimento, a planta depende das folhas, e a taxa de crescimento da planta depende tanto da taxa de expansão da área foliar, como da taxa de fotossíntese por unidade de área foliar (TERRA et al., 2011).

Os resultados observados para todos os caracteres, mostram o potencial positivo da inoculação dos isolados em plantas de milho. Essas respostas observadas nas plântulas, ocorrem pela produção de hormônios, maior absorção de água e nutrientes que resultaram em vigoroso crescimento inicial. Considerando, que não foi fornecido nitrogênio, elemento necessário para a composição de ATP, NADH, NADPH, clorofila, proteínas e inúmeras enzimas, os resultados evidenciam que o mesmo foi fornecido pela associação com as bactérias.

## **5 CONCLUSÃO**

Foi possível selecionar isolados bacterianos, diazotróficos solubilizadores de fosfato com potencial para promoção de crescimento de plantas.

## Referências

- ABIALLA, M. et al. Phytobeneficial properties of bacteria isolated from the rhizosphere of maize in southwestern Nigerian soils. **Applied and environmental microbiology**, Am Soc Microbiol, v. 81, n. 14, p. 4736 – 4743, 2015.
- ABOU-EL-SEOUD, I. I.; ABDEL-MEGEED, A. Impact of rock materials and biofertilizations on P and K availability for maize (*Zea Maize*) under calcareous soil conditions. **Saudi journal of biological sciences**, v. 19, p. 55 – 63, 8 2013.
- ALBAREDA, M. et al. Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to bean and soybean roots. **FEMS microbiology letters**, v. 259, p. 67 – 73, 5 2006.
- AMARAL, M. B. **Inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfatos e fixadoras de nitrogênio dos gêneros *Herbaspirillum* e *Azospirillum* em plantas de arroz**. 2014. 28 p. Monografia (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro).
- ANTOUN, H. Beneficial microorganisms for the sustainable use of phosphates in agriculture. **Procedia Engineering**, Elsevier, v. 46, p. 62 – 67, 2012.
- BAI, Y.; SOULEIMANOV, A.; SMITH, D. L. An inducible activator produced by a *Serratia proteamaculans* strain and its soybean growth-promoting activity under greenhouse conditions. **Journal of experimental botany**, v. 53, p. 1495 – 502, 5 2002.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, SciELO Brasil, v. 77, n. 3, p. 549 – 579, 2005.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. In: **Advances in agronomy**. [S.l.]: Elsevier, 2010. p. 77 – 136.
- BERTHRONG, S. T. et al. Nitrogen fertilization has a stronger effect on soil nitrogen-fixing bacterial communities than elevated atmospheric CO<sub>2</sub>. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, p. 3103 – 12, 3 2014.
- DELVASTO, P. et al. Characterization of brushite as a re-crystallization product formed during bacterial solubilization of hydroxyapatite in batch cultures. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 9, p. 2645 – 2654, 2006.
- DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, p. 621 – 31, 7 2004.
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, CRC Press, v. 22, n. 2, p. 107 – 149, 2003.
- DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A. P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**, Lisboa, v. 1, p. 261 – 272, 1958.
- FAN, D.; SMITH, D. L. Characterization of Selected Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Their Non-Host Growth Promotion Effects. **Microbiology spectrum**, v. 9, p. e0027921 –, 6 2021.

FERREIRA, J.; GUIMARÃES, S.; BALDANI, V. L. Produção de grãos de arroz em função da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 13, 2011.

GARCÍA, J. E. et al. In vitro PGPR properties and osmotic tolerance of different *Azospirillum* native strains and their effects on growth of maize under drought stress. **Microbiological research**, v. 202, p. 21 – 29, 6 2017.

GONZÁLEZ, L. C. et al. Use of filter cake enriched with rock phosphate and biofertilizers in a Haplustox soil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Universidade Federal de Goiás-Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, v. 44, n. 2, 2014.

GUIMARÃES, V. F. et al. Eficiência de inoculante contendo *Bacillus megaterium* (B119) e *Bacillus subtilis* (B2084) para a cultura do milho, associado à fertilização fosfatada. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p. e431101220920 – e431101220920, 2021a.

GUIMARÃES, V. F. et al. Eficiência de inoculante contendo *Bacillus megaterium*(B119) e *Bacillus subtilis*(B2084) para a cultura do milho, associado à fertilizaçãofosfatada. **Research, Society and Development**,, v. 10, n. 12, p. 1 – 28, 2021b.

GUPTA, M. et al. Enhanced biomass and steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* treated with phosphate-solubilizing bacteria and rock phosphate. **Plant Growth Regulation**, Springer, v. 65, n. 3, p. 449 – 457, 2011.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **Circular. California agricultural experiment station**, v. 347, n. 2nd edit, 1950.

HOFFMAN, B. M.; DEAN, D. R.; SEEFELDT, L. C. Climbing nitrogenase: toward a mechanism of enzymatic nitrogen fixation. **Accounts of chemical research**, v. 42, p. 609 – 19, 3 2009.

HOFFMAN, B. M. et al. Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage. **Chemical reviews**, v. 114, p. 4041 – 62, 1 2014.

HOSSAIN, M.; SATTAR, M. Effect of inorganic phosphorus fertilizer and inoculants on yield and phosphorus use efficiency of wheat. **Journal of Environmental Science and Natural Resources**, v. 7, n. 1, p. 75 – 79, 2014.

KAPPES, C. et al. Desempenho de híbridos de milho em diferentes arranjos espaciais de plantas. **Bragantia**, v. 70, n. 2, p. 334 – 343, 2011.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A.; KECSKÉS, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry**, Elsevier, v. 36, n. 8, p. 1229 – 1244, 2004.

KUAN, K. B. et al. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Inoculation to Enhance Vegetative Growth, Nitrogen Fixation and Nitrogen Remobilisation of Maize under Greenhouse Conditions. **PLoS one**, v. 11, p. e0152478 –, 3 2016.

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

MELDAU, D. G.; LONG, H. H.; BALDWIN, I. T. A native plant growth promoting bacterium, *Bacillus* sp. B55, rescues growth performance of an ethylene-insensitive plant genotype in nature. **Frontiers in plant science**, v. 3, p. 112 –, 6 2012.

MELO, I. S. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (ed.). **Ecologia Microbiana**. 1. ed. Jaguariúna: [s.n.], 1998. v. 1, p. 87 – 116.

MENDONÇA, J. J. et al. Diversidade, mecanismos de atuação e potencial agrícola de bactérias promotoras de crescimento de plantas, usando milho como cultura exemplo. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 25, n. 2, 2020.

MONTALDO, Y. et al. Bacterial biofilm production and water stress resistance by rhizobacteria associated to sugarcane (*Saccharum officinarum*) Linnaeus (POACEAE). **Diversitas Journal**, v. 6, n. 2, p. 1899 – 1909, 2021.

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

MOREIRA, F. M. de S. et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74 – 74, 2010.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MUÑOZ-ROJAS, J.; CABALLERO-MELLADO, J. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. **Microbial ecology**, v. 46, p. 454 – 64, 1 2004.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS microbiology letters**, v. 170, p. 265 – 70, 1 1999.

PEREIRA, N. C. M. et al. Corn yield and phosphorus use efficiency response to phosphorus rates associated with plant growth promoting bacteria. **Frontiers in Environmental Science**, Frontiers Media SA, v. 8, 2020.

RAMOS, P. de P. et al. Isolamento, caracterização de rizobactérias e análise da produção de ácido indolacético visando ao enraizamento de estacas de oliveira (*Olea europaea* L.). **Ciência Florestal**, v. 31, p. 1612 – 1630, 2022.

RAMPIM, L. et al. Desenvolvimento inicial de plântulas de milho reinoculadas com bactérias diazotróficas Initial development of reinoculated maize seedlings with diazotrophic bacteria Desarrollo inicial de plântulas de maíz reinoculadas con bacterias diazotróficas. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 5, 2020.

REIS, V. et al. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Microbiology Society, v. 54, n. 6, p. 2155 – 2162, 2004.

REPKE, R. A. et al. Eficiência da *Azospirillum brasilense* combinada com doses de nitrogênio no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, p. 214 – 226, 2013.

- RESTREPO-FRANCO, G. M. et al. Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, v. 46, n. 1, p. 63 – 76, 2015.
- ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 19, p. 827 – 37, 8 2006.
- ROSENBLUETH, M. et al. Nitrogen Fixation in Cereals. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1794 –, 8 2018.
- SHUKLA, S. et al. Improving rhizospheric environment and sugarcane ratoon yield through bioagents amended farm yard manure in udic ustochrept soil. **Soil & Tillage Research**, v. 99, p. 158 – 168, 2008.
- SILVA, C. dos S. et al. Bioprospecting of endophytic bacteria ('Bacillus' spp.) from passionfruit ('Passiflora edulis' Sims f.'flavicarpa') for plant growth promotion. **Australian Journal of Crop Science**, v. 13, n. 8, p. 1369 – 1374, 2019.
- SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fostatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, SciELO Brasil, v. 24, n. 2, p. 311 – 319, 2000a.
- SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fostatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, n. 2, p. 311 – 319, 2000b.
- SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. da S.; MOUNTEER, A. Development of a root colonization bioassay for rapid screening of rhizobacteria for potential biocontrol agents. **Journal of Phytopathology**, v. 151, n. 1, p. 42 – 46, 2003.
- SILVA, T. F. et al. BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NÃO SIMBIÓTICAS E ENRAIZAMENTO DE ESTACAS SEMILENHOSAS DE OLIVEIRA (*Olea europaea* L.). **Ciência Florestal**, SciELO Brasil, v. 27, p. 61 – 71, 2017.
- SMITH, D. L.; GRAVEL, V.; YERGEAU, E. Editorial: Signaling in the Phytomicrobiome. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 611 –, 5 2017.
- SOTTERO, A. N. et al. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, p. 225 – 234, 04 2006.
- SOUZA, A. A. D. **Resposta do milho e do tomateiro à inoculação com bactérias diazotróficas isoladas da superfície de folhas**. 2017. 79 p. Dissertação (Solos e Nutrição de Plantas) — Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
- SUBRAMANIAN, S.; SMITH, D. L. Bacteriocins from the rhizosphere microbiome - from an agriculture perspective. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 909 –, 11 2015.
- TERRA, T. G. R. et al. Análise de crescimento em sorgo sob diferentes stands. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 3, p. 45 – 57, 2011.
- VEJAN, P. et al. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability-A Review. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 21, 5 2016.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and soil**, Springer, v. 255, n. 2, p. 571 – 586, 2003.

VURUKONDA, S. S. K. P. et al. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological research**, v. 184, p. 13 – 24, 2 2016.

XIA, Y. et al. Recent advances in control technologies for non-point source pollution with nitrogen and phosphorous from agricultural runoff: current practices and future prospects. **Applied Biological Chemistry**, SpringerOpen, v. 63, n. 1, p. 1 – 13, 01 2020.

YADAV, R. et al. Effect of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Trichoderma viride* on soil health, yield and N-economy of sugarcane cultivation under subtropical climatic conditions of India. **European journal of Agronomy**, Elsevier, v. 30, n. 4, p. 296 – 303, 2009.

## **Apêndices**

**APÊNDICE A – Quadrados médios obtidos da análise de variância da eficiência da solubilização de fosfato em meio NBRIP sólido indicada pelo índice de solubilização (IS) calculado pela razão entre a média do diâmetro dos halos e a média dos diâmetros das colônias de cada isolado após 5 10 e 15 dias de incubação**

Fontes de Variação	GL	QM
Isolados (I)	10	86,921**
Tempo de Incubação (T)	2	98,056**
Interação (IxT)	20	16,710**
Resíduo	99	
CV%	18,94	

\*\* significativo  $p < 0,01$  pelo Teste F

**APÊNDICE B – Quadrados médios obtidos das análises de variância de altura de planta (AP), do comprimento de raiz (CR) do diâmetro do coleto (DC) área foliar (AF) número de folhas (NF) e de peso de matéria seca total (PMST), peso de matéria seca total (PMST) de plântulas de milho.**

Fontes de variação	GL	Quadrados médios					
		CPA	CR	DC	AF	NF	PMST
Isolados	11	31,429**	44,394**	0,165**	35,190**	0,414**	0,00075**
Resíduo	24	0,347	3,435	0,006	0,659	0,056	0,00002
CV %		4,43	10,44	16,40	6,72	11,47	5,58

\*\* significativo  $p < 0,01$  pelo Teste F

## **Anexos**

**ANEXO A – Meios de cultura semissólidos, livre de nitrogênio para isolamento de bactérias diazotróficas não simbióticas**

Constituintes	Meios			
	NFb	JMV	JNFb	LG-P
			gL <sup>-1</sup>	
Ácido málico	5,00	---	5,00	---
Manitol	---	5,00	---	---
Sacarose ou Açúcar Cristal	---	---	---	100
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,50	0,60	0,60	0,20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	---	1,80	1,80	0,60
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,20	0,20	0,20	0,20
NaCl	0,10	0,10	0,10	---
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02	0,02	0,02	0,02
KOH	4,50	---	4,50	---
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	---	---	---	0,01
Ágar	1,80	1,80	1,80	1,80
			mLL <sup>-1</sup>	
Solução aquosa de micronutrientes	2,00	2,00	2,0	2,00
0,04% CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O				
0,12% ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O				
0,14% H <sub>3</sub> B O <sub>3</sub>				
0,1% Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O				
0,1175% MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O				
Azul de bromotimol solução (0,5% em 0,2N KOH)	2,00	2,00	2,00	5,00
1,1222% KOH				
0,5% azul de bromotimol				
FeEDTA (mL, solução aquosa 1,64%)	4,00	4,00	4,00	4,00
0,7011% FeSO <sub>4</sub>				
0,939% EDTA				
Solução aquosa de vitaminas (mL):	1,00	1,00	1,00	1,00
0,01% biotina				
0,02% piridoxol-HCl				
Ajuste de pH	KOH a 10% e/ou H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 5%.			C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> a 10%
	6,5-6,8	4,2-4,5	5,8	5,5

## ANEXO B – Meio de batata para conservação de bactérias diazotróficas não simbióticas

Constituintes	Meios	
	Batata*	Batata-P
	$gL^{-1}$	
Batata**	200g	200g
Acido Málico	2,50	---
Açucar Cristal	2,50	100
Agar	25,00	25,00
	$mL^{-1}$	
Solução de Micronutrientes	2,00	2,00
Solução de Vitaminas	1,00	1,00
Ajuste de pH	Solução de KOH a 10%	Solução de $C_2H_4O_2$ a 10%
	6,8-7,0	5,5

\* adicionar 2 gotas da solução de bromotimol Azul de bromotimol solução (0,5% em 0,2N KOH)

\*\*Pesar 200 g de batata, descascar, lavar, cortar e colocar para ferver por meia hora, em 500 ml de água, filtrar, recolher o filtrado e completar o volume para 1000 mL

**ANEXO C – NBRIP sólido (NAUTIYAL, 1999)**

---

Constituinte	gL <sup>-1</sup>
Glicose	10,00
Ca <sub>5</sub> (OH)(PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	5,00
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5,00
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,25
KCl	0,20
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,10
Agar	15,00
Água destilada	1000mL
pH7,0	

---

## ANEXO D – Solução de Hoagland & Arnon para crescimento de plantas

Figura 6 – Legenda

Solução estoque	Reagentes	gL <sup>-1</sup>	Concentração	Concentração	Concentração
			100%	25%	10%
Usar para 1L de solução mL <sup>-1</sup>					
<b>Macronutrientes</b>					
A	KNO <sub>3</sub>	82,15			
B	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	118,08	8	2	0,8
C	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	28,80			
D	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	61,62			
<b>Micronutrientes</b>					
E	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,284			
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,099	1	0,25	0,1
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,055			
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>5</sub> Mo <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,124			
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,050			
F	FeCl <sub>3</sub> +EDTA*		1	0,25	0,1

Pesar 5g de NaOH e dissolver em 800mL de H<sub>2</sub>O. Dissolver em 32,2g de EDTA; adicionar 24mL de solução de FeCl<sub>3</sub> (60%*m/v*); completar para 100mL de água destilada.